



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월06일

(11) 등록번호 10-2417995

(24) 등록일자 2022년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/48 (2006.01) A61L 27/50 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류
A61L 27/3633 (2013.01)
A61L 27/3683 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7023310(분할)

(22) 출원일자(국제) 2014년03월13일

심사청구일자 2021년08월23일

(85) 번역문제출일자 2021년07월22일

(65) 공개번호 10-2021-0095722

(43) 공개일자 2021년08월02일

(62) 원출원 특허 10-2015-7029696
원출원일자(국제) 2014년03월13일

심사청구일자 2019년03월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/026456

(87) 국제공개번호 WO 2014/168719

국제공개일자 2014년10월16일

(30) 우선권주장
61/790,118 2013년03월15일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
W02012005760 A1
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 60 항

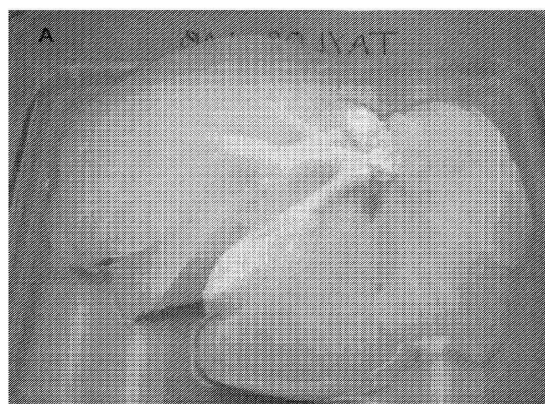
심사관 : 이수희

(54) 발명의 명칭 탈세포화된 기관 및 조직에 대한 마이크로입자 및 내피 세포의 용도

(57) 요약

본 발명은 무손상 세포의 기질 혈관망을 사용하여 모세 혈관 내강 직경을 유지하거나, 모세 혈관 내강 직경에서의 줄이거나, 재-내피화된 그러나 달리 탈세포화된 기관 또는 조직 이식편에서의 모세 혈관 내강 직경을 확장하는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61L 27/3804 (2013.01)
A61L 27/3808 (2013.01)
A61L 27/3834 (2013.01)
A61L 27/48 (2013.01)
A61L 27/507 (2013.01)
C12N 5/069 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Ngan F. Huang et al., "Regulation of the matrix microenvironment for stem cell engineering and regenerative medicine", Ann Biomed Eng.(2011), Vol.39(4), pp.1201-1214
 Basak E Uygun et al., "Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix", Nature Medicine, Vol. 16 no. 7, pp. 814-820
 S. M. Jay et al., "Engineering of multifunctional gels integrating highly efficient growth factor delivery with endothelial cell transplantation", The FASEB Journal, Vol. 22 no. 6, pp. 2949-2956
 Michael Lovett et al., "Vascularization strategies for tissue engineering", Tissue Engineering Part B, Vol. 15, no. 3, pp. 353-370

명세서

청구범위

청구항 1

무손상 혈관상이 있는 포유동물 기관, 조직 또는 그의 부분의 재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질을 제공하는 단계로서, 탈세포화된 세포의 기질이 내피 세포 또는 내피 세포로 분화할 수 있는 줄기 또는 전구 세포 집단으로 재-내피화되는 것인 단계;

마이크로입자가 없는 상응하는 재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질에 비하여 혈관계 내의 모세 혈관 내강 직경을 유지하거나, 감소를 줄이거나, 확장하는 양의 생체적합성 마이크로입자를 포함하는 제1 수용액의 양을 재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질에 도입하고 순환시키는 단계; 및

재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질로부터 마이크로입자를 제거하는 단계

를 포함하는, 무손상 혈관상이 있는 포유동물 기관, 조직 또는 그의 부분의 재-내피화된 세포의 기질 내의 모세 혈관 내강 직경을 유지하거나, 감소를 줄이거나, 확장하기 위한 방법.

청구항 2

무손상 혈관상이 있는 포유동물 기관, 조직 또는 그의 부분의 재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질을 제공하는 단계로서, 탈세포화된 세포의 기질이 내피 세포 또는 내피 세포로 분화할 수 있는 줄기 또는 전구 세포 집단으로 재-내피화되는 것인 단계;

마이크로입자가 없는 상응하는 재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질에 비하여 혈관계 내의 모세 혈관 내강 직경을 유지하거나, 감소를 줄이거나, 확장하는 양의 생체적합성 마이크로입자를 포함하는 제1 수용액의 양을 12시간 이상 동안 재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질에 도입하고 순환시키는 단계; 및

재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질로부터 마이크로입자를 제거하는 단계

를 포함하는, 무손상 혈관상이 있는 포유동물 기관, 조직 또는 그의 부분의 재-내피화된 세포의 기질 내의 모세 혈관 내강 직경을 유지하거나, 감소를 줄이거나, 확장하기 위한 방법.

청구항 3

무손상 혈관상이 있는 포유동물 기관, 조직 또는 그의 부분의 재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질을 제공하는 단계로서, 탈세포화된 세포의 기질이 내피 세포 또는 내피 세포로 분화할 수 있는 줄기 또는 전구 세포 집단으로 재-내피화되는 것인 단계;

마이크로입자가 없는 상응하는 재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질에 비하여 혈관계 내의 모세 혈관 내강 직경을 유지하거나, 감소를 줄이거나, 확장하는 양의, 적혈구의 직경 이상인 생체적합성 마이크로입자를 포함하는 제1 수용액의 양을 재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질에 도입하고 순환시키는 단계; 및

재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질로부터 마이크로입자를 제거하는 단계

를 포함하는, 무손상 혈관상이 있는 포유동물 기관, 조직 또는 그의 부분의 재-내피화된 세포의 기질 내의 모세 혈관 내강 직경을 유지하거나, 감소를 줄이거나, 확장하기 위한 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 마이크로입자가 모세혈관상을 통한 흐름을 유지하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 마이크로입자가 생분해성인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 마이크로입자가 생분해성이 아닌 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 마이크로입자가 구형 또는 타원형이거나, 변형가능한 것이거나, 중합체로 형성된 것이거나, 알기네이트, 폴리사카라이드, 콜라겐, 텍스트란, 히알루론산, 유리, 세라믹, 금속, 폴리-락트산 (PLA), 폴리-글리콜산 (PGA), 또는 PLA 및 PGA (PLA/PGA)의 공중합체를 포함하는 것이거나, 카르복실레이트, 에스테르, 아민, 알데히드, 알콜 또는 할라이드를 포함하도록 개질된 것이거나, 단백질 및 비-단백질 중합체로 형성된 것이거나, 평균 직경이 0.5 μm 내지 20 μm 이거나, 친수성 표면을 포함하는 것이거나, 자성이거나, 리간드와 결합하는 표면 개질을 포함하는 것이거나, 또는 이들의 임의의 조합인 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 중합체가 자연 발생 중합체인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 중합체가 비-자연 발생 중합체인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 마이크로입자가 히드로겔을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 마이크로입자가 변형가능한 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 용액 내의 마이크로입자의 직경보다 10% 이상 더 큰 평균 직경을 갖는 생체적합성 마이크로입자를 포함하는 제2 수용액을 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 용액 내의 마이크로입자의 직경보다 10% 이상 더 큰 평균 직경을 갖는 생체적합성 마이크로입자를 포함하는 제3 수용액을 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 용액이 μL 당 300 내지 500,000개 마이크로입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 마이크로입자가 없는 용액으로 혈관계를 세척하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 나노입자 또는 마이크로입자가 없는 용액이 마이크로입자를 분해하는 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 온도, pH, 초음파, 빛 또는 전기 에너지를 포함하는, 마이크로입자를 분해 또는 제거하는 외부 인자를 적용하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 마이크로입자가 폴리스티렌을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 마이크로입자가 폴리스카라이드를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 마이크로입자가 5 내지 20 마이크로미터의 평균 직경을 갖는 것인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 기관이 심장, 췌장, 골, 간, 신장, 또는 폐인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 iPS 세포로부터 수득되는 것인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 집단이 주사 또는 관류, 또는 그의 조합에 의해 기질에 도입되는 것인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 집단이 1차 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 집단이 복수의 상이한 세포 유형을 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 집단이 인간 배아 줄기 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 및 관류 탈세포화된 기관 또는 조직이 동종인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 및 관류 탈세포화된 기관 또는 조직이 이종인 방법.

청구항 29

내피 세포 또는 내피 세포로 분화할 수 있는 줄기 또는 전구 세포 집단으로 재내피화된, 포유동물 기관, 조직 또는 그의 부분의 탈세포화된 세포와 기질의 재내피화된 혈관계를 포함하는 생물반응기로서, 여기서 상기 생물반응기는 재내피화된 혈관계를 통하여 수용액을 순환시키고, 상기 용액은 혈관계 내의 모세 혈관 내강 직경을 유지하거나, 감소를 줄이거나, 확장하는 직경의 생체적합성 마이크로입자의 양을 포함하는 것인, 생물반응기.

청구항 30

제29항에 있어서, 마이크로입자가 생분해성인 생물반응기.

청구항 31

제29항에 있어서, 마이크로입자가 생분해성이 아닌 것인 생물반응기.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 마이크로입자가 구형 또는 타원형이거나, 변형가능한 것이거나, 중합체로 형성된 것이거나, 알기네이트, 폴리스카라이드, 콜라겐, 텍스트란, 히알루론산, 유리, 세라믹, 금속, 폴리-락트산 (PLA), 폴리-글리콜산 (PGA), 또는 PLA 및 PGA (PLA/PGA)의 공중합체를 포함하는 것이거나, 카르복실레이트, 에스테르, 아민, 알데히드, 알콜 또는 할라이드를 포함하도록 개질된 것이거나, 단백질 및 비-단백질 중합체로 형성된 것이거나, 평균 직경이 0.5 μm 내지 20 μm 이거나, 친수성 표면을 포함하는 것이거나, 자성이거나, 리간드와 결합하는 표면 개질을 포함하는 것이거나, 또는 이들의 임의의 조합인 것인 생물반응기.

청구항 33

제32항에 있어서, 중합체가 자연 발생 중합체인 생물반응기.

청구항 34

제32항에 있어서, 중합체가 비-자연 발생 중합체인 생물반응기.

청구항 35

제29항에 있어서, 마이크로입자가 히드로겔을 포함하는 것인 생물반응기.

청구항 36

제35항에 있어서, 마이크로입자가 변형가능한 것인 생물반응기.

청구항 37

제29항에 있어서, 마이크로입자가 폴리스티렌을 포함하는 것인 생물반응기.

청구항 38

제29항에 있어서, 마이크로입자가 폴리스카라이드를 포함하는 것인 생물반응기.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 마이크로입자가 5 내지 20 마이크로미터의 평균 직경을 갖는 것인 생물반응기.

청구항 40

제29항에 있어서, 상기 기관이 심장, 췌장, 골, 간, 신장, 또는 폐인 생물반응기.

청구항 41

제29항에 있어서, 상기 세포가 iPS 세포인 생물반응기.

청구항 42

제29항에 있어서, 상기 세포가 1차 세포를 포함하는 것인 생물반응기.

청구항 43

제29항에 있어서, 상기 세포가 복수의 상이한 세포 유형을 포함하는 것인 생물반응기.

청구항 44

제29항에 있어서, 상기 세포가 인간 배아 줄기 세포를 포함하는 것인 생물반응기.

청구항 45

제29항에 있어서, 세포 및 탈세포화된 기관 또는 조직이 동종인 생물반응기.

청구항 46

제29항에 있어서, 세포 및 탈세포화된 기관 또는 조직이 이종인 생물반응기.

청구항 47

제4항에 있어서, 제1 용액 내의 마이크로입자의 직경보다 10% 이상 더 큰 평균 직경을 갖는 생체적합성 마이크로입자를 포함하는 제2 수용액을 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 48

제4항에 있어서, 제2 용액 내의 마이크로입자의 직경보다 10% 이상 더 큰 평균 직경을 갖는 생체적합성 마이크

로입자를 포함하는 제3 수용액을 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 49

제4항에 있어서, 제1 용액이 μL 당 300 내지 500,000개 마이크로입자를 포함하는 것인 방법.

청구항 50

제4항에 있어서, 마이크로입자가 없는 용액으로 혈관계를 세척하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 나노입자 또는 마이크로입자가 없는 용액이 마이크로입자를 분해하는 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 온도, pH, 초음파, 빛 또는 전기 에너지를 포함하는, 마이크로입자를 분해 또는 제거하는 외부 인자를 적용하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제4항에 있어서, 마이크로입자가 폴리스티렌을 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제4항에 있어서, 마이크로입자가 폴리스카라이드를 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제4항에 있어서, 세포가 iPS 세포로부터 획득되는 것인 방법.

청구항 56

제4항에 있어서, 집단이 주사 또는 관류, 또는 그의 조합에 의해 기질에 도입되는 것인 방법.

청구항 57

제4항에 있어서, 집단이 1차 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 58

제4항에 있어서, 집단이 복수의 상이한 세포 유형을 포함하는 것인 방법.

청구항 59

제4항에 있어서, 집단이 인간 배아 줄기 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제4항에 있어서, 세포 및 관류 탈세포화된 기관 또는 조직이 동종인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2013년 3월 15일에 출원된 미국 출원 61/790,118호의 출원일의 이익을 주장하며, 그 개시내용은 본원에 참조문헌으로 포함된다.

배경 기술

[0003] 조직 공학은 세포, 스캐폴드 및 가용성 매개체의 조합의 이식을 통해 손상되거나 병든 조직 및 기관의 치료 또

는 재생을 추구하는 급속하게 성장하고 있는 분야이다. 현재의 줄기 세포 분화 및 1차 세포 배양은 일반적으로 2-차원 (2D) 배양 조건에서 달성된다. 그 시스템은 특정한 세포 집단의 증식을 가능하게 하지만 기능 세포 표현형을 보유하고, 고밀도 세포 배양 및 장기 1차 또는 분화된 세포 기능을 지원하는 능력이 제한된다. 예를 들어, 특정한 세포 치료에 필요한 다수의 1차 세포의 제한된 이용가능성과 대조적으로, 줄기 세포의 수는 특정한 계통으로 분화하는 능력을 보유하면서도 크게 확대될 수 있다. 생체내 또는 시험관내 줄기 세포 운명 (예를 들어, 분화)의 제어는, 주로 유전자 및 분자 매개체 (예를 들어, 성장 인자 및 전사 인자)로 인한 것이었다. 줄기 및 전구 세포 분화가 적절한 계통- 또는 조직-특이적 유전자 발현을 갖는 세포를 가져올 수 있지만, 분화된 세포는 시험관내 또는 생체내 응용에 필요한 기능적 특성이 결여될 수 있다.

