



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월22일
(11) 등록번호 10-1719081
(24) 등록일자 2017년03월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61F 2/06 (2006.01) A61L 27/34 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61F 2/06 (2013.01)
A61L 27/34 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7013852(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2008년01월30일
심사청구일자 2015년06월25일
- (85) 번역문제출일자 2015년05월26일
- (65) 공개번호 10-2015-0067388
- (43) 공개일자 2015년06월17일
- (62) 원출원 특허 10-2009-7018065
원출원일자(국제) 2008년01월30일
심사청구일자 2013년01월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2008/052408
- (87) 국제공개번호 WO 2008/094971
국제공개일자 2008년08월07일
- (30) 우선권주장
60/898,356 2007년01월30일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020050084599 A*
JP2004525272 A*
US20040171545 A1
WO2006044904 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
유니버시티 오브 피츠버그 - 오브 더 커먼웰스 시스템 오브 하이어 에듀케이션
미국 펜실베이니아 15260 피츠버그 테커라이 앤드 오히라 스트리트 가드너 스틸 컨퍼런스 센터 200
- (72) 발명자
엘-쿠르디 모하메드
미국 펜실베이니아주 15203 피츠버그 미션 스트리트 3113
홍 위
미국 펜실베이니아주 15213 피츠버그 씨드 플로어 마리포에 스트리트 4733
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 29 항

심사관 : 이훈재

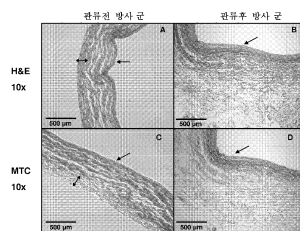
(54) 발명의 명칭 **생분해성 랩 및 그의 용도**

(57) 요약

관상 조직, 및 이 관상 조직의 원주 둘레에 존재하는 생분해성 중합체의 제한적 섬유 기질을 포함하는 관상 조직 이식편 장치가 제공된다. 상기 기질은 관상 조직 위에 전기방사된다. 하나의 구체예에서, 상기 관상 조직은 예로 들지만 한정되지 않는 관상동맥 바이패스술에서 동맥 이식편으로서 유용한 정맥, 이를 테면 복재 정맥으로부터

(뒷면에 계속)

대표도



얻어진다. 관상 조직의 주변에 생분해성 중합체의 섬유 기질을 침착하여 관상 조직 이식편 장치를 제조하는 단계를 포함하는, 관상 이식편의 제조 방법이 또한 제공된다. 정맥 및 이 정맥의 원주 둘레에 존재하는 생분해성 중합체의 제한적 섬유 기질을 포함하는 관상 조직 이식편 장치로 관상동맥을 바이패스하는 단계를 포함하는 심장 바이패스 방법이 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61L 27/3625 (2013.01)
A61L 27/3683 (2013.01)
A61L 27/3804 (2013.01)
A61L 27/507 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 27/58 (2013.01)
C12N 5/0068 (2013.01)
A61L 2300/414 (2013.01)
A61L 2300/604 (2013.01)

(72) 발명자

솔레티 로렌조

미국 펜실베이니아주 15221 피츠버그 트렌톤 애브뉴
 823 아파트먼트 3

스탠쿠스 존 제이.

미국 캘리포니아주 95008 캠벨 서니오크스 애브뉴
 820

보프 데이비드 에이.

미국 펜실베이니아주 15237 피츠버그 엘렌베리 드라
 이브 437

마그너 윌리엄 알.

미국 펜실베이니아주 15090 웨스포드 수드베리 드라
 이브 10193

명세서

청구범위

청구항 1

내강을 둘러싸는 벽을 갖는 생 관상 조직 구조물(living tubular tissue structure)로서, 상기 벽은 적어도 부분적으로 생 관상 조직 구조물의 길이의 일부에 걸쳐 달라지는 일련의 비원형 단면을 포함하는 외면을 갖는 것인 생 관상 조직 구조물, 및

생 관상 조직 구조물의 외면을 따라 주변을 둘러싸도록 형성되어 외면의 본래의 형상에 정합하는 1종 이상의 생분해성(bioerodible) 중합체 섬유를 형성하는 전기방사된 침착물(electrospun deposition)로서, 상기 침착된 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는, 제한적인 섬유 기질(restrictive fiber matrix)이 침착되어 있는 생 관상 조직 구조물의 길이의 일부에 걸쳐 생 관상 조직 구조물의 외면의 일련의 비원형 단면과 인접하는 내면을 보유하고, 고유 비등방성을 가진 제한적인 섬유 기질을 형성하는 것인 전기방사된 침착물

을 포함하는 관상 조직 이식편 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 생 관상 조직 구조물이 정맥인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 3

제2항에 있어서, 정맥 생 관상 조직 구조물이 복재 정맥으로부터 얻어지는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 4

제1항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 에스테르 및 우레탄 결합을 포함하는 중합체를 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 5

제4항에 있어서, 에스테르 및 우레탄 결합을 포함하는 중합체는 폴리(에스테르 우레탄)우레아를 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 6

제1항에 있어서, 생 관상 조직 구조물은 동맥, 요도, 장, 식도, 요관, 기관, 기관지, 난관 또는 이의 조합으로부터 얻어지는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 7

제1항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 알파-히드록시산으로부터 유도된 1종 이상의 중합체를 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 8

제1항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 락톤 단량체를 포함하는 1종 이상의 중합체를 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 9

제1항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 카르보네이트 결합을 포함하는 1종 이상의 중합체를 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 10

제1항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 우레탄 결합을 포함하는 1종 이상의 중합체를 포함하는 것

인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 11

제10항에 있어서, 우레탄 결합을 포함하는 1종 이상의 중합체는 폴리우레탄, 폴리(에스테르 우레탄)우레아 엘라스토머 또는 이의 조합을 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 12

제11항에 있어서, 우레탄 결합을 포함하는 1종 이상의 중합체는 폴리(에스테르 우레탄)우레아 엘라스토머를 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 13

제1항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 에스테르 결합을 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 14

제1항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 1종 이상의 천연 중합체를 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 15

제1항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 콜라겐을 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 16

제1항에 있어서, 제한적인 섬유 기질에 회합된 1종 이상의 세포, 활성제 또는 이의 조합을 추가로 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 17

제1항에 있어서, 비스테로이드성 항염증 약물, 항생제, 항응고 인자, 면역억제제, 글루코코르티코이드, 이뮤노필린에 작용하는 약물, 인터페론, TNF 결합 단백질, 탁산, 스타틴, 산화질소 공여체, 산화질소 전구체 및 이의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된 제제를 추가로 포함하는 것인 관상 조직 이식편 장치.

청구항 18

내강을 둘러싸는 벽을 갖는 생 관상 조직 구조물을 제공하는 단계로서, 상기 벽은 적어도 부분적으로 생 관상 조직 구조물의 길이의 일부에 걸쳐 달라지는 일련의 비원형 단면을 포함하는 외면을 갖는 것인 생 관상 조직 구조물인 단계, 및

생 관상 조직 구조물의 외면을 따라 주변을 둘러싸도록 형성되어 외면의 본래의 형상에 정합하는 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유를 형성하는 침착물을 전기방사하는 단계로서, 상기 침착된 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는, 제한적인 섬유 기질이 침착되어 있는 생 관상 조직 구조물의 길이의 일부에 걸쳐 생 관상 조직 구조물의 외면의 일련의 비원형 단면과 인접하는 내면을 보유하고, 고유 비등방성을 가진 제한적인 섬유 기질을 형성하는 것인 단계

를 포함하는, 관상 조직 이식편 장치의 제조 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 에스테르 및 우레탄 결합을 포함하는 중합체를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 생 관상 조직 구조물은 동맥, 요도, 장, 식도, 요관, 기관, 기관지, 난관 또는 이의 조합으로부터 얻어지는 것인 제조 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 알파-히드록시산으로부터 유도된 1종 이상의 중합체를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 22

제18항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 락톤 단량체를 포함하는 1종 이상의 중합체를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 23

제18항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 카르보네이트 결합을 포함하는 1종 이상의 중합체를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 24

제18항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 우레탄 결합을 포함하는 1종 이상의 중합체를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 25

제18항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 에스테르 결합을 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 26

제18항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 1종 이상의 천연 중합체를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 27

제18항에 있어서, 1종 이상의 생분해성 중합체 섬유는 콜라겐을 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 28

제18항에 있어서, 생 관상 조직 구조물은 복재 정맥의 일부인 제조 방법.

청구항 29

제18항에 있어서, 1종 이상의 세포, 활성화제 또는 이의 조합과 제한적인 섬유 기질을 회합시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

- 청구항 36
삭제
- 청구항 37
삭제
- 청구항 38
삭제
- 청구항 39
삭제
- 청구항 40
삭제
- 청구항 41
삭제
- 청구항 42
삭제
- 청구항 43
삭제
- 청구항 44
삭제
- 청구항 45
삭제
- 청구항 46
삭제
- 청구항 47
삭제
- 청구항 48
삭제
- 청구항 49
삭제
- 청구항 50
삭제
- 청구항 51
삭제

- 청구항 52
- 삭제
- 청구항 53
- 삭제
- 청구항 54
- 삭제
- 청구항 55
- 삭제
- 청구항 56
- 삭제
- 청구항 57
- 삭제
- 청구항 58
- 삭제
- 청구항 59
- 삭제
- 청구항 60
- 삭제
- 청구항 61
- 삭제
- 청구항 62
- 삭제
- 청구항 63
- 삭제
- 청구항 64
- 삭제
- 청구항 65
- 삭제
- 청구항 66
- 삭제
- 청구항 67
- 삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생분해성 랩 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 심근경색증 및 허혈을 야기하는 관상동맥질환은 현재 전세계적으로 이환율 및 사망을 원인의 제1위를 차지하고 있다. 현재 치료 대체법은 경피경관 혈관성형술, 스텐트 이식술 및 관상동맥 바이패스 이식술(CABG, coronary artery bypass grafting)로 이루어진다. CABG는 동맥 또는 정맥 도관을 사용하여 수행될 수 있거나 관상동맥 협착증과 싸우는데 가장 효과적이고 가장 널리 사용되는 치료법으로서, 매년 거의 500,000회의 수술이 수행되고 있다. 또한, 매년 수행된 하지 바이패스 수술은 대략 80,000회이다. 가장 빈번하게 바이패스술에 사용된 정맥 도관은 자가 복제 정맥으로서, 이러한 바이패스술을 수행하는 외과 의사의 95%가 선택하는 이식편이다. 미국 심장 협회에 따르면, 2004년에 249,000명의 환자에게서 427,000회의 바이패스술이 수행되었다. 수 개월 내지 수 년의 시간에 걸쳐 발생할 수 있는 내막 과형성(IH, intimal hyperplasia)의 결과로서 이식 혈관 또는 문합 부위의 폐색으로 인해 이들 수술의 장기적 성과는 제한된다.

[0003] 합성 또는 조직공학에 의해 제조된 소경(small diameter)의 혈관 이식편의 성공적인 개발이 여전히 달성되어야 하며, 동맥 이식편(예를 들어, 내유, 요골 또는 위대망 동맥)의 사용은 이들 혈관의 얇은 크기, 소경 및 사용가능성에 의해 제한된다. 이들의 폭넓은 사용에도 불구하고, 동맥성 정맥 이식편(AVG)의 기능상실은 주요 문제점을 남긴다: 첫 해에 AVG 중 12% 내지 27%가 폐색되었고, 이후 연간 폐색율이 2% 내지 4%이었다. AVG의 기능상실 환자는 죽거나 재수술이 필요할 것이다.

[0004] IH는 최초 5 년내의 모든 AVG 기능상실 중 20% 내지 40%를 차지한다. IH가 모든 성숙한 AVG에서 어느 정도까지 발달하며, 이것이 이식에 대한 정맥의 불가결한 응답이라고 많은 사람들에게 의해 간주되고 있다는 것이 몇 가지 연구를 통해 결정되었다. IH는 중막 및 외막 평활근 세포(SMC) 및 근육섬유아세포의 표현형 변화, 이후의 이들의 탈착, 및 이들이 증식하는 내막으로의 이동을 특징으로 한다. 다수의 경우에, 이러한 응답은 협착증을 야기하여 이식편을 통과하는 혈류량을 감소시킬 수 있다. IH는 정맥을 동맥 순환의 동적 기계적 환경에 갑작스럽게 노출시킴으로써 개시될 수 있는 것으로 생각된다.

[0005] 바이패스 이식편으로서 사용하기 위해 동맥 순환으로 전위된 정맥 분절을 노출시켜 혈류량 및 관강내 압력 (Porter KE, Nydahl S, Dunlop P, Varty K, Thrush AJ, and London NJ. The development of an in vitro flow model of human saphenous vein graft intimal hyperplasia. *Cardiovasc Res.* 1996;31(4): 607-14), 및 CABG 의 경우 박동하는 심장에 이들의 부착에 기인한 주기적인 벽운동(굽힘, 뒤틀림 및 연신 포함)(Vorp DA, Severyn DA, Steed DL, and Webster MW. A device for the application of cyclic twist and extension on perfused vascular segments. *Am J Physiol.* 1996;270(2 Pt 2): H787-95)을 증가시킨다. 정맥이 동맥보다 훨씬 더 얇은 벽으로 둘러싸여 있고 동맥보다 더 과열되기 쉽기 때문에, 이들은 이들이 정맥 도관에 축적되어 있는 것들 보다 동맥 도관에서 훨씬 더 큰 응력을 경험한다. 실제로, 리우(Liu)와 펑(Fung)은 동맥류의 재확립 직후 AVG에서의 평균 원주방향 벽응력(CWS, circumferential wall stress)이 정상 환경하 정맥에서의 것의 140배일 수 있었다는 것을 보여주었다(Fuchs JC, Mitchener JS, and Hagen PO. Postoperative changes in autologous vein grafts. *Ann Surg.* 1978;188(1): 1-15). 이와 같은 CWS의 극적인 증가는 동맥 압력하에서 그의 최대 직경으로 팽창된 AVG에 기인한다. 조직은 비대화함으로써 이러한 감지된 손상에 응답하는데, 이는 스트레스를 정맥 수준으로 회복하기 위한 시도인 것으로 생각된다. 그러나, 이러한 응답은 조절되지 않고 과잉-보상하여 목적하는 정맥 분절의 비대화 또는 "동맥혈화(arterialization) 대신에 협착증을 야기할 수 있다.

[0006] AVG에 의한 과형성 응답은 동맥의 생체역학적 환경에 대한 이들의 갑작스러운 노출의 결과로서 발생하는 "세포성 쇼크"의 직접적인 결과인 것으로 제시되었다 (Angelini GD, et al. Distention promotes platelet and leukocyte adhesion and reduces short-term patency in pig arteriovenous bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99(3): 433-9; Campbell PA, et al. vein grafts for arterial repair: Their success and reasons for failure. *Ann R Coll Surg Engl.* 1981;63(4): 257-60; Campeau L LJ, et al. Natural history of saphenous vein aortocoronary bypass grafts. *Mod Concepts Cardiovasc Dis.* 1984;53: 59-63; Fuchs JC, Mitchener JS, and Hagen PO. Postoperative changes in autologous vein grafts. *Ann Surg.* 1978;188(1): 1-15; Huynh TT, et al. Alterations in wall tension and shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts. *J Vasc Surg.* 1999;29(2): 334-44; Liu SQ et al. Changes in the organization of the smooth muscle cells in rat vein grafts. *Ann Biomed Eng.* 1998;26(1): 86-95; Ramos JR, et al. Histologic fate and endothelial changes of distended and nondistended vein grafts. *Ann Surg.* 1976;183(3): 205-28; Resnick N and Gimbrone MA. Hemodynamic forces

are complex regulators of 내피 gene expression. The FASEB J. 1995;9(10): 874-82; Sumpio B. Hemodynamic forces and vascular cell biology. Austin: R.G. Landes Company. 1993; Szilagyi DE, et al. Biologic fate of autogenous vein implants as arterial substitutes: Clinical, angiographic and histopathologic observations in femoro-popliteal operations for atherosclerosis. Ann Surg. 1973;178(3): 232-46; and Zwolak RM, et al. Kinetics of vein graft hyperplasia: Association with tangential stress. Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 1987;5(1): 126-36). 외부 구조 지지체(또는 피포 (sheath))의 첨가에 의한 AVG 급성 팽창의 방지는 외관상으로는 정맥 이식편의 개존성(patency)을 향상시켰다 (Huynh TT, et al. J Vasc Surg. 1999;29(2): 334-44; Cabrera Fischer EI, et al. Reduced elastic mismatch achieved by interposing vein cuff in expanded polytetrafluoroethylene femoral bypass decreases intimal hyperplasia. Artif Organs. 2005;29(2): 122-30; Ducasse E, et al. Interposition vein cuff and intimal hyperplasia: An experimental study. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2004;27(6): 617-21; Huynh TT, et al. External support modulates g protein expression and receptor coupling in experimental vein grafts. Surgery. 1999; 126(2): 127-34; Jeremy JY, et al. A bioabsorbable (polyglactin), nonrestrictive, external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004;127(6): 1766-72; Karayannacos PE, et al. Late failure in vein grafts: Mediating factors in subendothelial fibromuscular hyperplasia. Ann Surg. 1978;187(2): 183-8; Kohler TR, et al. The effect of rigid external support on vein graft adaptation to the arterial circulation. J Vasc Surg. 1989;9(2): 277-85; Liu SQ, et al. Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach. J Biomech. 1999;32(11): 1165-75; Liu SQ, et al. A possible role of initial cell death due to mechanical stretch in the regulation of subsequent cell proliferation in experimental vein grafts. Biomech Model Mechanobiol. 2002;1(1): 17-27; Mehta D, et al. External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting. Nat Med. 1998;4(2): 235-9; Parsonnet V, et al. New stent for support of veins in arterial grafts. Arch Surg. 1963;87: 696-702; Vijayan V, et al. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. J Vasc Surg. 2004;40(5): 1011-9; and Vijayan V, et al. External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2002;24(1): 13-22). 그러나, 하나 이상의 근본적인 제한점으로 인해, 이들 이전 접근법들은 AVG 개존성을 향상시키기 위한 임상적으로 실행가능한 수단을 생성하지는 못했다. 이들 이전 접근법들은 모두 생체내구적이고/이거나 느슨하게 고정되는, 외막에 설치된 랩/피포를 사용하였다.

[0007]

내막 과형성의 발달에 있어서 생체역학의 역할

[0008]

IH는 전형적으로 내막내 세포의 수 및/또는 크기의 증가, 이후 이들 세포에 의한 다량의 ECM의 침착의 결과로서 혈관 내층 두께의 증가에 의해 정의된다. 이러한 응답에 기여하는 세포는 주로 중막 및 외막 기원의 SMC이다. IH는 동맥관의 폐쇄에서와 같이 발달동안 생리학적으로 및 혈관 손상의 결과로서 병리학적으로 모두 일어난다. AVG IH는 동맥 순환의 동적 기계적 환경에 대한 정맥의 갑작스러운 노출에 의해 개시될 수 있는 것으로 생각된다(Dobrin PB, Littooy FN, and Endean ED. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. Surgery. 1989; 105(3): 393-400). 그러나, CWS의 수준 증가는 IH 형성을 촉진하는 것으로 나타난 반면(Huynh TT, Davies MG, Trovato MJ, Svendsen E, and Hagen PO. Alterations in wall tension shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts. J Vasc Surg. 1999;29(2): 334-44 and Gusic RJ, Myung R, Petko M, Gaynor JW, and Gooch KJ. shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo. J Biomech. 2005;38(9): 1760-9), 전단 응력의 수준 증가는 그것을 변화시키는 경향이 있다(Huynh TT, Davies MG, Trovato MJ, Svendsen E, and Hagen PO. Alterations in wall tension and shear stress modulate tyrosine kinase signaling and wall remodeling in experimental vein grafts. J Vasc Surg. 1999;29(2): 334-44; Gusic RJ, Myung R, Petko M, Gaynor JW, and Gooch KJ. shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo. J Biomech. 2005;38(9): 1760-9; Goldman J, Zhong L, and Liu SQ. Negative regulation of vascular smooth muscle cell migration by blood shear stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; Jiang Z, Berceli SA, Pfahnl CL, Wu L, Goldman D, Tao M, Kagayama M, Matsukawa A, and Ozaki CK. Wall shear modulation of cytokines in early vein grafts. J Vasc Surg. 2004;40(2): 345-50; Jiang Z, Wu L,

Miller BL, Goldman DR, Fernandez CM, Abouhamze ZS, Ozaki CK, and Berceli SA. A novel vein graft model: Adaptation to differential flow environments. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. 2004;286(1): H240-5; and Morinaga K, Okadome K, Kuroki M, Miyazaki T, Muto Y, and Inokuchi K. Effect of wall shear stress on intimal thickening of arterially transplanted autogenous veins in dogs. J Vasc Surg. 1985;2(3): 430-3). 외관상으로 AVG에 의한 대립적 과형성 응답을 야기하는 이들 두 가지 생체역학적 인자는 도브린(Dobrin) 등에 의해 주의깊게 연구되었는데, 이들은 증가된 전단 응력이 내막 비대화를 방해하는 것보다 증가된 원주방향의 연신이 내막 비대화를 촉진하는데 더 큰 역할을 한다는 것을 보여주었다(Dobrin PB, Littooy FN, and Endean ED. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. Surgery. 1989; 105(3): 393-400). 이러한 작업을 자극하는 또 다른 연구에서, 졸락(Zwolak) 등은 AVG의 동맥혈화에서 생체역학적 벽응력의 조절 역할을 제시하였다(Zwolak RM, Adams MC, and Clowes AW. Kinetics of vein graft hyperplasia: Association with tangential stress. Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 1987;5(1): 126-36)). 지양(Jiang) 등은 벽장력 증가의 부재하에 증가된 벽 전단 응력이 AVG에서의 과형성 응답을 감소시켰음을 입증하였다(Jiang Z, Wu L, Miller BL, Goldman DR, Fernandez CM, Abouhamze ZS, Ozaki CK, and Berceli SA. A novel vein graft model: Adaptation to differential flow environments. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. 2004;286(1): H240-5). 리유(Liu) 등에 의한 생체내 작업은 영구적인 폴리테트라플루오로에틸렌 피포의 설치를 통해 AVG 내 CWS 수준을 감소시키면 과형성 응답을 감소시킬 수 있다는 것을 보여주었다(Cabrera Fischer EI, Bia Santana D, Cassanello GL, Zocalo Y, Crawford EV, Casas RF, and Armentano RL. Reduced elastic mismatch achieved by interposing vein cuff in expanded polytetrafluoroethylene femoral bypass decreases intimal hyperplasia. Artif Organs. 2005;29(2): 122-30; Liu SQ, Moore MM, Glucksberg MR, Mockros LF, Grotberg JB, and Mok AP. Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach. J Biomech. 1999;32(11): 1165-75; and Liu SQ, Ruan YY, Tang D, Li YC, Goldman J, and Zhong L. A possible role of initial cell death due to mechanical stretch in the regulation of subsequent cell proliferation in experimental vein grafts. Biomech Model Mechanobiol. 2002;1(1): 17-27). AVG의 생체역학적 환경이 IH의 발달에 중요한 역할을 한다는 것이 이들 이전 연구로부터 명백하다. 특히, CWS는 IH의 형성을 조절하는 것처럼 보이며, 이를 제어하는 것이 본 연구에 기술된 접근법의 초점이었다.

[0009] *내막 과형성과 관련된 분자 및 세포 과정*

[0010] 일단 정맥에 의해 손상이 감지되면 과형성 응답이 개시되는데, 과형성 응답은 다섯 가지의 상이하지만 서로 연관이 있는 세포 과정에 의해 설명될 수 있다: 1) 증식능이 낮은 수축 및 정지 상태로부터 증식능이 높은 합성 상태로의 외막 및 중막 SMC의 표현형 변화; 2) SMC의 탈착 또는 ECM 및 다른 세포와의 초점 부착의 변화; 3) 세포로 하여금 ECM을 따라 "걷도록(walk)"하는 초점 부착의 선택적인 재집합을 필요로 하는, 외층으로부터 기저막을 거쳐 내막으로의 SMC의 이동; 4) 증식; 및 5) 다양한 기질 금속단백분해효소(MMP)와 같은 기질 분해 효소 뿐만 아니라 합성 SMC 분비 콜라겐, 엘라스틴, 섬유결합소 등에 의해 야기된 ECM 조성의 변화를 반영하는 조직의 리모델링. AVG IH의 개시 사건을 억제하기 위해서는, 아마도 이들 다섯 가지 과정 각각을 고려해야 할 것이다. IH와 관련된 일련의 사건을 나타내는 개략도를 도 1에 도시하였다.

[0011] *표현형 조절*

[0012] SMC 표현형 조절은 IH의 발병기전에 있어서 두드러진 특징이다. 변형된 SMC가 풍부한 플라크(plaque)는 이식하고 2 주후와 같이 초기에 내막에서 발견되었다. 완전 분화된 성인 SMC는 낮은 증식 및 아포토시스 속도에 의해 입증된 바와 같이 낮은 전환을 입증한다. 그러나, 동맥 손상 48 시간후, SMC의 15-40%는 유사분열이다. 이러한 기능성의 갑작스러운 변화는 SMC가 완전 합성으로부터 완전 수축에 이르는 표현형의 범위에 존재할 수 있다는 사실과 관련이 있다. 합성 SMC는 조절 신호 및 시토카인에 응답하며, 성장인자를 생성할 뿐만 아니라 ECM을 전환시킬 수 있다. 다른 한편으로, 수축 SMC는 혈관운동 신호에 응답하여 혈관 긴장(vessel tone)을 제어한다. AVG는 탈분화된 형태의 SMC의 장기적인 존재하에 합성 SMC의 이동 및 증식에 의해 그리고 그 이후 지속적인 ECM 축적에 의해, 처음 두 달 이내에 I형 콜라겐 생성을 비롯한 신생혈관내막 형성을 나타낸다.

[0013] 주기적인 연신이 시험관내 h-칼데스몬 발현 및 증식의 기질-의존성 변화를 유도한다는 관찰에 의해 입증된 바와 같이, SMC의 표현형 상태는 기계적인 힘에 의해 적어도 부분적으로 조절된다. 생체내 연구가 또한 SMC의 표현형에 대한 기계적 손상의 중요성을 보여주었다. 중막에 대한 풍선 팽창 손상은 SMC에 의한 ECM 합성을 촉진할 뿐

만 아니라 알파 액틴 함량을 감소시키는 것으로 제시되었다. 몇 가지 보고에 따르면 동맥 순환으로 전위된 정맥의 신생혈관내막 SMC가 표현형적으로 변경된다고 하며, 이는 정맥으로부터 동맥 환경으로의 변화가 표현형 변경을 유발한다는 견해를 뒷받침하는 것이다. 예를 들어 배양된 래트 문맥에서 SMC의 수축 기능을 유지하는데 주기적 연신이 필요한 것으로 판명된 생체의 장기 배양 연구로부터, 추가적인 증거가 도출된다. 골드만(Goldman) 등은 중막 원주방향 스트레인을 대폭적으로 증가시키고 SMC 섬유상 액틴 피복을 동시 감소시키는 동맥 압력에 래트의 대정맥을 노출시켰다(Goldman J, Zhong L, and Liu SQ. Degradation of alpha-actin filaments in venous smooth muscle cells in response to mechanical stretch. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. 2003;284(5): H1839-47). 분명히, 정맥 이식술과 관련이 있는 기계적 환경의 변화는 벽내성 SMC의 표현형을 변경시킬 수 있어, 아마도 IH 발달에 기여할 것이다.

[0014] 합성 표현형의 지표로는 골지 복합체 및 조면 소포체의 양 증가 및 섬유상 액틴의 양 감소의 존재가 포함된다. 수축성 표현형은 다량의 섬유상 액틴, 및 스무텔린(smoothelin), h-칼데스몬, 평활근 미오신 중쇄와 같은 수축성 단백질의 발현에 의해 표시되는 무손상 수축 장치의 존재에 의해 입증된다.

[0015] 탈착 및 이동

[0016] 세포 탈착은 IH 연쇄반응의 최초 응답 중 하나이다. 이 과정은 ECM에 대한 세포 부착을 초점 부착 및 스트레스 섬유를 가진 부착력이 강한 상태에서부터 확산 세포 형상을 유지하면서 초점 부착 및 스트레스 섬유의 재구축에 의해 특징지어지는 부착력이 더 약한 상태로 변경하는 것을 말한다. SMC 탈착은 물론 신생혈관내막 형성에 기여하게 될 SMC 이동 및 증식을 허용할 것이다.

[0017] 세포 부착의 조절에 관여하는 많은 중요한 단백질이 존재하는데, 본 발명자들은 그 관심을 세포 기질 상호작용의 적합자(adaptor) 및 조정자로서 기능하는 세포기질 단백질(Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular protein: An appraisal of thrombospondin 1. J Cell Biol. 1995;130(3): 503-6 and Sage EH and Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. Sparc, tenascin, and thrombospondin. The Journal of Biological Chemistry. 1991;266(23): 14831-4) 및 세포 초점 부착 부위에 국소화하는 것으로 보이는 세포내 부착 단백질(Nikolopoulos SN and Turner CE. Integrin-linked kinase (ilk) binding to paxillin IdI motif regulates ilk localization to focal adhesions. The Journal of Biological Chemistry. 2001;276(26): 23499-505 and Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, and Wu C. Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. Cell. 2003;113: 37-47)에 집중하였다. 테나신(tenascin C, TN-C), 트롬보스폰딘(thrombospondin) 1,2(TSP), 및 시스테인이 풍부한 산성의 분비 단백질(secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)은 발달 및 세포 손상 동안 고도로 조절된 발현을 나타내는 세포기질 단백질이다(Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: Is intermediate cell adhesion an adaptive state? J Clin Invest. 2001; 107(7): 785-90). 미토겐 유도 유전자 2(Mig-2) 및 인테그린 결합 키나제(ILK)는 각각 세포 형상의 조정(Nikolopoulos SN and Turner CE. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin IdI motif regulates ilk localization to focal adhesions. The Journal of Biological Chemistry. 2001;276(26): 23499-505 and Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, and Wu C. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. Cell. 2003; 113: 37-47) 및 인테그린 매개 신호 전달(Wu C and Dedhar S. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: A new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. J Cell Biol. 2001;155(4): 505-10)에 관여하는 세포내 단백질이다. 세포골격 및 초점 부착에 대한 TN-C, TSP 및 SPARC의 작용은 근본적으로 구별하기 어렵다(Greenwood JA, Theibert AB, Prestwich GD, and Murphy-Ullrich JE. Restructuring of focal adhesion plaques by pi 3-kinase. Regulation by ptdins (3,4,5)-p(3) binding to alpha-actinin. J Cell Biol. 2000;150(3): 627-42 and Murphy-Ullrich JE, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, and Hook M. Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. J Cell Biol. 1991; 115(4): 1127-36). 그러나, 이들 세 단백질은 각각 고유한 수용체를 가지며, 세포 이동에 대한 전구체인 중간체 부착의 상태를 생성하는 유사하지만 개별적인 신호전달 경로를 가진다(Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: Is intermediate cell adhesion an adaptive state? J Clin Invest. 2001;107(7): 785-90). Mig-2 및 ILK는 또한 세포 부착에 관여하였다(Nikolopoulos SN and Turner CE. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin IdI motif regulates ilk localization to focal adhesions. The Journal of Biological Chemistry. 2001;276(26): 23499-505 and Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, and Wu C. Migfilin and Mig-2 link

focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*. 2003; 113: 37-47). 특히, Mig-2는 세포 형상을 조절할 뿐만 아니라 액틴 세포골격 및 세포기질 부착 사이의 접속에 참여하는 것으로 나타났다(Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, and Wu C. Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*. 2003; 113: 37-47). 최근 연구에 따르면 ILK는 인테그린 매개 신호 전달에서 매개자로서 역할하는 것으로 나타났다(Wu C. Integrin-linked kinase and pinch: Partners in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *Journal of Cell Science*. 1999;112 (Pt 24): 4485-9). 또한, Mig-2 및 ILK 모두는 초점 부착을 유지하는데 필요하다(Nikolopoulos SN and Turner CE. Integrin-linked kinase (ilk) binding to paxillin IdI motif regulates ilk localization to focal adhesions. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(26): 23499-505 and Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, and Wu C. Migfilin and mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell*. 2003;113: 37-47). TN-C, TSP, SPARC, Mig-2 및 ILK의 수준 변화를 조사함으로써, 정맥 분절내 SMC의 부착 상태에 대한 결론을 내릴 수 있을 것으로 판단된다. TN-C, TSP, SPARC, Mig-2 및 ILK의 세포내 국소위치를 나타내는 개략도가 도 2에 도시되어 있다.