[0004] [선행기술문헌]

[0005] · BASAK E UYGUN ET AL, "Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix", NATURE MEDICINE, (2010-07-01), vol. 16, no. 7, pages 814 - 820

[0006] · WO2012005760 (MIROMATRIX MEDICAL INC), 2012-01-12

[0007] · S. M. JAY ET AL, "Engineering of multifunctional gels integrating highly efficient growth factor delivery with endothelial cell transplantation", THE FASEB JOURNAL, (2008-04-16), vol. 22, no. 8, pages 2949 - 2956

[0008] · SHIMIZU ET AL, "Effective cell-seeding technique using magnetite nanoparticles and magnetic force onto decellularized blood vessels for vascular tissue engineering", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, (2007-05-01), vol. 103, no. 5, pages 472 - 478

[0009] · STEPHEN F. BADYLAK ET AL, "Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds", ANNUAL REVIEW OF BIOMEDICAL ENGINEERING, (2011-08-15), vol. 13, no. 1, pages 27 - 53

[0010] · T. H. PETERSEN ET AL, "Tissue-Engineered Lungs for in Vivo Implantation", SCIENCE, (20100730), vol. 329, no. 5991, pages 538 - 541

[0011] · TABATA YASUHIKO ET AL, "Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor", JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE. POLYMER EDITION, (1999-01-01), vol. 10, no. 1, pages 79 - 94

[0012] · MICHAEL LOVETT ET AL, "Vascularization Strategies for Tissue Engineering", TISSUE ENGINEERING PART B: REVIEWS, (2009-09-01), vol. 15, no. 3, pages 353 - 370

발명의 내용

[0013] 본 발명은, 예를 들어, 이식 시 연속적인 혈류를 지속시키는 적절한 모세혈관 직경을 담보하도록, 무손상 혈관 상을 갖는 포유동물 기관, 조직 또는 그의 부분의 재-내피화된 및/또는 재세포화된 (내피 세포 외의 세포로) 세포의 기질 내의 모세 혈관 내강 직경을 유지하거나, 감소를 줄이거나, 확장하는 방법을 제공한다. 본 방법은 무손상 혈관상을 갖는 포유동물 기관, 조직 또는 그의 부분의 탈세포화된 세포의 기질을 제공 또는 준비하는 단계 및 내피 세포 또는 내피 세포로 분화할 수 있는 줄기 또는 전구 세포 집단을 제공 또는 준비하는 단계를 포함한다. 일정량의 세포 및 생체적합성 나노입자 또는 마이크로입자를 포함하는 일정량의 제1 수용액은 공동으로 또는 순차적으로 탈세포화된 세포의 기질에 도입된다. 세포의 양은 탈세포화된 세포의 기질의 혈관계를 재-내피화하기에 유효하고 나노입자 또는 마이크로입자의 양은, 혈관계를 통해 순환할 때, 나노입자 또는 마이크로입자가 없는 상응하는 재-내피화된 탈세포화된 세포의 기질에 비해, 재-내피화 동안 또는 이후에, 혈관계 내의 모세 혈관 내강 직경을 유지하거나, 감소를 줄이거나, 예를 들어, 약 4 마이크로미터로 줄이거나, 또는, 예를 들어, 약 15 내지 약 20 마이크로미터까지 확장한다. 한 실시양태에서, 나노입자 또는 마이크로입자 생분해성이다. 한 실시양태에서, 나노입자 또는 마이크로입자는 첨가된 작용제 또는 에너지원에 급속하게 생분해성이다. 한 실시양태에서, 나노입자 또는 마이크로입자는 생분해성이 아니다. 나노입자는 임의의 생체 적합성 물질로 형성될 수 있고 혈관계를 통한 통과를 가능하게 하는 임의의 형상일 수 있다. 한 실시양태에서, 나노입자 또는 마이크로입자는 구형 또는 타원형 형상이다. 한 실시양태에서, 나노입자 또는 마이크로입자의 평균 직경은 약 0.5 μm 내지 약 30 μm 또는 약 5 μm 내지 약 20 μm 이다. 한 실시양태에서, 나노입자 또는

마이크로입자는 변형가능하다. 한 실시양태에서, 나노입자 또는 마이크로입자는 자연 발생 및 합성 (비-자연 발생) 중합체를 포함한 중합체로 형성된다. 한 실시양태에서, 나노입자 또는 마이크로입자는 단백질 및 비-단백질 중합체로 형성된다. 한 실시양태에서, 나노입자 또는 마이크로입자는 카르복실레이트, 에스테르, 아민, 알데히드, 알콜, 또는 할라이드, 뿐만 아니라 자성 분자의 리간드와 같은 관능성 분자를 포함하도록 개질된다. 한 실시양태에서, 입자를 분해하는 예컨대, 빛, 자성, 기계적 또는 초음파, 그러나 이에 제한되지 않는 외부 에너지원이 첨가된다. 한 실시양태에서, 수용액이 재-내피화 이후에 첨가된다. 한 실시양태에서, 나노입자 또는 마이크로입자는 입자가 없고 입자를 분해하는 작용제를 함유할 수 있는 또 다른 용액으로 재-내피화된 혈관계를 세척함으로써 제거된다. 한 실시양태에서, 본 방법은 제1 용액 내의 나노입자 또는 마이크로입자보다 적어도 10% 더 큰 평균 직경을 갖는 생체적합성 나노입자 또는 마이크로입자를 포함하는 제2 수용액을 도입하는 단계를 포함한다. 입자의 농도는 달라질 수 있고 목적을 달성하는 임의의 양일 수 있다. 예를 들어, 제1 용액은 μL 당 약 300 내지 약 50,000,000개 입자를 포함할 수 있다.

[0014] 기관 및 조직이 기관 또는 조직의 혈관 도관으로 및 혈관 도관으로부터의 용액의 순환을 가능하게 하는 무손상 혈관 (모세혈관) 상 ("무손상" 혈관계)을 갖는 한 탈세포화된 세포의 기질은 임의의 기관 또는 조직으로부터 유래될 수 있다. 한 실시양태에서, 탈세포화된 기관은 탈세포화된 심장, 췌장, 간, 신장, 골, 또는 폐이다. 무손상 혈관계를 갖는 탈세포화된 기관, 조직 또는 그의 부분의 세포의 기질 혈관계를 재-내피화할 수 있는 임의의 세포 유형이 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포는 iPS 세포로부터 수득할 수 있다. 한 실시양태에서, 세포는 주사 또는 관류, 또는 그의 조합에 의해 기질에 도입된다. 한 실시양태에서, 세포는 주사 또는 관류, 또는 그의 조합에 의해 혈관계에 도입된다. 한 실시양태에서, 탈세포화된 세포의 기질에 도입되는 세포는 1차 세포이다. 한 실시양태에서, 탈세포화된 세포의 기질에 도입되는 세포는 기관, 조직, 또는 그의 부분을 완전히 또는 부분적으로 재세포화하도록 의도된 복수의 상이한 세포 유형이다. 한 실시양태에서, 탈세포화된 세포의 기질에 도입되는 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 한 실시양태에서, 세포 및 관류 탈세포화된 기관, 조직 또는 그의 부분은 동종이다. 한 실시양태에서, 세포 및 관류 탈세포화된 기관, 조직 또는 그의 부분은 이종이다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1a는 관류 탈세포화된 돼지 간의 사진을 제시한다.

도 1b-c는 각각 관류 탈세포화된 돼지 간의 혈관 및 실질 기질의 스캐닝 전자 현미경검사 (SEM) 사진을 제시한다.

도 2는 침지 탈세포화된 래트 간의 육안적 촬영상을 제공하며, 여기서 기질의 프레임은 양쪽 저배율 (좌측) 및 고배율 (우측) 둘 다에서 볼 수 있다.

도 3은 침지 탈세포화된 래트 간 (A 및 B) 및 관류 탈세포화된 래트 간 (C 및 D)의 SEM 사진을 제시한다.

도 4는 침지 탈세포화된 간의 조직학 (A, H&E 염색; B, 트리크롬 염색) 및 관류 탈세포화된 간의 조직학 (C, H&E 염색; D, 트리크롬 염색)을 제공한다.

도 5는 래트 심장의 침지 탈세포화 (상단 열) 및 관류 탈세포화 (하단 열) 사이의 비교를 제시한다.

도 6은 래트 신장을 사용한 침지 탈세포화 (상단 열) 대 관류 탈세포화 (하단 열) 사이의 비교를 제시한다.

도 7은 탈세포화된 신장의 SEM 사진을 제시한다.

도 8a는 관류 탈세포화된 심장의 SEM 사진을 제시하는 한편, 도 8b는 침지 탈세포화된 심장의 SEM 사진을 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은, 물리적 뿐만 아니라 분자 상호작용을 통해, 세포의 환경 제어에 의해 이러한 세포 거동을 직접 제어하는 세포 및 ECM 조작을 제공한다. 특히, 본 발명은 세포의 조합을 포함한 세포 집단이 이식되고, 예를 들어, 가용성 매개체의 관류를 포함한 배양 조건에 노출되는, 관류 탈세포화된 ECM을 갖는 조작된 기관, 조직 또는 생물반응기를 제공하고, ECM 구조 및 배양 조건은 기능 세포 및 상응하는 천연 기관에서와 실질적으로 동일한, 예를 들어, 약 $5\ \mu\text{m}$ 내지 약 $10\ \mu\text{m}$, 또는 약 $3\ \mu\text{m}$ 내지 약 $20\ \mu\text{m}$ 모세 혈관 내강 직경을 가져온다. 특히, 본 발명은 모세 혈관 내강 직경의 유지 결과로, 성체 및 배아 줄기 세포 및 부분적으로 분화된 전구 세포의 세포 분화, 성장, 및 표현형 발현의 향상된 조절, 및 분화된 세포 유형의 향상된 유지를 제공할 수 있다. 이는 또한 태아 유도된 세포, 예를 들어, 태아 세포 또는 신생아 세포로부터 수득한 기관-특이적 세포 (예를 들어, 특정한

계통에 얽매이지만 말단으로 분화하지 않은 세포)를 포함한 1차 세포의 성장 및 기능 유지를 포함한다.

[0017] 본 발명은 관류 탈세포화된 기관- 또는 조직-유래의 세포의 기질 (ECM) 및 시스템의 용도를 제공하며, 이는 이들 기질의 세포의 기질 혈관계에서, 혈관 (예를 들어, 내피) 세포와 함께 상기 기질의 재세포화, 또는 줄기 또는 전구 세포의 내피 세포로의 분화 및/또는 성숙, 또는 1차 세포의 유지 또는 분화를 지지하는데 유용하다. 1차 세포는 일반적으로 시험관내에서 배양된 유기체로부터 수득된 세포이지만, 이러한 세포는 무기한으로 증식하지 않는다. 분화된 세포는 1차 세포 및 시험관내에서 분화된 세포, 예를 들어 본 발명의 관류 탈세포화된 기질에서의 줄기 세포 또는 전구 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 분화된 세포의 적어도 5%, 10% 또는 20%, 또는 그 초과는 기능적으로 성숙한 표현형을 갖는다. 조직은 공통의 구조 및 기능을 갖는 세포들의 집단으로, 예를 들어, 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 (골격, 심근, 또는 평활근), 및 신경 조직이고, 기관을 덮거나, 기관을 따라 늘어서거나, 또는 기관을 연결하는 유연한 시트를 포함한다. 기관은 구조적 단위로 연결된 (둘 이상의) 조직의 무리로, 공통의 구조를 제공한다. 기관은 뇌, 간, 췌장, 골, 심장, 위, 신장, 폐, 전체 근육, 흉선, 항문, 및 장을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 사용되는 바와 같이, 기관은 관류할 수 있는 전체 기관, 또는 기관의 일부, 또는 이들의 혈관성 구조를 포함하고, 조직은 혈관성 조직, 예를 들어 기도를 포함하는 임의의 구조를 포함한다.

[0018] 한 실시양태에서, 본 발명은 줄기 또는 전구 세포와 같이 분화 또는 성숙이 요구될 수 있는 세포를 사용하여 재-내피화를 위한 기관- 또는 조직-특이적 세포의 기질 (ECM) 스캐폴드의 용도를 제공한다. 분화는 한 과정으로, 이에 의해 세포는 본래 세포 집단으로부터 구별되는 새로운 표현형, 예를 들어, 구별되는 세포 유전자 및/또는 단백질 발현 및/또는 기능(들)을 습득한다. 성숙은 추가적으로 생체내 세포 집단에서 세포의 정상적으로 성숙한 기능적 능력을 갖도록 세포 집단의 표현형을 명확하게 한다. 한 실시양태에서, 스캐폴드는 기관의 관류 탈세포화된 ECM 부분이다. 또 다른 실시양태에서, 스캐폴드는 관류 탈세포화된 ECM 기관이다.

[0019] 기관 또는 조직으로부터 관류 탈세포화된 ECM은 침지 기반 탈세포화와 같은 다른 탈세포화 기술과 비교할 때, 무손상의 혈관 및/또는 미세혈관 시스템을 포함하여 오히려 더 본래의 미세구조를 보유한다. 예를 들어, 기관 또는 조직으로부터 관류 탈세포화된 ECM은 콜라겐 함량, 기타 결합 및 신호전달 인자 및 혈관계 구조를 보존하고, 그로 인해, 도입된 세포의 세포 기능의 유지 또는 기능적 분화를 위한 본래의 신호에 적합한 환경을 제공한다. 한 실시양태에서, 기관 또는 조직으로부터 관류 탈세포화된 ECM은 유기체에서 정상적으로 확인되는 조건을 모방하는 적절한 압력 및 유량을 포함하는 적절한 조건 하에서, 관류 탈세포화된 ECM의 혈관계를 사용하여 세포 및/또는 매질과 관류된다. 인간 크기의 기관의 정상적인 압력은 약 40 내지 약 200 mm Hg이고, 생성된 유량은 유입되는 관류 혈관 직경에 의존한다. 정상적인 인간 심장에 대해서, 생성된 관류 유량은 약 20 내지 약 200 mL/min/100 g이다. 이러한 시스템을 사용하여, 시딩된 세포는 2D 세포 배양 조건하에서 달성된 것보다 약 5x 내지 약 1000x 더 큰 시딩 농도를 달성할 수 있고, 2D 세포 배양 시스템과는 달리, ECM 환경은 세포의 추가적인 기능적 분화를 위해 예를 들어, 일관된 기능을 갖는 기관- 또는 조직-특이적 표현형을 보이는 세포로의 전구 세포의 분화를 가능하게 한다. 한 실시양태에서, 배양 조건과 ECM 공급원의 조합은 도입된 세포의 ECM으로의 기능적 분화를 가능하게 한다.

[0020] 한 실시양태에서, 방법은 기관 또는 조직의 관류 탈세포화된 기질 및 내피 세포 또는 내피 세포로 분화할 수 있는 전구 세포를 포함하는 세포의 집단을 선택하는 것을 포함한다. 선택된 관류 탈세포화된 기질은 관류 탈세포화된 기질의 재세포화 및 전구 세포의 경우, 집단 내 세포들의 기능적 세포로의 분화를 제공하는 일정 기간 및 조건 하에서 세포 집단들과 접촉된다. 한 실시양태에서, 나노입자 및 마이크로입자는 혈관계를 통해 세포 내로 도입되고 순환된다. 한 실시양태에서, 나노입자 및 마이크로입자는 재-내피화 후에 혈관계를 통해 세포 내로 도입되고 순환된다. 한 실시양태에서, 기관은 심장이다. 또 다른 실시양태에서, 기관은 간이다. 또 다른 실시양태에서, 기관은 췌장이다. 또 다른 실시양태에서 기관은 폐이다.

[0021] 한 실시양태에서, 본 발명은 재-내피화된 관류 탈세포화된 기질 내의 모세 혈관 내강 직경을 유지하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 기관 또는 조직의 관류 탈세포화된 기질 및 내피 세포 또는 내피 세포로 분화할 수 있는 줄기 세포의 집단을 선택하는 방법을 포함한다. 선택된 관류 탈세포화된 기질은 관류 탈세포화된 기질 및 내피 세포의 재세포화 또는 집단 내 줄기 세포의 기능적 내피 세포로의 분화를 제공하는 일정 기간 및 조건 하에서 세포들과 접촉된다. 한 실시양태에서, 줄기 세포는 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포이다. 한 실시양태에서, 줄기 세포는 배아 줄기 (ES) 세포, 예를 들어, 인간 ES 세포이다. 한 실시양태에서, 줄기 세포는 성체 줄기 세포이다.

[0022] 한 실시양태에서, 기관 또는 조직 ECM의 부분, 예를 들어 섬세포를 포함하는 췌장의 내부 구조, 심장의 심방 또

는 심실은 본 발명의 방법으로 이용된다. 한 실시양태에서, 상기 부분은 약 5 내지 약 10 mm 두께이다. 한 실시양태에서, 상기 부분은 약 70 내지 약 100 mm 두께이다.

[0023] ECM 기관 또는 조직 기질은 임의의 공급원으로부터 수득될 수 있으며, 이는 비제한적으로, 심장, 간, 폐, 골격근, 뇌, 췌장, 비장, 신장, 자궁, 눈, 척수, 전체 근육, 또는 방광, 또는 이들의 임의의 부분 (예를 들어, 대동맥관, 승모관, 폐동맥관, 삼첨관, 폐정맥, 폐동맥, 관상동맥 혈관계, 격막, 우심방, 좌심방, 우심실, 또는 좌심실)을 포함한다. 실질 기관은 "실질적으로 폐쇄된" 혈관계 시스템을 갖는 기관을 나타낸다. 기관과 관련하여, "실질적으로 폐쇄된" 혈관계 시스템은 액체로 관류 시, 주요 혈관이 캐놀라삽입되어 있거나, 묶여있거나, 또는 다른 식으로 제한되어 있다고 가정하면, 액체의 대다수가 실질 기관 내에 함유되어 있거나 본래의 혈관 구조를 통과하고, 실질 기관 밖으로 새어 나오지 않는 것을 의미한다. "실질적으로 폐쇄된" 혈관계 시스템을 가짐에도 불구하고, 상기 언급된 다수의 기관은 관류 중에 기관 전체를 거쳐 액체의 도입 및 이동에 유용한 한정된 "입구" 및 "출구"를 가진다. 게다가, 예를 들어, 관절 (예를 들어, 무릎, 어깨, 또는 둔부), 항문, 기도, 또는 척수의 전부 또는 일부와 같은 다른 유형의 혈관성 기관 또는 조직은 관류 탈세포화될 수 있다. 또한, 예를 들어, 연골 또는 각막과 같은 무혈관성 조직은 전체 하지와 같은 더 큰 혈관성 구조일 때 탈세포화될 수 있다.

[0024] 실질적으로 폐쇄된 혈관계 시스템을 갖는 기관의 관류 탈세포화된 기질은 특히 유용한데, 이는 관류 탈세포화가 무손상 혈관 및 미세혈관 시스템을 포함하여 무손상 기질 및 미세환경을 보존하여, 혈관계가 세포 뿐만 아니라 영양분 및/또는 분화 또는 유지 인자를 세포로 시험관내에서 전달하는 것에 활용될 수 있기 때문이다. 세포 및 영양분 및/또는 다른 인자들은 다른 수단들, 예를 들어, 주입, 또는 수동적 수단, 또는 이들의 조합에 의해 전달될 수 있다. 한 실시양태에서, 관심있는 세포의 집단은 간질 공간 또는 혈관 도관의 기질 외부로의 시딩이 가능하도록 관류 탈세포화된 기관 ECM으로 관류된다. 이는 그들의 본래의 미세환경으로 세포의 능동적 이동 및/또는 귀소, 예를 들어, 내피 세포의 혈관계로의 귀소를 포함한다. 한 실시양태에서, 관심있는 세포의 집단은 관류 탈세포화된 ECM으로 관류되고, 2차 세포 집단, 예를 들어 베타 세포 집단이 내피 세포 집단에 이어 도입되며, 거기서 내피 세포는 그들의 본래의 미세환경에서처럼 혈관 도관 내에 남는다. 한 실시양태에서, 관심있는 세포의 집단은 관류 탈세포화된 ECM으로 관류되고, 2차 세포 집단, 예를 들어 내피 세포 집단이 베타 세포를 포함하는 세포 집단에 이어 도입되며, 거기서 내피 세포는 그들의 본래의 미세환경에서처럼 혈관 도관 내에 남는다. 또 다른 실시양태에서, 둘 이상의 세포 집단은 함께 합해지고 관류된다. 또 다른 실시양태에서, 둘 이상의 별개의 세포 집단은 관류, 직접 주입, 또는 양자의 조합을 통해서 연속적으로 도입된다. 본 발명의 입자들은 생체외에서 재-내피화된 혈관계로 도입되어 모세 혈관 내강 직경을 유지하거나, 감소를 줄이거나, 또는 증대시킨다.

[0025] 세포는 세포의 증식, 대사, 및/또는 분화를 지지하는 매질 내로 도입될 수 있다. 대안적으로, 세포가 ECM으로 거주한 후에, 매질은 세포의 증식, 대사 및 분화를 지지하는 것으로 변화된다. 배양된 세포는 생리학적 세포 밀도에서, 그리고 세포의 증식, 대사, 및/또는 분화를 지지하는 매질 및/또는 세포의 유지 및/또는 기능적 분화를 가능하게 하는 ECM 내의 적절한 미세환경의 존재에서 ECM 내에 존재할 수 있다.

[0026] 세포 및 ECM은 이종 또는 동종일 수 있다. 한 실시양태에서, 부분적으로 또는 완전히 분화된 인간 세포 및 소형 동물, 예를 들어 비인간 포유동물로부터 관류 탈세포화된 기관 또는 조직은 합해질 수 있다. 한 예에서, 인간으로부터 관류 탈세포화된 간 기질은 내피 세포 및 부분적으로 분화된 인간 ES 유래의 간세포와 시딩되어, 각각 동종 또는 이종의 세포 시딩된 기질을 제공한다.

[0027] 관류 탈세포화된 ECM

[0028] 연구들은 연결 조직 세포가 2D 배양물과는 대조적으로 3D에서 매우 상이하게 거동함을 나타내었다 (Cukierman et al., *Science*, 294:1708 (2001)). 예를 들어, 평평한 기질 상의 섬유모세포의 배양은 생체내에서 발생하지 않는 극성을 유도한다. 또한, 섬유모세포 및 다른 세포 유형이 3D 조직-유래된 기질에서 배양되는 경우, 이는 생체내에서 발견되는 복합체와 닮은 성숙한 인테그린-함유 초점 부착 복합체로 수 분 내에 발달하는 반면, 단지 원시 부착 복합체만이 2D 배양물 또는 심지어 간단한 3D 유형 I 콜라겐 겔 또는 매트릭셀 (Matrigel)에서 발달한다. 이들 부착 복합체는 적절한 성장 인자-활성화된 수용체 신호화 및 그들 자신의 ECM 성분 및 ECM을 변경하는 인자의 합성의 급속한 (5분 내) 개시에 요구된다 (Cukierman et al., 2001; Abbott, *Nature*, 424:870 (2003)). 또한, ECM 배양물 중의 세포는 조직-유래된 기질 내로 자가분비 성장 인자를 침착시키며, 이는 성장 인자의 표적 세포로의 적절한 제시에 요구될 수 있는 과정이다. 이러한 인자는 주로 2D 배양물 중의 배양 배지 내로 분비된다.

[0029] 상기 언급된 바와 같이, 화학적, 분자 (예를 들어, 가용성 매개체) 또는 유전적 (세포-유형) 인자 이외에 ECM과

의 물리적 상호작용은 세포 거동을 조절할 수 있다. 예를 들어, 세포의 ECM-기반 제어는 다수의 물리적 메커니즘, 예컨대 마이크로- 및 나노규모에서의 ECM 기하구조, ECM 탄성, 또는 ECM으로부터 세포로 전달되는 기계적 신호를 통해 발생할 수 있다.

[0030] 본 발명은, 물리적 뿐만 아니라 분자적 상호작용을 통해, 예를 들어 성체 또는 배아 줄기 세포로부터의 세포 거동의 보다 우수한 제어를 가능하게 하는 유전자조작된 관류 탈세포화된 ECM의 용도를 포함한다. 본 발명의 관류 탈세포화된 기질은 천연 ECM의 복잡하고 고도로 정돈된 성질, 및 세포와 ECM 사이의 가능성 있는 호혜적 상호작용을 모방한다. 특히, ECM은 줄기 또는 전구 세포에 대한 조직-특이적 단서를 제공할 수 있다. 특히, 개별 기질 단백질은 ECM의 구조에 대한 그들의 기여를 통해, 또는 성장 인자 및/또는 정주 세포 자신들과 상호작용하는 그들의 능력을 통해, ECM의 특이성을 위해 중요할 수 있다.

[0031] 조직 또는 기관 ECM의 관류 탈세포화는 기능적 세포 분화 및 유지를 가능하게 하는 구조적, 생화학적 및 기계적 특성을 제공하는 능력을 갖는 무손상 ECM을 제공한다. 따라서, 기관의 관류 탈세포화는 기관이 줄기 또는 전구 세포 분화를 위한 조직/기관 특이적 생물반응기로서 기능하는 것을 가능하게 한다. 또한, 기관 또는 조직 ECM의 관류 탈세포화는 무손상 혈관구조를 포함하는 구조적 및 생화학적 단서를 갖는 무손상 기질을 보존하는 관점에서 침지에 비해 우수하다. 또한, 관류 탈세포화는 조직 또는 기관 두께가 약 2 mm 두께를 초과하는 경우, 침지 탈세포화에 비해 이점을 제공한다.

[0032] 기관 또는 조직의 탈세포화

[0033] 탈세포화는 일반적으로 하기 단계를 포함한다: 고형 기관, 예를 들어 그의 혈관화된 구조, 또는 조직의 안정화, 고형 기관 또는 조직의 탈세포화, 고형 기관 또는 조직의 복원 및/또는 중화, 고형 기관의 세척, 기관 상에 잔류하는 임의의 DNA의 분해, 기관 또는 조직의 소독 및 기관의 항상성.

[0034] 기관 혈관화된 구조 또는 조직을 탈세포화하는데 있어서 초기 단계는 기관 또는 조직을 캐놀라삽입하는 것이다. 기관 또는 조직의 혈관, 도관 및/또는 강은 관련 기술분야에 공지된 방법 및 물질을 이용하여 캐놀라삽입될 수 있다. 다음으로, 캐놀라삽입된 기관 혈관화된 구조 또는 조직은 세포 파괴 배지로 관류된다. 기관을 통한 관류는 다중-방향성 (예를 들어, 선행성 및 역행성)일 수 있다.

[0035] 심장의 랑겐도르프 관류는 생리학적 관류 (4 챔버 워킹 모드 관류로도 공지됨)에서와 같이 관련 기술분야에서 통상적이다. 예를 들어, 문헌 [Dehnert, The Isolated Perfused Warm-Blooded Heart According to Langendorff, In Methods in Experimental Physiology and Pharmacology: Biological Measurement Techniques V. Biomesstechnik-Verlag March GmbH, West Germany, 1988]을 참조한다.

[0036] 간략하게, 랑겐도르프 관류를 위해, 대동맥은 캐놀라삽입되고, 생리학적 용액을 함유하는 저장소에 부착되어, 심장이 특정한 기간 동안 신체 외부에서 기능하는 것을 가능하게 한다. 관류 탈세포화를 달성하기 위해, 예를 들어 주입 또는 롤러 펌프에 의해 또는 일정한 정수압 펌프에 의해, 전달되는 일정한 유속으로 대동맥 아래로 역행성 방향으로 전달되는 세포 파괴 배지를 관류하도록 프로토콜이 변형되었다. 모든 예에서, 대동맥 관막은 폐쇄되고, 관류 유동액은 관상동맥 소공으로 향하며 (그에 의해 선행성을 통해, 심장의 전체 심실 질량을 관류함), 그 후 관상 정맥동을 통해 우심방으로 배수된다. 워킹 모드 관류를 위해, 제2 캐놀라가 좌심방에 연결되고, 관류는 역행성으로 변경될 수 있다.

[0037] 한 실시양태에서, 생리학적 용액은 포스페이트 완충제 염수 (PBS)를 포함한다. 한 실시양태에서, 생리학적 용액은, 예를 들어, 영양 보충제 (예를 들어, 글루코스)가 보충된 생리학상 상용성인 완충제이다. 예를 들어, 심장의 경우에, 생리학적 용액은 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM 글루코스, 1.75 mM CaCl₂, 2.0 mM 피루베이트 및 5 U/L 인슐린을 갖는 변형 크랩스-헨셀라이트 완충제; 또는 95% O₂, 5% CO₂로 기체주입된 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂를 함유하는 크랩스 완충제일 수 있다. 심장은 단독 기재로서 또는 약 1 또는 1.2 mM 팔미테이트와 조합된 글루코스 (예를 들어, 약 11 mM)로 관류될 수 있다. 신장의 경우에, 생리학적 용액은 KPS-1RegS 신장 관류 용액일 수 있다. 간의 경우에, 생리학적 용액은 2% BSA가 보충된 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 8 mM 글루코스, 및 1.25 mM CaCl₂를 갖는 크랩스-헨셀라이트 완충제일 수 있다.