[0018]

생체내 SMC 이동에 대한 필수조건은 주위 기질 단백질의 분해이다. 기질 금속단백분해효소(특히, MMP-1, MMP-2 및 MMP-9)는 혈관 ECM의 다양한 성분을 선택적으로 분해할 수 있다(Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon_Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, and Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circulation Research (Online)*. 1994;75(1): 181-9; Newby AC, Southgate KM, and Davies MG. Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Basic Res Cardiol*. 1994;89(Suppl 1): 59-70; Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickison T, Thompson MM, and London JM. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointima formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Vase. Surg*. 2002;36: 150-7; and Southgate KM, Davies M, Booth RF, and Newby AC. Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J*. 1992;288 (Pt 1): 93-9). MMPs는 SMC 이동을 조절함으로써 동맥 병변의 발달에 중요한 것으로 나타났다. MMPs, 이들의 활성자(MT-1 MMP)(Lafleur MA, Hollenberg MD, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G, and Edwards DR. Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2)(pro-mmp-2) by thrombin is membrane-type-mmp-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kda active species. *Biochem J*. 2001;357(Pt 1): 107-15), 및 이들의 억제자(특히, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 및 TIMP-4) 사이의 균형은 ECM 분해의 수준을 결정한다(Meng X, Mavromatis K, and Galis ZS. Mechanical stretching of human saphenous vein grafts induces expression and activation of matrix-degrading enzymes associated with vascular tissue injury and repair. *Exp MoI Pathol*. 1999;66(3): 227-37). MMPs 및 TIMPs가 변경된 혈류역학 및 혈관 손상에 대한 응답으로 IH의 초기 단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 다수의 연구를 통해 제시되었다(George SJ, Baker AH, Angelini GD, and Newby AC. Gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits metalloproteinase activity and neointima formation in human saphenous veins. *Gene Ther*. 1998;5(11): 1552-60; George SJ, Johnson JL, Angelini GD, Newby AC, and Baker AH. Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-I gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous veins. *Hum Gene Ther*. 1998;9(6): 867-77; and Lijnen HR, Soloway P, and Collen D. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 impairs arterial neointimal formation after vascular injury in mice. *Circ Res*. 1999;85(12): 1186-91). 예를 들어, 동맥 혈류역학과 함께 생체외 관류 6 시간후, MMP-2 및 MMP-9의 발현은 인간 복재 정맥을 증가시켰다(Mavromatis K, Fukai T, Tate M, Chesler N, Ku DN, and Galis ZS. Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous veins perfused ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(8): 1889-95). 인간 복재 정맥의 다른 장기 배양 연구는 동맥 조건하에서 MMP-9 생성 증가 및 MMP-2 활성 증가를 보여주었다(Porter KE, Thompson MM, Loftus IM, McDermott E, Jones L, Crowther M, Bell PR, and London NJ. Production and inhibition of the gelatinolytic matrix metalloproteinases in a human model of vein graft stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999;17(5): 404-12; Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickison T, Thompson MM, and London JM. Simvastatin inhibits human saphenous vein neointimal formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Vase. Surg*. 2002;36: 150-7; and George SJ, Zaltsman AB, and Newby AC. Surgical preparative injury and neointimal formation increase MMP-9 expression and MMP-2

activation in human saphenous veins. *Cardiovasc Res.* 1997;33(2): 447-59). 심바스타틴과 같은 광범위한 MMP 억제제는 이러한 모델에서 신생혈관내막 형성을 억제하는 것으로 나타났다(Porter KE, Naik J, Turner NA, Dickison T, Thompson MM, and London JM. Simvastatin inhibits human saphenous veins neointimal formation via inhibition of smooth muscle cell proliferation and migration. *J. Vasc. Surg.* 2002;36: 150-7 and Porter KE, Loftus IM, Peterson M, Bell PR, London NJ, and Thompson MM. Marimastat inhibits neointimal thickening in a model of human vein graft stenosis. *Br J Surg.* 1998;85(10): 1373-7).

[0019] 기계적인 힘은 상기 인자들의 직접적인 조절에 의해 SMC 탈착 및 이동에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, MMP-1 발현은 정적 상태에 비해 펄스 압력에 노출된 정맥 SMC에서 증가하였고(Redmond EM, Cahill PA, Hirsch M, Wang YN, Sitzmann JV, and Okada SS. Effect of pulse pressure on vascular smooth muscle cell migration: The role of urokinase and matrix metalloproteinase. *Thrombosis & Haemostasis.* 1999;81(2): 293-300), 반면에 MMP-2 mRNA 수준은 주기적 연신에 노출된 마우스 SMC에서 증가하였다(Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, and Schieffer B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via nad(p)h oxidase-derived reactive oxygen species. *Circulation Research.* 2003;92(11): 80-6). 인간 복재 정맥으로부터의 배양된 SMC에서, MMP-2 및 MMP-9 전사 및 단백질 수준은 단일축의 고정적 스트레인(uniaxial stationary strain)에 노출된 경우 증가하였지만, 단일축의 주기적 스트레인(uniaxial cyclic strain)에 노출된 경우 감소하였다(Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, and Galis ZS. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(5): H1778-84). 섬유아세포의 주기적 스트레인은 MT-1 MMP 수준을 증가시키고(Tyagi SC, Lewis K, Pikes D, Marcello A, Mujumdar VS, Smiley LM, and Moore CK. Stretch-induced membrane type matrix metalloproteinase and tissue plasminogen activator in cardiac fibroblast cells. *J Cell Physiol.* 1998;176(2): 374-82)[166], TIMP-1 수준을 감소시키는 것으로 나타났다(Yamaoka A, Matsuo T, Shiraga F, and Ohtsuki H. Timp-1 production by human scleral fibroblast decreases in response to cyclic mechanical stretching. *Ophthalmic Research.* 2001;33(2): 98-101). 또한, SMC 이동은 전단 응력 유도 EC 신호전달에 의해 조절되는 것으로 나타났다(Bassiouny HS, Song RH, Kocharyan H, Kins E, and Glagov S. Low flow enhances platelet activation after acute experimental arterial injury. *Journal of Vascular Surgery.* 1998;27(5): 910-8; Nakazawa T, Yasuhara H, Shigematsu K, and Shigematsu H. smooth muscle cell migration induced by shear-loaded platelets and endothelial cells. Enhanced platelet-derived growth factor production by shear-loaded platelets. *Int Angiol.* 2000; 19(2): 142-6; Powell RJ, Carruth JA, Basson MD, Bloodgood R, and Sumpio BE. Matrix-specific effect of endothelial control of smooth muscle cell migration. *Journal of Vascular Surgery.* 1996;24(1): 51-7; and Shigematsu K, Yasuhara H, Shigematsu H, and Muto T. Direct and indirect effects of pulsatile shear stress on the smooth muscle cell. *Int Angiol.* 2000; 19(1): 39-46). 기계적 힘은 상기 인자들의 직접적인 조절에 의해 SMC 탈착 및 이동에 영향을 줄 수 있다. SMC 이동은 전단 응력 유도 EC 신호전달에 의해 조절되는 것으로 나타났다(Garanich JS, Pahakis M, and Tarbell JM. shear stress inhibits smooth muscle cell migration via nitric oxide-mediated downregulation of matrix metalloproteinase-2 activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(5): H2244-52; Bassiouny HS, Song RH, Kocharyan H, Kins E, and Glagov S. Low flow enhances platelet activation after acute experimental arterial injury. *Journal of Vascular Surgery.* 1998;27(5): 910-8; Nakazawa T, Yasuhara H, Shigematsu K, and Shigematsu H. smooth muscle cell migration induced by shear-loaded platelets and endothelial cells. Enhanced platelet-derived growth factor production by shear-loaded platelets. *Int Angiol.* 2000; 19(2): 142-6; Powell RJ, Carruth JA, Basson MD, Bloodgood R, and Sumpio BE. Matrix-specific effect of endothelial control of smooth muscle cell migration. *Journal of Vascular Surgery.* 1996;24(1): 51-7; Shigematsu K, Yasuhara H, Shigematsu H, and Muto T. Direct and indirect effects of pulsatile shear stress on the smooth muscle cell. *Int Angiol.* 2000;19(1): 39-46; and Sho M, Sho E, Singh TM, Komatsu M, Sugita A, Xu C, Nanjo H, Zarins CK, and Masuda H. Subnormal shear stress-induced intimal thickening requires medial smooth muscle cell proliferation and migration. *Exp Mol Pathol.* 2002;72(2): 150-60).

[0020] 증식

[0021] 몇몇 성장 인자는 정맥 이식편의 과형성 응답에 있어서 중요한 구성요소로서 관련이 있었다. 형질전환 성장 인자 베타(TGF-β)는 특히 중요한 것으로 여겨진다. 예를 들어, 울프(Wolf) 등은 TGF-β에 대한 항체의 전신 투여가 래트 모델에서 IH의 발달을 크게 감소시켰음을 입증하였다(Wolf YG, Rasmussen LM, and Ruoslahti E.

Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest.* 1994;93(3): 1172-8). 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 및 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF)가 또한 IH 관련 SMC 증식에 관여하는 주요 인자인 것으로 보인다. 예를 들어, TGF-β는 증식을 억제하는 반면(Mi S, Ware JA, and Kent KC. transforming growth factor-beta inhibits human vascular smooth muscle cell growth and migration. *Surgery.* 1993 ;114(2): 464-70), PDGF는 배양된 SMC에서 용량 의존성 증식 응답을 야기한다(Uzui H, Lee JD, Shimizu H, Tsutani H, and Ueda T. The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cell. *Atherosclerosis.* 2000;149(1): 51-9). 자가 정맥 이식편의 사멸 세포 및 손상 세포로부터 방출된 bFGF는 SMC 증식을 촉진한다(Qian H, Zhang B, and Zhao H. [gene expression of bfgf and intimal hyperplasia of autologous vein grafts in rats]. *Zhonghua Yi Xue Za ZhL* 1996;76(11): 826-8). 증식 세포의 수 및 PDGF 전사의 mRNA 수준은 돼지의 정맥 이식편의 신생혈관내막에서 가장 높은 것으로 나타났다(Francis SE, Hunter S, Holt CM, Gadsdon PA, Rogers S, Duff GW, Newby AC, and Angelini GD. Release of platelet-derived growth factor activity from pig venous arterial grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994; 108(3): 540-8). 성장 인자가 분명히 IH에 영향을 미쳤고, MMPs가 또한 SMC 증식을 조절함으로써 동맥 병변의 발달에 중요한 것으로 나타난 반면(Southgate KM, Davies M, Booth RF, and Newby AC. Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J.* 1992;288 (Pt 1): 93-9; Cho A and Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res.* 2002;91(9): 845-51), TIMPs는 SMC의 아포토시스를 촉진하는 것으로 나타났다(Annabi B, Shedid D, Ghosn P, Kenigsberg RL, Desrosiers RR, Bojanowski MW, Beaulieu E, Nassif E, Moumdjian R, and Beliveau R. Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2002;35(3): 539-46)

[0022] IH는 SMC 증식의 증가 및 아포토시스의 증가 및 감소 모두와 연관이 있는 것으로 나타났다. 내막 아포토시스의 증가가 세포수의 증가와 연관된 상태인 IH와 연관이 있다는 것은 반-직관적인 것처럼 보일 수 있다. 그러나, 세포수의 증가가 단지 IH를 조절하는 균형에서 유일한 사건임을 유의하여야 한다. 즉, 아포토시스의 절대적인 증가가 있을 수 있지만, 세포 증식의 더 큰 증가는 세포수의 순수한 증가를 초래한다. 이러한 이유들 때문에, 증식을 평가할 때 균형의 양면(즉, 촉진 인자 및 억제 인자 모두)을 검토하는 것이 중요하다.

[0023] 증식성 세포 핵 항원(PCNA, Proliferating cell nuclear antigen) 및 말단 테옥시뉴클레오티드 전이효소-매개 dUTP-바이오틴 원위치 Nick 말단 표지화(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP-biotin in situ nick end labeling, TUNEL)는 각각 생체내(Nishibe T, Miyazaki K, Kudo F, Flores J, Nagato M, Kumada T, and Yasuda K. Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement. *Int Angiol.* 2002;21(3): 250-5) 및 시험관내(Zuckerbraun BS, McCloskey CA, Mahidhara RS, Kim PK, Taylor BS, and Tzeng E. Overexpression of mutated ikappabalpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia formation. *J Vasc Surg.* 2003;38(4): 812-9) 모두 무손상 AVG 내에서 증식성 및 아포토시스 세포를 표지하는데 사용되었다. 세포 증식 및 아포토시스는 이식술후 첫 재수 동안 정맥의 외막 및 중막 내에서 일어나는 동시적인 과정이지만, 이후 이러한 균형은 아포토시스 속도 이상으로 증가하는 증식 속도에 의해 무너진다(Nishibe T, Miyazaki K, Kudo F, Flores J, Nagato M, Kumada T, and Yasuda K. Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement. *Int Angiol.* 2002;21(3): 250-5). 재수술시 절제되는 협착된 대동맥관상동맥 바이패스 이식편의 중막 및 신생혈관내막에서의 증식 수준은 비협착 대조군 보다 상당히 높은 것으로 나타났다(Hilker M, Buerke M, Lehr HA, Oelert H, and Hake U. Bypass graft disease: Analysis of proliferative activity in human aorto-coronary bypass grafts. 2002;5 Suppl 4: S331-41).

[0024] 증가된 벽응력은 AVG IH와 관련이 있으며, 이는 아포토시스 및 SMC 증식의 기계적 조절의 직접적인 결과일 수 있다. 예를 들어, 동맥 수준의 주기적 연신에 노출된 경우, 정맥 SMC는 동맥 SMC에 비해 그의 증식을 증가시키는 것으로 나타났다(Predel HG, Yang Z, von_Segesser L, Turina M, Buhler FR, and Luscher TF. Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle. *Lancet.* 1992;340(8824): 878-9 and Dethlefsen SM, Shepro D, and D'Amore PA. Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res.* 1996;33(5): 405-13). 리우(Liu) 등은 브로모데옥시우리딘 염색 및 TUNEL 분석을 통해, 동맥 혈류역학으로 인한 기계적 연신이 세포사를 유발하고, 아마도 래트 AVG 모델에서 후속의 세포 증식을 매개할 것이라고 나타내었다(Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, and Kent KC. The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle

migration and survival but not for proliferation. Surgery. 2002;132(2): 317-25). 프레델(Predel) 등은 박동성 연신은 내유 동맥이 아닌 복재 정맥에서 SMC 증식을 자극하며, 정맥 바이패스 이식편 질환의 원인이 될 수 있다는 것을 나타내었다(Predel HG, Yang Z, von_Segesser L, Turina M, Buhler FR, and Luscher TF. Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle. Lancet. 1992;340(8824): 878-9). 정맥은 동맥 순환으로 전위된 경우, 벽내성 응력 이외에 관강내 전단 응력의 증가를 겪는다. 실제로, 배양된 SMC에 가해진 증가된 전단 응력 및 주기적 연신의 조합은 PDGF 수용체 알파를 활성화시키는 것으로 나타났다(Hu Y, Bock G, Wick G, and Xu Q. Activation of pdgf receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. Faseb J. 1998;12(12): 1135-42)[192].

[0025] 리모델링

[0026] 혈관 리모델링은 전형적으로 생체역학적 환경의 변화에 응답한 혈관의 형태 및 미세구조의 변화를 말한다. 생체역학적 항상성을 회복하기 위해(즉, 정상 수준의 전단 및 벽 응력으로 돌아가기 위해) 조직에 의한 시도로서 일어나는 것으로 여겨진다. AVG의 경우, IH는 SMC 이동 및 증식에 의해 야기된 내막 두께의 증가, 내막 아포토시스의 증가, ECM 침착 증가로 인한 내막 및 중막의 경화, 및 중막 및 외막 SMC의 비대를 포함하는 병리학적인 형태의 리모델링이다.

[0027] 혈관 세포는 콜라겐 및 엘라스틴과 같은 ECM 구성요소를 생성한다. 정맥 이식술과 관련이 있는 SMC의 표현형 변화는, I형 콜라겐 및 엘라스틴 생성의 증가에 의해 특징지어지는 ECM 합성을 변경시키는 것으로 나타났다. 동맥 바이패스 이식편으로서 사용되는 정맥은 이들의 ECM 구성요소의 변경을 거치며, 이로 인해 관강내 영역이 손실되고 최종적으로 폐색이 일어날 수 있다. 기질 합성의 변경은, 풍선 혈관성형술로 야기된 손상후 처음 1주일동안 과형성 신생혈관내막내 콜라겐 함량의 증가를 직접적으로 유도한다. 또한, 이러한 과형성 리모델링을 거치는 AVG는 신선한 정맥과 비교한 바 감소된 순응도를 나타내며, 이는 이들의 기능상실의 원인될 수 있다.

발명의 내용

[0028] IH 과정의 조기 사건을 예방하기 위한 확실한 방법을 개발하면 동맥 바이패스술의 결과를 향상시키는데 기여할 것이다. 따라서, 전형적이거나 배타적이지 않게 동종이형의 이중발생성 자가 이식술에서 동맥성 정맥 이식편 또는 임의의 관상 조직(살아있는 세포 구조)을 기계적으로 조건화하는 방법이 본원에 제공된다. 이를 달성하기 위해, 정맥, 동맥, 요도, 장, 식도, 호흡관, 기관지, 요관 및 자궁관을 포함하나 이들에 한정되지 않는 관상 조직을 랩핑(wrapping)하는 방법이 본원에 제공된다. 관상 조직은 관상 조직의 원주 둘레에 존재하는 생분해성(생체분해성 또는 생체재흡수성이라고도 함) 중합체의 제한적인 섬유 기질로 랩핑된다. 하나의 비한정적인 구체예에서, 기질은 전기방사에 의해 관상 조직 위에 침착된다. 하나의 특징의 비한정적인 구체예에서, 관상 조직은 예를 들어 동맥 바이패스술, 이를 테면 관상동맥 바이패스술에서 사용되는 복재 정맥과 같은 정맥이다.

[0029] 중합체 기질의 생체분해 속도는, 기질이 유용한 시간 기간에 걸쳐 분해되도록 조작되거나 최적화되거나 조정될 수 있다. 예를 들어, 관상동맥 바이패스의 경우, 이식편에 대한 대량의 갑작스러운 응력을 방지하기 위해 기질은 12 시간 이상에 걸쳐 용해하는 것이 바람직하다. 중합체는 목적하는 기간에 걸쳐 분해되는데, 이는 중합체 기질에 의해 제공된 기계적인 지지체가 이 기간에 걸쳐 서서히 감소되고, 정맥이 서서히 증가하는 수준의 CWS에 노출되도록 한다.

[0030] 이러한 새로운 접근법은 두 가지의 가능한 응용예를 가질 수 있다. 먼저 비한정적인 응용예의 경우, AVG로서 사용하고자 한 정맥 분절의 변형을 위한 주변-수술 도구로서 기질이 사용될 수 있다. 정맥 또는 다른 관상의 해부학적 구조의 변형은 몸에서 제거된 바로 직후 및 이식술 바로 직전에 동맥을 처리함으로써 수행되는 것으로, 동맥 바이패스 수술을 예로 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 하나의 비한정적인 예에서, 복재 정맥이 수확된 후 및 외과위가 수술 부위를 노출하는 동안, 중합체 랩은 이를 바이패스술에 사용하기 바로 직전에 정맥 위에 전기방사될 것이다.

[0031] 두 번째의 비한정적인 구체예에서, 중합체 기질은 AVG로 지지체를 전달하기 위한 신규한 운반체로서 사용될 수 있다. 시간에 따른 정맥 이식편의 기계적 환경의 변형은 그 자체로 AVG 개존성을 향상시킬 수 있지만, AVG로의 활성화제 및 생물학적(세포) 지지체의 전달은 많은 경우에 바람직함의 것으로 입증될 수 있다. 활성화제 및/또는 생물학적 제제가 혼입되는 전기방사 중합체 랩이 원하는 속도로 분해되도록 조정함으로써, 이들 지지체의 전달 속도가 조절될 수 있다.

[0032] 하나의 구체예에 따르면, 관상 조직 이식편 장치가 제공된다. 본 장치는 관상 조직, 및 상기 관상 조직 원주 둘레에 존재하는 생분해성 중합체의 제한적인 섬유 기질을 포함한다. 기질은 관상 조직의 적어도 일부(부분)의 원

주 둘레에 전형적으로 인접하거나 본질적으로 인접한다. 하나의 구체예에서, 관상 조직은 정맥에서 얻어지며(정맥이며), 예로 들지만 제한적이지 않게 정맥 관상 조직은 복재 정맥의 일부로부터 얻어진다. 다른 구체예에서, 관상 조직은 동맥, 요도, 장, 식도, 요관, 기관, 기관지 및 난관 중 하나 이상으로부터 선택된다(이들로부터 선택된 장기/조직으로부터 얻어진다). 장치의 기질은 전형적으로 12 시간 내지 2 주 범위의 시간 기간에 걸쳐 원 위치에서(이식된 경우) 생분해되는데, 이는 기질의 보조적인 성질이 그 시간 기간에 걸쳐 붕괴되는 것을 의미하는 것이지 반드시 기질이 완전히 분해되는 것을 의미하는 것은 아니다.

[0033] 하나의 구체예에서, 장치는 관상 조직 위에 중합체 섬유를 전기방사함으로써 제조된다. 중합체 섬유는 임의의 유용한 생분해성 중합체 조성물을 포함할 수 있다. 하나의 구체예에서, 아래 나타낸 섬유는 에스테르 및 우레탄 결합을 포함하는 중합체를 포함하며, 예를 들어 폴리(에스테르 우레탄)우레아를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 다른 구체예에서, 섬유는 알파-하이드록시산으로부터 유도된 중합체, 폴리락티드, 폴리(락티드-코-글리콜리드), 폴리(L-락티드-코-카프롤락톤), 폴리글리콜산, 폴리(dl-락티드-코-글리콜리드), 폴리(l-락티드-코-dl-락티드), 락톤 단량체를 포함하는 중합체, 폴리카프롤락톤, 카보네이트 결합을 포함하는 중합체, 폴리카보네이트, 폴리글리코네이트, 폴리(글리콜리드-코-트리메틸렌 카보네이트), 폴리(글리콜리드-코-트리메틸렌 카보네이트-코-디옥사논), 우레탄 결합을 포함하는 중합체, 폴리우레탄, 폴리(에스테르 우레탄)우레아, 폴리(에스테르 우레탄)우레아 엘라스토머, 에스테르 결합을 포함하는 중합체, 폴리알카노에이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리하이드록시발레레이트, 폴리디옥사논, 폴리갈락틴, 천연 중합체, 키토산, 콜라겐, 엘라스틴, 알기네이트, 셀룰로오스, 히알루론산 및 젤라틴 중 하나 이상으로부터 선택된 중합체를 포함한다. 하나의 구체예에서, 중합체 조성물은 약 25 중량% 내지 약 75 중량%의 콜라겐을 함유하는 폴리(에스테르 우레탄)우레아를 포함한다. 이러한 중합체는 또한 엘라스틴을 포함할 수 있고, 예로 들지만 이에 한정되지 않게 약 25 중량% 내지 약 75 중량%의, 콜라겐과 엘라스틴의 혼합물을 포함할 수 있으며, 여기서 콜라겐 및 엘라스틴은 하나의 구체예에 따라 대략(약) 동일량일 수 있다.

[0034] 또 다른 구체예에서, 세포 및 치료제(예, 약물, 시토키인, 화학유인물질, 항생제, 항염증제 등) 중 하나 또는 둘 다 기질에 회합한다(기질에 부착된다, 기질에 흡수된다, 기질에 흡착된다, 기질과 하나가 된다, 기질과 결합한다 등). 하나의 구체예에서, 세포는 기질에 회합되며, 예로 들지만 비한정적으로 줄기 세포, 선조(전구) 세포, 평활근 세포, 골격 근아세포, 심근 세포, 내피 세포, 내피 선조 세포, 골수 유래 중간엽 세포 및 유전자 변형 세포 중에서 선택된 세포 중 하나 이상은 기질에 회합한다. 또 다른 구체예에서, 성장 인자는 기질에 회합되며, 예로 들지만 비한정적으로 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 산성 섬유아세포 성장 인자(aFGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 간세포 성장 인자(HGF), 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 형질전환 성장 인자-베타 플레이오트로핀(pleiotrophin) 단백질, 미드카인 단백질 및 IGF-1 중 하나 이상으로부터 선택된 성장인자는 기질에 회합한다. 또 다른 구체예에서, 약물은 기질에 회합된다. 특정의 비한정적인 구체예에서, 약물은 비스테로이드성 항염증제 약물, 항생제, 항응고 인자, 면역억제제, 글루코코르티코이드, 이뮤노필린에 작용하는 약물, 인터페론, TNF 결합 단백질, 타산, 스타틴, 및 산화질소 공여체 중 하나 이상으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 약물은 NSAID, 살리실산, 인도메타신, 나트륨 인도메타신 삼수화물, 살리실아미드, 나프록센, 콜히친, 페노프로펜, 실린다, 디플루니살, 디클로페낙, 인도프로펜 나트륨 살리실아미드, 항염증 시토키인, 항염증 단백질, 스테로이드성 항염증제, 헤파린, 페박(Pebac), 에녹사프린, 아스피린, 히루딘, 플라빅스, 비발리루딘, 프라수그렐, 이드라파리녹스, 와파린, 쿠마딘, 클로피도그렐, PPACK, GGACK, 조직 플라스미노겐 활성자, 우로키나제, 스트렙토키나제, 글루코코르티코이드, 하이드로코르티손, 베타메티손, 텍사메타손, 플루메타손, 이소플루프레돈, 메틸프레드-니솔론, 프레드니손, 프레드니솔론, 트리암시놀론 아세토니드, 항혈관생성제, 플루오로우라실, 파클리탁셀, 독소루비신, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 사이클로포스파미드, 에토포시드, 페갑타니브, 루센티스, 트립토판-tRNA 합성효소, 리테인(retaane), CA4P, AdPEDF, VEGF-TRAP-EYE, AG-103958, 아바스틴(Avastin), JSM6427, TG100801, ATG3, OT-551, 엔도스타틴, 탈리도미드, 베카시주마브, 네오바스타트, 항증식제, 시롤리무스, 파클리탁셀, 페틸릴 알코올, 파르네실 전이효소 억제제, FPTIII, L744, 항증식 인자, Van 10/4, 독소루비신, 5-FU, 다우노마이신, 미토마이신, 텍사메타손, 아자티오프린, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 메토티렉세이트, 모페틸, 혈관활성 장 폴리펩티드, 항체, 이뮤노필린에 작용하는 약물, 사이클로스포린, 조타롤리무스, 에버롤리무스, 타크롤리무스, 시롤리무스, 인터페론, TNF 결합 단백질, 타산, 파클리탁셀, 도세탁셀, 스타틴, 아토르바스타틴, 로바스타틴, 심바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴, 로수바스타틴, 산화질소 공여체 또는 전구체, 안젤리 염(Angeli's Salt), L-아르기닌, 프리 베이스(Free Base), 디에틸아민 노노에이트, 디에틸아민 노노에이트/AM, Glyco-SNAP-1, Glyco-SNAP-2, (±)-S-니트로소-N-아세틸페니실라민, S-니트로소글루타티온, NOC-5, NOC-7, NOC-9, NOC-12, NOC-18, NOR-1, NOR-3, SIN-1, 염산염, 나트륨 니트로프루시드, 이수화물, 스페르민 노노에이트, 스트렙토조토신, 항생제, 아시클로비르, 아플록사신, 암피실린, 암포테리신 B, 아토바쿠온, 아지트로

마이신, 시프로플록사신, 클라리트로마이신, 클린다마이신, 클로파지민, 다프손, 디클라자릴, 독시사이클린, 에리트로마이신, 에탐부톨, 플루코나졸, 플루오로퀴놀론, 포스카르네트, 간시클로비르, 겐타미신, 이아트록코나졸, 이소니아지드, 케토코나졸, 레보플록사신, 린코마이신, 미코나졸, 네오마이신, 노르플록사신, 오픈플록사신, 파로모마이신, 페니실린, 펜타미딘, 폴리믹신 B, 피라지나미드, 피리메타민, 리파부틴, 리팜핀, 스파르플록사신, 스트렙토마이신, 설파디아진, 테트라사이클린, 토브라마이신, 트리플루오로우리딘, 트리메토프림 설페이트, Zn-피리티온, 및 은 염, 이를 테면 염화물, 브롬화물, 요오드화물 및 과요오드산염 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0035] 관상 조직의 주위(외면, 원주) 둘레에 생분해성 중합체의 섬유 기질을 침착하여 관상 조직 이식편 장치를 생성하는 단계를 포함하여, 관상 이식편(tubular graft)을 제조하는 방법이 또한 본원에 제공된다. 기질은 관상 조직의 적어도 일부(부분)의 원주 둘레에 전형적으로 인접하거나 본질적으로 인접한다. 하나의 구체예에서, 기질은 전기방사에 의해 침착된다. 상기와 같이, 기질은 전형적으로 12 시간 내지 2 주 범위의 시간 기간에 걸쳐 원위에서 생분해한다.