[0038] 다른 기관 또는 조직을 관류하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예로써, 하기 참고문헌에는 폐, 간, 신장, 뇌 및 수족의 관류가 기재되어 있다. 문헌 [Van Putte et al., *Ann. Thorac. Surg.*, 74(3):893

(2002)]; [den Butter et al., *Transpl. Int.*, 8:466 (1995)]; [Firth et al., *Clin. Sci. (Lond.)*, 77(6):657 (1989)]; [Mazzetti et al., *Brain Res.*, 999(1):81 (2004)]; [Wagner et al., *J. Artif. Organs*, 6(3):183 (2003)].

- [0039] 하나 이상의 세포 파괴 배지는 기관 또는 조직을 탈세포화하는데 사용될 수 있다. 세포 파괴 배지는 일반적으로 SDS, PEG, CHAPS 또는 트리톤 (Triton) X와 같은 (이에 제한되지 않음) 적어도 1종의 세제를 포함한다. 세포 파괴 배지는 배지가 세포와 삼투적으로 비혼화성이 되도록 물을 포함할 수 있다. 대안적으로, 세포 파괴 배지는 세포와의 삼투적 혼화성을 위한 완충액 (예를 들어, PBS)을 포함할 수 있다. 세포 파괴 배지는 또한 효소, 예컨대 1종 이상의 콜라게나제, 1종 이상의 디스파제, 1종 이상의 DNase, 또는 트립신과 같은 프로테아제 (이에 제한되지 않음)를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 세포 파괴 배지는 또한 또는 대안적으로 1종 이상의 효소의 억제제 (예를 들어, 프로테아제 억제제, 뉴클레아제 억제제 및/또는 콜라게나제 억제제)를 포함할 수 있다.
- [0040] 특정 실시양태에서, 캐놀라삽입된 기관 또는 조직은 실질적으로 2개의 상이한 세포 파괴 배지로 관류될 수 있다. 예를 들어, 제1 세포 파괴 배지는 SDS와 같은 음이온성 세제를 포함할 수 있으며, 제2 세포 파괴 배지는 트리톤 X와 같은 이온성 세제를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 세포 파괴 배지로 관류 후, 캐놀라삽입된 기관 또는 조직은 예를 들어 세척 용액 및/또는 본원에 개시된 것과 같은 1종 이상의 효소를 함유하는 용액으로 관류될 수 있다.
- [0041] 관류의 방향 (예를 들어, 선행성 및 역행성)을 교대하는 것은 전체 기관 또는 조직을 탈세포화하는데 도움이 될 수 있다. 탈세포화는 일반적으로 안에서 밖으로 기관을 탈세포화하며, 이는 ECM에 거의 손상을 초래하지 않는다. 기관 또는 조직은 4 내지 40℃의 적합한 온도에서 탈세포화될 수 있다. 기관 또는 조직의 크기 및 중량, 및 세포 파괴 배지 중의 특정 세제(들) 및 세제(들)의 농도에 따라, 기관 또는 조직은 일반적으로 세포 파괴 배지로, 고형 기관 또는 조직의 그램 당 (일반적으로 > 50 그램 초과) 약 0.05시간 내지 약 5시간, 또는 기관에 대한 고형 기관 또는 조직의 그램 당 (일반적으로 < 50 그램) 약 2시간 내지 약 12시간으로 관류된다. 세척제를 포함하여, 기관은 고형 기관 또는 조직의 그램 당 (일반적으로 >50 그램) 약 0.75시간 내지 약 10시간, 또는 조직의 그램 당 (일반적으로 <50 그램) 약 12시간 내지 약 72시간 관류될 수 있다. 탈세포화 시간은 전체 질량에 대해 제한된 스케일링으로 기관 또는 조직의 혈관 및 세포 밀도에 의존한다. 따라서, 일반적인 지침으로서 상기 시간 범위 및 질량이 제공된다. 관류는 일반적으로 맥박 유동, 속도 및 압력을 포함하는 생리학적인 조건으로 조정된다.
- [0042] 탈세포화된 기관 또는 조직은 혈관 수상구조의 ECM 성분을 포함하는 기관 또는 조직의 모든 또는 대부분의 영역의 세포외 기질 (ECM) 성분을 갖는다. ECM 성분은 하기: 피브로넥틴, 피브릴린, 라미닌, 엘라스틴, 콜라겐과의 일원 (예를 들어, 콜라겐 I, III 및 IV), 성장 인자 및 사이토킨을 포함하는 ECM 회합된 성장 단백질, 글리코사미노글리칸, 기저 물질, 망상 섬유 및 트롬보스폰딘 중 임의의 것 또는 모두를 포함할 수 있으며, 이는 기저판과 같은 한정된 구조로서 조직화되어 잔류할 수 있다. 성공적인 탈세포화는 표준 조직학적 염색 절차 또는 형광 어세이에 의해 측정된 바로 검출가능한 DNA의 97% 초과를 제거를 이용한 조직 절편 중 검출가능한 근필라멘트, 내피 세포, 평활근 세포, 및 핵의 부재로서 정의된다. 잔류의 세포 조직파편은 탈세포화된 기관 또는 조직으로부터 제거될 수 있다.
- [0043] ECM의 형태 및 구조는 탈세포화의 과정 동안 및 후에 유지된다. 본원에 사용된 "형태"는 기관, 조직의 또는 ECM의 전체 형태를 지칭하는 반면, 본원에 사용된 "구조"는 외부 표면, 내부 표면, 및 그 사이의 ECM을 지칭한다.
- [0044] ECM의 형태 및 구조는 시각적으로 및/또는 조직학적으로 검사될 수 있다. 예를 들어, 고형 기관의 외부 표면상의 또는 기관 또는 조직의 혈관구조 내의 기저판은 관류 탈세포화로 인해 제거되거나 유의하게 손상되지 않아야 한다. 또한, ECM의 원섬유는 탈세포화되지 않은 기관 또는 조직의 그것과 유사하거나 그것으로부터 유의하게 변화되지 않아야 한다.
- [0045] 1종 이상의 화합물은 예를 들어 탈세포화된 기관을 보존하거나, 재세포화를 위해 탈세포화된 기관 또는 조직을 제조하거나, 및/또는 재세포화 과정 동안 세포를 보조 또는 자극하기 위해, 탈세포화된 기관 또는 조직 내에 또는 상에 적용될 수 있다. 이러한 화합물로는 1종 이상의 성장 인자 (예를 들어, VEGF, DKK-1, FGF, BMP-1, BMP-4, SDF-1, IGF, 및 HGF), 면역 조절제 (예를 들어, 사이토킨, 글루코코르티코이드, IL2R 길항제, 류코트린 길항제), 및/또는 응고 캐스케이드를 개질하는 인자 (예를 들어, 아스피린, 헤파린-결합 단백질 및 헤파린)를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 탈세포화된 기관 또는 조직은 탈세포화된 기관 또는 조직 상에

또는 내에 잔류하는 임의의 유형의 미생물의 존재를 감소시키거나 제거하기 위해 예를 들어 조사 (예를 들어, UV, 감마)로 더 처리될 수 있다.

[0046] 예시적인 심장의 관류 탈세포화

[0047] PEG 탈세포화 프로토콜

[0048] 심장을 100 U/mL 페니실린, 0.1 mg/mL 스트렙토마이신 (Streptomycin), 0.25 µg/mL 암포테리신 (Amphotericin) B, 1000 U의 헤파틴, 및 2 mg의 아데노카르드 (Adenocard)를 함유하는 200 ml PBS에서 재순환 없이 세척한다. 그 후, 심장을 35 ml 폴리에틸렌글리콜 (PEG; 1 g/mL)로 최대 30분 동안 수동 재순환으로 탈세포화한다. 그 후, 기관을 500 mL PBS로 최대 24시간 동안 재순환용 펌프를 사용하여 세척한다. 세척 단계를 매 회 적어도 24시간 동안 적어도 2회 반복한다. 심장을 35 ml DNase I (70 U/mL)에 적어도 1시간 동안 수동 재순환으로 노출시킨다. 기관을 500 ml PBS로 적어도 24시간 동안 다시 세척한다.

[0049] 트리톤 X 및 트립신 탈세포화 프로토콜

[0050] 심장을 100 U/mL 페니실린, 0.1 mg/mL 스트렙토마이신, 0.25 µg/mL 암포테리신 B, 1000 U의 헤파틴, 및 2 mg의 아데노카르드를 함유하는 200 ml PBS에서 적어도 약 20분 동안 재순환 없이 세척한다. 그 후, 심장을 0.05% 트립신 (Trypsin)으로 30분 동안 탈세포화한 후, 5% 트리톤-X 및 0.1% 수산화암모늄을 함유하는 500 mL PBS로 약 6시간 동안 관류한다. 심장을 탈이온수로 약 1시간 동안 관류한 후, PBS로 12시간 동안 관류한다. 그 후, 심장을 500 mL PBS에서 재순환용 펌프를 사용하여 매 회 24시간 동안 3회 세척한다. 심장을 35 ml DNase I (70 U/mL)로 1시간 동안 수동 재순환으로 관류하고, 500 mL PBS에서 재순환용 펌프를 사용하여 매 회 적어도 약 24시간 동안 2회 세척한다.

[0051] 1% SDS 탈세포화 프로토콜

[0052] 심장을 100 U/mL 페니실린, 0.1 mg/mL 스트렙토마이신, 0.25 µg/mL 암포테리신 B, 1000 U의 헤파틴, 및 2 mg의 아데노카르드를 함유하는 200 mL PBS에서 적어도 약 20분 동안 재순환 없이 세척한다. 심장을 1% SDS를 함유하는 500 mL 물로 적어도 약 6시간 동안 재순환용 펌프를 사용하여 탈세포화한다. 그 후, 심장을 탈이온수로 약 1시간 동안 세척하고, PBS로 약 12시간 동안 세척한다. 심장을 500 mL PBS로 재순환용 펌프를 사용하여 매 회 적어도 약 24시간 동안 3회 세척한다. 그 후, 심장을 35 ml DNase I (70 U/mL)로 약 1시간 동안 수동 재순환을 사용하여 관류하고, 500 mL PBS로 재순환용 펌프를 사용하여 매 회 적어도 약 24시간 동안 3회 세척한다.

[0053] 트리톤 X 탈세포화 프로토콜

[0054] 심장을 100 U/mL 페니실린, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신, 0.25 µg/mL 암포테리신 B, 1000 U의 헤파틴, 및 2 mg의 아데노카르드 (아데노신)을 함유하는 200 mL PBS로 적어도 약 20분 동안 재순환 없이 세척한다. 그 후, 심장을 5% 트리톤 X 및 0.1% 수산화암모늄을 함유하는 500 mL 물로 적어도 6시간 동안 재순환용 펌프를 사용하여 탈세포화한다. 그 후, 심장을 탈이온수로 약 1시간 동안, 그 후 PBS로 약 12시간 동안 관류한다. 심장을 500 mL PBS로 재순환용 펌프를 사용하여 매 회 적어도 24시간 동안 3회 관류함으로써 세척한다. 그 후, 심장을 35 ml DNase I (70 U/mL)로 약 1시간 동안 수동 재순환을 사용하여 관류하고, 500 ml PBS에서 매 회 약 24시간 동안 3회 세척한다.

[0055] 심장을 60 cm H₂O의 관상동맥 관류압에서 관류할 수 있다. 요구되지는 않지만, 심장을 탈세포화 챔버에 실장하고, 항생제를 함유하는 PBS로 72시간 동안 재순환 모드에서 5 mL/분의 연속적 유동으로 완전히 침지 및 관류하여 가능한 한 많은 세포 성분 및 세제를 세척한다.

[0056] 심장 탈세포화의 검출

[0057] 성공적인 탈세포화는 조직 절편 중의 근필라멘트 및 핵의 결여에 의해 측정될 수 있다. 혈관 구조의 성공적인 보존은 조직 절편을 포매하기 전에 2% 에반스 블루 (Evans Blue)로 관류함으로써 평가될 수 있다. 매우 효과적인 탈세포화는 심장을 먼저 탈이온화된 H₂O에 용해된 이온성 세제 (1% 나트륨-도데실-설페이트 (SDS), 대략 0.03 M)로 일정한 관상동맥 관류압으로 선행성으로 관류한 후, 비-이온성 세제 (1% 트리톤 X-100)로 선행성으로 관류하여 SDS를 제거하고, 아마도 세포의 기질 (ECM) 단백질을 복원하는 경우 관찰된다. 간헐적으로, 심장은 폐색된 모세혈관 및 소혈관을 청소하기 위해 인산염 완충 용액으로 역행성으로 관류될 수 있다.

[0058] 탈세포화 후 무손상 혈관 구조를 입증하기 위해, 탈세포화된 심장을 랑겐도르프 관류를 통해 에반스 블루로 염색하여 혈관 기저 막을 염색하고, 거대- 및 미세-혈관 밀도를 정량화할 수 있다. 또한, 폴리스티렌 입자를 심

장 내로 및 심장을 통해 관류하여 심장 부피, 혈관 누출의 수준을 정량하고, 심장 용출액 및 조직 절편을 분석함으로써 관류의 분포를 평가할 수 있다. 3가지 범주의 조합을 평가하고, 단리된 비-탈세포화된 심장과 비교한다: 1) 폴리스티렌 입자의 균등한 분포, 2) 일부 수준에서의 누출의 유의한 변화, 3) 미세혈관 밀도.

[0059] 섬유 배향은 단축 또는 이축 스트레스에 적용된 샘플에 실시간으로 적용할 수 있는 편광 현미경 기술 (문헌 [Tower et al., *Ann Biomed Eng.*, 30(10):1221 (2002)] 참조)에 의해 평가하였다. 랑겐도르프 관류 동안, 탈세포화된 ECM의 기본 기계적 특성을 기록하고 (순응도, 탄성, 파열 압력), 새로이 단리된 심장과 비교하였다.