[0036] 하나의 구체예에서, 관상 조직은 정맥에서 얻어지며, 예로 들지만 제한적이지 않게 정맥 관상 조직은 복재 정맥의 일부로부터 얻어진다. 다른 구체예에서, 관상 조직은 동맥, 요도, 장, 식도, 요관, 기관, 기관지 및 난관 중 하나 이상으로부터 선택된다(이들로부터 선택된 장기/조직으로부터 선택된다).

[0037] 중합체 섬유는 임의의 유용한 생분해성 및 생체적합성 중합체 조성물을 포함할 수 있다. 하나의 구체예에서, 아래 나타낸 섬유는 에스테르 및 우레탄 결합을 포함하는 중합체를 포함하며, 예를 들어 폴리(에스테르 우레탄)우레아를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 다른 구체예에서, 섬유는 알파-하이드록시산으로부터 유도된 중합체, 폴리락티드, 폴리(락티드-코-글리콜리드), 폴리(L-락티드-코-카프롤락톤), 폴리글리콜산, 폴리(dl-락티드-코-글리콜리드), 폴리(l-락티드-코-dl-락티드), 락톤 단량체를 포함하는 중합체, 폴리카프롤락톤, 카보네이트 결합을 포함하는 중합체, 폴리카보네이트, 폴리글리코네이트, 폴리(글리콜리드-코-트리메틸렌 카보네이트), 폴리(글리콜리드-코-트리메틸렌 카보네이트-코-디옥사논), 우레탄 결합을 포함하는 중합체, 폴리우레탄, 폴리(에스테르 우레탄)우레아, 폴리(에스테르 우레탄)우레아 엘라스토머, 에스테르 결합을 포함하는 중합체, 폴리알카노에이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리하이드록시발레레이트, 폴리디옥사논, 폴리갈락틴, 천연 중합체, 키토산, 콜라겐, 엘라스틴, 알기네이트, 셀룰로오스, 히알루론산 및 젤라틴 중 하나 이상으로부터 선택된 중합체를 포함한다. 하나의 구체예에서, 중합체 조성물은, 다음 범위 사이의 단위를 포함하여 약 25 중량% 내지 약 75 중량%의 콜라겐을 함유하는 폴리(에스테르 우레탄)우레아를 포함한다. 이러한 중합체는 또한 엘라스틴을 포함할 수 있고, 예로 들지만 이에 한정되지 않게 약 25 중량% 내지 약 75 중량%의 콜라겐과 엘라스틴의 혼합물을 포함할 수 있으며, 여기서 콜라겐 및 엘라스틴은 하나의 구체예에 따라 대략(약) 동일량일 수 있다.

[0038] 또 다른 구체예에서, 상기 방법은 세포 및 치료제(예, 약물, 시토키인, 화학유인물질, 항생제, 항염증제 등) 중 하나 또는 둘 다 기질에 회합하는(기질에 부착되는, 기질에 흡수되는, 기질에 흡착되는, 기질과 하나가 되는, 기질과 결합하는 등) 단계를 포함한다. 하나의 구체예에서, 세포는 기질에 회합되며, 예로 들지만 비한정적으로 줄기 세포, 선조(전구) 세포, 평활근 세포, 골격 근아세포, 심근 세포, 내피 세포, 내피 선조 세포, 골수 유래 중간엽 세포 및 유전자 변형 세포 중에서 선택된 세포 중 하나 이상은 기질에 회합한다. 또 다른 구체예에서, 성장 인자는 기질에 회합되며, 예를 들지만 비한정적으로 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 산성 섬유아세포 성장 인자(aFGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 간세포 성장 인자(HGF), 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 형질전환 성장 인자-베타 플레이오토핀 단백질, 미드카인 단백질 및 IGF-1 중 하나 이상으로부터 선택된 성장인자는 기질에 회합한다. 특정의 비한정적인 구체예에서, 약물은 비스테로이드성 항염증제 약물, 항생제, 항응고 인자, 면역억제제, 글루코코르티코이드, 이뮤노필린에 작용하는 약물, 인터페론, TNF 결합 단백질, 탁산, 스타틴, 및 산화질소 공여체 중 하나 이상으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 약물은 NSAID, 살리실산, 인도메타신, 나트륨 인도메타신 삼수화물, 살리실아미드, 나프록센, 콜히친, 페노프로펜, 설린다, 디플루니살, 디클로페낙, 인도프로펜 나트륨 살리실아미드, 항염증 시토키인, 항염증 단백질, 스테로이드성 항염증제, 해파린, 페박, 에녹사프린, 아스피린, 히루딘, 플라빅스, 비발리루딘, 프라스그렐, 이드라파리누스, 와파린, 쿠마딘, 클로피도그렐, PPACK, GGACK, 조직 플라스미노겐 활성화자, 우로키나제, 스트렙토키나제, 글루코코르티코이드, 하이드로코르티손, 베타메티손, 텍사메타손, 플루메타손, 이소플루프레돈, 메틸프레드-니솔론, 프레드니손, 프레드니솔론, 트리암시놀론 아세토니드, 항혈관생성제, 플루오로우라실, 파클리탁셀, 독소루비신, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 사이클로포스파미드, 에토포시드, 페갑타니브, 루센티스, 트립토판-*t*RNA 합성효소, 리테인, CA4P, AdPEDF, VEGF-TRAP-EYE, AG-103958, 아바스틴, JSM6427, TG100801, ATG3, OT-551, 엔도스타틴, 탈리도미드, 베카시주마브, 네오바스타트, 항증식제, 시롤리무스, 파클리탁셀, 페틸릴 알코올, 파르네실 전이효소 억제

제, FPTIII, L744, 항중식 인자, Van 10/4, 독소루비신, 5-FU, 다우노마이신, 미토마이신, 텍사메타손, 아자티오프린, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 메토틱렉세이트, 모페딜, 혈관활성 장 폴리펩티드, 항체, 이뮤노필린에 작용하는 약물, 사이클로스포린, 조타롤리무스, 에버롤리무스, 타크롤리무스, 시롤리무스, 인터페론, TNF 결합 단백질, 탁산, 파클리탁셀, 도세탁셀, 스타틴, 아토르바스타틴, 로바스타틴, 심바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴, 로수바스타틴, 산화질소 공여체 또는 전구체, 안젤리 염, L-아르기닌, 프리 베이스, 디에틸아민 노노에이트, 디에틸아민 노노에이트/AM, Glyco-SNAP-1, Glyco-SNAP-2, (±)-S-니트로소-N-아세틸페니실라민, S-니트로소글루타티온, NOC-5, NOC-7, NOC-9, NOC-12, NOC-18, NOR-1, NOR-3, SIN-1, 염산염, 나트륨 니트로프루시드, 이수화물, 스페르민 노노에이트, 스트렙토조토신, 항생제, 아시클로비르, 아플록사신, 암피실린, 암포테리신 B, 아토바쿠온, 아지트로마이신, 시프로플록사신, 클라리트로마이신, 클린다마이신, 클로파지민, 다프손, 디클라자릴, 독시사이클린, 에리트로마이신, 에탐부톨, 플루코나졸, 플루오로퀴놀론, 포스카르네트, 간시클로비르, 겐타미신, 이아트록코나졸, 이소니아지드, 케토코나졸, 레보플록사신, 린코마이신, 미코나졸, 네오마이신, 노르플록사신, 오픈록사신, 파로모마이신, 페니실린, 펜타미딘, 폴리믹신 B, 피라지나미드, 피리메타민, 리파부틴, 리팜핀, 스파르플록사신, 스트렙토마이신, 설파디아진, 테트라사이클린, 토브라마이신, 트리플루오로우리딘, 트리메토프림 설페이트, Zn-피리티온, 및 은 염, 이를 테면 염화물, 브롬화물, 요오드화물 및 과요오드산염 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0039] 또 다른 구체예에서, 정맥 및 상기 정맥의 원주 둘레에 인접하는 생분해성 중합체의 제한적인 섬유 기질을 포함하는 관상 조직 이식편 장치로 관상동맥을 바이패스하는 단계를 포함하는 심장 바이패스 방법이 제공된다. 인접하는 생분해성 중합체 기질은 위에 개시되었거나 본 명세서 전체에 걸쳐 개시된 임의의 기질이며, 위에 개시된 바와 같은 추가의 치료제를 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1: 내막 과형성 진행의 개략도. 주: IEL, 내탄성층; SMC, 평활근 세포. 문헌[Robbins Pathologic Basis of Disease, 1999(Kumar V, Fausto N, and Abbas A. Robbins & coltran pathologic basis of disease. Saunders. 2004)]에 적응시킨 이미지.

도 2: 테나신-C(TN-C), 트롬보스폰딘-1,2(TSP), 시스테인이 풍부한 산성의 분비 단백질(SPARC), 미토젠 유도 유전자 2(Mig-2) 및 인테그린 결합 키나제(ILK)의 국소위치화를 나타내는 개략도. 주: ECM, 세포외기질; α 및 β, 인테그린.

도 3: 폐쇄-루프 관류/장기 배양 시스템 중 하나의 개략도. 루프는 박동 압력 및 혈류를 제공하는 Biomedicus 원심 펌프(A), 열교환기(D), 조직용 챔버(C), 근위부(B1) 및 원위부(B2) 압력 변환기, 가변저항밸브(E), 혈류 프로브(F), 수집물 저장기(G) 및 혈관 바이패스(H)로 이루어진다. 도시되지 않는 구성요소로는 외막 육조 루프(adventitial bath loop), He-Ne 레이저 마이크로미터 및 데이터 획득 시스템이 포함된다. 문헌(Labadie (1996) et al. for more detail (Labadie, R.F., J.F. Antaki, J.L. Williams, S. Katyal, J. Ligush, S. C. Watkins, S. M. Pham, and H.S. Borovetz, "Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue", American Journal of Physiology, 1996. 270(2 Pt 2): p. H760-8)을 참조할 수 있다.

도 4: 돼지 내경정맥 정맥 분절의 압력 대 직경 응답.

도 5: 상부의 세 패널은 기준 대조군(baseline control)(BASE), "정맥" 48 시간 관류된 대조군(정맥) 및 "동맥" 48 시간 관류된 (동맥) 돼지 내경정맥 정맥 분절의 관내강에 대한 대표적인 주사 전자현미경 이미지를 나타낸다. 조약돌 모양의 무손상 내피 세포층. 두 번째 열의 패널은 각 군의 H&E 염색을 통한 대표적인 미세구조 및 생존 핵을 나타낸다(200× 확대). 세 번째 열의 패널은 각 조직 군내의 대표적인 생존(본래 녹색) 및 사멸(본래 적색) 세포를 나타낸다(200× 확대). BASE 대조군 조직과 비교한 경우 관류된 조직에서 증가된 수준의 괴사를 보이지 않았음을 유념하라. 하부의 세 패널은 동일한 48 시간 관류 실험으로부터의 취한 조직에 대한 대표적인 TUNEL 분석 이미지를 나타낸다(침지유하에 400× 확대). BASE와 비교한 경우 관류된 조직에서 증가된 수준의 아포토시스를 보이지 않았음을 유념하라. 모든 패널에서, 화살표는 혈관 내강을 가리킨다.

도 6: VEN 대 ART 생체의 관류 실험을 나타낸 개략도.

도 7: ART 대 cART 생체의 관류 실험을 나타내는 개략도.

도 8: ART 대 wART 생체의 관류 실험을 나타내는 개략도.

도 9: 정맥/랩 복합체의 횡단면도를 나타내는 개략도.

도 10: 종점 분석(endpoint analysis)을 위한 관류후 정맥 분절 처리의 개략도. 제시된 길이는 무부하(unloaded) 혈관 정지 길이를 나타낸다.

도 11: 위장(sham) 및 방사(spun) PIJV 모두에 대한 PIJV의 정규화된 외경 응답. 방사(wART) 및 위장 대조군 PIJV 모두 120/80 mmHg 압력 및 100 ml/분 평균 유속의 ART 조건하에서 관류시켰다. 방사 정맥(N=7)의 정규화 직경이 위장 대조군(N=5)과 비교했을 때 현저히 감소되었음을 유념하기 바란다. 가압 외경(ODp)을 비가압 외경(ODup)으로 정규화하고, 데이터를 평균±표준오차로서 나타내었다.

도 12: 표 1의 각각의 조합에 대한 전기방사 중합체 랩핑 PIJV 분절의 24 시간 생체의 관류로부터의 결과 대 CWS. 아래 쪽 수평의 점선은 정맥 조건(CWS₀ 약 25 KPa)하에 랩핑되지 않은 정맥에서 측정된 평균 CWS 수준을 가리키고,中间的 수평의 점선은 관상동맥(약 120 KPa)에서의 평균 CWS를 가리킨다(Labadie RF, et al. Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue. Am J Physiol. 1996;270(2 Pt 2): H760-8). 윗 쪽의 점선은 ART 조건하에 랩핑되지 않은 정맥(위장 대조군)에서 측정된 평균 CWS를 나타낸다. 사용부호의 설명에서, ET는 전기방사 시간을 의미한다. 모든 CWS 값은 CWS₀로 정규화하였다. 데이터는 평균±표준오차로서 나타내었다.

도 13: 방사 및 위장 대조군 PIJV 분절 둘 다를 자극하기 위해 에피네프린(EPI, epinephrine) 및 나트륨 니트로프루시드(SNP, sodium nitroprusside)를 사용하여 취득된 대표적인 혈관운동 유발 결과. EPI로 자극후 조직의 자연스러운 이완이 관찰되었을 때 즉시 SNP가 투여된 것을 유념하기 바란다. 즉, (EPI에 의한 자극후) 조직의 자연스러운 이완이 관찰된 경우에 따라, 위장 및 방사 PIJV에 대해 상이한 시간에 SNP를 투여하였다. 실험 기간에 걸쳐 PIJV 분절 각각에 대한 외경 측정값은 최초 용량의 EPI를 투여하기 전에 측정된 표준 외경으로 정규화하였다.

도 14: 혈관운동 쉐던지 실험의 결과(N=4). 위장 대조군 및 방사 PIJV 사이의 수축 또는 확장 수준에서 유의차는 없는 것으로 나타났다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다.

도 15: 24 시간에 걸쳐 위장(a & c) 및 방사(b & d) PIJV에 대한 순응도 및 β-경직도를 계산한 결과. 데이터는 평균±표준오차로서 나타내었다.

도 16: 관류전 및 랩핑 절차후(A,C) 및 생체의 관류 24 시간후(B,D) 모두에 대한 H&E(A,B) 및 매슨 트리크롬(Masson's trichrome) 이미지(C,D). 관류 이전 균일한 두께의 중합체 랩 및 관류후 중합체 랩의 부재 이미지이다. 일방향 화살표는 혈관 내강을 가리킨다. (A) 및 (C)의 양방향 화살표는 중합체 랩의 두께를 가리키는데, (B) 또는 (C)에서는 검출불가능했다.

도 17: 피크로시리우스 레드(picrosirius red)(본래 색)로 염색한 정맥 절편의 대표적인 복굴절 이미지. 실험 조건은 다음과 같이 정의된다: 압력 20 mmHg 및 유속 20 ml/분의 정맥 (VEN) 조건; 압력 120/80 mmHg 및 평균 유속 100 ml/분의 박동성 동맥 (ART) 조건; 및 랩핑된 정맥 분절을 생체외에서 24 시간동안 ART 조건하에 관류시킨 랩핑 동맥 (wART) 조건. 화살표는 혈관 내강을 가리킨다.

도 18: 정맥 조직 절편의 모벳 펜타크롬(Movat's pentachrome) 염색(본래 색). 각 이미지에서, 콜라겐은 황색으로 염색되고, 엘라스틴 및 핵은 흑색으로 염색되고, 근육은 적색으로 염색된다. wART 절편 중 외막쪽의 적색 염색은 생체의 관류 실험 동안 중합체내에 포착되는 배양 배지 단백질의 비특이적 염색이다. 화살표는 혈관 내강을 가리킨다.

도 19: (A)는 그의 외막 표면에 전기방사 중합체가 침착된 PIJV 분절의 저배율 SEM 이미지를 나타낸다. (B)는 중합체 랩이 적용된 PIJV 외막 표면에 대한 SEM 이미지(500× 확대)이다. 주: 다공성이 큰 중합체 랩. (C)는 정맥에 대한 중합체 랩의 부착을 나타내는 SEM 이미지(500× 확대)이다. (D)는 정맥의 관강내 표면의 SEM 이미지(500× 확대)이며, 무손상으로 보이는 연속적인 내피층을 나타낸다.

도 20: 전기방사후 및 전기방사후 정치 배양 18시간 및 92 시간후 PIJV 내 괴사의 수준을 평가하기 위한 정량적인 Live/Dead™ 결과. 도시된 데이터는 단일 실험에 대한 것이고, 오차 막대는 각 PIJV 분절에 대해 분석된 10 개의 시야로부터 생성된다. 데이터는 평균±표준오차로서 나타내었다.

도 21: 형광 기초 TUNEL 분석으로부터의 대표적인 면역조직화학적 이미지(본래 색). 윗 쪽의 두 패널은 24-시간 VEN(A) 대 ART(B) 실험으로부터 얻은 것이다. 다음의 두 번째 패널은 24-시간 ART(C) 대 cART(D) 실험으로부터

얻은 것이다. 세 번째 열의 패널은 72-시간 ART(E) 대 cART(F) 실험으로부터 얻은 것이다. 아래쪽의 두 패널은 24-시간 ART(G) 대 wART(H) 실험으로부터 얻은 것이다. 화살표는 아포토시스 세포를 가리킨다. L은 PIJV 내강을 가리킨다.

도 22: 생체의 혈관 관류 실험 모두로부터 PIJV내 아포토시스 세포의 비율을 평가하기 위한 형광 기초 TUNEL 분석으로부터의 정량적 면역조직화학적 결과. 데이터는 평균±표준오차로서 나타내었다.

도 23: HRP/ABC 기초 PCNA 분석으로부터의 대표적인 면역조직화학적 이미지(본래 색). 윗 쪽의 두 패널은 24-시간 VEN(A) 대 ART(B) 실험으로부터 얻은 것이다. 다음의 두 번째 패널은 24-시간 ART(C) 대 cART(D) 실험으로부터 얻은 것이다. 세 번째 열의 패널은 72-시간 ART(E) 대 cART(F) 실험으로부터 얻은 것이다. 아래쪽의 두 패널은 24-시간 ART(G) 대 wART(H) 실험으로부터 얻은 것이다. 화살표는 증식 세포를 가리킨다. L은 PIJV 내강을 가리킨다.

도 24: 생체의 혈관 관류 실험 모두로부터 PIJV내 증식 세포의 비율을 평가하기 위한 HRP/ABC 기초 PCNA 분석으로부터의 정량적 면역조직화학적 결과. 데이터는 평균±표준오차로서 나타내었다.

도 25: HRP/ABC 기초 골지 복합체 분석으로부터의 대표적인 면역조직화학적 이미지(본래 색). 윗 쪽의 두 패널은 24-시간 VEN(A) 대 ART(B) 실험으로부터 얻은 것이다. 다음의 두 번째 패널은 24-시간 ART(C) 대 cART(D) 실험으로부터 얻은 것이다. 세 번째 열의 패널은 72-시간 ART(E) 대 cART(F) 실험으로부터 얻은 것이다. 아래쪽의 두 패널은 24-시간 ART(G) 대 wART(H) 실험으로부터 얻은 것이다. 화살표는 양으로 염색된 세포를 가리킨다. L은 PIJV 내강을 가리킨다.

도 26: 생체의 혈관 관류 실험 모두로부터 PIJV내 골지 복합체에 대해 양으로 염색된 세포의 비율을 평가하기 위한 HRP/ABC 기초 골지 복합체 발현 분석으로부터의 정량적 면역조직화학적 결과. 데이터는 평균±표준오차로서 나타내었다.

도 27: 좌측 - 전기방사 공정 동안 랩핑된 PIJV 분절. 중앙 - 본원에 제시된 바와 같이 목동맥 삽입 이식편으로서 이식된 랩핑된 PIJV. 우측 - 랩핑되지 않은 PIJV 이식편. PIJV(B)는 랩핑되지 않은 정맥(C)과 마찬가지로 동맥 압력하에 확장되지 않음을 유의하기 바란다.

도 28: 방사 및 위장 AVG 모두로부터의 형광투시 혈관조영술 이미지.

도 29: IH의 형태학적 측정에 사용되는 대표적인 모뱃 펜타크롬 염색 이미지(본래 색). 내막 대 중막 두께의 비는 상기 방정식을 사용하여 계산되었다.

도 30: IH의 형태학적 측정으로부터의 정량적인 결과의 요약. $P < 0.05$ 는 통계학적으로 유의적인 것으로 고려되었다. 단지 통계학적 유의성에 대한 경향만이 관찰되었음을 유의하기 바란다.

도 31: AVG가 폐색되지 않은 두 가지 생체내 시험으로부터의 저배율(30×) SEM 이미지. A 및 B는 이식편이 확실히 개존성인 실험으로부터 얻은 것이다. C 및 D는 이식편이 단지 부분적으로 폐색된 실험으로부터 얻은 것이다. 이들 이미지는 정맥 이식편과 목동맥 사이의 문합부 계면을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 전형적이거나 배타적이지 않게 동종이형의 이중발생성 자가 이식술에서 동맥성 정맥 이식편 또는 임의의 관상 조직을 기계적으로 조절하는 방법이 본원에 제공된다. 이를 달성하기 위해, 정맥, 동맥, 요도, 장, 식도, 호흡관, 기관지, 요관 및 자궁관을 포함하나 이들에 한정되지 않는 관상 조직을 랩핑(wrapping)하는 방법이 본원에 제공된다(전체 구조 또는 실질적으로 전체 구조를 사용할 지는 하나의 선택권이지만, 이들 조직 중 임의의 부분이 이식편을 위해 공급하는 것을 의미하는 것이지 모든 언급된 해부학적 구조가 이식편 목적을 위해 사용되는 것을 시사하는 것은 아니다. 따라서, 관상 조직이 정맥, 이를 테면 복재 정맥으로 언급된 경우, 이는 모든 복재 정맥이 사용되어야 하는 것을 의미하는 것이 아니다). 구조는 관상 조직의 원주 둘레에 존재하는 생분해성 중합체의 제한적인 섬유 기질로 랩핑된다. 본원에 개시된 바와 같이 "섬유"는 길게 늘어나고, 가느다라며, 길게 늘어나고, 실과 같고/같거나 섬유상 구조이다. "기질"은 정연하거나(예, 직물 또는 부직포 메쉬에서) 랜덤하게 배열된(전형적으로 전기방사에 의해 생성된 섬유의 매트에 있는 전형적임) 요소의 임의의 이차원 또는 삼차원 배열이다.

[0042] 기질은 전형적으로 관상 조직의 원주 둘레에 실질적으로 또는 본질적으로 인접하는데, 이는 기질이 반드시 관상 조직의 전체 표면(예를 들어, 길이)일 필요는 없고 관상 조직의 일부 원주 둘레에 및 표면에 연속적이고 지지하

는 환(ring)을 형성한다는 것을 의미한다. 기질은 "제한적"인데, 이는 기질이 관상 조직의 외면과 실질적으로 접촉하며, 이식되었을 때 관상 조직의 원주방향으로의 상당한 확장을 제한, 방해 및/또는 방지하는 것을 의미한다. 기질에 의한 제한 정도는 전형적으로 전형적인 동맥 압력하에서 관상 조직이 실질적으로 그 조직의 최대 팽창 직경으로 팽창하는 것을 방지한다는 것이다(예를 들어 도 4를 참조할 수 있다). 기질은 제한적인 한 탄력적일 수 있다. 기질이 생분해성인 경우, 기질이 분해하기 때문에 기질의 제한적인 성질은 시간이 경과함에 따라 감소한다.

[0043] 하나의 비한정적인 구체예에서, 기질은 전기방사에 의해 관상 조직, 이를 테면 관상의 해부학적 구조 또는 장기 위에 침착된다. 하나의 특정의 비한정적인 구체예에서, 해부학적 구조는 예를 들어 관상동맥 바이패스술과 같은 동맥 바이패스술에 사용되는 정맥, 이를 테면 복제 정맥이다.

[0044] 관상 조직의 표면에 미세 섬유를 침착하는 임의의 유용한 방법이 사용될 수 있지만, 전기방사가 이러한 표면에 실질적으로 균일한 섬유를 침착하는 유용한 방법이다. 전기방사는 자연 세포외기질(ECM)의 비늘모양 및 섬유상 성질을 닮은 스캐폴드의 제조를 허용한다. ECM은 섬유, 기공, 및 서브미크론 및 나노미터 크기의 다른 표면 성질(feature)로 구성된다. 이러한 성질은 이동 및 배향과 같은 합성 물질과의 세포간 상호작용에 영향을 준다. 전기방사는 또한 고유 비등방성을 가진 스캐폴드를 생성하도록 배향 섬유의 제작을 허용한다. 이들 정렬된 스캐폴드는 세포 성장, 형태 및 ECM 생성에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 슈(Xu) 등은 폴리(L-락티드-코-ε-카프롤락톤) 섬유를 가진 평활근 세포(SMC) 정렬을 발견하였고(Xu C.Y., Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S., "Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential for vessel engineering", *Biomaterials* 2004 (25) 877-86), 리(Lee) 등은 기계적인 자극에 대한 정렬된 비생체분해성 폴리우레탄을 제안하였고, 무작위적으로 조직화된 스캐폴드위의 것보다 더 많은 ECM을 생성하는 정렬된 스캐폴드위의 배양 세포를 발견하였다(Lee C.H., Shin H.J., Cho I.H., Kang Y.M. Kim I.A., Park K.D., Shin, J.W., "Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast", *Biomaterials* 2005 (26) 1261-1270).

[0045] 일반적으로, 전기방사 공정은 중합체-함유 유체(예를 들어, 중합체 용액, 중합체 현탁액 또는 중합체 용융액)를 바늘 또는 피펫 팁 및 계량 펌프와 같은 작은 오리피스를 구비한 저장기에 배치하는 단계를 포함한다. 고전압원 중 하나의 전극은 또한 중합체-함유 유체 또는 오리피스와 전기적으로 접촉한 상태로 배치되고, 다른 전극은 표적(전형적으로 컬렉터 스크린 또는 회전 맨드릴(rotating mandrel))과 전기적으로 접촉한 상태로 배치된다. 전기방사동안, 중합체-함유 유체는 용액 또는 오리피스에의 고전압(예를 들어, 약 3-15 kV) 인가에 의해 충전된 다음, 일정한 흐름을 제공하는 계량 펌프에 의해 작은 오리피스를 통해 강제배출된다. 오리피스에서 중합체-함유 유체는 보통 표면 장력으로 인해 반구 형상을 가지지만, 고전압의 인가로 인해 오리피스에서 다른 반구 형상의 중합체-함유 유체가 길게 연장되어 테일러 콘(Taylor cone)으로서 공지된 원뿔 형상을 형성한다. 중합체-함유 유체 및/또는 오리피스에 매우 높은 전압이 인가되면, 충전된 중합체-함유 유체의 정전기적 반발력이 표면 장력을 극복하고, 충전된 유체의 분사물이 테일러 콘의 팁으로부터 배출되어 표적을 향해 가속되며, 전형적으로 -2 내지 -10 kV 바이어스된다. 임의로, 인가 바이어스(예, 1-10 kV)를 가진 초점 링(focusing ring)을 사용하여 충전된 중합체-함유 유체의 분사물의 궤도를 안내한다. 충전된 유체의 분사물은 바이어스 표적을 향하여 이동함에 따라, 복잡한 휘핑 및 굽힘 운동을 겪게 된다. 유체가 중합체 용액 또는 현탁액이면, 용매는 전형적으로 비행중 증발하게 되어, 바이어스 표적위에는 중합체 섬유가 남게 된다. 유체가 중합체 용융물이면, 용융 중합체는 비행중 냉각 및 고체화되고 바이어스 표적 위에 중합체 섬유로서 수집된다. 중합체 섬유가 바이어스 표적에 축적됨에 따라, 바이어스 표적위에는 다공성의 부직포 메쉬(기질)가 형성된다.

[0046] 전기방사된 엘라스토머 기질의 특성은 전기방사 조건을 변화시킴으로써 조절될 수 있다. 예를 들어, 바이어스 표적이 오리피스에 비교적 가까운 경우, 생성된 전기방사 메쉬는 섬유의 일부 영역에서 "비드모양(bead-like)"의 외관을 가지는 것과 같은 평탄하지 않은 두꺼운 섬유를 포함하는 경향이 있다. 그러나, 바이어스 표적이 오리피스에서 더 멀리 이동함에 따라, 부직포 메쉬의 섬유는 그 두께가 더욱 균일해지는 경향이 있다. 또한, 바이어스 표적은 오리피스에 비례하여 이동될 수 있다. 특정의 구체예에서, 바이어스 표적은 부직포 메쉬의 섬유가 실질적으로 서로 평행한 것과 같이 규칙적인 주기 방식으로 전후로 이동한다. 이러한 경우에, 생성된 부직포 메쉬는 섬유에 수직인 방향에 비해 섬유에 평행한 방향의 스트레인에 대해 더 큰 내성을 가질 수 있다. 다른 구체예에서, 부직포 메쉬면의 스트레인에 대한 내성이 비등방성이므로, 바이어스 표적은 오리피스에 대해 무작위적으로 이동한다. 표적은 또한 회전 맨드릴일 수 있다. 이경우에, 부직포 메쉬의 특성은 회전 속도를 변화시킴으로써 변환될 수 있다. 전기방사된 엘라스토머 스캐폴드의 특성은 또한 전기방사 시스템에 인가되는 전압 크기의 변환에 의해 변화될 수 있다. 하나의 바람직한 구체예에서, 전기방사 장치는 12 kV로 바이어스된

오리피스, -7 kV로 바이어스된 표적 및 3 kV로 바이어스된 초점 링을 포함한다. 또한, 유용한 오리피스 직경은 0.047"(I.D.)이고, 유용한 표적 거리는 약 23 cm이다. 중합체 현탁액 또는 용융물에 인가되는 고전압의 유용한 범위는 0.5-30 kV, 더욱 바람직하게는 5-25 kV, 더욱더 바람직하게는 10-15 kV이다.