[0060] 예시적인 간의 관류 탈세포화

[0061] 간 분리를 위해, 대정맥을 중앙 개복술을 통해 노출시키고, 절개하고, 마우스 대동맥 캐놀라 (래드노티 글래스 (Radnoti Glass), 캘리포니아주 몬로비아)를 사용하여 캐놀라삽입한다. 간 동맥 및 정맥 및 담관을 횡단하고, 간을 주의깊게 복부로부터 제거하고, 멸균 PBS (하이클론(Hyclone), 미국 유타주 로간)에 침지시켜 간문맥 상의 인장력을 최소화하였다. 헤파린화된 PBS 관류의 15분 후, 탈이온수 중 1% SDS (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스버드)로 2 내지 12시간의 관류 및 탈이온수 중 1% 트리톤-X (시그마(Sigma), 미주리주 세인트 루이스)의 15분의 관류를 한다. 그 후, 간을 PBS (100 U/ml 페니실린-G (깁코(Gibco), 미국 캘리포니아주 칼스버드), 100 U/ml 스트렙토마이신 (깁코, 캘리포니아주 칼스버드), 0.25 µg/ml 암포테리신 B (시그마, 미주리주 세인트 루이스))를 함유하는 항생제로 124시간 동안 연속적으로 관류한다.

[0062] 120분의 SDS 관류 후, 트리톤-X 100으로 관류하는 것은 완전히 탈세포화된 간을 생성하기에 충분하다. 탈세포화된 간의 모바트(Movat) 펜타크롬 염색은 중심 정맥 및 간 동맥, 담관 및 간문맥을 함유하는 문맥 공간으로 특징적인 간 조직화의 보유를 확인한다.

[0063] 기관 또는 조직의 재세포화

[0064] 탈세포화된 기관 또는 조직을 상이한 유형의 세포를 비롯한 분화된 (성숙 또는 1차) 세포, 줄기 세포, 또는 부분적으로 분화된 세포 중 어느 하나의 세포의 집단과 접촉시킨다. 따라서, 세포는 전능 세포, 만능 세포, 또는 다능 세포일 수 있고, 비수입된 또는 수입된 것일 수 있고, 단일-혈통 세포일 수 있다. 세포는 비분화된 세포, 부분적으로 분화된 세포, 또는 태아 유래된 세포를 포함하는 완전히 분화된 세포일 수 있다. 세포는 전구 세포, 전구체 세포, 또는 제대 세포 및 태아 줄기 세포를 포함하는 "성체" 유래된 줄기 세포를 포함할 수 있다. 본 발명의 기질에 유용한 세포로는 배아 줄기 세포 (미국 국립 보건원 (NIH)에 의해 정의된 바와 같음; 예를 들어 월드 와이드 웹 상의 stemcells.nih.gov에서의 용어해설 참조) 및 iPS 세포를 들 수 있다.

[0065] 기관 또는 조직을 재세포화하는데 사용될 수 있는 세포의 예로는 배아 줄기 세포, 제대혈 세포, 조직-유래된 줄기 또는 전구 세포, 골수-유래된 줄기 또는 전구 세포, 혈액-유래된 줄기 또는 전구 세포, 중간엽 줄기 세포 (MSC), 골격근-유래된 세포, 다능 성체 전구 세포 (MAPC), 또는 iPS 세포를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 사용될 수 있는 추가의 세포로는 심장 줄기 세포 (CSC), 다능 성체 심장-유래된 줄기 세포, 심장 섬유모세포, 심장 미세혈관 내피 세포, 대동맥 내피 세포, 관상동맥 내피 세포, 미세혈관 내피 세포, 정맥 내피 세포, 동맥 내피 세포, 평활근 세포, 심장근육세포, 간세포, 베타-세포, 케라티노사이트, 푸르키니에 섬유, 뉴런, 담관 상피 세포, 섬 세포, 폐포세포, 세기관지 세포, 브러시 보더 세포 또는 발세포를 들 수 있다. 골수-유래된 줄기 세포, 예컨대 골수 단핵 세포 (BM-MNC), 내피 또는 혈관 줄기 또는 전구 세포, 및 말초 혈액-유래된 줄기 세포, 예컨대 내피 전구 세포 (EPC)는 또한 세포로서 사용될 수 있다.

[0066] 관류 탈세포화된 스캐폴드 내로 또는 상으로 도입되는 세포의 수는 기관 (예를 들어, 어느 기관인지, 기관의 크기 및 중량) 또는 조직 및 재생 세포의 유형 및 발달 단계 모두에 의존할 것이다. 상이한 유형의 세포는 이들 세포가 도달할 집단 밀도에 대해 상이한 경향을 가질 수 있다. 유사하게, 상이한 기관 또는 조직은 상이한 밀도로 세포화될 수 있다. 예로써, 탈세포화된 기관 또는 조직은 적어도 약 1,000개 (예를 들어, 적어도 10,000, 100,000, 1,000,000, 10,000,000 또는 100,000,000개) 세포로 "시딩될" 수 있거나, 그에 부착된 약 1,000개 세포/mg 조직 (습윤 중량, 예를 들어 탈세포화 전) 내지 약 10,000,000개 세포/mg 조직 (습윤 중량)을 가질 수 있다.

[0067] 세포는 하나 이상의 위치 내로 주사에 의해 탈세포화된 기관 또는 조직 내로 도입될 ("시딩될") 수 있다. 또한, 1종 초과 유형의 세포는 탈세포화된 기관 또는 조직 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 분화된 세포 유형의 집단은 탈세포화된 기관 또는 조직 중의 다중 위치에 주사될 수 있거나, 상이한 세포 유형은 탈세포화된 기관 또는 조직의 상이한 부분 내로 주사될 수 있다. 대안적으로, 또는 주사 외에, 세포 또는 세포의 각테일은 캐놀라삽입된 탈세포화된 기관 또는 조직 내로 관류에 의해 도입될 수 있다. 예를 들어 세포는 탈세포화된 기

관 내로 관류 배지를 사용하여 관류될 수 있으며, 이는 그 후 세포의 성장 및/또는 분화를 유도하는 확대 및/또는 분화 배지로 교환될 수 있다. 위치 특이적 분화는 기관 내의 다양한 위치 내로, 예를 들어 심장의 영역, 예컨대 심방, 심실 또는 결절 내로 세포를 정치시킴으로써 달성될 수 있다.

[0068] 재세포화 동안, 기관 또는 조직은 적어도 일부의 세포가 탈세포화된 기관 또는 조직 내 및 상에서 다중화 및/또는 분화될 수 있는 조건 하에서 유지된다. 그 조건으로는 적절한 온도 및/또는 압력, 전기적 및/또는 기계적 활성화, 힘, 적절한 양의 O_2 및/또는 CO_2 , 적절한 양의 습도, 및 멸균 또는 멸균-부근 조건을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 재세포화 동안, 탈세포화된 기관 또는 조직 및 그에 부착된 재생 세포는 적합한 환경에서 유지된다. 예를 들어, 세포는 영양학적 보충물 (예를 들어, 영양분 및/또는 글루코스와 같은 탄소 공급원), 외인성 호르몬 또는 성장 인자, 및/또는 특정 pH를 요구할 수 있다.

[0069] 세포는 탈세포화된 기관 또는 조직 (예를 들어, 인간 세포로 시딩된 인간 탈세포화된 기관 또는 조직)에 대해 동종일 수 있거나, 세포는 탈세포화된 기관 또는 조직 (예를 들어, 인간 세포로 시딩된 돼지 탈세포화된 기관 또는 조직)에 대해 이종일 수 있다. 본원에 사용된 "동종"은 기관 또는 조직이 기원되는 것 (예를 들어, 관련된 또는 비관련된 개체)과 동일한 종으로부터 획득된 세포를 지칭하는 반면, 본원에 사용된 "이종"은 기관 또는 조직이 기원되는 것과는 상이한 종으로부터 획득된 세포를 지칭한다.

[0070] 줄기 또는 전구 배지는 예를 들어 KODMEM 배지 (넉아웃 둘베코 변형 이글 배지 (Knockout Dulbecco's Modified Eagle's Medium)), DMEM, 햄 (Ham) F12 배지, FBS (소 태아 혈청), FGF2 (섬유모세포 성장 인자 2), KSR 또는 hLIF (인간 백혈병 억제 인자)를 포함하는 다양한 성분을 함유할 수 있다. 세포 분화 배지는 또한 L-글루타민, NEAA (비-필수 아미노산), P/S (페니실린/스트렙토마이신), N2, B27 및 베타-머캅토에탄올과 같은 보충물을 함유할 수 있다. 피브로넥틴, 라미닌, 헤파린, 헤파린 술페이트, 레티노산, 표피 성장 인자 과 (EGF)의 일원, FGF2, FGF7, FGF8, 및/또는 FGF10을 포함하는 섬유모세포 성장 인자 과 (FGF)의 일원, 혈소판 유래 성장 인자 과 (PDGF)의 일원, 노킨, 폴리스타틴, 코르딘, 그렐린, 케르베루스/DAN 과 단백질, 벤트로핀, 고 용량 액티빈, 및 암니온리스 (amniotless) 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는 전환 성장 인자 (TGF)/골 형태형성 단백질 (BMP)/성장 및 분화 인자 (GDF) 인자 과 길항제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 추가의 인자가 세포 분화 배지에 첨가될 수 있음이 고려된다. TGF/BMP/GDF 길항제는 또한 TGF/BMP/GDF 수용체-Fc 키메라의 형태로 첨가될 수 있다. 첨가될 수 있는 다른 인자로는 델타-유사 및 재기드 (Jagged) 과의 단백질, 및 노치 (Notch) 프로세싱 또는 절단의 억제제, 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는 노치 수용체 과를 통한 신호전달을 활성화 또는 불활성화시킬 수 있는 분자를 들 수 있다. 다른 성장 인자로는 인슐린 유사 성장 인자 과 (IGF), 인슐린, 왕리스 관련 (WNT) 인자 과, 및 헤지호그 인자 과의 일원 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편을 들 수 있다. 추가의 인자는 중내배엽 줄기/전구체, 내배엽 줄기/전구체, 중배엽 줄기/전구체, 또는 진정 내배엽 줄기/전구체 증식 및 생존, 및 이들 전구체의 유도체의 생존 및 분화를 촉진시키기 위해 첨가될 수 있다.

[0071] 한 실시양태에서, 관류 탈세포화된 기질은 배양체 (EB) 방법을 이용하여 분화된 iPS 또는 ES 세포와 조합된다. 예를 들어, 형질도입, 예를 들어 전사 인자 (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG* 및 *LIN28*; Oct3/4, Sox2, Klf4, 및 c-Myc; 또는 Oct3/4, Sox2, 및 Klf4)의 렌티바이러스-매개된 형질도입에 의해 재프로그래밍된 인간 iPS 세포주가 채용된다. 태아 기원 또는 신생아 기원의 iPS 클론이 채용될 수 있다. 인간 ES 세포주가 또한 채용될 수 있다. iPS 세포 및 ES 세포는 20% 넉아웃 혈청 리플레이서 (인비트로젠), 0.1 mmol/L 비필수 아미노산, 1 mmol/L L-글루타민, 및 0.1 mmol/L β -머캅토에탄올 (시그마)로 보충된 DMEM/F12 배양 배지 중 6-웰 배양 플레이트 (넉 (Nunc)) 중 19,500개 세포/cm²의 밀도로 조사된 마우스 배아 섬유모세포 (MEF) 상에 유지될 수 있다. 또한, 배지는 iPS 세포에 대해 100 ng/mL, 제브라피쉬 염기성 섬유모세포 성장 인자로, 및 hES 세포에 대해 4 ng/mL 인간 재조합 염기성 섬유모세포 성장 인자 (인비트로젠)로 보충될 수 있다. iPS 및 ES 세포주는 또한 15% 송아지 태아 혈청 (FCS: 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)), 0.1 μ mol/L 2-머캅토에탄올 (2ME), 및 1,000 유닛/ml LIF (케미콘 인터내셔널(Chemicon International))을 함유하는 DMEM (시그마-알드리치) 중 젤라틴화된 100-mm 디쉬 상에서 유지될 수 있다. 분화를 위해, 이들 세포를 0.25% 트립신/에틸렌디아민테트라아세트산 (깁코)로 처리하고, 10% FCS 및 0.05 μ mol/L 2ME로 보충된 α -최소 필수 배지 (깁코) 중 젤라틴화된 6-웰 플레이트에 3×10^4 개 세포/웰의 농도로 옮길 수 있다.

[0072] 콜로니를 1 mg/mL 디스파제 (깁코) 용액으로 37°C에서 8 내지 15분 동안 인큐베이션함으로써 배양 플레이트로부터 분리하고, 현탁 배양물 중 초저 부착 플레이트에 예를 들어 4일 동안 정치할 수 있다. 현탁 배양 동안, 배지를 1일에 교환한 후, 배지 교환 없이 추가의 3일 동안 배양할 수 있다. 그 후, EB를 0.1% 젤라틴-코팅된 배

양 플레이트 상에, 예를 들어 웰 당 50 내지 100 EB의 밀도로, 또는 관류 탈세포화된 ECM 내에 플레이팅하고, 분화 배지에서 (예를 들어, 매일 교환됨) 배양한다.

[0073] 일부 예에서, 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 기관 또는 조직은 환자 내로 이식된다. 그 경우에, 탈세포화된 기관 또는 조직을 재세포화하는데 사용되는 세포는 세포가 환자에 대해 "자가성"이도록 환자로부터 수득될 수 있다. 환자로부터의 세포는 관련 기술분야에 공지된 방법을 이용하여, 예를 들어 생명의 상이한 단계 (예를 들어, 태아기, 신생아기 또는 주산기, 청소년기 동안, 또는 성인으로서)에서의 혈액, 골수, 조직 또는 기관으로부터 수득될 수 있다. 대안적으로, 탈세포화된 기관 또는 조직을 재세포화하는데 사용되는 세포는 환자에 대해 동계 (즉, 일란성 쌍생아로부터)일 수 있거나, 세포는 예를 들어 환자의 친척 또는 환자와 관련되지 않은 HLA-매칭된 개체로부터의 인간 림프구 항원 (HLA)-매칭된 세포일 수 있거나, 세포는 예를 들어 비-HLA-매칭된 공여자로부터 환자에 대해 동종일 수 있다.

[0074] 세포의 공급원에 관계없이 (예를 들어, 자가성 또는 아님), 탈세포화된 고품 기관은 환자에 대해 자가성, 동종 또는 이종일 수 있다.

[0075] 세포의 진행은 재세포화 동안 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 기관 또는 조직 상의 또는 내의 세포의 수는 재세포화 동안 하나 이상의 시점에서 생검을 취함으로써 평가될 수 있다. 또한, 세포가 겪은 분화의 양은 다양한 마커가 세포 또는 세포의 집단에 존재하는지 여부를 측정함으로써 모니터링될 수 있다. 상이한 세포 유형과 회합되는 마커 및 이들 세포 유형의 상이한 분화 단계는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 항체 및 표준 면역어레이를 이용하여 용이하게 검출될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Immunology, 2005, Coligan et al., Eds., John Wiley & Sons, Chapters 3 and 11]을 참조한다. 핵산 어레이 및 형태학적 및/또는 조직학적 평가는 재세포화를 모니터링하는데 이용될 수 있다.