- [0047] 전기방사는 둘 이상의 노즐을 사용하여 수행될 수 있는데, 여기서 각각의 노즐은 상이한 중합체 용액의 공급원이다. 생성된 부직포 중합체 메쉬의 물리적 및 화학적 특성을 맞추기 위해 노즐은 상이한 바이어스 또는 동일한 바이어스로 바이어스될 수 있다. 추가로, 많은 상이한 표적이 사용될 수 있다. 평판형 표적이외에, 맨드릴이 표적으로서 사용될 수 있다.
- [0048] 중합체 현탁액을 사용하여 전기방사를 수행하는 경우, 현탁액 중 중합체 성분의 농도를 또한 변화시켜 엘라스토머 스키펴의 물리적 특성을 변경시킬 수 있다. 예를 들어, 중합체 성분이 비교적 낮은 농도로 존재하는 경우, 전기방사된 부직포 메쉬의 생성된 섬유는 중합체 성분이 비교적 높은 농도로 존재하는 경우보다 작은 직경을 가진다. 이러한 이론에 의해 제한시키고자 하는 의도없이, 더 낮은 농도의 용액이 더 낮은 점도를 가지며, 오리피스를 통해 더 빠르게 흐르게 하여 더 얇은 섬유를 생성하는 것으로 여겨진다. 당업자라면 목적하는 특징의 섬유를 얻기 위해 중합체 농도를 조절할 수 있다. 중합체 성분에 대한 유용한 농도 범위는 약 1 중량% 내지 약 15 중량%, 약 4 중량% 내지 약 10 중량%, 및 약 6 중량% 내지 약 8 중량%이다.
- [0049] 사용시, 맨드릴은 관상 조직, 이를 테면 정맥의 안쪽에 배치되고, 중합체 섬유가 맨드릴의 회전에 의해 조직의 적어도 일부의 원주 둘레에 침착된다. 맨드릴은 관상 조직의 피복률을 증가시키기 위해 방적돌기(spinneret)와 컬렉터 사이에서 종방향으로 왕복운동할 수 있다.
- [0050] 기질의 두께는 침착될 중합체 조성물의 점도를 조정하고/하거나 전기방사 시간을 조정함으로써 조절될 수 있다. 점도가 더 큰 중합체 조성물을 사용하면 더 두꺼운 섬유가 생성될 수 있으며, 목적하는 두께의 기질을 침착하기 위해 적은 시간이 소요된다. 기질 및 기질내 섬유의 두께는 기질의 생분해 속도에 영향을 미친다. 목적하거나 최적의 생리학적 효과를 달성하기 위해 기질의 최종-용도에 따라 이들 파라미터가 최적화된다.
- [0051] 기질이 유용한 시간 기간에 걸쳐 분해되도록 중합체 기질의 생분해 속도는 조작되거나 최적화되거나 조정될 수 있다. 예를 들어, 관상동맥 바이패스의 경우, 기질은 이식편에 대량의 갑작스러운 응력을 방지하기 위해 12 시간 이상에 걸쳐 용해하는 것이 바람직하다. 중합체 기질에 의해 제공된 기계적 지지체가 상기 기간에 걸쳐 서서히 감소되고 정맥이 CWS의 수준을 서서히 증가시키도록 노출되도록, 중합체는 목적하는 시간 기간에 걸쳐 분해된다.
- [0052] 이러한 새로운 접근법은 두 가지의 가능한 응용예를 가질 것이다. 먼저 비한정적인 응용예의 경우, AVG로서 사용하고자 한 정맥 분절의 변형을 위한 주변-수술 도구로서 기질이 사용될 수 있다. 정맥 또는 다른 관상의 조직 또는 해부학적 구조의 변형은 몸에서 제거된 바로 직후 및 이식술 바로 직전에 예로 들지만 이에 한정되지 않는 동맥 바이패스 수술 동안 수행될 수 있다. 하나의 비한정적인 예에서, 복재 정맥이 수확된 후 및 외과외과가 수술(이식편) 부위를 노출하는 동안, 중합체 랩은 이를 바이패스술에 사용하기 바로 직전에 정맥 위에 전기방사될 것이다.
- [0053] 두 번째의 비한정적인 구체예에서, 중합체 기질은 AVG로 지지체를 전달하기 위한 신규한 운반체로서 사용될 수 있다. 시간에 따른 정맥 이식편의 기계적 환경의 변형은 그 자체로 AVG 개존성을 향상시킬 수 있지만, AVG로의 활성화 및 생물학적(세포) 지지체의 전달은 많은 경우에 바람직한 것으로 입증되었다. 활성화 및/또는 생물학적 체제가 혼입되는 전기방사 중합체 랩을 원하는 속도로 분해하도록 조정함으로써, 이들 지지체의 전달 속도가 조절될 수 있다.
- [0054] AVG에 지지체를 전달하기 위해 랩을 혈관주변에 배치하는 이전 방법에는 임상 해석에 대한 속도-제한적 장벽이 있었고, 전기방사된 생체분해성 중합체를 사용하는 본원에 개시된 접근법은 이러한 제한점을 해소한다.
- [0055] 정맥 이식편 주위의 외부 피포(external sheath)의 사용은 먼저 파르소네트(Parsonnet) 등에 의해 개시되었다. 이들은 상기 피포의 확장을 방지하였는데, 이것은 숙주 조직에 널리 용인되었으며, 지지된 혈관 및 지지되지 않은 혈관 사이에 인장 강도의 차이가 없었음을 제시하였다(Parsonnet V, Lari AA, and Shah IH. New stent for support of veins in arterial grafts. Arch Surg. 1963;87: 696-702). 카라야나코스(Karayannacos) 등은 지지되지 않은 대조군 이식편에 비해 다크론(Dacron) 메쉬 피포가 느슨하거나 단단하게 부착된 AVG에서 감소된 혈전증 및 내피하 증식을 보여주었다(Karayannacos PE, Hostetler JR, Bond MG, Kakos GS, Williams RA, Kilman JW, and Vasko JS. Late failure in vein grafts: Mediating factors in subendothelial fibromuscular hyperplasia. Ann Surg. 1978;187(2): 183-8). 메타(Mehta) 등은 외부의 비제한적인 마크로다공성 폴리에스테

르 스텐트의 배치에 의해 돼지 정맥 이식편에서 신생혈관내막 형성이 감소되었음을 입증하였다(Mehta D, George SJ, Jeremy JY, Izzat MB, Southgate KM, Bryan AJ, Newby AC, and Angelini GD. External stenting reduces long-term medial and neointimal thickening and platelet derived growth factor expression in a pig model of arteriovenous bypass grafting. *Nat Med.* 1998;4(2): 235-9). 보다 최근에, 폴리테트라플루오로에틸렌 피포가 동맥 압력하 확장으로부터 AVG를 영구적으로 제한하기 위해 사용되었고, 이것은 돼지 모델에서 IH 형성을 감소시켰다(Liu SQ, Moore MM, Glucksberg MR, Mockros LF, Grotberg JB, and Mok AP. Partial prevention of monocyte and granulocyte activation in experimental vein grafts by using a biomechanical engineering approach. *J Biomech.* 1999;32(11): 1165-75).

[0056]

AVG에 대한 영구적인 기계적 지지체의 임상적 해석은 아직 보고된 바 없는데, 이는 혈관 응용예에서 생체내구성 합성 물질에 대한 불리한 염증성 응답으로 인한 가능성때문일 것이 가장 높다(Bunt TJ. Synthetic vascular graft infections. I. Graft infections. *Surgery.* 1983;93(6): 733-46 and Edwards WH, Jr., Martin RS, 3rd, Jenkins JM, Edwards WH, Sr., and Mulherin JL, Jr. Primary graft infections. *J Vasc Surg.* 1987;6(3): 235-9). 이러한 제한점이 비자얀(Vijayan) 등과 제레미(Jeremy) 등으로 하여금 AVG에서 IH를 감소시키는데 폴리글락틴 기초 생체분해성 피포를 사용하도록 자극하였다(Jeremy JY, Bulbulia R, Johnson JL, Gadsdon P, Vijayan V, Shukla N, Smith FC, and Angelini GD. A bioabsorbable (polyglactin), nonrestrictive, external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 127(6): 1766-72; Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, and Jeremy JY. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg.* 2004;40(5): 1011-9; and Vijayan V, Smith FC, Angelini GD, Bulbulia RA, and Jeremy JY. External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;24(1): 13-22). 주목되는 유의한 효과로는 램핑되지 않은 대조군에서 신생-맥관혈관벽 발달의 향상이 포함된다(Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, and Jeremy JY. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg.* 2004;40(5): 1011-9). 그러나, 이들 생체분해성 피포는 느슨하게 부착되어 있어, 동맥 압력하에서 AVG를 그의 최대 직경으로 확장시키며, CWS 수준 증가에 대하여 기계적 지지체를 제공하지 않았다. 비자얀(Vijayan) 등(Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, and Jeremy JY. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *J Vasc Surg.* 2004;40(5): 1011-9 and Vijayan V, Smith FC, Angelini GD, Bulbulia RA, and Jeremy JY. External supports and the prevention of neointima formation in vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;24(1): 13-22) 및 제레미(Jeremy) 등(Jeremy JY, Bulbulia R, Johnson JL, Gadsdon P, Vijayan V, Shukla N, Smith FC, and Angelini GD. A bioabsorbable (polyglactin), nonrestrictive, external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 127(6): 1766-72)에 의해 사용된 접근법 이전에, 휴인(Huynh) 등은 토끼 정맥 이식편에서 IH 형성을 감소시키기 위해 임시적인 외부 콜라겐 관 지지체를 사용하였다. 이들 콜라겐 관 또한 비제한적이며, 분해 동력학에 대한 어떠한 언급도 보고된 바 없다(Huynh TT, Iaccarino G, Davies MG, Safi HJ, Koch WJ, and Hagen PO. External support modulates g protein expression and receptor coupling in experimental vein grafts. *Surgery.* 1999;126(2): 127-34). 전기방사된 가교결합 콜라겐은 수용액에서 매우 빠르게 분해되며(Rho KS, Jeong L, Lee G, Seo BM, Park YJ, Hong SD, Roh S, Cho JJ, Park WH, and Min BM. Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials.* 2006;27(8): 1452-61), 따라서 콜라겐으로만 만들어진 피포에 의해 AVG에 제공된 구조적 지지체는 너무 임시적이어서 장기간에 걸쳐 효과적일 수 없는 것으로 보고되었다. 리아오(Liao) 등에 의해 개발된 외부 AVG 피포는 시간 경과에 따라 CWS를 AVG에 서서히 전달하기 위해 목적하는 속도로 분해되도록 설계되었다. 폴리 락틱-코 글리콜산 시트는 테플론 봉 둘레를 램핑함으로써 관에 사전제작되어 있고, 따라서 각각의 AVG에 맞게 맞출 수 없다(Liao SW, Lu X, Putnam AJ, and Kassab GS. A novel time-varying poly lactic-co glycolic acid external sheath for vein grafts designed under physiological loading. *Tissue Eng.* 2007;13(12): 2855-62). 즉, 이전의 접근법과 마찬가지로, 리아오(Liao) 등의 접근법은 임의의 기계적 지지체를 전달하기 전에 동맥 압력하에서 AVG를 확장하도록 한다. 본원에 개시된 바와 같이 중막-AVG-벽이 아닌 피포에서의 생성된 CWS 대 시간 프로파일 및 분해 동력학이 보고되었다. 본 발명자들의 접근법은 위에 개시된 이전 작업과 관련된 두 가지, 특히 생체내구성 및/또는 비제한적 외부 피포에 관하여 주요 제한점을 해소한다.

- [0057] AVG에의 기계적 지지체의 전달은 외막 랩에 대한 하나의 가능성이다. 다른 응용에는 생화학물질, 약물, 유전자 또는 세포의 국소 전달을 위한 운반체로서 일 수 있다. 캔지컬(Kanjickal) 등은 AVG에의 사이클로스포린의 서방적인 국소 전달을 위해 폴리(에틸렌 글리콜)하이드로겔을 사용하였고, 문합부의 IH 발달을 성공적으로 감소시켰다(Kanjickal D, Lopina S, Evancho-Chapman MM, Schmidt S, Donovan D, and Springhetti S. Polymeric sustained local drug delivery system for the prevention of vascular intimal hyperplasia. *J Biomed Mater Res A*. 2004;68(3): 489-95). 또 다른 연구에서 캔지아노스(Cagiannos) 등은 AVG에 라파마이신(시롤리무스)을 국소적으로 전달하기 위해 폴리테트라플루오로에틸렌 피포를 사용하였고, 돼지 모델에서 문합부의 IH를 효과적으로 감소시켰다(Cagiannos C, Abul-Khoudoud OR, DeRijk W, Shell DHT, Jennings LK, Tolley EA, Handorf CR, and Fabian TC. Rapamycin-coated expanded polytetrafluoroethylene bypass grafts exhibit decreased anastomotic neointimal hyperplasia in a porcine model. *J Vasc Surg*. 2005;42(5): 980-8). 보다 최근에, 콜러(Kohler) 등은 파클리탁셀을 전달하기 위해 생체분해성 메쉬를 사용하여, 투석 액세스(dialysis access)의 양 모델에서 이식편-정맥 문합부에서 IH를 효과적으로 감소시켰다(Kohler TR, Toleikis PM, Gravett DM, and Avelar RL. Inhibition of neointimal hyperplasia in a sheep model of dialysis access failure with the bioabsorbable vascular wrap paclitaxel-eluting mesh. *J Vasc Surg*. 2007;45(5): 1029-1037; discussion 1037-8). 이러한 활동은 전기방사 중합체 랩의 분해 속도를 조정함으로써 어느 정도까지 전달 속도를 조절할 가능성이 있는 전기방사 중합체 랩 기술을 사용하여 이론적으로 구체화될 수 있었다.
- [0058] 본 발명자들이 알고 있는 한에서, 생체분해성 AVG 랩/피포를 통한 세포의 전달은 이전에 보고된 바 없으며, 따라서 외막 랩의 이러한 장래가능한 응용에는 신규할 것이다. 본원에 사용된 중합체는 특징화되었고(Stankus JJ, Guan J, and Wagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. *J Biomed Mater Res A*. 2004;70(4): 603-14), 생존 SMC과 성공적으로 미세융합되었으며(Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, and Wagner WR. Microintegrating smooth muscle into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. *Biomaterials*. 2006;27(5): 735-44), 이러한 장래가능한 응용에 적합할 것이다.
- [0059] 생체분해성 중합체는 중합체 및 그의 분해 생성물은 실질적으로 비발암성 및 비면역원성을 비롯한 비독성이며, 상당한 독성 효과없이 생물 시스템, 이를 테면 유기체(환자)에서 절단되거나 분해된다는 점에서 "생체적합성"이다. 생물 시스템에서의 비한정적인 분해 기전의 예로는 화학 반응, 가수분해 반응 및 효소적 절단이 포함된다. 생체분해성 중합체로는 천연 중합체, 합성 중합체, 천연 및 합성 중합체의 혼련물이 포함된다. 예로 들지만 한정되지 않는 천연 중합체로는 키토산, 콜라겐, 엘라스틴, 알기네이트, 셀룰로오스, 폴리알카노에이트, 히알루론산 또는 젤라틴이 포함된다. 천연 중합체는 자연원으로부터 수득될 수 있거나, 본원에 개시된 기술에서 사용시 합성 방법(재조합 방법 포함)에 의해 제조될 수 있다. 합성 폴리머의 비한정적인 예로는 동중중합체, 이종중합체, 공중합체 및 블록 중합체 또는 공중합체가 포함된다.
- [0060] 본원에 사용된 용어 "중합체 조성물"은 하나 이상의 중합체를 포함하는 조성물이다. 하나의 분류로서, "중합체"로는 동중중합체, 이종중합체, 공중합체, 블록 중합체, 블록 공중합체가 포함되며, 이들은 천연 및 합성일 수 있다 동중공중합체는 한 형태의 빌딩 블록 또는 단량체를 포함하며, 반면에 공중합체는 하나 보다 많은 형태의 단량체를 포함한다. 예로 들지만 한정되지 않는 단량체를 포함하는 중합체로는 폴리락티드, 폴리(락티드-코-글리콜리드), 폴리(L-락티드-코-카프롤락톤), 폴리글리콜산, 폴리(dl-락티드-코-글리콜리드), 폴리(l-락티드-코-dl-락티드)를 비롯한 알파-하이드록시산으로부터 유도된 단량체; 폴리하이드록시부티레이트, 폴리하이드록시발레레이트, 폴리디옥사논 및 폴리갈락틴을 비롯한 에스테르로부터 유도된 단량체; 폴리카프롤락톤을 비롯한 락톤으로부터 유도된 단량체; 폴리카보네이트, 폴리글리코네이트, 폴리(글리콜리드-코-트리메틸렌 카보네이트), 폴리(글리콜리드-코-트리메틸렌 카보네이트-코-디옥사논)를 비롯한 카보네이트로부터 유도된 단량체; 폴리우레탄, 폴리(에스테르 우레탄)우레아 엘라스토머를 비롯한 우레탄 결합을 통해 연결된 단량체가 포함된다.
- [0061] 비한정적인 구체예에 따라, 중합체 조성물은 콜라겐 및 엘라스틴 중 하나 또는 둘 다를 포함한다. 콜라겐은 통상의 ECM 구성요소이며, 전형적으로 대부분의 합성 생분해성 중합체 보다 빠른 속도로 생체내에서 분해된다. 따라서, 중합체 조성물 내 콜라겐 함량을 조작하면 생체내에서 생분해 속도의 변형 방법으로서 사용될 수 있다. 콜라겐은 2 중량% 내지 약 95 중량%를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 유용한 범위로 중합체 조성물에 존재할 수 있고, 더욱 전형적으로는 이들 사이의 모든 범위 및 소수점을 포함하는 약 25 중량% 내지 약 75 중량%의 범위를 포함하며, 약 75 중량% 및 약 42.3 중량%를 포함하는 약 40 중량% 내지 약 75 중량%를 포함한다. 엘라스틴은 증가된 탄성을 제공하기 위해 중합체 조성물내로 혼입될 수 있다. 엘라스틴의 사용은 동맥 사용과 같이 그의 새로운 기능에 적응된 관상 조직, 이를 테면 정맥을 돕기 위해 제한적인 기질의 원주방향으로의 약간의 팽창을 허용할 수 있다. 엘라스틴은 이들 사이의 모든 범위 및 소수점을 포함하는 약 2 중량% 내지 약 50 중량%

를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 유용한 범위로 중합체 조성물에 존재할 수 있고, 약 40 중량% 및 약 42.3 중량%를 포함하며, 이들 사이의 모든 정수 및 모든 소수점 및 그의 동등물을 포함한다. 하나의 비한정적인 구체예에서, 콜라겐 및 엘라스틴은 대략 동일량으로 중합체 조성물에 존재한다. 또 다른 구체예에서, 중합체 조성물 중 콜라겐 및 엘라스틴 함량의 합은 약 2 중량% 내지 약 95 중량%를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 유용한 범위이며, 더욱 전형적으로는 이들 사이의 모든 범위 및 소수점을 포함하는 약 25 중량% 내지 약 75 중량%의 범위이며, 약 75 중량% 및 약 42.3 중량%를 포함하는 약 40 중량% 내지 약 75 중량%를 포함한다.

- [0062] 본원에 언급된 모든 범위 또는 수치는, 달리 언급되지 않은 한 용어 "약"으로 서두를 달거나 그렇지 않더라도, 측정치 정밀도의 편차 및 기능적으로 동등한 범위를 설명하기 위해 용어 "약"으로 서두가 달린 것으로 고려된다. 예를 들어, 콜라겐은 10 중량%로 중합체 조성물에 존재하는 것으로 언급될 수 있지만, 측정치의 편차로 인해 10 중량%±0.05%, 0.10 중량% 또는 1.0 중량%로서 문자대로 존재할 수 있고, 이러한 중량 퍼센트에서 동일한 방식으로 작용하기 쉽다.
- [0063] 본원에 사용된 용어 "포함하는", "포함하다" 또는 "포함된" 및 그의 변형은 변경가능한 것을 의미한다. 부정관사 "a" 및 "an"은 하나 이상을 말하는 것으로 의도된다.
- [0064] 본원에 사용된 용어 "환자" 또는 "대상"은 인간을 포함하나 이에 제한되지 않는 동물계의 일원을 말한다.
- [0065] 중합체는 그 단량체가 중합체에 혼입된 경우 언급된 단량체를 "포함한다" 또는 언급된 단량체"로부터 유도된다". 따라서, 중합체가 포함하는 혼입 단량체는 적어도 특정 말단기가 중합체 주쇄에 혼입된다는 점에서 중합체에 혼입이전의 단량체와 동일한 것이 아니다. 특정한 형태의 결합이 중합체에 존재하면 중합체는 그 결합을 포함하는 것이라 한다.
- [0066] 본원에 개시된 생체분해성 중합체는 생분해성이라 한다. "생분해성"이란, 중합체가 신체의 체액 및 조직과 접촉한 상태로 이식 및 배치되면, 전형적으로 및 종종 바람직하게는 일정 기간의 시간, 일, 주 또는 월에 걸쳐 신체의 체액 및/또는 조직과의 화학 반응을 통해 부분적으로 또는 완전히 분해되는 것을 의미한다. 이러한 화학 반응의 비한정적인 예로는 산/염기 반응, 가수분해 반응 및 효소적 절단이 포함된다. 특정 구체예에서, 중합체는 불안정성 화학 부분을 가지는데, 그의 예로는 에스테르, 무수물, 다가무수물 또는 아미드가 포함된다. 다르게는, 중합체는 원위치에 배치되면 화학 반응이 일어나기 쉬운 빌딩 블록으로서 펩티드 또는 생체고분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 중합체는 중합체에 효소적 불안정성을 제공하는 펩티드 서열 알라닌-알라닌-리신을 함유할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 중합체는 빌딩 블록으로서 세포외기질 단백질, 이를 테면 콜라겐을 포함할 수 있다.
- [0067] 중합체 또는 중합체들은 전형적으로 그것이 원위치에서 조직의 기계적 조건화를 최적화하는 시간 기간에 걸쳐 분해하도록 선택될 것이다. 유용한 원위치 분해 속도의 비한정적인 예로는 이들 사이의 1, 2, 3, 6, 12, 24 및/또는 48 시간의 단위로 12 시간 내지 2 주가 포함된다.
- [0068] 본원에 유용한 생체분해성 중합체는 엘라스토머일 수 있다. 일반적으로, 복원 또는 복구될 연조직의 것과 유사한 특성을 가진 임의의 엘라스토머 중합체가 적절하다. 예를 들어, 특정 구체예에서, 램프 제조하는데 사용되는 중합체는 고도로 팽창가능하다. 적합한 중합체의 비한정적인 예로 100% 내지 1700%, 더욱 바람직하게는 200% 내지 800%, 더욱더 바람직하게는 325% 내지 600%의 파단 스트레인(breaking strain)을 가진 것들이 포함된다. 특정의 바람직한 구체예에서, 중합체의 파단 스트레인은 5% 내지 50%, 더욱 바람직하게는 10% 내지 40%, 더욱더 바람직하게는 20% 내지 30%이다. 추가로, 10 kPa - 30 MPa, 더욱 바람직하게는 5 - 25 MPa, 더욱더 바람직하게는 8 내지 20 MPa의 인장 강도를 가진 중합체를 선택하는 것이 종종 유용하다. 특정 구체예에서, 초기 계수는 10 kPa 내지 100 MPa, 더욱 바람직하게는 10 내지 90 MPa, 더욱더 바람직하게는 20 내지 70 MPa이다.
- [0069] 특정 구체예에서, 본원에 사용된 중합체는 또한 이들이 환자의 신체내에서 분해할 경우 치료제를 방출한다. 예를 들어, 중합체의 개개의 빌딩 블록은 그 빌딩 블록 자체가 분해 과정을 통해 원위치에서 방출될 경우 치료 이익을 제공하도록 선택될 것이다. 하나의 특정의 바람직한 구체예에서, 중합체 빌딩 블록 중 하나는 푸트레신(putrescine)이며, 이는 세포 성장 및 세포 분화를 야기하는 물질로서 관여한다.
- [0070] 하나의 구체예에서, 섬유는 생체분해성 폴리(에스테르 우레탄)우레아 엘라스토머(PEUU)를 포함한다. 이러한 PEUU의 예로는 사슬 연장제로서 디아민, 이를 테면 푸트레신과 함께 폴리카프롤락톤디올(MW 2000) 및 1,4-디이소시아네이트로부터 제조된 엘라스토머 중합체이다. 적합한 PEUU 중합체는 2 단계의 중합화 공정에 의해 제조될 수 있으며, 여기서 폴리카프롤락톤디올(MW 2000), 1,4-디이소시아네이트부탄 및 푸트레신을 2:1:1 몰비로 혼합한다. 첫 번째 중합화 단계에서, DMSO 중 1,4-디이소시아네이트부탄의 15 wt% 용액을 DMSO 중 디올의 25

wt% 용액과 연속적으로 교반한다. 두 번째 단계에서, 주석 옥토에이트를 첨가하고, 이 혼합물에 용해를 돕기 위해 트리에틸아민을 첨가하여 75°C에서 3 시간동안 반응하도록 한다. 엘라스토머 중합체는 또한 폴리(에테르 에스테르 우레탄)우레아 엘라스토머(PEEU)일 수 있다. 예를 들어, PEEU는 폴리카프롤락톤-b-폴리에틸렌 글리콜-b-폴리카프롤락톤 트리블록(triblock) 공중합체를 1,4-디이소시아네이토부탄 및 푸트레신과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 바람직한 구체예에서, PEEU는 1,4-디이소시아네이토부탄:트리블록 공중합체:푸트레신의 반응 화학양론 2:1:1을 사용하여 2 단계 반응에 의해 수득된다. 첫 번째 중합화 단계에서, DMSO 중 1,4-디이소시아네이토부탄의 15 wt% 용액을 DMSO 중 트리블록 공중합체 디올의 25wt% 용액과 함께 연속적으로 교반한다. 두 번째 단계에서, 주석 옥토에이트를 첨가하고 이 혼합물을 75°C에서 3 시간동안 반응하도록 한다. 이어, 반응 혼합물을 실온으로 냉각하고 18 시간동안 지속한다. 이어, PEEU 중합체 용액을 증류수를 사용하여 침전시키고 습윤성 중합체를 3 시간동안 이소프로판올에 침지시켜 미반응 단량체를 제거한 다음 진공하에 건조시킨다.

[0071] 다른 구체예에서, 적어도 하나의 치료제가 생분해성 섬유에 첨가된다. 유용한 치료제로는 환자에게 치료적 이익을 제공하게 될 생분해성 섬유로 피복되거나 부착되거나 흡수되거나 흡착되거나 매립되거나 회합될 수 있는 임의의 물질이 포함된다. 중합체가 처리되는 동안, 치료제는 중합체와 혼련될 수 있다. 예를 들어, 치료제는 용매(예, DMSO)에 용해되어 처리하는 동안 중합체 혼련물에 첨가될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 치료제는 담체 중합체(예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 하이드로겔 또는 폴리락틱-글리콜산 미세입자가 포함되나 이에 한정되지 않음)와 혼합되는데, 이것은 엘라스토머 중합체와 함께 후속 처리된다. 치료제를 담체 중합체 또는 엘라스토머 중합체 자체와 혼련함으로써, 치료제의 방출 속도가 중합체 분해 속도에 의해 조절될 수 있다. 하나의 구체예에서, 활성제 또는 세포를 포함하는 생분해성 하이드로겔은 관상 조직의 표면에 적용된 후 생분해성 섬유에 적용된다.

[0072] 본원에 사용된 "생체분해성(biogradable)", "생체재흡수성(bioresorbable)" 및 "생분해성(bioerodible)"은 동의어이다. 또한, 기술어 "관상"은 특히 일정한 직경 및 원형의 단면을 가진 기하학적으로 완벽한 관을 말하는 것이 아니다. 이것은 또한 원형이 아닌 다양한 단면을 가진 조직을 포괄하는 것으로, 가변 직경을 가져 내강을 둘러싸는 인접 벽을 가진 다양한 형태를 가질 수 있으며(즉, 이들은 중공임), 액체, 고체 또는 기체가 한 쪽 개구부로부터 다른 쪽 개구부로 이동하도록 내강에 2 개의 개구부를 가질 수 있다. 본원에 지적된 바와 같이, 비한정적이나 설명에 도움이 되는 관상 조직의 특징으로는 동맥, 요도, 장, 식도, 요관, 기관, 기관지 및 난관 조직이 포함된다.

[0073] 추가로, 생체내분해성 섬유에 혼입될 수 있는 다른 활성제로는 항염증제, 이를 테면 비한정적인 NSAID(비스테로이드성 항염증 약물) 이를 테면 살리실산, 인도메타신, 나트륨 인도메타신 삼수화물, 살리실아미드, 나프록센, 콜히친, 페노프로펜, 설린다, 디플루니살, 디클로페낙, 인도프로펜 나트륨 살리실아미드, 항염증 시토카인, 및 항염증 단백질 또는 스테로이드 항염증제); 항생제; 항응고 인자, 이를 테면 헤파린, 페박, 에녹사프린, 아스피린, 히루딘, 플라빅스, 비발리루딘, 프라수그렐, 이드라파리녹스, 와파린, 쿠마딘, 클로피도그렐, PPACK, GGACK, 조직 플라스미노겐 활성화자, 우로키나제 및 스트렙토키나제; 성장 인자가 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 다른 활성제로는 (1) 면역억제제; 글루코코르티코이드, 이를 테면 하이드로코르티손, 베타메티손, 텍사메타손, 플루메타손, 이소플루프레돈, 메틸프레드-니솔론, 프레드니손, 프레드니솔론 및 트리암시놀론 아세트오니드; (2) 항혈관생성제, 이를 테면 플루오로우라실, 파클리탁셀, 독소루비신, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 사이클로포스파미드, 에토포시드, 페갑타니브, 루센티스, 트립토판-*t*-RNA 합성효소, 리테인, CA4P, AdPEDF, VEGF-TRAP-EYE, AG-103958, 아바스틴, JSM6427, TG100801, ATG3, OT-551, 엔도스타틴, 탈리도미드, 베카시주마브, 네오바스타트; (3) 항증식제, 이를 테면 시롤리무스, 파클리탁셀, 페릴릴 알코올, 파르네실 전이효소 억제제, FPTIII, L744, 항증식 인자, Van 10/4, 독소루비신, 5-FU, 다우노마이신, 미토마이신, 텍사메타손, 아자티오프린, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 메토트렉세이트, 모페틸, 혈관활성 장 폴리펩티드 및 PACAP; (4) 항체; 이뮤노필린에 작용하는 약물, 이를 테면 사이클로스포린, 조타롤리무스, 에버롤리무스, 타크롤리무스 및 시롤리무스(라파마이신), 인터페론, TNF 결합 단백질; (5) 타산, 이를 테면 파클리탁셀 및 도세탁셀; 스타틴, 이를 테면 아토르바스타틴, 로바스타틴, 심바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴 및 로수바스타틴; (6) 산화질소 공여체 또는 전구체, 이를 테면 비한정적인 안젤리 염(Angeli's Salt), L-아르기닌, 프리 베이스(Free Base), 디에틸아민 노노에이트, 디에틸아민 노노에이트/AM, Glyco-SNAP-1, Glyco-SNAP-2, (±)-S-니트로소-N-아세틸페니실라민, S-니트로소글루타티온, NOC-5, NOC-7, NOC-9, NOC-12, NOC-18, NOR-1, NOR-3, SIN-1, 염산염, 나트륨 니트로프루시드, 이수화물, 스페르민 노노에이트, 스트렙토조토신; 및 (7) 항생제, 이를 테면 비한정적인 아시클로비르, 아플록사신, 암피실린, 암포테리신 B, 아토바쿠온, 아지트로마이신, 시프로플록사신, 클라리트로마이신, 클린다마이신, 클로파지민, 다프손, 디클라자릴, 독시사이클린, 에리트로마이신, 에탐부톨, 플루코나졸, 플루오로퀴놀론, 포스카르네트, 간시클로비르, 겐타미신, 이아트록코나졸, 이소니아지드, 케토코나졸, 레보플록사신, 린코마

이신, 미코나졸, 네오마이신, 노르플록사신, 오픈록사신, 파로모마이신, 페니실린, 펜타미딘, 폴리믹신 B, 피라지나미드, 피리메타딘, 리파부틴, 리팜핀, 스파르플록사신, 스트렙토마이신, 설과디아진, 테트라사이클린, 토브라마이신, 트리플루오로우리딘, 트리메토프림 설페이트, Zn-피리티온, 및 은 염, 이를 테면 염화물, 브롬화물, 요오드화물 및 과요오드산염이 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0074] 세포는 다양한 방법을 사용하여 제한적인 생분해성 기질내에 미세융합될(microintegrated) 수 있다. 예를 들어, 기질은 관심의 대상이 되는 세포의 적절한 성장 배지에 침지시킨 다음 세포에 직접 노출시킬 수 있다. 세포는 기질의 표면 및 틈새에서 증식하게 된다. 이어, 기질을 성장 배지로부터 제거하여 필요한 경우 세척하고 이식한다. 그러나, 전기방사 부직포 섬유는 기공 크기는 (예를 들어, 염 침출(salt leaching) 또는 열 유도 상분리(thermally induced phase separation)와 같은 다른 방법에 의해 제작된 부직포 섬유의 기공 크기에 비해) 비교적 작기 때문에, 스캐폴드의 표면 위에서의 세포 배양은 통상적으로 엘라스토퍼 스캐폴드의 표면에 가까운 세포의 미세융합이 바람직한 경우에만 사용된다.