[0076] 재세포화된 이식편은 계속적으로 관류된다. 세포 생존율은 배양 동안 유지되고, TUNEL-양성 세포의 정량화는, 예를 들어 아포토시스성인 세포를 결정하기 위해 수행될 수 있다.

[0077] 기관 또는 조직을 탈세포화 및/또는 재세포화하기 위한 제어된 시스템

[0078] 기관 또는 조직을 탈세포화 및/또는 재세포화하기 위한 시스템 (예를 들어, 생물반응기)은 일반적으로 기관 또는 조직을 캐놀라삽입하기 위한 적어도 하나의 캐놀라삽입 장치, 기관 또는 조직을 캐놀라(들)를 통해 관류하기 위한 관류 장치, 및 기관 또는 조직을 위한 멸균 환경을 유지하기 위한 수단 (예를 들어, 격납 시스템)을 포함한다. 캐놀라삽입 및 관류는 관련 기술분야에 널리 공지된 기술이다. 캐놀라삽입 장치는 일반적으로 기관 또는 조직의 혈관, 도관 및/또는 강 내로 도입하기 위한 크기-적절한 공동 튜브를 포함한다. 전형적으로, 하나 이상의 혈관, 도관 및/또는 강은 기관에서 캐놀라삽입된다. 관류 장치는 액체를 위한 보유 용기 (예를 들어, 세포 파괴 배지) 및 하나 이상의 캐놀라를 통해 기관을 통해 액체를 이동시키기 위한 메커니즘 (예를 들어, 펌프, 기압, 중력)을 포함할 수 있다. 탈세포화 및/또는 재세포화 동안 기관 또는 조직의 멸균은 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술, 예컨대 공기 유동의 제어 및 여과, 및/또는 원하지 않는 미생물의 성장을 방지하기 위한 예를 들어 항생제, 항진균제 또는 다른 항미생물제를 사용한 관류를 이용하여 유지될 수 있다.

[0079] 본원에 기재된 바와 같은 기관 또는 조직을 탈세포화 또는 재세포화하기 위한 시스템은 특정 관류 특징 (예를 들어, 압력, 부피, 유동 패턴, 온도, 기체, pH), 기계적 힘 (예를 들어, 심실벽 운동 및 스트레스), 및 전기적 자극 (예를 들어, 페이스)을 모니터링하는 능력을 가질 수 있다. 관상동맥 혈관상이 탈세포화 및 재세포화의 과정에 걸쳐 변화함에 따라 (예를 들어, 혈관 저항성, 부피), 압력-조절된 관류 장치는 큰 변동을 피하는 것이 유리하다. 관류의 유효성은 용출액 중에서 및 조직 절편 중에서 평가될 수 있다. 관류 부피, 유동 패턴, 온도, O₂ 및 CO₂ 분압 및 pH는 표준 방법을 이용하여 모니터링될 수 있다.

[0080] 센서는 시스템 (예를 들어, 생물반응기) 및/또는 기관 또는 조직을 모니터링하는데 사용될 수 있다. 음파마이크로측정, 마이크로압력측정 및/또는 전도도 측정은 심근벽 운동 및 성능에 대한 압력-부피 또는 전부하 동원가능 스트로크 작업 정보를 얻기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 센서는 캐놀라삽입된 기관 또는 조직을 통해 이동하는 액체의 압력; 시스템 내의 주위 온도 및/또는 기관 또는 조직의 온도; pH 및/또는 캐놀라삽입된 기관 또는 조직을 통해 이동하는 액체의 유속; 및/또는 기관 또는 조직의 재세포화의 생물학적 활성을 모니터링하는데 사용될 수 있다. 이러한 특징을 모니터링하기 위한 센서를 갖는 것 외에, 기관 또는 조직의 탈세포화 및/또는 재세포화를 위한 시스템은 또한 이러한 특징을 유지 또는 조정하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 이러한 특징을 유지 또는 조정하기 위한 수단은 온도계, 온도조절기, 전극, 압력 센서, 오버플로우 밸브, 액체의 유속을 변화시키기 위한 밸브, 용액의 pH를 변화시키기 위해 사용되는 용액에의 유체 연결을 개방 및 폐쇄하기 위한 밸

브, 풍선, 외부 조율기 및/또는 컴플라이언스 챔버와 같은 성분을 포함할 수 있다. 안정한 조건 (예를 들어, 온도)을 보장하는 것을 돕기 위해, 챔버, 저장기 및 튜브는 물-재킷화될 수 있다.

[0081] 재세포화 동안 기계적 하중을 기관 및 그에 부착된 세포에 부하하는 것이 유리할 수 있다. 예로서, 좌심방을 통하여 좌심실 내로 삽입된 풍선을 사용하여 기계적 스트레스를 심장에 부하할 수 있다. 부피 및 속도의 조정을 가능하게 하는 피스톤 펌프를 풍선에 연결시켜 좌심실 벽 운동 및 스트레스를 자극할 수 있다. 벽 운동 및 스트레스를 모니터링하기 위해, 마이크로압력측정 및/또는 음파마이크로측정을 사용하여 좌심실 벽 운동 및 압력을 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 외부 심장 박동조율기를 피스톤 펌프에 연결시켜 심실 풍선 (이는 심장 수축기와 등가임)의 각 디플레이션과 동기화된 자극을 제공할 수 있다. 말초 ECG를 심장 표면으로부터 기록하여 조율 전압의 조정, 탈분극 및 재분극의 모니터링을 가능하게 할 수 있고, 재세포화성 또는 재세포화된 심장의 단순화된 표면 지도를 제공할 수 있다.

[0082] 기계적 심실 확장은 또한 좌심방을 통해 좌심실 내로 삽입된 캐놀라에 연동 펌프를 부착시킴으로써 달성될 수 있다. 풍선을 수반하는 상기 기재된 과정과 유사하게, 캐놀라를 통한 주기적 유체 이동 (예를 들어, 박동 흐름)에 의해 달성된 심실 확장이 전기적 자극과 동기화될 수 있다.

[0083] 본원에 개시된 방법 및 물질을 사용하여, 포유동물 심장을 탈세포화 및 재세포화할 수 있고, 적당한 조건 하에 유지된 경우에는, 수축 기능을 겪고 조율 자극 및/또는 약리학적 작용제에 반응하는 기능적 심장을 생성시킬 수 있다.

[0084] 기관 또는 조직을 생성하기 위한 시스템은 프로그램화가능한 프로세서와 조합된 컴퓨터-판독가능한 저장 매체 (예를 들어, 본원에 사용된 컴퓨터-판독가능한 저장 매체는 특정 단계를 수행하기 위한 프로그램화가능한 프로세서를 유발하기 위한 그안에 저장된 지시를 가짐)에 의해 제어될 수 있다. 예를 들어, 이러한 저장 매체는 프로그램화가능한 프로세서와 조합으로 하나 이상의 센서로부터 정보를 받고 가공할 수 있다. 이러한 프로그램화가능한 프로세서와 조합된 저장 매체는 또한 생물반응기 및/또는 기관 또는 조직에 정보 및 지시를 다시 전달할 수 있다.

[0085] 재세포화를 겪은 기관 또는 조직은 생물학적 활성에 대해 모니터링될 수 있다. 생물학적 활성은 기관 또는 조직 자체의 것, 예컨대 심장 조직, 전기적 활성, 기계적 활성, 기계적 압력, 수축성 및/또는 기관 또는 조직의 벽 스트레스일 수 있다. 또한, 기관 또는 조직에 부착된 세포의 생물학적 활성은 예를 들어 이온 수송/교환 활성, 세포 분열 및/또는 세포 생존성에 대해 모니터링될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Laboratory Textbook of Anatomy and Physiology (2001, Wood, Prentice Hall)] 및 [Current Protocols in Cell Biology (2001, Bonifacino et al., Eds, John Wiley & Sons)]을 참조한다. 상기 논의된 바와 같이, 재세포화 동안 기관 상에 활성 부하를 자극하는 것이 유용할 수 있다. 본 발명의 컴퓨터-판독가능한 저장 매체는 프로그램화가능한 프로세서와 조합으로 기관 또는 조직 상의 활성 부하를 모니터링 및 유지하는데 필요한 성분을 조정하는데 사용될 수 있다.

[0086] 한 실시양태에서, 기관 또는 조직의 중량은 프로그램화가능한 프로세서와 조합으로 특정 기관 또는 조직에 대한 노출 시간 및 관류 압력을 계산할 수 있는 본원에 기재된 바와 같은 컴퓨터-판독가능한 저장 매체에 도입될 수 있다. 이러한 저장 매체는 전부하 및 후부하 (각각 관류 전 및 후의 압력) 및 유속을 기록할 수 있다. 본 실시양태에서, 예를 들어 프로그램화가능한 프로세서와 조합된 컴퓨터-판독가능한 저장 매체는 관류 압력, 관류의 방향, 및/또는 하나 이상의 펌프 및/또는 밸브 컨트롤을 통한 관류 용액의 유형을 조정할 수 있다.

[0087] 본 발명은 하기 실시예에서 더욱 설명될 것이며, 이는 청구범위에 기재된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0088] 실시예 1

[0089] 관류 대 침지의 비교

[0090] 도 1a는 관류 탈세포화된 돼지 간의 사진을 제시하고, 도 1b 및 1c는 관류 탈세포화된 돼지 간의 혈관 및 실질 기질의 SEM을 각각 제시한다. 이들 사진은 관류 탈세포화된 기관의 혈관 도관 및 기질 완전성을 나타낸다. 한편, 도 2는 침지 탈세포화된 래트 간의 육안적 촬영상을 제시하며, 여기서 기질의 프레임이 저배율 (좌측) 및 고배율 (우측) 둘 다에서 관찰될 수 있다.

[0091] 도 3은 침지 탈세포화된 래트 간 (A 및 B) 및 관류 탈세포화된 래트 간 (C 및 D)의 SEM을 제시한다. 이들 결과는 침지 탈세포화가 기관 캡슐 (글리송 캡슐)을 상당히 손상시키는 반면, 관류 탈세포화는 캡슐을 보존시켰다는 것을 명백히 나타낸다. 또한, 도 4는 침지 탈세포화된 간의 조직학 (A, H&E 염색; B, 트릭롬 염색) 및 관류

탈세포화된 간의 조직학 (C, H&E 염색; D, 트릭롬 염색)을 도시한다. 침지 탈세포화된 래트 간은 주사 시 세포 또는 염료를 유지하지 못하였다.

[0092] 도 5는 래트 심장의 침지 탈세포화 (상단 열)와 관류 탈세포화 (하단 열) 간의 비교를 제시한다. 좌측 칼럼 내의 사진은 전체 기관을 제시한다. 2개 사진으로부터 알 수 있는 바와 같이, 관류 탈세포화된 기관 (하단 좌측)은 사체 근육 조직의 철-풍부 "적갈색"을 유지하고 여전히 세포를 함유하는 것으로 보이는 침지 탈세포화된 기관 (상단 좌측)보다 훨씬 더 반투명하다. 중앙 칼럼 내의 사진은 탈세포화 조직의 H&E 염색 패턴을 나타낸다. 염색은 실질 내에 있는 세포와 혈관계 벽 내에 있는 세포 수가 침지 탈세포화 (상단 중앙) 후에도 유지되는 반면, 거의 모든 세포 및 또한 세포성 파편은 명백한 혈관 도관이 눈에 띄는 바로 그 순간에 관류 탈세포화 (하단 중앙)에 따라 제거된다는 것을 보여준다. 또한, 우측 칼럼 내의 스캐닝 전자 현미경사진은 침지 (상단 우측) 대 관류 (하단 우측) 탈세포화에 따른 기질의 초미세구조 간에는 상당한 차이가 있다는 것을 보여준다. 다시, 심근 단면적 전반에 걸친 세포성 성분의 완전한 체류가 침지 탈세포화된 심장의 모든 벽에서 관찰되었지만, 혈관 도관을 포함한 무손상 심근의 공간적 및 구조적 특징의 보존과 함께 이들 세포성 성분의 거의 완전한 손실이 관류-탈세포화 심장에서 관찰되었다. 예를 들어, 관류-탈세포화 기질은 세포의 완전한 손실에도 불구하고, 위브 (w), 코일 (c) 및 스트러트 (s)를 포함한 기질 내의 구조적 특징을 유지하였다.

[0093] 도 6은 래트 신장을 이용한 동일한 비교 (침지 탈세포화 (상단 열) 대 관류 탈세포화 (하단 열))를 제시한다. 심장과 달리, 침지-탈세포화 전체 신장 (상단 좌측)은 둘 다가 꽤 반투명성이라는 점에서 관류-탈세포화 전체 신장 (하단 좌측)과 전반적으로 유사한 것으로 보인다. 그러나, 관류-탈세포화된 신장에서는 관류-탈세포화 기관 내의 혈관 도관의 네트워크가 더 뚜렷하고, 더 큰 분지도가 침지-탈세포화 구조물에서보다 가시적일 수 있다. 더우기, 관류-탈세포화된 신장은 무손상 기관 캡슐을 보존하고 있고, 장간막에 의해 둘러싸여 있으며, 도시된 바와 같이 부착된 부신과 함께 탈세포화될 수 있다. 중앙 칼럼 내의 사진은 2개 조직의 H&E 염색 패턴을 보여준다. 염색은 세포성 성분 및/또는 파편 및 가능하게는 심지어 무손상 핵 (퍼플 염색)이 침지-탈세포화 (상단 중앙) 후에 보존된 반면, 거의 모든 세포 및/또는 모든 세포성 파편은 관류-탈세포화 (하단 중앙) 후에 제거된다는 것을 제시한다. 마찬가지로, SEM 사진은 침지-탈세포화된 신장 기질 (상단 우측)이 관류-탈세포화된 신장 기질 (하단 우측) 보다 훨씬 더 많은 손상을 겪었다는 것을 입증한다. 침지-탈세포화된 신장에서, 기관 캡슐이 생략되거나 손상되므로, 기질의 표면 "구멍" 또는 프레임이 명백한 반면, 관류 탈세포화된 기관에서는 캡슐이 무손상이다.

[0094] 도 7은 탈세포화된 신장의 SEM 사진을 제시한다. 도 7a는 관류-탈세포화된 신장을 제시하는 한편, 도 7b는 침지-탈세포화된 신장을 제시한다. 도 8a는 관류-탈세포화된 심장의 SEM 사진을 제시하는 한편, 도 8b는 침지-탈세포화된 심장의 SEM 사진을 제시한다. 이들 영상은 침지-탈세포화가 해당 기관의 초미세구조에 유발시켰던 손상, 및 관류-탈세포화 후의 기질의 생존율을 추가로 입증한다.