[0075] 또 다른 구체예에서, 관심의 대상이 되는 세포를 적절한 용매(예를 들어, 성장 배지 또는 완충액)에 용해시킨 다음, 기질이 전기방사에 의해 형성되는 동안 제한적인 생분해성 기질 위에 분무한다. 이 방법은 조직공학에 의해 제조된 고도의 세포화 작제물이 바람직한 경우 특히 적합하다. 하나의 구체예에서, 세포를 침착하는데 가압 분무(즉, 가압하에 노즐로부터 세포를 분무하는 것)가 사용된다. 또 다른 구체예에서, 세포는 전기방사동안 부직포 매쉬에 전기분무된다. 본원에 개시된 바와 같이, 전기분무는 적절한 점도 및 농도를 가진 세포-함유 용액을 세포를 함유하는 용액의 작은 대전액적(charged droplet)의 분무를 생성하기에 충분한 전기장으로 처리하는 단계를 포함한다. 하나의 실험에서(미도시), 상이한 조건하에 분무된 평활근 세포(SMC)에 대하여 세포 생존능(cell viability)을 시험하였다. 이들 상이한 조건으로는 분무 단독, -15kV로 대전된 표적 위에 분무, -15kV로 대전된 표적 위에 PEUU 전기방사에 의해 분무 및 -15kV로 대전된 표적 위에 10 kV에서 전기분무, 및 -15kV로 대전된 표적 위에 PEUU 전기방사에 의해 10 kV에서 전기분무가 포함된다. SMC 생존능의 유의적인 감소는 노즐을 통한 세포의 분무로부터 발생하였다. 이러한 이론에 의해 제한시키고자 하는 의도없이, 분무 단독 및 심지어 전기방사 PEUU (e-PEUU) 제작중 분무 둘 다에 의해 생존능이 손실되기 때문에, 처리 용매에의 세포 노출과 함께 가압 분무의 물리적 힘이 이러한 결과를 유발할 수 있는 것으로 여겨진다. 세포 에어로졸 분무로부터의 생존능 감소는 다른 것들에 의해 보고되었으며, 노즐 직경, 분무 압력 및 용액 점도에 따라 크게 달라지는 것으로 밝혀졌다(Veazey W.S., Anusavice K. J., Moore K., "Mammalian cell delivery via aerosol deposition", J. Biomed. Mater. Res. 2005 (72B)334-8.). 따라서, 세포는 점도를 증가시키고 기계적 및 화학적 응력으로 부터의 세포 보호를 돕기 위해 젤라틴으로 보충된 배지로부터 분무되었다. 생존능은 회복되었지만 섬유상 내의 젤라틴화때문에 PEUU 기질의 기계적 융합성은 방해되었다.

[0076] 가압 분무와는 대조적으로, 전기분무 세포는 세포 생존능 또는 증식능에 그다지 영향을 미치지 않았다. 이는 세포가 고전압 전기장에 노출시 생존할 수 있다는 다른 것들에 의한 보고에 일치한다(예를 들어, 문헌[Nedovic V.A., Obradovic B., Poncelet D., Goosen M.F.A., Leskosek-Cukalovic O., Bugarski B., "Cell immobilization by electrostatic droplet generation", Landbauforsch VoIk 2002, (241) 11-17; Temple M.D., Bashari E., Lu J., Zong W.X., Thompson CB. , Pinto N.J., Monohar S.K., King R.C.Y., MacDiarmid A.G., "Electrostatic transportation of living cells through air", Abstracts of Papers, 223 ACS National Meeting, Orlando, FL, April 7-11, 2002]을 참조할 수 있다). PEUU 전기방사의 존재하에서 조작, SMC 생존능은 감소하지 않았는데, 이는 아마도 양으로 하전된 전기방사 및 전기분무 흐름이 서로 반발하여 침착된 용매에 의 세포의 노출을 막기 때문일 것이다. 또한, 23 cm라는 비교적 큰 전기방사 거리로 인해, PEUU 섬유는 아마도 이들이 침착될 때까지 용매를 함유하지 않을 것이다. 젤라틴이 보충된 배지로부터의 전기분무는 젤라틴이 없는 배지로부터의 전기분무에 비해 더 많은 생존 세포를 발생시킨다. 그러나, 젤라틴의 사용은 작제물의 기계적 특성을 감소시킨다. 따라서, 다수의 경우에, 배지 단독으로부터의 전기분무는 바람직한 세포 융합 방법일 수 있다.

[0077] 생분해성 기질 위에 또는 그 안에 혼입될 수 있는 세포로는 줄기 세포, 선조 (전구) 세포, 평활근 세포, 골격근아세포, 심근 세포, 내피 세포, 내피 선조 세포, 골수 유래 중간엽 세포 및 유전자 변형 세포가 포함된다. 특정의 구체예에서, 유전자 변형 세포는 치료제 물질, 이를 테면 성장 인자를 발현할 수 있다. 적합한 성장 인자의 예로는 혈관형성 또는 신경영양 인자가 포함되며, 이는 임의로 재조합 기술을 사용하여 수득될 수 있다. 성장 인자의 비한정적인 예로는 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 산성 섬유아세포 성장 인자(aFGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 간세포 성장 인자(HGF), 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 형질전환 성장 인자-베타 플레이오프로틴 단백질, 미드카인 단백질이 포함된다. 하나의 바람직한 구체예에서, 성장 인자는 IGF-1이다.

[0078] **실시예**

[0079] 자가 복제 정맥은 여전히 관상(매년 500,000회) 및 말초(매년 80,000회) 동맥 바이패스술 둘 다에 선택되는 이식편이다. AVG의 기능상실은 여전히 중요한 문제로 남아있으며 실패한 이식편을 가진 환자들은 죽거나 재수술이 필요할 것이다. IH는 모든 AVG 실패의 20% 내지 40%를 차지한다. IH는 동맥 시스템과 관련이 있는 CWS의 수준 증가(자연 정맥 조건에 비해 140 배 증가) 및 동맥 순환의 엄한 새로운 생체역학적 환경에 대한 AVG의 갑작스러운 노출에 의해 유발되는 것으로 여겨진다. 본원에서의 작업 가설은 IH 응답이 동맥 수준의 CWS에 대한 AVG의 보다 점진적인 노출에 의해 감소되거나 제거될 수 있다는 것이다. 즉, AVG는 그의 새로운 환경의 응력에 대하여 적응 및 리모델링하는데 충분한 기회가 제공된다면, 세포 손상이 감소되고, 따라서 IH의 초기 기전을 제한할 수 있다. 분명히, IH 과정의 조기 사건을 예방하기 위한 확실한 방법을 개발하면 동맥 바이패스술의 임상적 결과를 향상시키는데 크게 기여할 것이다. 따라서, 본 작업의 장기 목적은 외막 주위에 배치된 생체분해성 중합체 랩의 형태로 새로운 조건화 패러다임을 개발하여 원위치에서 AVG를 안전하고 기능적으로 "동맥혈화"하는 것이다. 중합체 랩은, 목적하는 시간의 기간에 걸쳐 분해됨에 따라, 그에 의해 제공된 기계적 지지체가 감소되고 원위치에서 CWS의 수준을 서서히 증가하도록 정맥이 노출되도록 조정된다.

[0080] 본원에 개시된 분자 신호 중 몇몇 및 본 연구의 중점으로서 이들을 선택하기 위한 근본적인 이유가 표 1에 요약되어 있다.

표 1

[0081] 본 연구에서 선택된 중점을 위한 근본적인 이유의 요약

본 연구에 제시된 중점	IH에서의 역할	문헌에 의해 뒷받침되는 근본적인 이유
골지 복합체	표현형 조절 단백질 합성	합성 대 수축성 SMC에서의 양 증가 ^a
PCNA	증식	갑작스럽게 노출된 AVG에서의 세포 증식능 증가 ^b
TUNEL	아포토시스	갑작스럽게 노출된 AVG에서의 아포토시스 변성 ^c
순응도	임상 성적	중요한 AVG 개존성의 예측 ^d . 순응도는 갑작스럽게 노출된 동맥혈화 AVG에서 감소하며, 그에 의해 순응도 불일치가 증가한다 ^e .
경직도	임상 성적	중요한 AVG 개존성의 예측 ^d . 경직도는 갑작스럽게 노출된 동맥혈화 AVG에서 증가하며, 임상 성적의 감소에 기여할 수 있다.

^a Morisaki N, et al. Cell cycle-dependent inhibition of DNA synthesis by prostaglandin i2 in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1988;71(2-3): 165-71; Campbell GR, et al. Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. *Arch Pathol Lab Med*. 1988;112(10): 977-86; and Nagai R, et al. Identification of two types of smooth myosin heavy chain isoforms by cdna cloning and immunoblot analysis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(17): 9734-7.

^b Nishibe T, et al. Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement. *Int Angiol*. 2002;21(3): 250-5 and Zuckerbraun BS, et al. Overexpression of mutated ikappabalpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia formation. *J Vasc Surg*. 2003;38(4): 812-9.

^c Wang GJ, et al. Regulation of vein graft hyperplasia by survivin, an inhibitor of apoptosis protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10): 2081-7 and Wang AY, et al. Expression of apoptosis-related proteins and structural features of cell death in explanted aortocoronary saphenous vein bypass grafts. *Cardiovasc Surg*. 2001 ;9(4): 319-28.

^d Davies AH, et al. Prevention of malalignment during non-reversed femorodistal bypass. *Ann R Coll Surg Engl*. 1992;74(6): 434-5.

^e Jacot JG, et al. Early adaptation of human lower extremity vein grafts: Wall stiffness changes accompany geometric remodeling. *J Vasc Surg*. 2004;39(3): 547-55.

^f Tai NR, et al. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *Br J Surg*. 2000;87(1 1): 1516-24 and Jacot JG, *J Vasc Surg*. 2004;39(3): 547-55.

[0082] **실시예 1 - PEUU 구조의 제작**

- [0083] 시린지 펌프에 의해 직경 4.5"의 알루미늄 맨드릴에 대해 수직으로 13-cm에 매달린 스테인리스 모세관내로 헥사플루오로이소프로판올(HFIP) 중 5-중량% PEUU 용액을 1.0 mL/시간의 속도로 공급하였다. 고압 발생기(Gamma High Voltage Research)를 사용하여 알루미늄 표적에는 -7kV로 대전시키고, PEUU는 +12kV로 대전시켰다. 범위 0.0 내지 13.8 m/s의 속도로 회전하는 표적 위에 전기방사에 의해 정렬된 PEUU 섬유를 형성하였다. 스케폴드를 실온에서 밤새 건조시킨 다음 30°C에서 48 시간동안 진공하에 두었다. 각 시료의 부분을 섬유 배향이 X-선 빔과 평행하게 되도록 분석용 표준 X-선 회절 홀더에 설치하였다. 구리 방사선을 사용하는 PANalytical X'Pert Pro 회절계에서 시료를 가동시켰다. 다분산지수 2.61를 생성하는 PEUU의 수평균 분자량 및 중량평균 분자량은 각각 228,700 및 87,600이었다. DSC에 의해 PEUU 연한 분절의 용융 온도가 41.0°C이고 유리 전이온도가 -54.6°C임이 입증되었다.
- [0084] *혈관 조직공학에 대한 전기방사 관상 작제물*
- [0085] 본 실시예는 강력한 엘라스토머 기계적 지지체를 또한 제공할 수 있는 세포밀도가 높은 혈관 작제물을 제공하는 하나의 방법이 기술된다. 본 방법은 세포 배치 공정(cellular placement process)을 가지거나 가지지 않고 서브미크론 엘라스토머 섬유의 그물세공(meshwork)을 혈관벽에 구축하는 미세융합 접근법을 포함한다. 생체내 또는 시험관내 배양 방법을 통해 세포충실도를 발달시킬 수 있다. 이들 방법은 본원에 개시된 바와 같이 관상 조직의 회복에 적용가능하다.
- [0086] 본 실시예는 본원에 개시된 바와 같이 관상 조직을 회복하는데 사용될 수 있는 소경의 전기방사 폴리우레탄 도관을 관강내 표면 집중하는 방법을 제공한다. 전기방사기술은 조직 발달을 더욱 조장할 수 있도록 스케폴드를 제작하는 동안 세포를 혼입하기 위해 사용된다.
- [0087] 폴리(에스테르 우레탄)우레아는 푸트레신 사슬 연장제와 함께 폴리(ϵ -카프롤락톤)디올 및 1,4-디이소시아네이토부탄으로부터 합성되었다. PEUU를 헥사플루오로이소프로판올 중 6중량%로 용해시키고 전기방사하였다. 전기방사 조건으로는 용액의 체적 유량 1.0 mL/시간, 노즐과 표적간의 거리 13.5 cm 및 노즐 전압 +12, 표적 전압 -3kV이 포함되었다. 이식용 소경의 관을 제작하는데 사용된 표적은 250 rpm으로 회전하는 직경 1.3 mm의 316형 스테인리스 스틸 맨드릴이었다.
- [0088] 맨드릴은 또한 더욱 균일한 도관 두께를 생성하기 위해 대략 8 cm/s의 속도로 리니어 스테이지(linear stage) 위에서 그의 축을 따라 8 cm 평행이동하였다. 시료를 15 분동안 전기방사하여 약 150 내지 200 μ m의 벽두께를 가진 다공성 관상 작제물을 생성하였다. 내피세포증식 연구를 위해, 동일한 공정 조건을 가지고 4.7 mm 스테인리스 맨드릴을 대신 사용하였다.
- [0089] HFIP 중 6 % PEUU를 음으로 대전된 회전 맨드릴에 250 rpm으로 전기방사하여 관상 작제물을 생성하였다. 전기방사된 관은 그 내경이 1.3 mm, 길이가 8 cm 이하, 벽두께가 150-200 μ m이었다. 섬유 크기는 대략 1000 μ m의 범위였다. 또한, 이들 작제물은 붕합가능하고 그의 내강에 보유되었다.
- [0090] 제작후, 스틸 맨드릴로부터 더 쉽게 제거하기 위해 맨드릴을 70% 에탄올에 침지하였다. 이어, 도관을 탈이온수에서 여러 번 세정하고, 블롯팅한 다음 실온에서 24 내지 48 시간동안 진공하에 건조시켰다. 이어, 도관에 대하여 해부현미경을 사용하여 그의 총체적 구조를, 주사전자현미경을 사용하여 그의 섬유 형태를 조사하였다. 연속적인 섬유 단면을 조사하기 위해, 시료를 액체 N₂에 1분동안 침지한 다음, 파쇄하고 SEM을 위해 스퍼터-코팅하였다.
- [0091] PEUU 도관(4.7 mm)을 맞춤 설계된 회전 진공 집중 장치의 내부에 배치하고 2×10^6 개의 근육-유래 줄기 세포(MSDCs)로 접종하였다. 보다 특히, 전기방사된 도관을 금속 스템(stub) 위에 배치하고 도관의 외부에 약한 진공을 적용하였다. 이어, 계대배양된 MSDCs를 도관의 내강을 통해 관류시키고 진공에 의해 관의 섬유상 내강 측벽으로 밀어넣었다. 작제물을 페트리 디쉬에서 24 시간동안 정적 조건하에 배양하였다. 정적 배양 24 시간후, 세포는 생존가능하였고 내강에 부착되어 단층을 형성하였다.
- [0092] 다공성의 1.3 mm 내경을 가진 관상의 전기방사 스케폴드를 복부대동맥에 삽입 이식편으로서 이식하였다. 작제물은 붕합가능하여 생체내 그의 내강에 쉽게 보유되었다. 체중 250-300 g의 암컷 루이스 래트를 1% 이소플루오란 및 2.5 2.5mg/100g 케타민으로 마취하였다. 중복부를 절개하고 복막뒤공간을 노출시켰다. 신장 수준 아래 하행대동맥을 절개하고, 근위부를 클램핑하고 1 cm의 갭을 두도록 원위부를 절단하였다. 이어 전기방사된 도관을 10.0 프롤렌(prolene) 붕합사를 사용하여 단단(end-to-end) 방식으로 이식하였다. 정맥내 해파린을 투여하고 200 유닛/kg으로 클램핑하였다. 복부벽을 2.0 바이크릴(Vycril) 붕합사를 가지고 두 층으로 밀폐시켰다. 래트는

수술로부터 수축 기능을 가지도록 회복할 수 있었다. 래트를 2 주체에 희생시키고, 시료 체외이식편을 실온에서 10% 중성 완충 포르말린에 고정하였다 이식하고 2 주체에, 이식편은 개선성 및 기능성을 보유하였다. 이어, 시료를 파라핀에 매설하고 절단한 다음 헤마톡실린 및 에오신 또는 매슨 트리크롬으로 염색하였다. 헤마톡실린 및 에오신 염색에 의해, 체외이식된 이식편 주위에 외부 캡슐을 형성하는 것이 입증되었다. 매슨 트리크롬 염색은 캡슐이 새로 개발된 모세 혈관의 존재와 함께 정렬된 콜라겐으로 구성되어 있음을 보여주었다. 콜라겐 발달의 존재를 가지고 작제물 전체에 걸쳐 성장중인 세포 및 조직을 관찰하였다. 세포는 또한 작제물 내강 주위의 위치에 단층을 형성하였음을 입증하였다.

[0093] 이전 실시예가 생체내 접근법으로 제공된 반면, 생체분해성 및 세포적합성 엘라스토머 폴리(에스테르 우레탄)우레아는 래트 모델에서의 이식에 적절한 소경의 관대로 전기방사된다.

[0094] 이전 실시예와 마찬가지로, 본 실시예는 강력한 엘라스토머 기계적 지지체도 또한 제공하는 세포밀도가 높은 혈관 작제물을 제작하기 위한 방법을 제공한다. 그러나, 이전 모델은 생체내 접근법으로서, 생체분해성 및 세포적합성 엘라스토머 폴리(에스테르 우레탄)우레아는 래트 모델의 이식에 적절한 소경의 관대로 전기방사되었다. 본 실시예는 시험관내 접근법을 제공하는 것으로, 여기서 SMC는 미세융합 기술을 사용하여 스캐폴드 제작과 동시에 전기방사 나노섬유대로 집중된다.

[0095] 래트의 대동맥으로부터 분리한 혈관 평활근 세포(SMC)를 10% 소태아 혈청 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 돌베코 변형 이글 배지(DMEM)하에 조직 배양 폴리스티렌(TCPS, tissue culture polystyrene) 배양 플레이트 위에서 확장시켰다. 더 소경의 전기분무/전기방사 맨드릴을 고려하여 일부 변형예로서 이미 개시된 것과 유사하게 미세융합을 수행하였다.

[0096] 7.5×10^6 개 SMC/mL을 배지에서 계대배양하고 8.5kV로 대전된 316형 멸균 스테인리스 스틸 모세관에 0.1 mL/분으로 공급한 다음 표적으로부터 4.5 cm에 배치하였다. HFIP 중 6 중량% PEUU/콜라겐(75/25) 또는 6 중량% PEUU를 12 kV로 대전된 모세관에 1.5 mL/분으로 공급하고 표적으로부터 23 cm에 배치하였다. 표적은 1.6 mm/s로 그의 축을 따라 8-cm 평행이동하면서 250 rpm으로 회전하고 -3kV로 대전된 멸균 스테인리스 스틸 맨드릴(직경 4.7 mm)로 구성되었다. 각각의 미세융합된 도관을 생성하는데 30 분의 제작 시간이 사용되었다. 도관을 제작한 후, 무균 기술을 가지고 맨드릴을 회전병위에 부드럽게 배치하고 16 시간동안 정적으로 배양하였다. 16 시간후, 시료를 배양을 위해 맨드릴로부터 부드럽게 제거하였다. 이어, 시료를 15 mm 길이로 절단한 다음 금속 스티브에 봉합하고 도 3에 상세히 도시한 바와 같은 장치에서 배지를 3 일동안 박동류(pulsatile flow)로 관류시켰다.

[0097] 제작하고 1 일째 및 4 일째 시점에, 시료를 특징화하였다. MTT 측정법을 사용하여 세포 생존능을 측정하였다. 조직학적 조사를 위해, 시료를 실온에서 10% 중성 완충 포르말린에 고정하였다. 이어, 시료를 파라핀에 매설한 다음 절단하고 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 제작후 즉시, 그의 생체학적 특성에 대하여 시료를 분석하였다. 측정된 특성으로는 환 강도, 동적 순응도 및 파열 압력이 포함된다. 환 강도를 측정하기 위해, 스테인리스 스틸 스테이플을 5 mm의 긴 관상 부분에 삽입한 다음 단일축 인장 시험기(ATS)의 그립에 삽입하였다. 10 lb 부하 세포 및 10.05 mm/분의 변위 속도를 사용하여 파열될 때까지 시료를 잡아당겼다(strained).

[0098] 동적 순응도 및 파열 강도를 위해, 15 mm의 긴 관상 시료를 원심 펌프(Biomedicus)에 의해 구동되는 유동장(flow loop)에 배치하고 37°C에서 PBS에 침지하였다. 압력을 모니터링하고 표준 인라인 스트레인-게이지 압력변환기 및 PC 획득판(acquisition board)을 사용하여 30 Hz에서 기록하였다. 혈관 작제물을 박동류(110/70 mmHg, 1.2 Hz)를 가지고 관류시키고, 동적 순응도 C는 He-Ne 레이저 마이크로미터(He-Ne laser micrometer)(Beta Lasermike)을 가지고 시료의 외경을 기록함으로써 측정되었다. 순응도는 각각의 펄스(D = 최대 또는 최소 직경, P = 최대 또는 최소 압력)에 대해 다음과 같이 산출되었다:

$$C = \frac{(D_{\text{최대}} - D_{\text{최소}})}{D_{\text{최소}}(P_{\text{최대}} - P_{\text{최소}})}$$

[0099]

[0100] 순응도 연구에서 미세융합된 PEUU와 비교하기 위해 대조군으로서 돼지의 내유 동맥을 사용하였다. 파열 압력을 측정하기 위해, 시료 배출구를 밀봉하고 관이 파열할 때까지 흐름을 증가시켰다. 파열전 최대 압력을 파열 압력으로 취했다.

[0101] 소경 관에 대하여 세포 미세융합 기술을 확장하기 위해, 시트 미세융합을 위해 이전에 사용한 직경 19 mm의 맨드릴 대신에 직경 4.7 mm의 스테인리스 스틸 맨드릴을 사용하였다. 세포밀도가 높고 결함이 없는 관상 작제물을 미세융합하기 위해, 전기방사 거리를 0.5 cm 약간 감소시키고 맨드릴 음전하를 이전 방법보다 -10 kV 내지 -3

kV로 낮추는 것이 유용하다. 제작하는 동안, PEUU는 맨드릴 위에 반짝이는 분홍색으로 나타났는데, 이는 균일한 세포 전기분무를 나타내는 것이다. 맨드릴로부터 제거후, PEUU 또는 PEUU/콜라겐(75/25)의 시료는 이들이 봉합 가능하여 압착후에 그의 내강을 유지할 수 있었다는 점에서 기계적으로 강건하다는 것을 알 수 있다.

[0102] SMC 미세융합된 작제물의 세포 배치 및 생존능을 초기에 조사하고, 정적 또는 관류 배양하고 4 일후에 다시 조사하였다. 관류후, 시료를 스티브로부터 부드럽게 제거한 다음 MTT 및 조직학을 위한 대표적인 절편으로 절단하였다. MTT 결과는 제작하고 1 일후 나타났다. 또한, 정적 또는 관류 배양 4 일째 세포가 여전히 생존하였으며, 세포수는 관류 배양의 경우 약간 높은 것으로 보고 되었다. 시료를 고정하고 헤마톡실린 및 에오신 염색으로 염색하였다. H&E 염색은 관상 작제물내에서 균일한 초기 세포 융합을 보여 주었다.

[0103] 제작후, 환 강도, 파열 압력 및 봉합 유지 강도를 미세융합된 작제물에서 평가하였다. 각각 6.3 MPa 및 170%의 최대 응력 및 스트레인 값을 가진 작은 관 절편(환)은 기계적으로 강건하고 유연하였다. 환 시료는 각 경우에 깨끗하게 파열되지 않았고, 궁극적인 응력치 이후 얇은 층으로 갈라지거나 잡아당겨 따로따로 분리되는 것처럼 보였다. 미세융합된 작제물의 동적 순응도를 계산하기 위해, 시료를 박동류에 노출하였고, 압력/직경 관계를 평가하였다. 이러한 관계를 동일한 박동류에 노출시킨 돼지의 내유 동맥(pMA)과 비교하였다. pMA 및 미세융합된 PEUU 둘 다의 기계적 응답은 서로 저하하는 시료 둘 다에 대하여 저하하는 값과 매우 유사하였다. 순응값은 pMA에 대하여 $1.02 \pm 0.33 \times 10^{-3} \text{ mmHg}^{-1}$ 이었고, SMC 미세융합 PEUU에 대하여 $0.71 \pm 0.13 \times 10^{-3} \text{ mmHg}^{-1}$ 이었다. 모든 시료에 대한 파열 압력치는 150 mmHg 보다 크다. 파열 압력치는 미세융합된 관의 다공성 성질로 인해 근사치였다.

[0104] 본 방법은 세포밀도가 높은 엘라스토퍼 스케폴드를 생성하였다. 세포는 제작후 생존하였고 관류 배양하에 증식하였다. 혈관 원형(prototype)으로서 소경의 관상 작제물내에 세포를 미세융합하는 이러한 기술을 확장하기 위해, 변하기 쉬운 일부 공정을 변형시키는 것이 유리하였다. 예를 들어, 소경의 맨드릴 위에 세포를 표적화하거나 전기분무하기 위해서는, 전기분무 노즐과 맨드릴 사이의 거리를 감소시키는 것이 유용하였다. 또한, 맨드릴 위의 상당한 음의 바이어스를 피하는 것이 유용하였다. 회전하는 맨드릴 표적에 높은 음의 전하를 사용하면, 도관 융합 및 세포 생존능을 붕괴시키는 관내 "돌기(spike)" 또는 중합체 돌출 결함을 발생시켰다. 따라서, 맨드릴 전하를 감소시켜 세포밀도가 균일하고 섬유상 관상 도관을 생성하는 것이 유용하였다. 이어, 이러한 작제물을 관 내부에서 세포에의 영양제, 폐물 및 산소의 교환을 더욱 촉진하도록 관류 생체반응기하에 배양하였다. H&E 및 MTT 결과는 제작 및 관류 배양후 작제물에 존재하는 생존가능 세포를 나타내었다.

[0105] **실시예 2 - 정맥 이식편 동맥혈화로 인한 기계적 특성의 변화**

[0106] 동맥 압력 범위에서, AVG는 그의 전면 팽창의 정도 때문에 본질적으로 견고한 관이다(Stooker W, Gok M, Sipkema P, Niessen HW, Baidoshvili A, Westerhof N, Jansen EK, Wilde vuur CR, and Eijssman L. Pressure-diameter relationship in the human greater saphenous vein. *Ann Thorac Surg.* 2003;76(5): 1533-8). 이를 확인하기 위해, 본 발명자들은 압력 램핑(ramping) 실험을 수행하였다. 이 실험의 결과가 도 4에 도시되어 있다. 정맥의 최대 팽창은 대략 30 mmHg에 도달하는 것으로 볼 수 있다. 결과적으로, 동맥 수준의 압력에서, 정맥은 매우 경직되는데, 본 발명자들은 임시적인 외부 구조 지지체에 생체분해성 외막 랩을 제공함으로써 이러한 현상을 중화시키고자 한다.

[0107] AVG 팽창의 정도는 정맥의 성질, 이를 테면 순응도에 직접적으로 관련이 있고, 이는 데이비즈(Davies) 등에 따른 개존률과 관련이 있는데(Davies AH, Magee TR, Baird RN, and Horrocks M. Prevention of malalignment during non-reversed femorodistal bypass. *Ann R Coll Surg Engl.* 1992;74(6): 434-5 and Davies AH, Magee TR, Baird RN, Sheffield E, and Horrocks M. Pre-bypass morphological changes in vein grafts. *Eur J Vasc Surg.* 1993;7(6): 642-7), 이들은 말초 바이패스 수술에서 순응도가 낮은 AVG의 개존률 저하를 보고하였다. 이러한 감소된 개존성은 그것이 이식되는 AVG 및 자연 동맥 사이의 순응도 불일치에 크게 기여하였다(Bandyk DF and Mills JL. The failing graft: An evolving concept. *Semin Vasc Surg.* 1993;6(2): 75-7; Bassiouny HS, White S, Glagov S, Choi E, Giddens DP, and Zarins CK. Anastomotic intimal hyperplasia: Mechanical injury or flow induced. *J Vasc Surg.* 1992;15(4): 708-16; discussion 716-7; and Berkowitz HD, Fox AD, and Deaton DH. Reversed vein graft stenosis: Early diagnosis and management. *J Vasc Surg.* 1992;15(1): 130-41; discussion 141-2). 정맥은 본질적으로 동맥 보다 순응도가 떨어지고(Tai NR, Salacinski HJ, Edwards A, Hamilton G, and Seifalian AM. Compliance properties of conduits used in vascular reconstruction. *Br J Surg.* 2000;87(11): 1516-24), 갑작스럽게 노출된 동맥혈화시 순응도가 더욱더 저하된다(Jacot JG, Abdullah I, Belkin M, Gerhard-Herman M, Gaccione P, Polak JF, Donaldson MC, Whittmore AD, and Conte MS. Early adaptation of human lower extremity vein grafts: Wall stiffness changes accompany geometric

remodeling. J Vasc Surg. 2004;39(3): 547-55). AVG 순응도의 변화가 AVG 기능상실의 중요한 예언자인 것으로 나타났다.