[0095] 실시예 2

[0096] 본 발명의 방법에 유용한 예시적인 입자

[0097] 본 발명의 방법에 유용한 입자는 나노입자 또는 마이크로입자를 포함하며, 예를 들어, 분해성 또는 비-분해성을 포함할 수 있으며, 예를 들어 합성 물질, 생물학적 (천연) 물질, 또는 개질된 생물학적 물질과 같은 다수의 상이한 생체 적합성 물질로 형성될 수 있는 나노구체 또는 마이크로구체를 포함한다. 나노입자 또는 마이크로입자를 형성할 수 있는 물질의 예는 알기네이트, 폴리스카라이드, 콜라겐, 텍스트란, 히알루론산, 유리, 세라믹, 금속 (티타늄 포함), 철 코어가 있는 입자, PLA, PGA, PLA/PGA, 단분산 멜라민 수지 입자, 폴리스티렌, 나일론, PMMA, 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 적합한 중합체 물질은 예로서 및 비제한적으로 다음의 중합체: 폴리옥시드, 예컨대 폴리(에틸렌 옥시드) 및 폴리(프로필렌 옥시드); 폴리에스테르, 예컨대 폴리(에틸렌 테레프탈레이트); 폴리우레탄; 폴리술포네이트; 폴리실록산, 예컨대 폴리(디메틸 실록산); 폴리술피드; 폴리아세틸렌; 폴리술폰; 폴리술폰아미드; 폴리아미드 예컨대 폴리카프로락탐 및 폴리(헥사메틸렌 아디프아미드); 폴리이미드; 폴리우레아; 헤테로시클릭 중합체 예컨대 폴리비닐 피리딘 및 폴리비닐 피롤리딘; 자연 발생 중합체 예컨대 천연 고무, 젤라틴, 셀룰로스; 폴리카르보네이트; 폴리무수물; 및 폴리알켄 예컨대 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 및 에틸렌-프로필렌 공중합체를 포함할 수 있다. 중합체 물질은 또한, 예를 들어 화학적 또는 생물학적 분석시 입자의 유용성을 향상시키는데 바람직한 화학적 또는 생물학적 모이어티의 부착을 위한 부위를 제공하기 위해, 카르복실레이트, 에스테르, 아민, 알데히드, 알콜, 또는 할라이드와 같은 관능기를 포함할 수 있다.

[0098] 중합체로부터 나노입자 또는 마이크로입자를 제조하는 방법은 관련 기술분야에서 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 단백질을 비-단백질 중합체와 합쳐 복합 나노구체 또는 마이크로구체를 형성할 수 있다. 한 실시양태에

서, 입자는 생침식성 합성 또는 천연 중합체이다. 용어 "생침식성" 또는 "생분해성"은 본 명세서에서 효소로, 열적으로, 전기적으로, 이온 강도, pH, 기계적으로 또는 화학적으로 분해되거나 더욱 단순한 화학종으로 해리되는 물질을 의미한다. 폴리스카라이드는 천연 중합체의 일례이다. 생체 내에서 무해한 생성물로 분해되는 합성 중합체는 폴리(락트산) (PLA), 폴리(글리콜산) (PGA) 및 PLA 및 PGA의 공중합체, 폴리오르토에스테르, 폴리무수물, 폴리포스포젠, 폴리카프로락톤, 폴리히드록시부티레이트, 그의 블렌드 및 공중합체를 포함한다. PLA, PGA 및 PLA/PGA 공중합체는 프롤라민 복합 마이크로구체를 형성하는데에 특히 유용하다. PLA 중합체는 통상적으로 락트산의 시클릭 에스테르로부터 제조된다. D(-) 및 L(+) 락트산의 혼합물의 광학적으로 불활성인 DL-락트산 혼합물 뿐만 아니라, 락트산의 L(+) 및 D(-) 형태 양쪽 모두는 PLA 중합체를 제조하는데 사용될 수 있다. 폴리락티드를 제조하는 방법은 특허 문헌에 잘 기록되어 있다. 그 교시가 본원에 참조로 포함된 다음의 미국 특허는 적합한 폴리락티드, 그의 특성 및 그의 제조법의 세부 사항을 기술하고 있다: 1,995,970 (Dorough); 2,703,316 (Schneider); 2,758,987 (Salzberg); 2,951,828 (Zeile); 2,676,945 (Higgins); 및 2,683,136; 3,531,561 (Trehu). 열반응성 중합체는 폴리(N-이소프로필아크릴아미드), 히드록시프로필셀룰로스, 폴리(비닐 카프로락탐), 폴리비닐 메틸 에테르, 폴리비닐메틸에테르 및 폴리히드록시에틸메타크릴레이트를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0099] 한 실시양태에서, 입자는 효소, 예컨대 아밀라제로 쉽게 분해될 수 있는 폴리스카라이드로 형성된다. 이는 이식 전 입자의 빠른 제거를 가능하게 한다.
- [0100] 입자의 직경은 적혈구의 직경과 유사할 수 있으며, 따라서 단일 입자가 모세혈관상을 통과하게 한다. 입자는 예를 들어, 약 0.01 μm 내지 약 30 μm , 약 0.5 μm 내지 약 20 μm , 또는 약 5 μm 내지 약 10 μm 일 수 있다.
- [0101] 입자는 혈관계를 통과하기에 적합한 임의의 형상일 수 있으며, 구형, 타원형, 디스크형, 도넛형 또는 별형을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 오목 또는 볼록 표면을 포함할 수 있고, 평활성 내지 비평활성 표면을 가질 수 있다.
- [0102] 입자는 용이한 통과를 확보하기 위해, 예컨대 히드로겔 또는 단백질 코팅과 같이 압력 하에서 표면이 접촉하는 능력을 확보하기 위해, 분해, 기계적 (예컨대 자기적 수집), 또는 에너지를 통해 더 작은 조각으로 부서져서 기질로부터 성공적으로 씻길 수 있는, 기질로부터 제거되는 능력을 확보하기 위해, 친수성 표면 특성을 갖거나 친수성 표면 특성을 갖도록 개질될 수 있으나 이로 제한되지는 않는다.
- [0103] 충분한 직경을 갖는 모세혈관이 형성되어 이식 후 적혈구가 포획되지 않도록 하기 위해, 내피 세포 시딩시 또는 세포 시딩 후 약 12 내지 96 시간 또는 최대 수 주에 입자가 첨가될 수 있다. 예를 들어, 다르게는 탈세포화된 이식편 내 또는 내피 세포가 아닌 세포로 재세포화된 이식편 내의 재-내피화된 혈관의 직경을 확장하기 위해, 작은 입자 크기로 시작하여 그 뒤 원하는 크기가 기질을 통해 관류될 수 있을 때까지 수 시간/수 주에 걸쳐 천천히 입자 크기를 증가시켜 모세혈관에 힘을 가해 열 수 있다.
- [0104] 한 실시양태에서, 입자는 온도 변화에 따라 용이하게 분해되거나 분리될 수 있는 열반응성 중합체로 형성된다. 이는 이식 전 입자의 빠른 제거를 가능하게 한다.
- [0105] 한 실시양태에서, 입자는 자기성 중합체로 형성되고 순환하는 용액 내 자기성 공급원을 첨가하여 이식 전 순환하는 입자의 제거를 가능하게 한다.
- [0106] 한 실시양태에서, 입자는 이식 전 재-내피화된 조직 또는 기관으로부터 제거된다. 생분해성 입자의 경우, 특정한 작용제 또는 조건이 입자를 분해시키거나, 용해시키거나, 또는 소화시키기 위해 추가되고 그 뒤 세척된다. 입자의 제거는 수 주/수 일에 걸쳐 행해질 수 있거나 이식 바로 전에 행해질 수 있다.
- [0107] 적혈구의 일반적인 농도는 약 3 내지 약 5백만개/ μL 이다. 혈관계가 전체 조직 또는 기관 공동 부피의 약 10% 이므로, 입자의 농도는 조직 또는 기관 관류 (또는 공동) 부피 μL 당 약 300-500,000 또는 최대 50백만개일 수 있다.
- [0108] 입자가 모세혈관 내강 직경을 유지하거나, 증대시키거나 또는 감소를 줄이는 효능을 결정하기 위해, 생리적 압력 하에서 재-내피화된 기질 전반에 입자를 살포한 뒤 회수된 입자의 퍼센트를 측정하였다. 예를 들어, 본 방법에 유용한 입자는 예를 들어, 혈액 세포 직경과 근사하거나, 또는 약 5 내지 8 μm 의 평균 직경을 갖는 크기를 갖는 입자의 >50%, 60%, 70% 또는 그 초과가 조직 또는 기관 전반에 살포된 후 회수되거나, 혈액이 생리적 압력 하에서 >50%, 60%, 70%의 회수율로 조직 또는 기관에 살포될 수 있는 것이다. 비-재세포화된 기관, 조직 또는 부분에서, 대다수의 입자 (5 내지 8 μm)가 사이 공간에 거주하고 상당한 회수율을 나타내지 않는다. 재-

내피화된 기관, 조직 또는 입자 처리되지 않은 부분에서 대다수의 입자 (예를 들어, 약 5 μm 내지 약 8 μm 의 입자)가 혈관계에 거주하고 모세혈관상에서는 분명하지 않다.

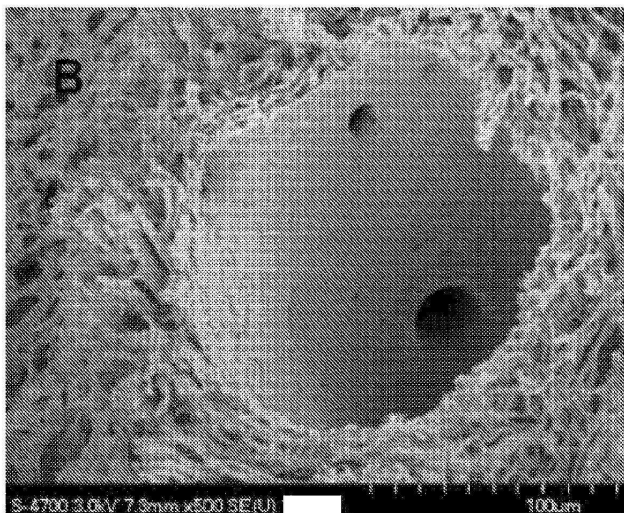
[0109] 모든 간행물, 특허 및 특허 출원들은 본원에 참조로 포함된다. 다음의 명세서에서, 본 발명은 특정한 바람직한 실시양태들과 관련되어 기술되었고, 상세히 설명하기 위한 목적으로 많은 세부사항이 제시되었으나, 본 발명은 추가 실시양태를 허용하고 본원의 몇몇 세부사항들은 본 발명의 기본 원리로부터 벗어남 없이 상당히 변화될 수 있다는 점은 관련 기술분야의 당업자들에게 명백할 것이다.