[0108] 실시예 3 - 제한적인 중합체 기질로 피복된 AVG

[0109] 본원에 제공된 데이터는 진행중인 연구의 상이한 두 영역을 포함한다: i) 동맥 혈류역학에 대한 무손상 정맥 분절의 기계-병리학적 응답의 조사 및 ii) 외막 랩으로서 사용하기 위한 전기방사된 생체분해성 중합체의 개발.

[0110] 잘 조절된 실제 생체역학적 및 대사적 조건에 대하여 무손상 혈관 분절 및 이식편의 응답을 연구하기 위해 생체 외 혈관 관류 장치가 개발되었다. 도 3은 이러한 장치를 나타낸다. 이 장치는 정밀하게 조절된 혈류역학 및 용해 기체(pH, pO₂, pCO₂)에 돼지 내경정맥 정맥 분절의 생체외 노출을 허용하여, 정맥 및 실제 AVG 환경을 비롯한 다양한 조건을 모의한다. 이러한 조절 조건의 달성은 두 가지의 독립적인 관류/장기 배양 시스템을 사용하여 달성된다(도 3에 개략적으로 도시됨). 폐쇄 루프 관류 설계는 무균 관류액의 순환을 허용한다(1% 소태아 혈청, 0.5 g/리터 세폭시틴으로 보충된 조직 배양 배지 199). 두 번째 롤러 펌프는 밀폐 챔버에 배치된 표본 주위에 외막 육조(1% 소태아 혈청 및 0.5 g/리터 세폭시틴을 함유하는 DMEM)를 순환하게 한다.

[0111] 자연 정맥 혈류역학 및 생체역학을 모의실험하기 위해, 20 ml/분의 비박동류 및 20 mmHg의 압력을 제공하도록 롤러 펌프 및 관류 루프의 흐름 저항기를 설치하였다. AVG 혈류역학을 모의하기 위해, 120/80 mmHg의 박동 압력 과형 및 100 ml/분의 평균 박동류를 제공하도록 펌프 및 흐름 저항기를 설치하였다. "AVG 조건화" 관리는 상술한 바와 같이 동맥 조건을 제공하도록 관류 시스템을 설치함으로써 개시될 것이다. 관류된 정맥 분절의 원주방향 벽응력은 조정된 생체분해성 혈관주위 전기방사 중합체 랩의 적용을 통해 조절될 것이다. 즉, 중심정맥벽 원주방향 벽응력 대 시간 프로파일은 24 또는 192 시간 기간에 걸쳐 선형으로 증가하는, 정맥(대략 25 KPa) 수준에서 동맥(대략 140 KPa 피크) 수준으로의 점진적인 부과를 포함할 것이다. 이러한 목적하는 분해 속도를 달성하면, AVG의 생체내 기계적 조절화를 아마도 모든 AVG의 개존물을 향상시키는 가능한 대안적인 처리법이 되도록 할 것이다.

[0112] 생체의 관류 능력을 추가로 입증하기 위해, 정맥 대 동맥 조건하에서 관류된 정맥 분절의 조직 생존능 분석을 수행하고, 그 결과를 조직 생존능의 기준 수준과 비교하였다. 생체의 관류 48 시간후, 주사전자현미경, H&E 염색, Live/Dead™ 염색 및 TUNEL 분석을 수행하였다(도 5 참조). 주사전자현미경 및 H&E 염색은 조직의 형태학적 융합이 관류 48 시간후 및 수확후 손상되지 않았음을 나타내었다. Live/dead 및 TUNEL 분석은 48 시간에서 기준선과 비교한 경우, 정맥 또는 동맥 조건에서 각각 유의적인 괴사 또는 아포토시스를 보여주지 않았다. 이러한 시스템의 초기 세대를 사용하는 14 일 지속 관류에 대하여 유사한 관찰을 실시하였다(Ligush, J., R.F. Labadie, S.A. Berceli, J.B. Ochoa, and H.S. Borovetz, *Evaluation of endotheliumderived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel*. The Journal of Surgical Research, 1992. 52(5): p. 416-21). 이들 실험은 멸균 상태 및 조직 생존능을 유지하면서 제안된 생체의 돼지 내경정맥 정맥 관류를 수행하는 능력을 입증한다.

[0113] 몇몇 세트의 생체의 혈관 관류 실험을 수행하였다. 먼저, 실험(N=세트 당 6 마리) 중 한 세트를 수행하여 동맥의 생체역학적 조건에 갑작스럽게 노출시킨 PIJV의 급성의 과형성 응답을 확립하고 자연 정맥 조건에 노출시킨 PIJV에 대한 본 응답과 비교하였다. 도 6은 이러한 실험적 설계를 개략적으로 나타내고 있는데, 이 역시 아래 상세히 설명되어 있다. 이어, 본 발명자들은 유효한 생체의 혈관 관류 시스템(EVPS, ex vivo vascular perfusion system) 압력의 수동 조절을 통해 목적하는 CWS 프로파일에 돼지 내경정맥 정맥 분절(PIJV)을 서서히 노출시킴으로써 이러한 급성의 과형성 응답을 약화시키고자 시도하였다. 도 7은 이러한 실험적 설계를 개략적으로 나타내고 있는데, 이 역시 아래 상세히 설명되어 있다. 이들 실험은 갑작스럽게 노출된 동맥 조건에 비해 서서히 증가하도록 가해진 동맥 조건하에서 생체의 관류된 새로-절제한 정맥 분절에 의한 급성 과형성 응답의 감소를 달성하는데 필요한 CWS 프로파일을 확립하는 것과 직접적으로 관련이 있다. 이들 결과를 사용하여, 본 발명자들은 또한 동일한 CWS 프로파일을 달성하도록 외막 생체분해성 중합체 랩의 분해 속도를 조정하고, 랩핑되지 않은 대조군과 비교하여 PIJV의 급성의 과형성 응답을 감소시키기 위해 사용하고자 하였다. 도 8은 이러한 실험적 설계를 개략적으로 나타내고 있는데, 이 역시 아래 상세히 설명되어 있다. 상술한 각각의 실험은 동물-대-동물 생존능을 고려하기 위해 "쌍을 이루게 하였고", 일반적으로 다음과 같이 진행하였다. 양쪽의 PIJV를 미성숙 돼지로부터 외과적으로 수확하고 별도의 독립적인 EVPSs에 고정하였다(아래 참조). 24 시간 또는 72 시간 동안 혈관 관류 실험을 수행하였는데, 이는 조사중 대부분의 종점이 이들 시점의 수 시간 이내에 성공적으로 검출되었기 때문이다(상기 표 1 참조). 각 실험을 끝맺음에 있어서, 표 1에 개시된 종점을 평가하기 위해 조직을

생물학적 측정법으로 처리하였다(아래 참조)

- [0114] 조직 수확 및 운반
- [0115] 돼지 내경정맥 (PIJV)을 모델로서 선택하였는데, 그 이유는 인간의 큰 복재 정맥과 내경 및 벽두께가 유사하기 때문이고, 이 조직이 동맥 혈류역학 조건에 노출된 정맥의 병리학적 응답을 조사하는데 이미 사용된 바 있기 때문이다. 바이패스를 위한 복재정맥절편술(saphenectomy)의 방식으로 외과적 수확 절차를 수행하였다. 요약하면, 마취시킨 동물을 양아위(supine position)로 배치하고, 쌍방으로 경부 절개(cervical incision)를 실시한 다음 목의 혈관 근막에 층상으로 박리하였다. 각 PIJV를 확인하고 경정맥 합류(jugular confluence)의 근위부 및 경정맥공(jugular foramen)의 말단부를 박리하였다. 모든 지맥을 확인하고 누출을 피하기 위해 조심스럽게 결찰하였다. 원하는 길이(6-8 cm)를 노출시킨 후, 분절의 각 단부에 오리같은 주둥이 가진 맥관 캐놀라를 꽂았다. 체외이식 직전에, 맞춤형-설계된 혈관 클램프(Ligush J, Labadie RF, Berceli SA, Ochoa JB, and Borovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. J Surg Res. 1992;52(5): 416-21)를 캐놀라의 단부에 부착하고 제거후 도관의 생체내 길이를 유지하게 하였다. 이어, 맥관을 클램핑된 캐놀라와 결찰부 사이의 일측에서 절단하였다. 제거후 즉시, 맥관을 무균 운반 상자(해파린(500 유닛/리터), 과과베린(60 mg/리터) 및 세폭시틴(1.0 g/리터)로 보충한 락트산 첨가 링거 용액 함유)에 넣었다. 조직 수확에서부터 아래 개시되는 관류 시스템에 배치하는 시간은 보통 1 시간 미만이었다.
- [0116] 전기방사된 생체분해성 중합체 랩의 혈관주변 배치
- [0117] 외막 랩을 형성하기 위해 사용된 생체분해성 중합체 복합체는 구안(Guan) 등에 의해 개발되었고(Guan J, Sacks MS, Beckman EJ, and Wagner WR. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. J Biomed Mater Res. 2002;61(3): 493-503), 스탠쿠스(Stankus) 등에 의해 전기방사된 형태가 추가로 특징화된(Stankus JJ, Guan J, and Wagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. J Biomed Mater Res A. 2004;70(4): 603-14 and Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, and Wagner WR. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. Biomaterials. 2006;27(5): 735-44) 폴리(에스테르 우레탄)우레아(PEUU) 물질을 기본으로 하였다. 이 중합체는 시험관내에서 비-세포독성 분해 산물로의 가수분해적 분해를 거치며, 생체내에서 대략 3 개월즈음에 완료에 가깝게 분해되는 것으로 나타났다(Fujimoto KL, Guan J, Oshima H, Sakai T, and Wagner WR. In vivo evaluation of a porous, elastic, biodegradable patch for reconstructive cardiac procedures. Ann Thorac Surg. 2007;83(2): 648-54 and Fujimoto KL, Tobita K, Merryman WD, Guan J, Momoi N, Stolz DB, Sacks MS, Keller BB, and Wagner WR. An elastic, biodegradable cardiac patch induces contractile smooth muscle and improves cardiac remodeling and function in subacute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2007;49(23): 2292-300). 랩의 분해 속도를 조절하기 위해, PEUU, 콜라겐 및 엘라스틴 단백질의 복합체를 이용하였는데, 질량 손실을 촉진하기 위해 단백질을 첨가하였다.
- [0118] PEUU는 푸트레신 사슬 연장제와 함께 폴리(ϵ -카프로락톤)디올 및 1,4-디이소시아네이토부탄으로부터 합성되었다. PEUU, 콜라겐 및 엘라스틴은 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(HFIP)중의 용액으로 혼합한 다음, 어딘가에 상세히 설명된 절차를 사용하여 PIJV 분절에 전기방사하였다(Stankus JJ, Guan J, and Wagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. J Biomed Mater Res A. 2004;70(4): 603-14). 요약하면, 전기방사 조건은 혼합 용액의 체적 유량 0.28 $\mu\text{l/s}$, 노즐과 표적간의 거리 17 cm 및 노즐에 +12 kV 및 표적에 -3 kV의 전하를 포함한다. 이식용 방사 AVG의 제작에 사용된 표적은 직경 3 mm의 316형 스테인리스 스틸 맨드릴로서, 내피 손상을 피하기 위해 AVG 내강에 주의깊게 삽입되었다. 맨드릴 및 동축 정맥은 250 rpm으로 함께 회전하였고, 더욱 균일한 두께의 피복을 생성하기 위해 10 cm에 걸쳐 대략 8 cm/초의 속도로 리니어 스테이지위를 축방향으로 평행이동하였다.
- [0119] 중합체의 분해 속도 및 기계적 특성을 조정하기 위해 3 개의 파라미터가 사용되었다: 1) 혼합 용액 중 최종 중합체 농도; 2) 혼합 용액 중 PEUU:콜라겐:엘라스틴 비율; 및 3) 전기방사 시간에 비례하는 랩 두께. 이들 파라미터의 모든 시험된 조합을 표 2에 요약하였다.

표 2

[0120] 중합체 조성 파라미터 조합의 요약

조합	PEUU:콜라겐:엘라스틴 (%)	전기방사 시간 (분)	최종 농도 (%)
A	14.3:42.3:42.3	20	6
B	25:75:0	15	6
C	50:50:0	15	6
D	50:50:0	20	12

[0121] 생체의 관류 조건

[0122] 정맥 분절을 본 발명자들의 잘 확립되고 유효한 생체의 혈관 관류/장기 배양 시스템에 배치하였다(EVPS, see, e.g., Labadie RF, Antaki JF, Williams JL, Katyal S, Ligush J, Watkins SC, Pham SM, and Borovetz HS. Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue. Am J Physiol. 1996;270(2 Pt 2): H760-8; Severyn DA, Muluk SC, and Vorp DA. The influence of hemodynamics and wall biomechanics on the thrombogenicity of vein segments perfused in vitro. J Surg Res. 2004;121(1): 31-7 and Muluk SC, Vorp DA, Severyn DA, Gleixner S, Johnson PC, and Webster MW. Enhancement of tissue factor expression by vein segments exposed to coronary arterial hemodynamics. Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 1998;27(3): 521-7). 요약하면, 폐쇄 루프 관류 설계는 혈관 분절을 통한 무균 관류액의 순환(1% 소태아 혈청, 0.5 g/리터 세록시틴으로 보충된 조직 배양 배지 199) 뿐만 아니라 밀폐 챔버내의 외막 육조(1% 소태아 혈청 및 0.5 g/리터 세록시틴을 함유하는 DMEM)의 순환을 허용한다. 관류액 및 육조 배지 모두 37°C 및 용해 기체의 생리학적 수준에서 유지하였다. 실험은 두 가지의 모의 혈류역학 조건 중 하나, 자연 정맥(VEN) 또는 동맥(ART) 조건을 사용하였다 (Severyn DA, Muluk SC, and Vorp DA. The influence of hemodynamics and wall biomechanics on the thrombogenicity of vein segments perfused in vitro. J Surg Res. 2004;121(1): 31-7 and Muluk SC, Vorp DA, Severyn DA, Gleixner S, Johnson PC, and Webster MW. Enhancement of tissue factor expression by vein segments exposed to coronary arterial hemodynamics. Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society For Vascular Surgery [and] International Society For Cardiovascular Surgery, North American Chapter. 1998;27(3): 521-7). VEN 혈류역학을 모의하기 위해, 관류 루프는 20 ml/분의 비박동류 및 20 mmHg의 압력을 제공하도록 설치되었다. ART 혈류역학을 모의하기 위해, 시스템은 100 ml/분의 평균 박동류와 함께 박동 압력 파형 120/80 mmHg을 제공하도록 설치하였다. VEN 또는 ART 조건하에서 랩핑되지 않은 정맥 및 ART 조건하 랩핑된 정맥(wART)을 조사하기 위해 별도의 실험을 수행하였다. 각각의 관류 실험은 24 시간 동안 지속하였고, 매 시간마다 관강내 압력, 외경 및 유량을 측정하였다. 이어, 정맥 분절을 아래 개시된 바와 같이 조직학적으로 또는 면역조직화학에 의해 분석하였다.

[0123] VEN 대 ART 실험

[0124] 도 6은 수행한 생체의 실험 중 첫 번째 세트를 나타내는 개략도이다. 이들 실험에서, 본 발명자들은 ART 조건에 갑작스럽게 노출된 PIJV 대 VEN 조건에 24 시간동안 노출된 PIJV에 대하여 전기방사된 생체분해성 중합체 랩의 유리한 효과를 평가하였다.

[0125] ART 대 cART 실험

[0126] 도 7은 수행한 생체의 실험 중 두 번째 세트를 나타내는 개략도이다. 이들 실험에서, 본 발명자들은 24 시간 및 72 시간동안 ART 조건에 갑작스럽게 노출된 PIJV 대 PIJV에 대하여 기계적 조건화 패러다임(cART 조건)의 효과를 평가하였다.

[0127] ART 대 wART 실험

[0128] 도 8은 수행한 생체의 실험 중 세 번째 세트를 나타내는 개략도이다. 본 발명자들은 24 시간동안 ART 조건에 노출된 랩핑되지 않은 PIJV 대 ART 조건에 노출된 PIJV 위의 조정된 생체분해성 중합체 랩(wART 조건)에 대하여 유리한 효과를 평가하였다.

[0129] 복합 실린더에서의 CWS 계산

[0130] 동맥 수준의 CWS에 대한 AVG의 갑작스러운 노출은 그의 기능상실에 원인이 될 수 있는 것으로 여겨지기 때문에, 본 발명자들은 전기방사된 생체분해성 중합체 랩의 하나의 가능한 응용에는 AVG를 동맥 수준의 CWS에 서서히 노출시키는 것이라 생각한다. 외부 피포를 사용하여 CWS를 제한하고자 하는 이전의 시도는 이들의 생체내구성 및/또는 느슨한 고정성 때문에 완전히 성공적이지 못했다. 어떻게 랩이 CWS를 조절할 수 있는 지 그리고 어떻게 랩이 목적하는 결과를 달성하기 위해 조절될 수 있는 지를 입증하기 위해, 본 발명자들은 표 1에 제시된 랩 조합 각각에 대해 CWS-대-시간 프로파일을 조사하고, 이들을 정맥 또는 동맥 조건에 노출된 랩핑되지 않은 정맥 분절과 비교하였다. 이는 생체의 관류 실험으로부터 수집한 데이터 및 CWS에 대한 수학적 모델을 사용하여 달성되었다.

[0131] 생체역학적 모델화 목적을 위해, 정맥/랩 복합체의 이상적인 횡단면을 나타내는 도 9의 개략도를 참고하기 바란다. 이층의 복합 관 중 외층을 전기방사된 중합체 랩으로서 취하고, 중심의 내층은 정맥 분절이다.

[0132] 이어, 다음과 같은 가정을 세웠다(Vorp DA, Raghavan ML, Borovetz HS, Greisler HP, and Webster MW. Modeling the transmural stress distribution during healing of bioresorbable vascular prostheses. Ann Biomed Eng. 1995;23(2): 178-88):

[0133] i) 층들 사이에는 헐거워짐 또는 분리가 생기지 않는다.

[0134] ii) 계면에 대한 변형의 적합성이 유지된다.

[0135] iii) 평균 동맥 압력하에 단지 약간의 변형이 존재한다.

[0136] iv) 시스템은 평면 응력 상태이다.

[0137] v) 두 층 모두 압축할 수 없는 등방성, 균일성 및 직선적으로 연신하는 물질이다.

[0138] vi) 각각의 분리된 층은 내부 및 외부 압력을 가한 두꺼운 벽을 가진 단일의 실린더로서 일반화될 수 있다.

[0139] 보르프(Vorp) 등(앞서 말한 문헌과 같이)에 의해 개발된 수학적 모델은 도 9에 의해 나타내어진 모델에 적합하였다. 요컨대, 본 발명자들은 내부 및 외부 압력의 작용하에 두꺼운 벽의 양단 개방형 실린더내에서 임의의 반경 r에서의 방사방향 변형(u_r) 및 방사방향 및 원주방향의 벽응력(각각 σ_r 및 σ_θ) 을 위해 고전적인 Lamé 용역을 사용하였다(위와 동일한 문헌). 도 9에 도시된 내부 (정맥) 층에 대하여, 본 발명자들은 다음을 얻었다(앞서 말한 문헌과 같이):

$$\left. \begin{aligned} \sigma_{r,v} &= \frac{a^2 P_i - b^2 P_2}{b^2 - a^2} - \frac{(P_i - P_2)a^2 b^2}{(b^2 - a^2)r^2} & (15a) \\ \sigma_{\theta,v} &= \frac{a^2 P_i - b^2 P_2}{b^2 - a^2} + \frac{(P_i - P_2)a^2 b^2}{(b^2 - a^2)r^2} & (15b) \\ u_{r,v} &= \frac{1 - \nu_v}{E_v} \frac{(a^2 P_i - b^2 P_2)r}{b^2 - a^2} + \frac{1 + \nu_v}{E_v} \frac{(P_i - P_2)a^2 b^2}{(b^2 - a^2)r} & (16) \end{aligned} \right\} a \leq r \leq b \text{의 경우}$$

[0140]

[0141] 여기서, 아래첨자 "V"는 정맥에 대한 정량을 말하며, a 및 b는 각각 정맥층의 내부 및 외부 반경이다. P_1 은 내부 압력이고, P_2 는 기계적 특성의 차이로부터 생성된 동심 실린더의 두 층간에 작용하는 계면 압력이다. ν 는 포아송 비(Poisson's ratio)이고, E는 영의 탄성계수(Young's modulus of elasticity)이다. 도 9에 도시된 외부 (랩) 층에 대하여, 본 발명자들은 다음을 가진다:

$$\left. \begin{aligned} \sigma_{r,w} &= \frac{b^2 P_2 - c^2 P_0}{c^2 - b^2} - \frac{(P_2 - P_0)b^2 c^2}{(c^2 - b^2)r^2} & (17a) \\ \sigma_{\theta,w} &= \frac{b^2 P_2 - c^2 P_0}{c^2 - b^2} + \frac{(P_2 - P_0)b^2 c^2}{(c^2 - b^2)r^2} & (17b) \\ u_{r,w} &= \frac{1 - \nu_w}{E_w} \frac{(b^2 P_2 - c^2 P_0)r}{c^2 - b^2} + \frac{1 + \nu_w}{E_w} \frac{(P_2 - P_0)b^2 c^2}{(c^2 - b^2)r} & (18) \end{aligned} \right\} b \leq r \leq c \text{의 경우}$$

[0142]

[0143] 여기서, 아래첨자 "W"는 랩으로 채워진 영역에 대한 양을 말하며, b 및 c는 각각 랩층의 내부 및 외부 반경이다. P_0 는 외부 압력이다. 층들 사이의 계면에 대한 변형의 적합성과 함께, 다음과 같아야 한다:

[0144] $r = b$ 에서 $u_{r,v} = u_{r,w}$ (19)

[0145] (16) 및 (18)을 (19)로 치환하고, $v_w = v_v = v = 0.5$ (두 물질 모두 압축할 수 없는 것으로 추정)으로 표기하며, $P_0 = 0$ (즉, 대기 압력)으로 셋팅하고, P_2 를 풀면, 본 발명자들은 다음을 얻는다:

[0146]
$$P_2 = \frac{a^2 P_1 (1-\nu) E_w b (c^2 - b^2) + (1+\nu) E_w (c^2 - b^2) b a^2 P_1}{b^2 (1-\nu) E_w b (c^2 - b^2) + (1-\nu) a^2 E_v (b^2 - a^2) + (1+\nu) E_w (c^2 - b^2) b a^2 + c^2 E_v b (b^2 - a^2)}$$
 (20)

[0147] P_1 및 외경(즉, c)은 본 발명자들의 생체의 관류 실험에서 측정되었음을 상기하기 바란다. 따라서, 각 세트의 측정된 P_1 및 c 에 대하여 내부($r = a$) 및 계면($r = b$) 반경을 평가해야 했다. 본 발명자들은 정맥 및 랩 둘 다 압축할 수 없는 재료이고, 각 실린더의 부피가 임의의 변형 상태에서 일정해야 한다는 가정을 사용하였기 때문에, 다음과 같아야 한다:

[0148]
$$[\pi(r_o^2 - r_i^2)L]_w = [\pi(r_o^2 - r_i^2)L]_p$$
 (21)

[0149] 여기서, r_o 및 r_i 는 각각 외부 및 내부 반경이고, L 은 각 실린더의 길이이며, 아래첨자 u 및 p 는 각각 비가압 및 가압 상태를 말한다. 도 9의 "랩" 실린더의 기하구조에 대하여 방정식 (21)을 적용하면 다음이 수득된다:

[0150]
$$b_p = \sqrt{\frac{c_p^2 L_p - (c_u^2 - b_u^2) L_u}{L_p}}$$
 (22)

[0151] 따라서, 임의의 측정된 c_p 및 L_p 에 대하여, b_p 의 값이 계산될 수 있다. 마찬가지로, 도 9의 "정맥" 실린더만 고려하고, b_p 에 대한 방정식 (22)를 사용하였더니, 본 발명자들은 다음을 얻었다:

[0152]
$$a_p = \sqrt{\frac{\left(\frac{c_p^2 L_p (c_u^2 - b_u^2) L_u}{L_p}\right) L_p - (b_u^2 - a_u^2) L_u}{L_p}}$$
 (23)

[0153] 방정식 (20), (22) 및 (23)을 방정식 (15b)로 치환하고, 평균 동맥 압력 및 $r = \frac{a_p + b_p}{2}$ 에서 평가하여, 본 발명자들은 중합체 랩핑된 정맥에서 중벽 CWS를 산출할 수 있었다. 본 발명자들은 계산식에서 $E_w = 7.5$ MPa(Stankus JJ, Guan J, and Wagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffoldss with sub-micron morphologies. J Biomed Mater Res A. 2004;70(4): 603-14) 및 $E_v = 600$ KPa(Wesly RL, Vaishnav RN, Fuchs JC, Patel DJ, and Greenfield JC. Static linear and nonlinear elastic properties of normal and arterialized venous tissue in dog and man. Circulation Research (Online). 1975;37(4): 509-20)임을 추정하였다.

[0154] **혈관운동 챌린지 실험**

[0155] 조직 생존능에 대한 전기방사 공정의 효과를 평가하기 위해, 본 발명자들은 새로 절제한 미처리("대조군") 조직 뿐만 아니라 적소에 중합체 랩을 가지거나("방사(spun)") 없는("위장(sham)") PIJV 분절을 조사하였다. 전기방사된 중합체 랩이 없는 위장 PIJV 분절의 경우, 본 발명자들은 중합체 랩이 실제 배치되는 지점까지 전기방사 공정을 모방하였다(즉, 맨드릴의 삽입 및 전기장내에서 정맥을 회전/평행이동하는 단계를 포함). 조직 기능성은 앞서 기술된 바와 같은 생체의 혈관운동 챌린지를 사용하여 평가하였다(Labadie RF, Antaki JF, Williams JL, Katyal S, Ligush J, Watkins SC, Pham SM, and Borovetz HS. Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue. Am J Physiol. 1996;270(2 Pt 2): H760-8 and Ligush J, Labadie RF, Berceci SA, Ochoa JB, and Borovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. J Surg Res. 1992;52(5): 416-21). 요컨대, 혈관 분절에 케놀라를 꽂아 20 mmHg의 일정한 관광내 압력하에 배치하고, 증가하는 양의 에피네프린(EPI)에 노출시킨다. 실험내내, 혈관 외경(D)을 레이저 마이크로미터로 연속적으로 측정하였다(Labadie RF, Antaki JF, Williams JL, Katyal S, Ligush J, Watkins SC, Pham SM, and Borovetz HS. Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular

tissue. Am J Physiol. 1996;270(2 Pt 2): H760-8; Brant AM, Rodgers GJ, and Borovetz HS. Measurement in vitro of pulsatile arterial diameter using a helium-neon laser. J Appl Physiol. 1987;62(2): 679-83; and Ligush J, Labadie RF, Berceli SA, Ochoa JB, and Borovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. J Surg Res. 1992;52(5): 416-21). 최초 용량의 EPI를 주입하기 전에, 기준 직경($D_{기준}$)을 측정하였다. 그후, 1분, 4.5분 및 10분에 최종 농도가 각각 2×10^{-5} , 2×10^{-4} 및 2×10^{-3} mg/ml이 되도록 EPI를 주입하였다. 각각의 용량과 함께 최대 혈관수축을 관찰한 후, 각각의 후속적인 용량을 투여하였다. 최대 용량의 EPI를 투여하고 최대 수준의 수축($D_{수축}$)을 관찰한 후, 25 mg/ml 나트륨 니트로프루시드(SNP)의 2 ml 볼루스를 주입하여 0.125 mg/ml의 최종 농도를 제공하였다. 완전 확장이 관찰되었을 때, $D_{확장}$ 을 기록하였다. EPI에 대한 수축의 수준을 다음과 같이 계산하였다:

$$\text{수축율 (\%)} = \frac{D_{기준} - D_{수축}}{D_{수축}} * 100 \quad (24)$$

[0156]

마찬가지로, SNP에 대한 확장의 수준을 다음과 같이 계산하였다:

$$\text{확장률 (\%)} = \frac{D_{확장} - D_{수축}}{D_{수축}} * 100 \quad (25)$$

[0158]

순응도(*compliance*) 및 베타-경직도(β -*stiffness*) 측정

[0159]

외경(OD) 및 관강내 박동 압력(P)을 상술된 ART 대 wART 24-시간 관류 실험(N=6) 동안 매시간 측정하였다. 이들 측정값을 사용하여 방사 및 위장 대조군 PIJV 둘 다에 대해 순응도(C) 및 β -경직도(β)를 산출하였다. 샘플링 주파수 150 Hz를 사용하여, 데이터 중 대략 5 개의 완전한 "심장 주기"가 수집되도록 5 초동안 매시간 측정하였다. 이어, 획득된 신호를 여과하여 플롯팅하였다. 각 주기에 대한 최대(OD_s 및 P_s) 및 최소(OD_d 및 P_d) 값을 사용하고, 방정식 (26)을 사용하여 C를 산출하고, 방정식 (27)을 사용하여 β 를 산출하였다(Hayashi K. Experimental approaches on measuring the mechanical properties and constitutive laws of arterial walls. J Biomech Eng. 1993;115(4B): 481-8). 5 개의 값을 평균내고 하나의 C 및 β 값을 매 시간 산출하였다.

[0160]

$$C = \frac{(OD_s - OD_d / OD_d)}{P_s - P_d} \quad (26)$$

[0161]

$$\beta = \frac{\ln(P_s - P_d)}{(OD_s - OD_d / OD_d)} \quad (27)$$

[0162]

관류후 조직 처리

[0163]

본 발명자들은 1 일 및 3일의 실험 기간으로부터 종점을 산출할 것이다. 본 발명자들은 새로 절제된 혈관 분절을 사용하는 경우 이러한 관류 기간동안 조직 생존능의 유지가 달성될 수 있음을 확립하였다(Ligush J, Labadie RF, Berceli SA, Ochoa JB, and Borovetz HS. Evaluation of endothelium-derived nitric oxide mediated vasodilation utilizing ex vivo perfusion of an intact vessel. J Surg Res. 1992;52(5): 416-21). 정맥의 과형성 응답은 섹션 1.2에서 요약된 주의깊게 선택된 다양한 종점을 측정함으로써 정량화될 수 있다. 이들 종점은 필요한 조직 처리공정에 기초하여 3 개의 범주로 분류될 수 있다: i) 조직학(미세/초미세구조 포함); ii) RNA 분석; 및 iii) 단백질 분석. 모든 정맥 분절은 도 10에 따라 분절되고 처리되었다.

[0165]

생물학적 분석

[0166]

상기에 대해 제안된 생물학적 종점은 필요한 측정법의 형태에 대하여 분자-기초적 또는 조직학적으로 특징화될 수 있다. 조직학적 종점은 미세구조, 아포토시스, 증식능, SMC 표현형 마커 및 세포-부착 마커의 평가를 포함하였다. 단백질 및 RNA의 분리에 필요한 단백질 및 유전자 발현 종점은 분자로 분류된다.

[0167]

조직학 분석을 위해 제공된 시료(도 10)를 냉동장치로부터 취한 즉시 Tissue Freezing Medium™(Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC)에 매설한 다음 -65°C 에서 동결하였다. 냉동절편기(cryotome)를 사용하여 5

미크론의 절편을 절단하여 양으로 하전된 현미경 글라스 슬라이드에 배치하였다. 조직학적 또는 면역조직화학적 측정을 수행할 수 있을 때까지 슬라이드를 -80℃로 저장하였다.

[0168] 조직학

[0169] 생체의 관류 시스템으로부터 정맥을 제거한 다음, 이들을 4℃에서 4 시간동안 4% 파라포름알데히드 이어 4℃에서 밤새 30% 수크로스에 고정하였다. 5 mm의 조직 환을 절단하고 PBS로 세척한 다음 Tissue Freezing Medium™(Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC)에 매설한 다음 5 μm 절편으로 잘라내었다. 조직 절편을 헤마톡실린 및 에오신(H&E), 매슨 트릭롬(MTC), 피크로시리우스 레드 또는 모벳 펜타크롬 염색으로 염색하였다. 이어, 염색된 조직 절편을 올림푸스 프로비스(Olympus Provis) 광학 현미경(Olympus, Center Valley, PA, USA)을 사용하여 가시화한 다음 정량적으로 비교하였다.

[0170] 주사전자현미경

[0171] 전기방사 램핑된 PIJV를 주사전자현미경(SEM)에서 조사하였다. 요컨대, SEM을 위해 설계된 조직 분절을 초순수 2.5% 글루테르알데히드에 고정하고, 일련의 단계적인 에탄올 용액(30-100%)을 통해 탈수하며, 임계점 건조시킨 다음(Emscope, CPD 750, Ashford, Kent, UK), 증발 탄소로 피복하였다(Cressington Freeze Fracture Device, Cressington, Cranberry, PA, USA). JEOL JEM-6335F 장 방출 건(field emission gun) SEM(JEOL, Peabody, MA, USA)을 사용하여 조직을 가시화하였다.

[0172] 피사

[0173] 조직 생존능에 대한 전기방사 공정의 효과를 평가하기 위해, 본 발명자들은 방사 및 위장 PIJV 분절 뿐만 아니라 새로 절제한 미처리 ("대조군") 조직을 조사하였다. 제조업자의 지침에 따라 냉동절편(cryosection)의 Live/Dead™ 염색(Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 조직 피사를 조사하였다. Live/Dead™ 염색을 위한 각각의 분절(대조군, 위장 대조군 및 방사)을 반으로 절단하고 표준 배양기 조건하 페트리-디쉬내에서 정적 배양에 배치하였다. 각 분절의 1/2을 배양 18 시간후에 평가하고, 나머지 반을 92 시간후에 평가하였다. 5 mm 환을 각각의 시료로부터 절단하고 냉동기질(cryomatrix)(TBS, Durham, NC)에 매설한 다음 동결시켰다. 5 개의 8 μm 절편을 각각의 환으로부터 절단하고 에피형광 현미경(epifluorescence microscopy)(Nikon, Model E800, Melville, NY, USA)을 사용하여 20x 확대하에 이미지화하였다. 절편 당 2 개의 이미지를 취하여 PIJV 분절에 대하여 총 10 개의 시야를 정량하였다. Scion Image(Version Beta 4.02, NIH, Bethesda, MD)을 사용하여 시야 중 세포의 총 수를 계수하였다. 시야 중 생존 세포의 비율을 결정하기 위해, 사멸 세포를 수동으로 계수하고, 이를 세포의 총수로 나눈 다음 100%를 곱하였다. 사멸 세포의 비율을 100%로부터 빼어 생존 세포의 비율을 산출하였다.

[0174] 아포토시스

[0175] In Situ Cell Death Kit, 형광물질(TUNEL)(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)을 사용하여 아포토시스를 평가하였다. 이 측정법은 아포토시스의 게놈 DNA 분할 효소를 확인하는 TUNEL 기술을 사용한다. 요약하면, 횡절편을 37℃에서 20 분동안 건조시키고, 4% 파라포름알데히드에 20 분동안 고정한 다음 인산 완충 식염(PBS)에서 30 분동안 재수화하였다. 이어, 시료를 for 30 minutes. Samples were then incubated at room temperature for 10 minutes each in 10 μg/ml의 단백질분해효소 K, 이어 막의 투과성을 위해 0.1% Triton X-100 및 0.1% 시트르산나트륨의 신선하게 제조한 용액에 각각 10 분동안 실온에서 인큐베이션하였다. 말단 데옥시뉴클레오티드 전이효소 및 형광 표지된 dUTP와 37℃에서 1 시간동안 인큐베이션함으로써 DNA 사슬 절단을 확인하였다(둘 다 Roche로부터의 키트에 제공됨). 핵을 Hoechst 33258로 대조염색하였다. 작은 세트의 시료를 100 U/ml의 DNase I로 처리하여 양성 대조군으로서 제공하였고, 매 시간 효능을 보증하기 위해 분석을 수행하였다. 인큐베이션 시간, 온도 및 시약 농도를 비롯한 모든 시료 제조 파라미터를 DNase I 처리 양성 대조군을 사용하여 최적화하였다. 음성 대조군을 전이효소없이 표지된 dUTP와 함께 인큐베이션하였다.

[0176] TUNEL 양성 세포 비율의 정량화를 수동 계수 절차(manual counting procedure)를 사용하여 수행하였다. 횡절편에 대한 양성 세포의 평균 비율을 규정하기 위해 5 μm의 횡절편으로부터의 5 개의 FOV(시야) 각각으로부터 양성 세포를 평균내었다. 하나의 분절로부터의 TUNEL 양성 세포의 평균 비율(도 10)을 결정하였다.

[0177] 증식

[0178] 면역조직화학에 의해 측정된 증식성 세포핵항원(PCNA)의 발현에 의해 증식능을 평가하였다. TUNEL 측정법에 대

하여 기술된 바와 같이 5 미크론의 횡절편을 건조, 고정 및 투과처리하였다. 시료를 PBS 중 1% 말 혈청과 함께 15 분동안 인큐베이션하여 항체의 비특이적 결합을 차단하였다. 이후, 시료의 건조를 방지하기 위해 습윤 챔버에서 시료를 인간 PCNA(Dako Cytomation, Clone PC10, Denmark)에 대한 마우스의 일차 단클론성 항체와 함께 4 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 미결합 일차 항체를 PBS에서의 후속 세척에 의해 제거하였다. 이어, 횡절편을 습윤 챔버에서 Vectastain Elite™ HRP(horse-radish peroxidase) 및 아비딘-바이오틴 검출 시스템(Vector Labs, Cat.# PK-6200, Burlingame, CA)의 일부인 범용 (항-마우스 및 항-래빗) 바이오틴화 이차 항체와 함께 60 분동안 37°C에서 인큐베이션한 다음 PBS로 3 회 세정하였다. 이어, Vectastain™ 시약과의 인큐베이션을 실온에서 30 분동안 수행하였다. 양성으로 염색된 세포를 검출하기 위해, 디아미노벤지딘(diaminobenzidine, DAB) 기질(Vector Labs, Cat.# SK-4100, Burlingame, CA)을 사용하였다. 효소 반응에 의해 PCNA 양성 세포가 갈색으로 염색되었고, 목적하는 수준의 염색이 달성될 때까지 현미경(100x 확대)을 통해 가시화하였다. 이어, 슬라이드를 탈이온수에 넣어 반응을 중지시켰다. 핵 가시화를 위해, 제조업자의 지침에 따라 세포를 헤마톡실린(Vector Labs, Cat.# H-3401, Burlingame, CA)으로 대조염색하였다. PCNA 양성 세포 비율의 정량화를 TUNEL에 대한 것과 동일한 방법을 사용하여 수행하였다.

[0179] SMC 표현형

[0180] 합성 SMC 표현형을 검출하기 위해, 본 발명자들은 인간 골지 복합체에 대하여 상승하는 마우스의 단클론성 항체를 사용하였다(Abeam, Cat.# ab14487, Cambridge, MA). 상술한 바와 같은 동일한 절차(PCNA)를 사용하여 정맥의 분절 당 골지 복합체 양성 세포의 평균 비율을 정량화하였다.

[0181] 통계학

[0182] 혈관운동 챌린지 데이터 및 면역조직화학 이미지 정량화 데이터에 대하여, 평균치에 대한 Paired Student's T-test를 수행하였고, P<0.05는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다. 달리 언급하지 않는 한, 모든 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다.

[0183] 결과

[0184] CWS 프로파일

[0185] 도 11에서 외경 프로파일을 조사한 경우, 랩에 의해 정맥에 제공된 구조적 지지체가 분명했다. 랩을 가진 정맥은 ART 조건하에서 랩을 가지지 않은 정맥과 같은 정도로 확대하지 않는 것으로 나타났다. 직경의 감소는 아래 개시된 동일한 수준의 동맥 압력하에 랩핑되지 않은 대조군에 비해 정맥벽에서 CWS를 효과적으로 감소시켰다.

[0186] 표 3.1의 증합체 용액 조합에 대한 CWS 대 시간 프로파일은 다소 가변적이었다(도 12). 하나의 경우에서(조합 B), 랩이 너무 빠르게 분해하여, ART 조건하에서 CWS를 신속하게 증가시켰다. 다른 조합(C 및 D)은 충분히 신속하게 분해되지 않았고, 24-시간 기간에 걸쳐 감지할 수 있을 정도로 증가하지 않았다. 조합 A는 24-시간 기간에 걸쳐 CWS의 VEN 및 ART 수준 사이에서 거의 선형의 변형을 생성하는 속도로 분해하였다. 본 조합을 반복하였고(N=7) 효과가 재현성있는 것으로 밝혀졌다.

[0187] 혈관운동 챌린지 결과

[0188] 전형적인 혈관운동 챌린지 실험의 결과를 도 13에 도시하였다. 위장 PIJV 분절은 EPI에 의한 자극에 대하여 예측가능한 용량-의존 방식으로 응답한 반면, 방사된 PIJV는 최소 용량의 EPI로 개시하는 단일 수축을 나타내었다. SNP에 대한 혈관확장은 대조군 및 방사 PIJV 둘 다 유사하였고, 각각은 기준에서 보다 더 큰 외경을 생성하였는데, 이는 위장 및 방사 PIJV 둘 다에서 특정 수준의 기저 긴장을 제시한다. 종합적으로, 위장 및 방사 PIJV 분절 사이의 수축(도 14A) 또는 확장(도 14B)의 수준에서 유의적인 차는 없었다.

[0189] 순응도 및 β-경직도

[0190] 도 15a 및 도 15c에서, 본 발명자들은 동맥 수준의 압력에 노출되었을 때 PIJV가 매우 경직된다는 것(따라서 순응성이 크게 떨어진다는 것)을 알았다. 동일한 혈류역학 조건하에, PIJV의 외막 표면에 방사된 조정된 증합체 랩은 감소된 경직도(도 15b) 및 증가된 순응도(도 15d)에 의해 명백한 구조적 지지체를 제공하였다. 기술적 문제로 인해, 위장 대조군 중 하나에 대한 압력 및 직경 측정은 불가능하였고, 따라서 데이터 세트가 방사 군(N=6)에서 보다 하나 적었다(N=5)는 것을 유의하기 바란다.

[0191] 생물학적 분석

- [0192] 조직학
- [0193] 조직학적 이미지는, 중합체 랩이 정맥의 외막 표면에 잘 부착되는 것을 나타내었고, 대략 균일한 두께로 전기방사될 수 있다는 점에서 SEM 이미지와 일치하였다(도 16A 및 16C). 추가로, 24 시간의 관류 기간 이후 중합체가 거의 완전히 분해되었다(도 16B 및 16D).
- [0194] 도 17은 피크로시리우스 레드로 염색된 정맥 절편의 대표적인 복굴절 이미지를 나타낸다. 각각의 이미지에서, 적색에서 녹색의 색 범위는 적색이 가장 조직화된 것이고 녹색이 덜 조직화된 것인 콜라겐 섬유 조직화의 범위를 가리킨다. 연신된 섬유는 파립상이 아닌 줄무늬 모양을 보이는 반면, 염색의 파립상 외관은 천연의 주름진 콜라겐 섬유 상태를 가리킨다. 이러한 결과는, 24 시간동안 ART 조건하에 생체외에서 관류된 대조군 PIJV 분절과 비교했을 때, 중합체 랩이 콜라겐 섬유 연신의 수준을 감소시킨다는 것(조직화 증가 및 주름 감소 포함)을 제시한다.
- [0195] 모벳 펜타크롬 염색 조직 절편의 대표적인 이미지를 도 18에 도시하였다. VEN 및 wART 조건 둘 다와 비교했을 때, 내탄성층은 ART 조건하에 관류된 PIJV에서 감소된 것으로 나타났다. 피크로시리우스 레드 염색과 마찬가지로, 본 데이터는 ART 조건에 노출된 경우, 중합체 랩이 정맥벽내에서의 연신 수준을 감소시키는데 성공적이었음을 제시한다.
- [0196] SEM
- [0197] 전기방사된 외막 랩은 정맥의 외막 표면에 대하여 견고한 부착성 및 높은 다공성을 나타내었는데(도 19A-C), 이는 랩이 조직으로의 기체 확산 및 외막의 영양을 억제하지 않으면서 AVG에 구조적 지지체를 제공한다는 것을 제시한다. 또 다른 중요한 소견은 전기방사 공정이 내피층을 손상시키는 흔적이 보이지 않았고, 이것이 계속 지속되었다는 점이다(도 19D).
- [0198] 괴사
- [0199] 각 시점 동안 각 실험군들 사이에서 조직 생존능의 유의차는 없었다(도 20).
- [0200] 아포토시스
- [0201] 도 21은 상술한 4 개의 생체의 혈관 관류 실험 모두로부터 얻은 TUNEL 염색의 쌍을 이룬 대표적인 형광 면역조직화학적 이미지를 나타낸다. 도 22는 이들 실험으로부터의 정량적인 TUNEL 분석 결과를 나타낸다. VEN 대조군에 비해 ART 조건에 갑작스럽게 노출된 PIJV내에서 아포토시스 세포가 통계학적으로 유의하게 증가한다는 것을 알 수 있다. 그러나, cART 조건(24 시간 및 72 시간 모두) 및 전기방사된 생체분해성 중합체 랩(wART 조건)을 통해 가해진 기계적 조건화 패러다임은 ART 대조군 조건에 비해 PIJV에서 아포토시스 세포의 수가 통계학적으로 유의하게 감소하였다.
- [0202] 증식
- [0203] 도 23은 상술한 4 개의 생체의 혈관 관류 실험 모두로부터 얻은 PCNA 염색의 쌍을 이룬 대표적인 HRP/ABC 기초 면역조직화학적 이미지를 나타낸다. 도 24는 이들 실험으로부터의 정량적인 PCNA 분석 결과를 나타낸다. VEN 대조군에 비해 ART 조건에 갑작스럽게 노출된 PIJV내에서 세포 증식이 통계학적으로 유의하게 감소한다는 것을 알 수 있다. 그러나, cART 조건(24 시간) 및 전기방사된 생체분해성 중합체 랩(wART 조건)을 통해 가해진 기계적 조건화 패러다임은 ART 대조군 조건에 비해 PIJV에서 증식 세포의 수가 통계학적으로 유의하게 억제되었다. 72 시간 동안 cART 조건에 노출된 PIJV에서 증식 세포의 수는 ART 대조군과 비교하여 통계학적 유의차는 없었다.
- [0204] SMC 표현형
- [0205] 도 25는 상술한 4 개의 생체의 혈관 관류 실험 모두로부터 얻은 골지 복합체 염색의 쌍을 이룬 대표적인 HRP/ABC 기초 면역조직화학적 이미지를 나타낸다. 도 26은 이들 실험으로부터의 정량적인 골지 복합체 분석 결과를 나타낸다. VEN 대조군에 비해 ART 조건에 갑작스럽게 노출된 PIJV내에서 골지 복합체에 대한 양성 염색 세포의 수가 통계학적으로 유의하게 증가한다는 것을 알 수 있다. 그러나, cART 조건(24 시간 및 72 시간 둘 다) 및 전기방사된 생체분해성 중합체 랩(wART 조건)을 통해 가해진 기계적 조건화 패러다임은 ART 대조군 조건에 비해 PIJV에서 골지 복합체에 대해 양으로 염색된 세포의 수의 증가가 통계학적으로 유의하게 억제된다는 경향만을 제시한다.
- [0206] 결론

- [0207] 본 챗터에서 나타난 작업은 전기방사된 생체분해성 중합체 랩이 정맥 분절에 균일하고(도 16) 안전하게(도 13 및 14) 전기방사될 수 있다는 것 및 CWS가 목적하는 속도로 AVG에 적용되도록 랩이 완전하게 분해되도록 조정될 수 있다는 것(도 12)을 나타낸다. 외막 배치된 전기방사 중합체 랩의 생체분해 속도가 조절되면, AVG에서 IH를 감소시키기 위한 세 개의 잠재적으로 유리한 지지체를 제공할 수 있다. 본원에 나타난 바와 같이, 생체역학적 지지체는 목적하는 속도로 전달될 수 있다. 결과적으로, 생화학적(약물) 및 생물학적(세포) 지지체 둘 다의 전달은 이론적으로 동일한 접근법(Stankus JJ, Guan J, Fujimoto K, and Wagner WR. *Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix*. *Biomaterials*. 2006;27(5): 735-44 and Stankus JJ, Soletti L, Kazuro F, Hong Y, and Vorp DA. *Fabrication of cell microintegrated blood vessel constructs through electrohydrodynamic atomization*. 2007;Accepted)을 사용하여 달성될 수 있다. AVG 미세 구조에 대한 중합체 랩의 잠재적으로 유리한 효과는 피크로시리우스-레드 및 모벳 펜타크롬 염색으로부터 관찰되었다(각각 도 17 및 18). 중합체 랩은 AVG에 구조적 지지체를 제공하여 콜라겐 섬유의 천연적으로 더 주름진 배열(도 17) 뿐만 아니라 내탄성층에의 손실 저하(도 18)를 생성하는 것으로 보인다. AVG 벽을 구성하는 구조 단백질의 융합성 유지는 혈관 ECs 및 SMC에 의해 용인된 유해한 기계적 요인의 트리거를 최소화하기 위해 도움이 것이며, 따라서, AVG에서 IH를 감소시키는데 도움을 줄 수 있다. 본 발명자들은 또한 전기방사된 PIJV에서 Live/Dead™ 염색을 통해 괴사의 수준을 평가하였고, 위장 및 정적 대조군에 대한 전기방사에 기인하여 감지할 수 있는 정도의 괴사 증가를 보이지 않았다(도 19). 혈관운동 챗터지 데이터(도 13 및 도 14) 이외에, 본 데이터는 조직 생존능이 전기방사에 의해 영향을 받지 않음을 나타내기 위한 많은 증거이다.
- [0208] 면역 조직학 결과는 동맥 수준의 CWS에 대한 AVG의 점진적 노출이 그의 갑작스러운 노출에 비해 유리할 수 있음을 제시한다. 도 22 및 도 24에 각각 나타난 바와 같이, 아포토시스와 증식능 사이의 균형은 VEN 대조군에 비해 ART 조건에 대한 PIJV의 갑작스러운 노출로 인해 붕괴되는 것으로 나타났다. ART 조건하 관류된 PIJV에서 관찰된 아포토시스 증가 및 증식능 감소는 정맥의 변경된 생체역학적 환경으로 인해 세포 기능이 즉각적으로 변화한다는 것을 제시한다. 이러한 정맥내 세포 기능의 변화는 cART 및 wART 생체의 관류 조건을 통한 동맥 수준의 CWS의 보다 점진적인 부과에 의해 억제되는 것으로 나타났다. 또한, 예상했던 대로, ART 조건에 노출된 PIJV에서 골지 복합체의 발현 수준은 VEN 대조군 이상으로 증가하였는데(도 26), 이는 보다 합성적인 상태로의 SMC 표현형 조절을 나타낸다. 이와 같은 세포 기능의 관찰된 변화는 cART 또는 wART 조건을 통한 CWS의 ART 수준에의 점진적 노출에 의해 통계학적으로 유의하지 않게 억제되었다. 그러나, 이러한 변화의 억제에 대하여 관찰된 경향을 도 26에 도시하였다. 이러한 경향이 통계학적으로 유의해지면, 추가의 실험이 요구된다.
- [0209] ART 조건에 대한 PIJV의 노출로부터 생성된 SMC 표현형의 관찰된 변경은 이전 보고된 데이터와 일치한다(Simosa HF, Wang G, Sui X, Peterson T, Narra V, Altieri DC, and Conte MS. *Survivin expression is up-regulated in vascular injury and identifies a distinct cellular phenotype*. *J Vasc Surg*. 2005;41(4): 682-90; Zhang WD, Bai HZ, Sawa Y, Yamakawa T, Kadoba K, Taniguchi K, Masuda J, Ogata J, Shirakura R, and Matsuda H. *Association of smooth muscle cell phenotype modulation with extracellular matrix alterations during neointima formation in rabbit vein grafts*. *J Vasc Surg*. 1999;30(1): 169-83; and Wolff RA, Malinowski RL, Heaton NS, Hullett DA, and Hoch JR. *Transforming growth factor-beta antisense treatment of rat vein grafts reduces the accumulation of collagen and increases the accumulation of h-caldesmon*. *J Vasc Surg*. 2006;43(5): 1028-36). AVG에 동맥 수준의 CWS를 더욱 점진적으로 부과한다는 개념은 이전에 보고된 바가 없지만, 결과적으로 과형성 응답을 감소시킬 수 있는 SMC 표현형 조절을 지연 또는 억제하기 위한 수단을 생성하였다. VEN 조건에 비해 ART에 노출된 PIJV에서의 아포토시스 감소는 또한 공개된 결과와 일치한다(Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, and Kent KC. *The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation*. *Surgery*. 2002;132(2): 317-25; Pintucci G, Saunders PC, Gulkarov I, Sharony R, Kadian-Dodov DL, Bohmann K, Baumann FG, Galloway AC, and Mignatti P. *Anti-proliferative and inflammatory effects of topical mapk inhibition in arterialized vein grafts*. *Faseb J*. 2006;20(2): 398-400; Alcocer F, Whitley D, Salazar J, Jordan W, and Bland KI. *Mutual exclusion of apoptosis and hsp70 in human vein intimal hyperplasia in vitro*. *J Surg Res*. 2001;96(1): 75-80; Igase M, Okura T, Kitami Y, and Hiwada K. *Apoptosis and bcl-xs in the intimal thickening of balloon-injured carotid arteries*. 1999;96(6): 605-12; Kamenz J, Seibold W, Wohlfrom M, Hanke S, Heise N, Lenz C, and Hanke H. *Incidence of intimal proliferation and apoptosis following balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model*. *Cardiovasc Res*. 2000;45(3): 766-76; and Wang GJ, Sui XX, Simosa HF, Jain MK, Altieri DC, and Conte MS. *Regulation of vein graft hyperplasia by*

survivin, an inhibitor of apoptosis protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10): 2081-7). 그러나, VEN, cART 및 ART 군에 비해 ART 관류된 PIJV에서의 증식능 감소는 일부 공개된 데이터와 불일치하였다 (Nishibe T, Miyazaki K, Kudo F, Flores J, Nagato M, Kumada T, and Yasuda K. Induction of angiotensin converting enzyme in neointima after intravascular stent placement. *Int Angiol.* 2002;21(3): 250-5; Predel HG, Yang Z, von_Segesser L, Turina M, Buhler FR, and Luscher TF. Implications of pulsatile stretch on growth of saphenous vein and mammary artery smooth muscle. *Lancet.* 1992;340(8824): 878-9 and Dethlefsen SM, Shepro D, and D'Amore PA. Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res.* 1996;33(5): 405-13). 그러나, 리유(Liu) 등은 동맥 혈류역학으로 인한 기계적 연신이 세포사를 유도하고, 이것은 아마도 후속하는 세포 증식을 매개한다는 것을 제시하였다(Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, and Kent KC. The signaling protein rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. *Surgery.* 2002; 132(2): 317-25). 이 학술 논문에서 연구된 단기 시점은 ART 관류된 PIJV에서의 아포토시스의 초기 증가 이후 증식능의 상승을 인지하기에는 충분히 길지 않을 수 있다.

[0210] 본 챕터의 몇몇 제한점에 주목해야 한다. Live/Dead™ 측정법은 생존 세포 및 조직에서의 괴사를 평가하는데 넓게 사용되고 있지만, 그것은 틀림없이 본 발명자들의 응용예에 이상적으로 적합하지 않았다. 이는 시약이 혈관 조직의 두께를 통과하여 확산될 수 있는 한정된 거리에 기인하였다. 중막은 대부분 신호가 없는 반면 염색이 정맥벽의 내막 및 외막 층에서 주로 일어난다는 것이 관찰되었다. 전기방사 공정의 역효과가 중합체 랩과 정맥벽 사이의 접촉 영역(즉, 외막) 뿐만 아니라 맨드릴과 정맥벽 사이의 접촉 영역(즉, 내강)에 존재한다는 것이 사실이다. Live/Dead™ 측정법은 이들 영역 모두에서 잘 작동하는 것처럼 보였고, 대조군 조직과 비교했을 때 감지할 수 있을 정도의 괴사의 수준 증가는 보이지 않았다. 추가로, 혈관운동 켈린지 데이터는 방사된 PIJV가 조직의 중막 층을 포함하는 SMC의 생존능을 입증한 위장 대조군과 동일한 강도로 접촉될 수 있다는 것을 나타내었다. 마지막으로, 본 발명자들은 위장 및 방사 PIJV의 혈관운동 응답을 기준 대조군 응답, 즉 새로 절제한 PIJV 분절과 이상적으로 비교하였다. 그러나, 본 발명자들은 동물마다 두 개의 PIJV 분절만을 수확할 수 있었기 때문에, 즉각적인 시험에 대해 PIJV의 세 번째 분절을 얻는 것은 실행가능하지 않았다. 본 발명자들은 전기방사와만 관련이 있는 차이점을 평가하고자 했다는 점에서 기준 대조군에 대한 위장 대조군의 선택은 허용가능하였다고 생각한다.

[0211] **결론**

[0212] 본 발명자들은 조정가능한 중합체 랩이 생존능 또는 기능을 손상시키지 않으면서 정맥 분절에 적용될 수 있음을 본원에서 보여주었고, 하나의 가능한 응용예, 즉 동맥 수준의 압력에 노출된 랩핑된 정맥에서 중막 CWS를 점진적으로 부과하는 것을 입증하였다. 갑작스러운 노출 보다 동맥 수준의 CWS의 점진적인 부과는 AVG의 과형성 응답을 감소시키고 대신 안전한 동맥혈화를 촉진하는 중요한 신규 수단일 수 있다.

[0213] 외막 중합체로의 약품 또는 세포의 혼입은 장래가능한 응용예를 나타내며, 추가로 AVG의 개존성을 증가시킬 수 있다. 본 발명자들이 알고 있는 한에서, 생체분해성 AVG 랩/피포를 통한 세포 지지체의 조절된 전달은 이전에 보고된 바 없으며, 따라서 외막 랩의 이러한 장래가능한 응용예는 신규할 것이다. 본원에 사용된 중합체는 특징화되었고, 생존가능 SMC와 성공적으로 미세융합되었으며, 이러한 장래가능한 응용예에 적합할 것이다.

[0214] **실시예 4 - 시험관내 동맥성 정맥 이식술**

[0215] 8 개(N=8)의 "개념 증명(proof of concept)" 목동맥 삽입 정맥 이식 실험을 수행하였다. 본 발명자들은 전임상 모델에서 목동맥 삽입 이식편으로서 이식된 정맥 분절의 급성 및 만성 과형성 응답에 대한 전기방사된 PEUU 외막 랩의 경감 효과를 평가하고자 하였다. 이를 위해, 본 발명자들은 돼지에 대한 일측성 자가 목동맥 삽입 이식 프로토콜을 사용하였다. 돼지를 "방사 군" AVG 및 "위장 대조군" AVG인 2개의 군으로 나누었다. 각 동물은 그의 정맥 이식편 공여체의 역할을 하였다. 요약하면, PIJV를 실시예 2에 개시된 바와 같이 수확하고, 본원에 개시된 전기방사 공정을 사용하여 실시부에 개시된 동일한 랩 조성물 및 두께로 방사하거나, 위장 대조군으로 지정하였다. 게다가, 전기방사된 중합체 랩이 없는 위장 PIJV 분절을 위해, 본 발명자들은 중합체 랩이 실제 배치되는 지점까지 전기방사 공정을 모방하였다(즉, 맨드릴의 삽입 및 정맥을 전기장내에서 정맥을 회전/평행이동하는 단계를 포함). 이어, 방사 군과 비교하여 위장 대조군에서 IH가 크게 보이도록 하는데 충분한 이식 기간인 30 일동안(또는 비가역적인 합병증이 관찰될 때) 목동맥 삽입 이식편으로서 AVG를 이식하였다(Angelini GD, Bryan AJ, Williams HM, Morgan R, and Newby AC. Distention promotes platelet and leukocyte adhesion and reduces short-term patency in pig arteriovenous bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99(3):

433-9; Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FC, Baird R, and Jeremy JY. Long-term reduction of media and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. J Vasc Surg. 2004;40(5): 1011-9 and Jeremy JY, Dashwood MR, Timm M, Izzat MB, Mehta D, Bryan AJ, and Angelini GD. Nitric oxide synthase and adenylyl and guanylyl cyclase activity in porcine interposition vein grafts. Ann Thorac Surg. 1997;63(2): 470-6). 혈관조영술을 통한 개존성의 평가 이외에, IH의 조직학적 평가를 위해 체외이식된 AVG를 처리하였다. 사실상 생체내 연구의 정량화 중점은 엄밀히 조직학적이었음을 유의하기 바란다.

[0216] **방법**

[0217] 일측성 돼지 목동맥 삽입 이식술

[0218] 동물을 실험일보다 7-10 일 이전에 시설에 가져온 다음 수술 12 시간 전에 절식시켰다. 수술 전, 동물을 아세프로마진(Acepromazine) 0.15 mg/kg IM 및 케타민(Ketamine) 15.0 mg/kg IM의 조합물로 마취하고, 이소플루란(산소 중 1-3%)을 삽관하고 유지하였다. 각각의 동물이 그 절차에 대하여 결찰되거나 표본화되면, 수술실로 옮겨 양압 환기(positive pressure ventilation)에 배치하고 모니터링 장비(ECG)를 장착하였다. 수술 절차내내 맥박산소계 측기 및 혈압을 모니터링하였다. 마취 도입 후, 무균 수술을 실시하였다.