도면

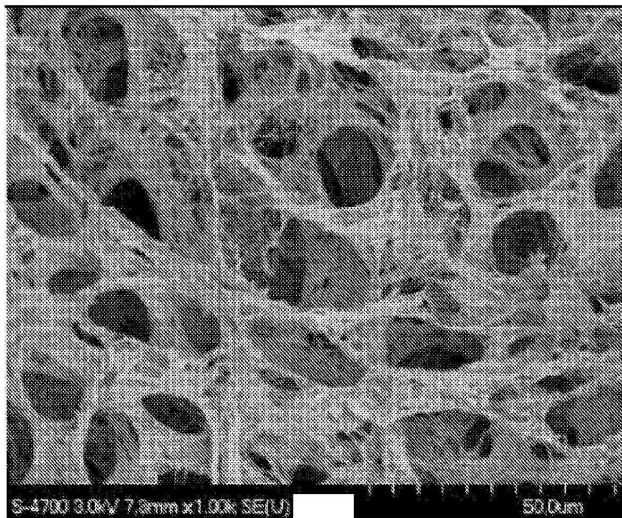
도면1a



도면1b



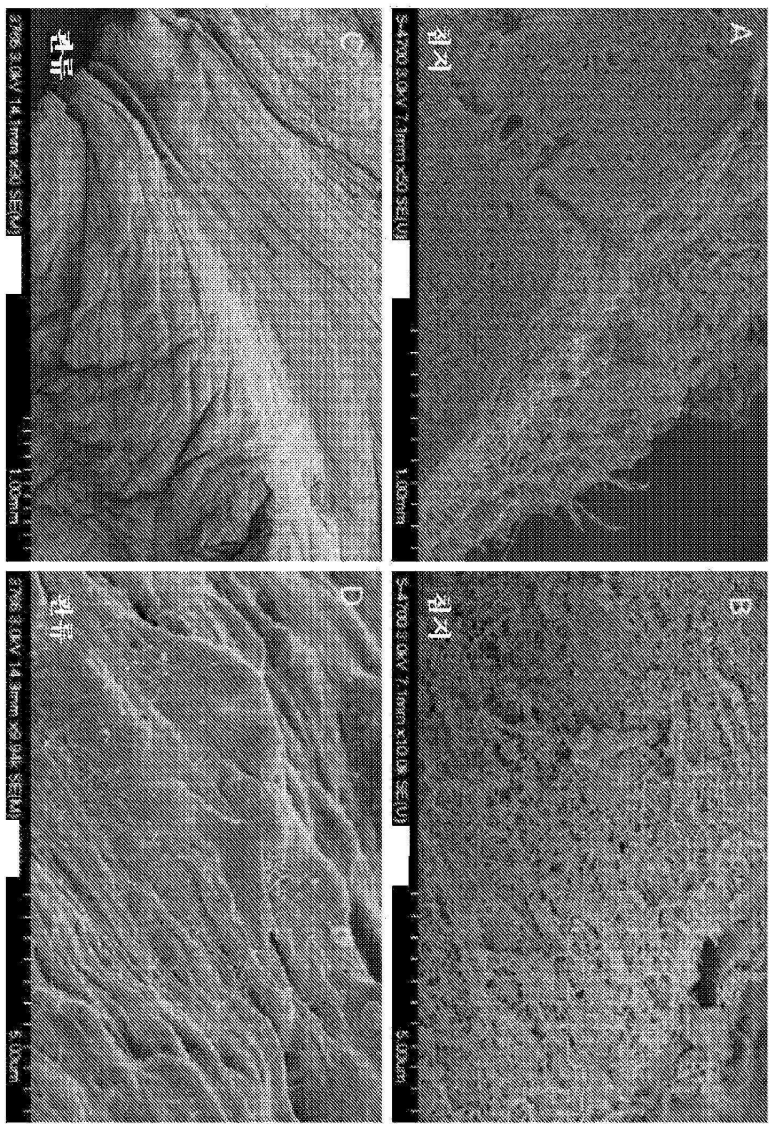
도면1c



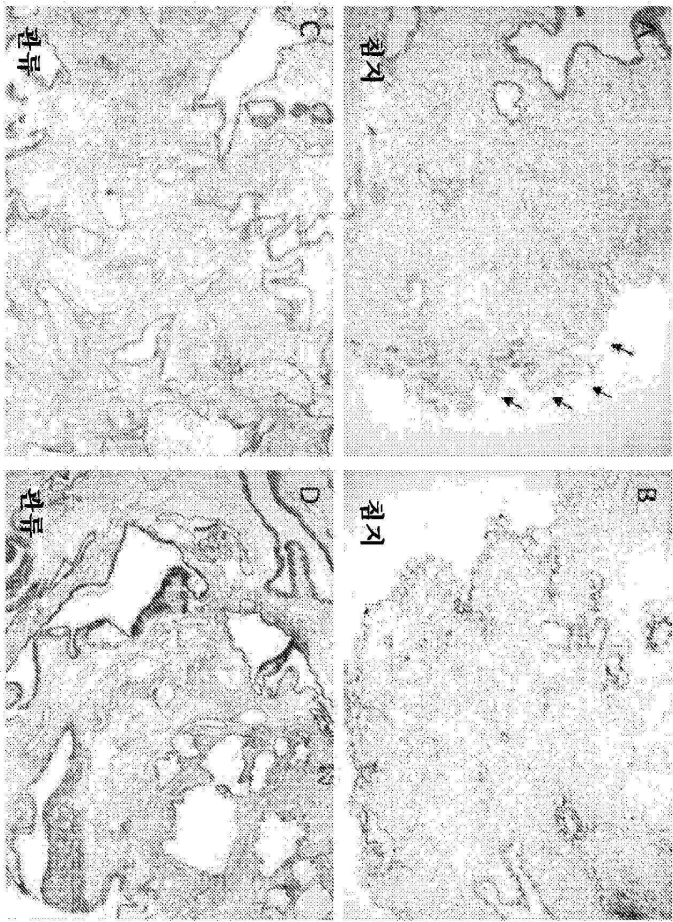
도면2



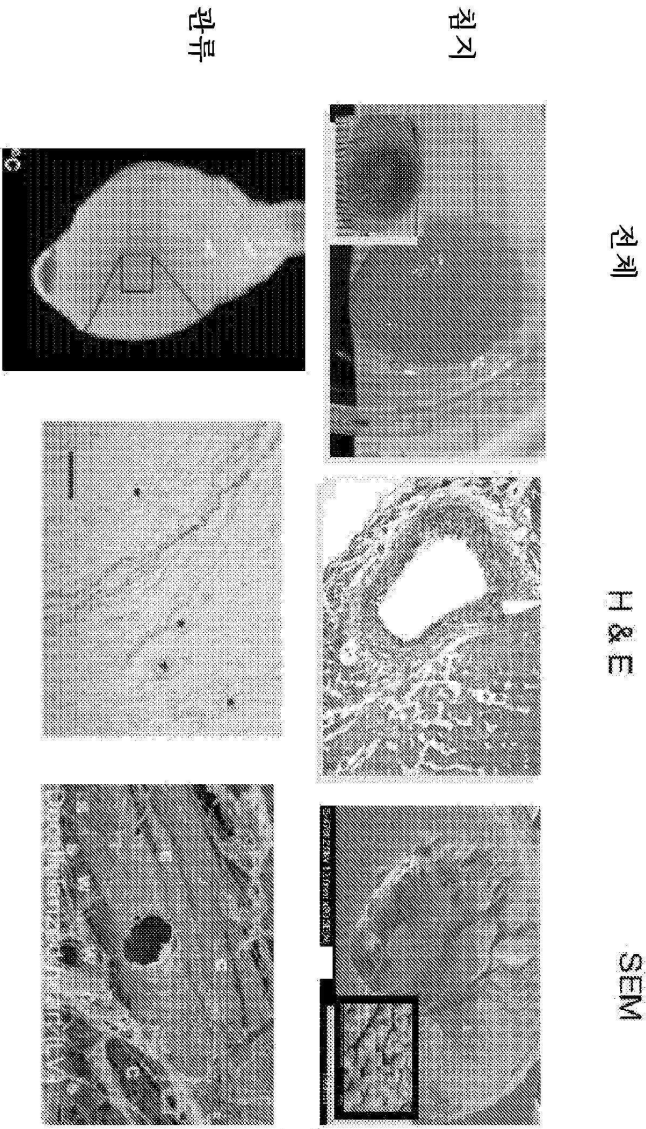
도면3



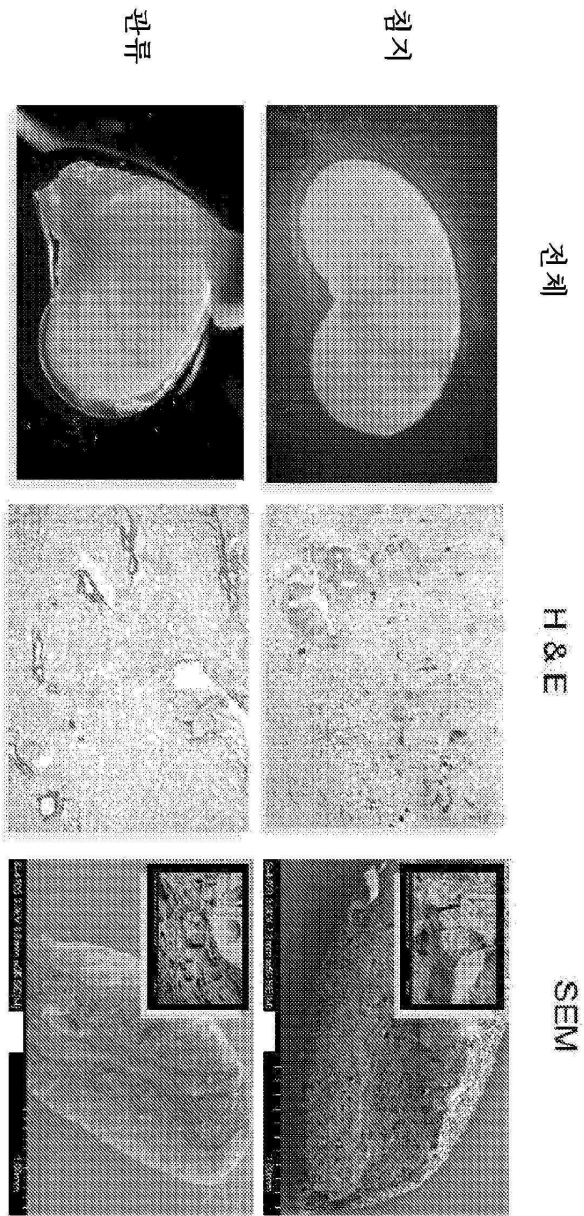
도면4



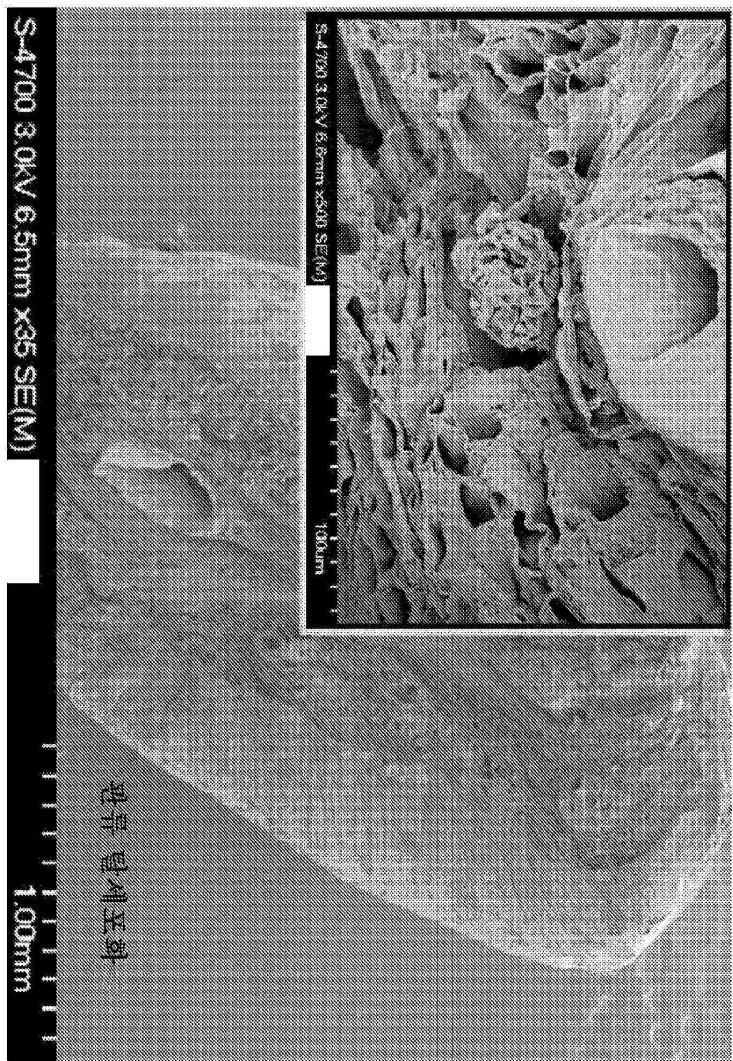
도면5



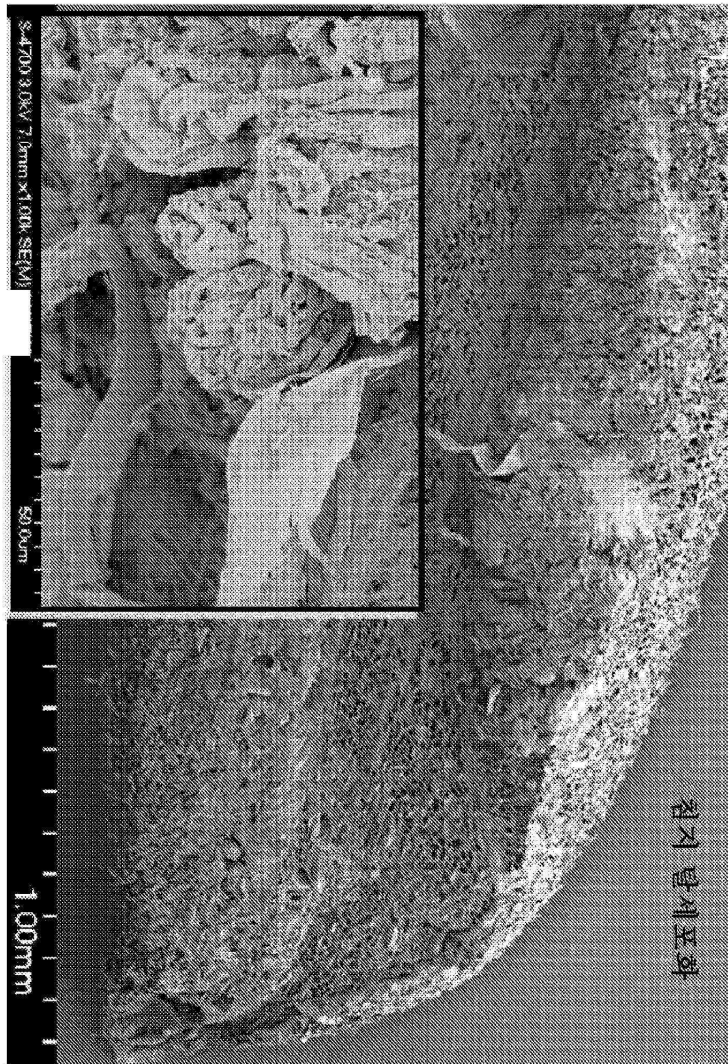
도면6



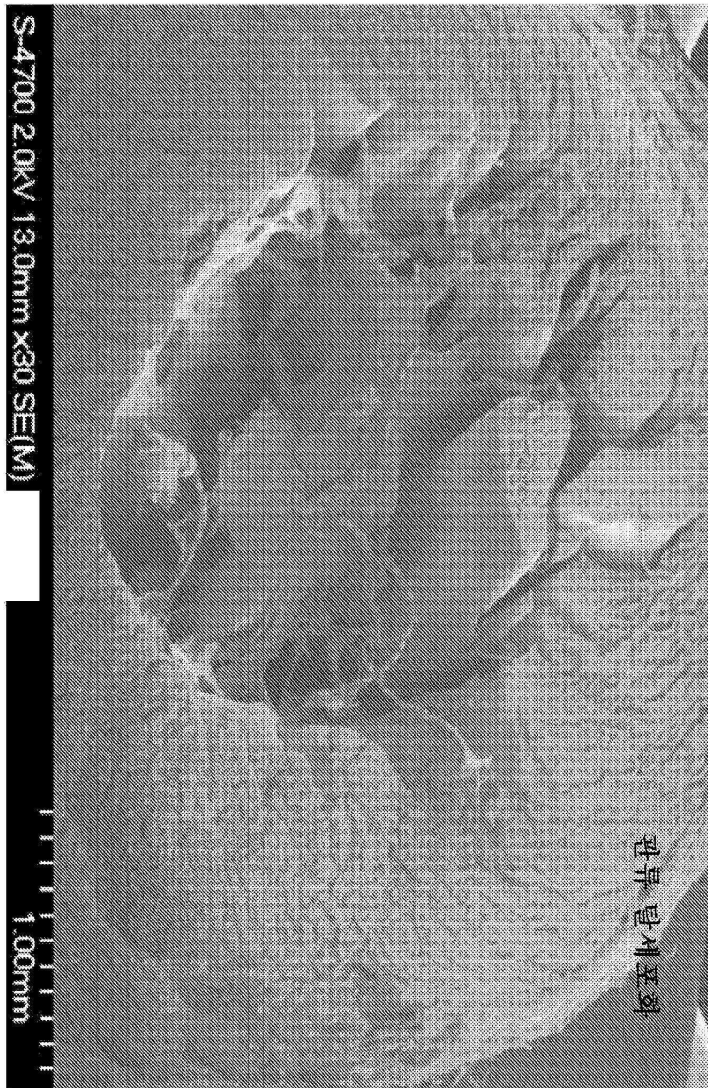
도면7a



도면7b



도면8a



도면8b