[0219] 일측성 경부 절개에 의해 보통의 목동맥을 노출시켰다. 이어, 동물에 헤파린을 첨가하고(300 UI/Kg), 비외상성 혈관 클램프를 사용하여 동맥을 근위부 및 원위부에서 클램핑하였다. 클램프들 사이의 분절을 절개하였다(약 6 cm). 각각의 돼지는 그의 이식편 공여체의 역할을 하였다. 이어, 새로운 일측성 IJV 수확을 상술된 바와 같이 돼지에서 수행하였다. 이어, 수확한 IJV를 방사하거나(상술되고 스탠쿠스(Stankus) 등[47]이 개시된 바와 같이), 위장 대조군으로서 지정하였다. 이어, 단속적인 7-0 프롤렌 봉합사를 사용하여 정맥 분절을 (한쪽 끝과 다른 한쪽 끝을 잇는) 일측성 목동맥 삽입 절편으로서 이식하였다.

[0220] 수술 후, 동물을 집중치료실에서 회복하게 하고 머무르게 했다. 외과적 절차 및 흡입 마취의 종료 후, 연하 반사를 나타냈을 때 동물을 발관하였더니(extubated), 방어적 기침 반사가 작용한다. 동물을 24 시간 동안 계속 모니터링하였고, 다음의 파라미터를 매 시간 기록하였다: 맥박수, 맥박 강도, 모세혈관 재충전 시간, 호흡수, 소변량 및 배변. 2 시간마다 체온을 측정하고 기록하였다. 체온저하를 예방하기 위해 동물을 따뜻하고 건조하게 유지하게 했다. 동통의 징후가 나타났을 때, 동통 경감을 위해 부프레노르핀(Buprenorphine) 염산염(0.005-0.01 mg/kg, IM, q12h)을 규칙적인 간격으로 4 일 동안 투여하였고, 동통 관리를 위해 계속 투여하였다. 동물의 급성 통증은 경계, 발성, 훼손, 안절부절증, 독특한 시간 길이 동안의 대만함, 우울증(움직임을 꺼려하거나 직립의 어려움) 또는 이상 외관(고개숙임(head down)), 주름잡힌 복부(tucked abdomen), 굵은등)에 의해 발견된다. 수술하고 10 일 후 피부 스테이플/봉합사를 제거하였다. 수의사, 등록된 동물간호사 및 동물 관리 직원 중 훈련받은 스태프가 모든 동물을 매일 모니터링하였다.

[0221] 혈전증을 통한 급성 AVG 기능상실과 싸우기 위해 항응고 요법을 사용하였다. 아스피린(325 mg/일) 및 플라빅스(75 mg/day)의 구강 투여는 모두 수술 3 일 전부터 개시하였다. 아스피린은 수술 후 총 30 일 동안 매일 투여하였고, 플라빅스는 수술 후 총 14 일 동안만 매일 투여하였다.

[0222] 30 일 생존 시간 후(또는 비가역적인 합병증이 관찰될 때), 동물을 안락사시켰다. 돼지를 아세프로마진 0.15 mg/kg IM 및 케타민 30.0 mg/kg IM의 조합물로 돼지를 철저히 마취시킨 다음, 심장 정지를 유도하도록 염화칼륨을 정맥내에 과량 주입하여 동물을 안락사시켰다.

[0223] 형광투시 혈관조영술

[0224] 안락사 후 및 이식편 체외이식 직전, 형광투시 혈관조영술을 수행하여 이식편의 개존성을 평가하였다. 목동맥을 근위 이식편 문합부 위쪽으로 대략 3 cm 클램핑하고, 클램프에 대해 원위부에 즉시 목동맥으로 대조 배지를 주입하였다. 전체 이식편 분절을 통과하는 흐름을 확인하기 위해 혈관조영상을 기록하였다(Model OEC 9800 Plus, General Electric Inc.). 이식편을 통과하는 흐름이 확립되지 않은 경우(즉, 폐식에 의해), 혈관조영술은 수행하지 않았다.

[0225] 체외이식 후 조직 처리

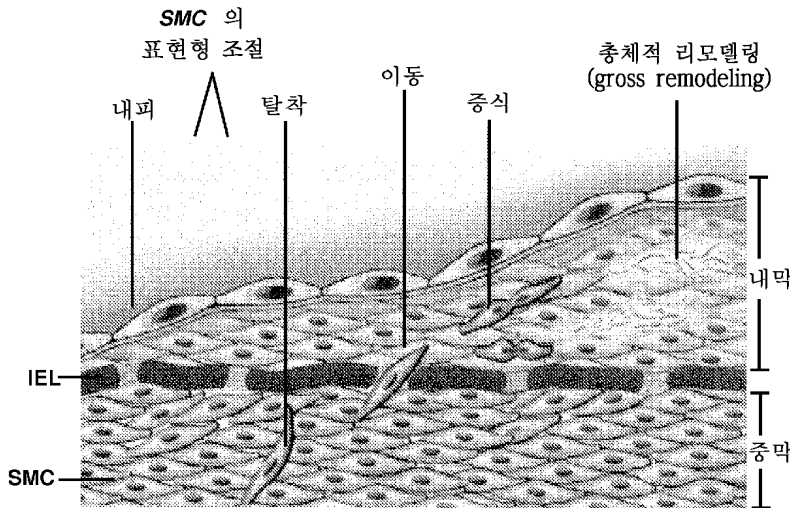
[0226] 이식편을 추출하고 조직이 1/2을 즉시 4% 파라포름알데하이드에 고정시킨 다음 아래 개시된 바와 같이 조직학적으로 분석하였다. 나머지 1/2 조직은 상기 섹션에 개시된 바와 같은 SEM 분석을 위해 초순수 2.5% 글루테르알데하이드에 고정하였다.

- [0227] *IH의 조직학적 측정*
- [0228] 체외이식된 이식편의 중심 영역으로부터 취한 절편에 대해 형태계측학적 분석을 수행하였다. 표준 모뎀 펜트크롬 염색 기술을 사용하여, 내막 및 중막 두께를 측정하였다. 이들 측정치로부터 내막 대 중막 두께의 비를 산출하였다. 측정치는 4 개의 시야로부터 작성하고 평균내어 각각의 AVG 절편에 대하여 하나의 값을 얻었다.
- [0229] *주사전자현미경*
- [0230] 위에 개시된 것과 동일한 절차를 사용하여 생체내 실험으로부터 취한 체외이식 AVG를 처리 및 이미지화하였다.
- [0231] *통계학*
- [0232] 내막 대 중막의 두께비 데이터에 대하여 Paired Student' s T-test를 수행하였다. $P < 0.05$ 는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다. 달리 언급하지 않는 한, 모든 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다.
- [0233] **결과**
- [0234] 외막 중합체 랩은 동맥 압력하에 자연 정맥(도 27의 가운데 및 오른쪽 비교)에 대한 것과 일치하는 직경으로 AVG를 유지하는 즉각적이고 뚜렷한 효과가 있었다. 또한, 랩핑되지 않은 AVG는 검출가능한 정도의 박동이 없는 견고한 관인 것으로 생각되는 반면, 랩핑된 AVG는 자연 목동맥과 유사한 방사상의 박동 운동(pulsatile radial excursion)(즉, 순응성)을 나타내었다. 즉, 대조군 이식편을 통과하는 흐름이 확립된 경우, 자연 목동맥 및 방사 정맥과 달리 위장 대조군 정맥은 박동 압력에 대한 직경의 변화가 없었음이 관찰되었다.
- [0235] 수행된 8 개의 생체내 실험에서, 겨우 하나의 실험만이 완전히 성공적이었다. 즉, 방사 및 위장 돼지 모두로부터 취한 AVG 30 일후 개존성이 100%이었다. 이들 AVG의 혈관조영술 이미지는 도 28에서 볼 수 있다. 나머지 실험들은 다음의 3 가지 이유 중 하나로 인해 성공할 수 없었던 것으로 생각된다: 1) IH 또는 혈전증으로 인한 방사 및 위장 AVG 중 하나 또는 둘 다의 부분 폐색; 2) 방사 군 중 한 동물의 사멸을 유도한 수술후 합병증; 및 3) 수술 1 주후 방사 군 중 한 동물을 안락사시킬 필요가 있게 한 감염. 그러나, 2 개의 개존성 AVG 및 부분적으로 폐색된 AVG(위장 군 N=6; 방사 군 N=4)을 가지고, 본 발명자들은 2개의 군을 비교하고자 IH 발달을 평가하기 위해 형태계측학적 측정을 수행하였다. 형태계측학적 분석에 사용되는 모뎀 펜트크롬 염색의 대표적인 이미지를 도 29에 도시하였고, 이는 시료 측정도 나타낸다. 정량적인 결과는 도 30에서 볼 수 있다. 방사 군 대 위장 대조군의 내막 대 중막 두께비 사이의 통계학적 유의성에 대한 경향인 것으로만 보인다.
- [0236] 하나의 완전 성공적인 실험(도 31A 및 31B) 및 AVG가 완전히 폐색되지 않은 또 다른 실험(도 31C 및 31D)으로부터 취한 AVG의 SEM 이미지를 촬영하였다. 봉합사에 의해 명확히 나타낸, 정맥 이식편과 동맥 사이의 문합 계면을 각 이미지에서 볼 수 있다.
- [0237] **결론**
- [0238] 본 발명자들은 방사 군 및 위장 군간의 내막 대 중막 두께비 사이의 통계학적 유의차에 대한 경향만을 관찰하였지만, 실험수가 증가하면 이러한 차이는 통계학적으로 유의하게 된다고 할 수 있을 것이다. 정량적인 형태계측학적 결과 및 정량적인 SEM 결과는 전기방사된 생체분해성 중합체 랩이 AVG에 유리한 효과를 제공한다는 것을 제시한다. 그러나, 이들 효과가 실제로 일관적으로 유리한 지를 결정하기 위해 추가의 조사가 필요하다. 기계-병리학적 데이터와 관련이 있는 고유의 가변성 이외에, 상이한 외과의, 다양한 경험의 차이, 수술법의 차이이라는 3 가지 차이점에 의해 본 발명자들의 결과는 또한 가변적일 수 있다. "학습 곡선"이 보통의 일층 AVG(위장 군) 대신 이층 AVG(방사 군)를 사용하여 문합부를 생성하는 것과 관련이 있다는 것이 또한 사실이다. 임의의 신규한 수술 절차와 같이, 수술을 수행하는 외과의사의 안도감이 증가함에 따라, 수술의 성공률은 결과적으로 증가한다.
- [0239] AVG IH를 감소시키기 위해 외부 피포를 사용하고자 했던 상술한 이전의 연구는 다양한 동물 모델의 AVG에 기계적이고(본 학위논문에 개시된 바와 같음) 생화학적인 지지체의 전달에 중점을 두었다. 이들 이전 접근법의 임상 해석은 두 가지의 주요 제한점으로 인해 달성되지 못했다. 특히, 이들은 모두 느슨한 고정성/생체분해성 또는 느슨한 고정성/생체내구성 피포를 사용하였다. 이러한 작업에서, 본 발명자들은 견고한 고정성 및 생체분해성 중합체로 AVG를 안전하게 "랩핑하는" 수단을 개발함으로써 이러한 제한점들을 해소하고자 하였다.
- [0240] 본원에 개시한 작업에는 제한점이 있다. 위장 대조군이 방사 AVG(즉, 동일한 돼지로부터)와 쌍을 이루지 못했다는 사실은 연구에서 통계학적 분석력을 저하시켰다. 그러나, 사용된 쌍을 이루지 않은 실험적 설계는 동물에서 수술후 합병증을 방지하기 위해 필요하였다. 뇌로부터 돌아오는 정맥혈이 과도하게 변경되지 않도록, 양측성 수

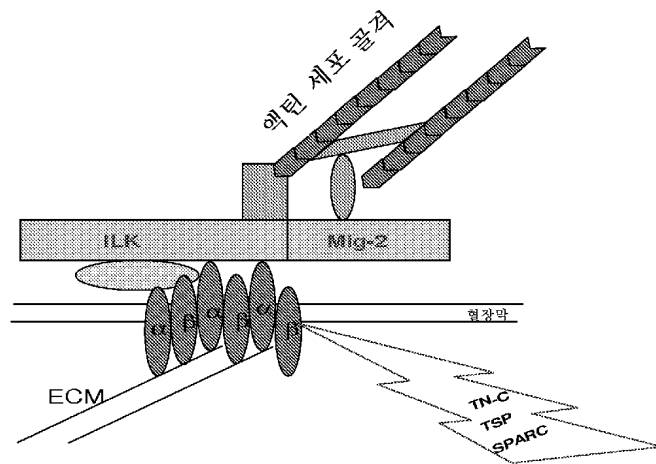
술 대신 일측성 수술을 수행하는 것이 더 안전하다는 것을 알게 되었다. 또 다른 제한점은 수술 절차를 수행하는 외과의의 다양한 경험으로부터 생긴다. AVG의 개존률이 증가한 경우 결과는 통계학적으로 더욱 유의하다고 할 수 있다. 수술 절차가 모두 가장 경험이 풍부한 외과의에 의해 수행되었다면, 전기방사된 생체분해성 중합체 랩은 위장 대조군에 비해 AVG에서 IH를 유의적으로 감소시킬 수 있다. 세 번째 제한점은 30 일의 이식 기간은 너무 짧다는 것이다. AVG IH를 감소시키는 본 발명자들의 접근법의 효율이 장시간 지속하는 지를 결정하기 위해서는 아마도 6 개월과 같은 장기적인 실험이 요구된다.

도면

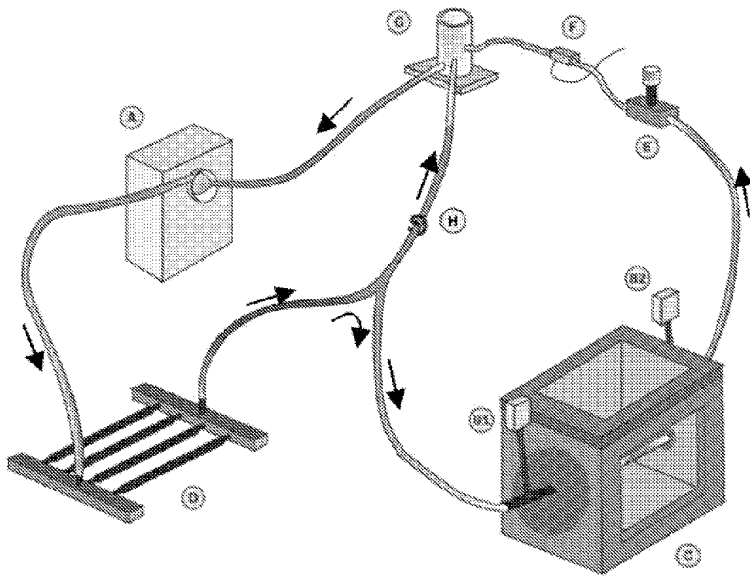
도면1



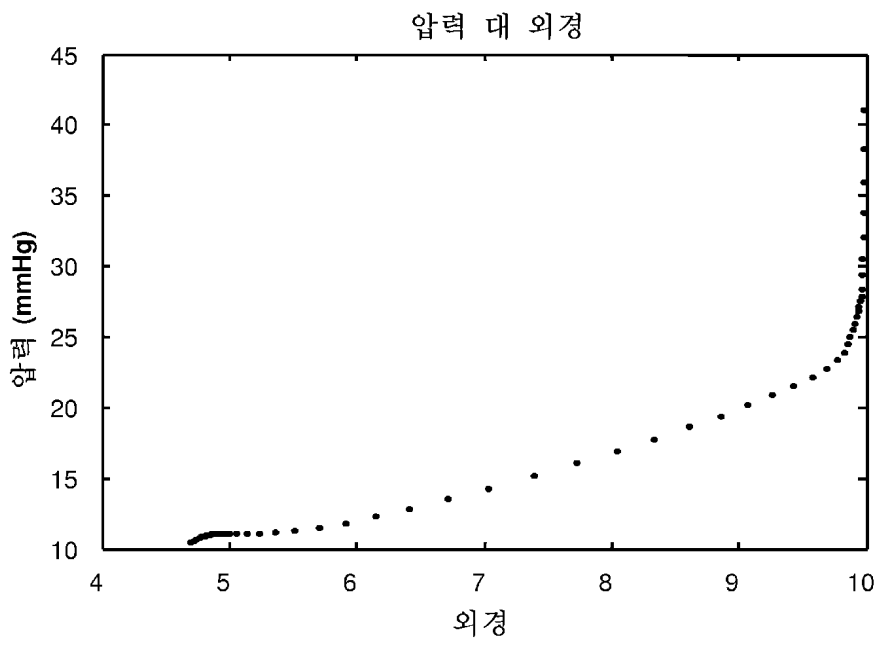
도면2



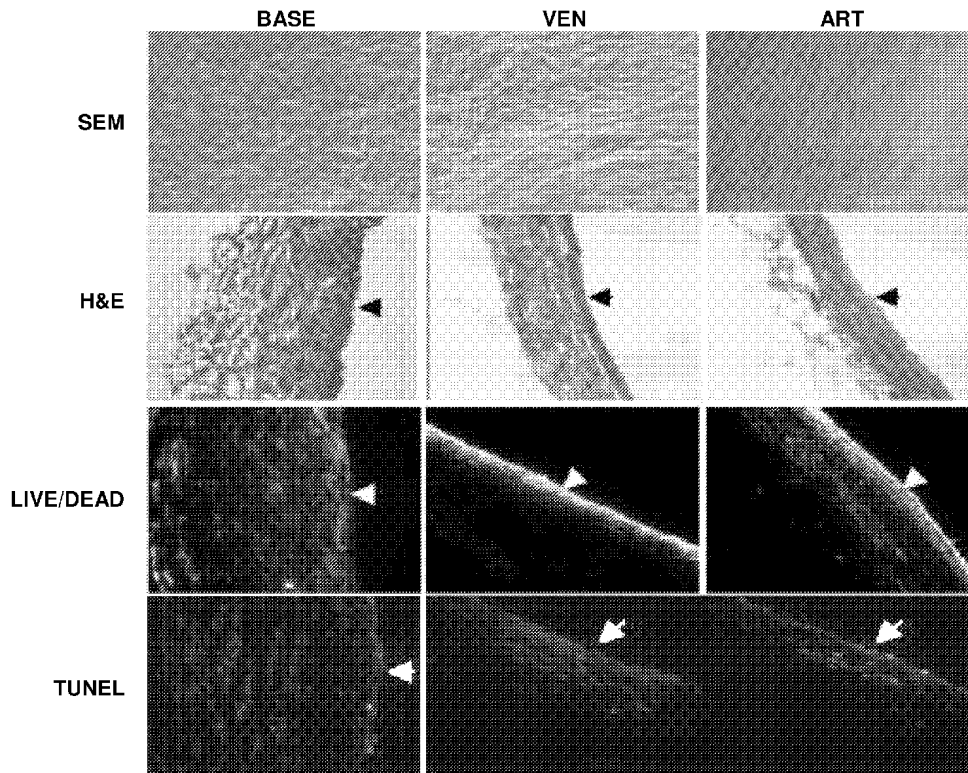
도면3



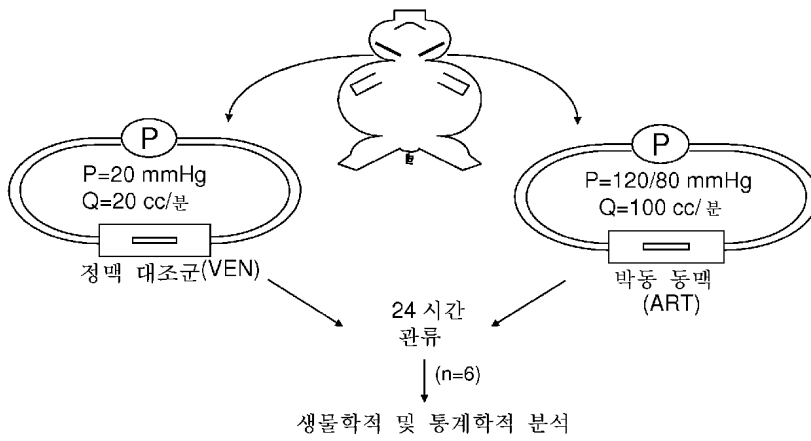
도면4



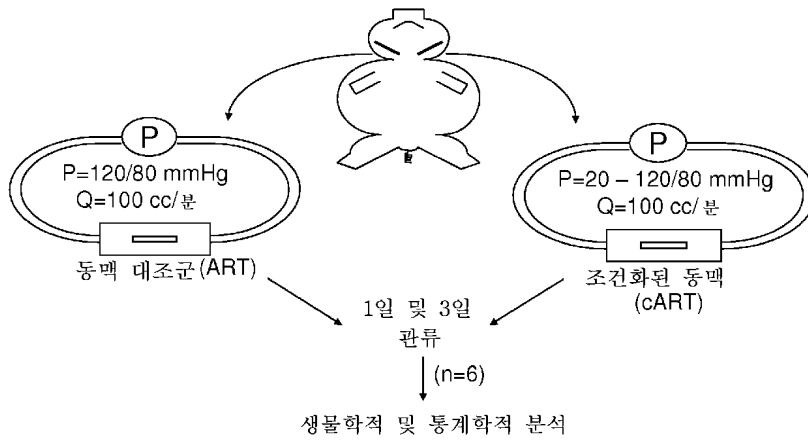
도면5



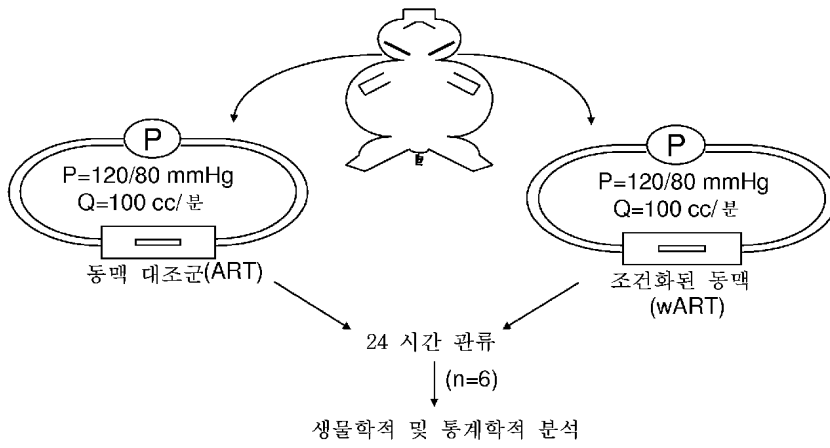
도면6



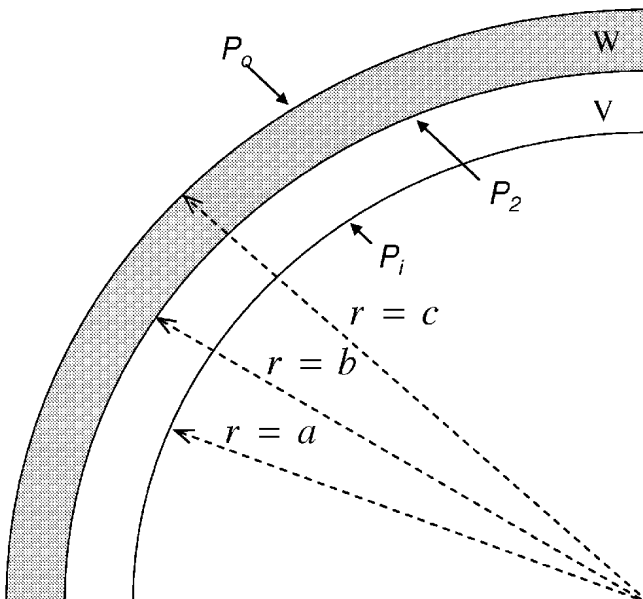
도면7



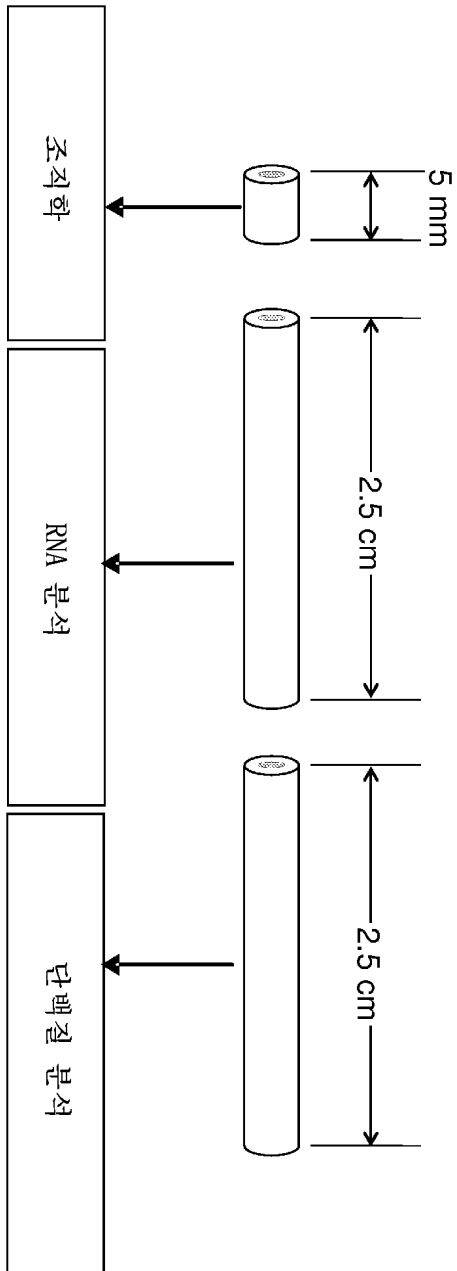
도면8



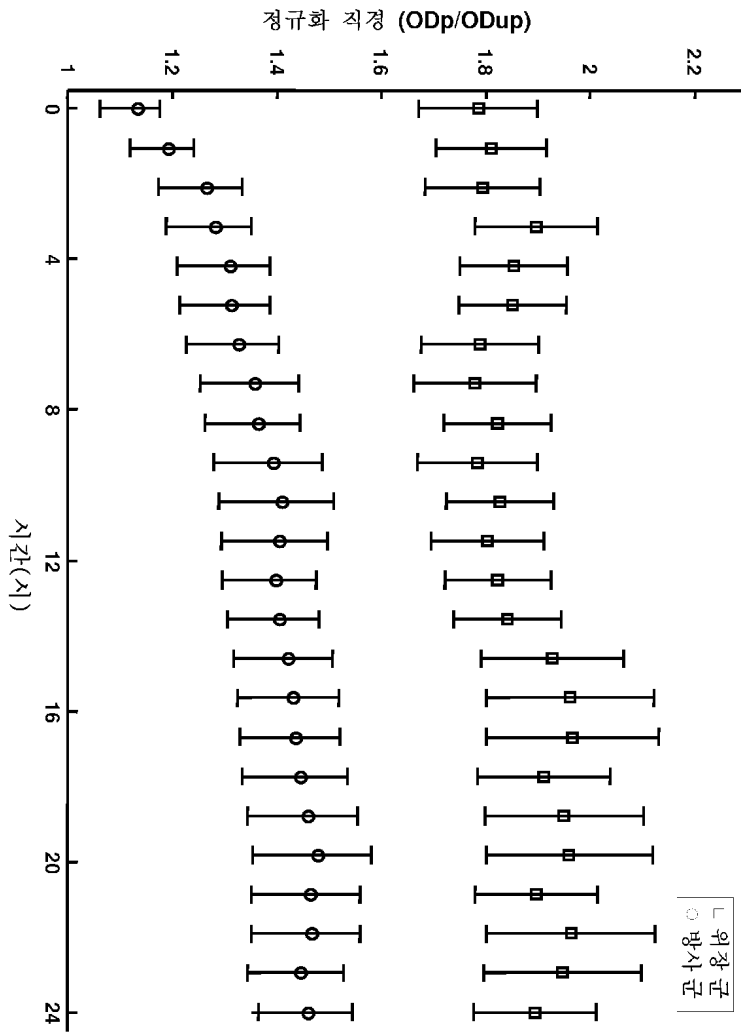
도면9



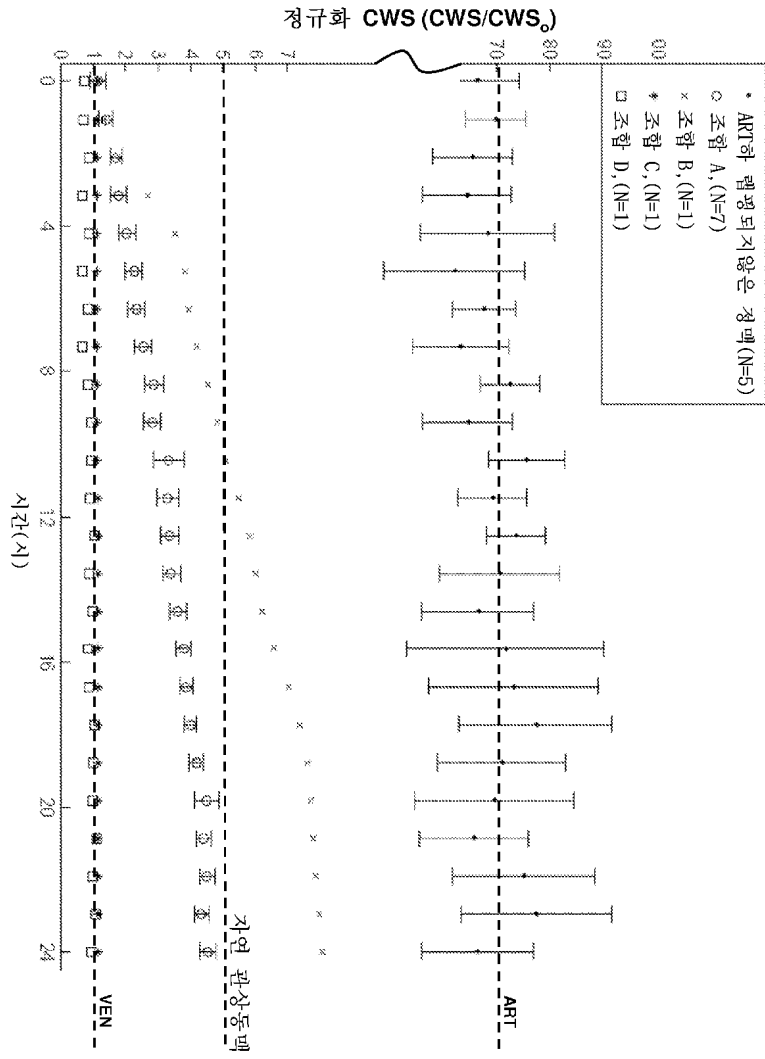
도면10



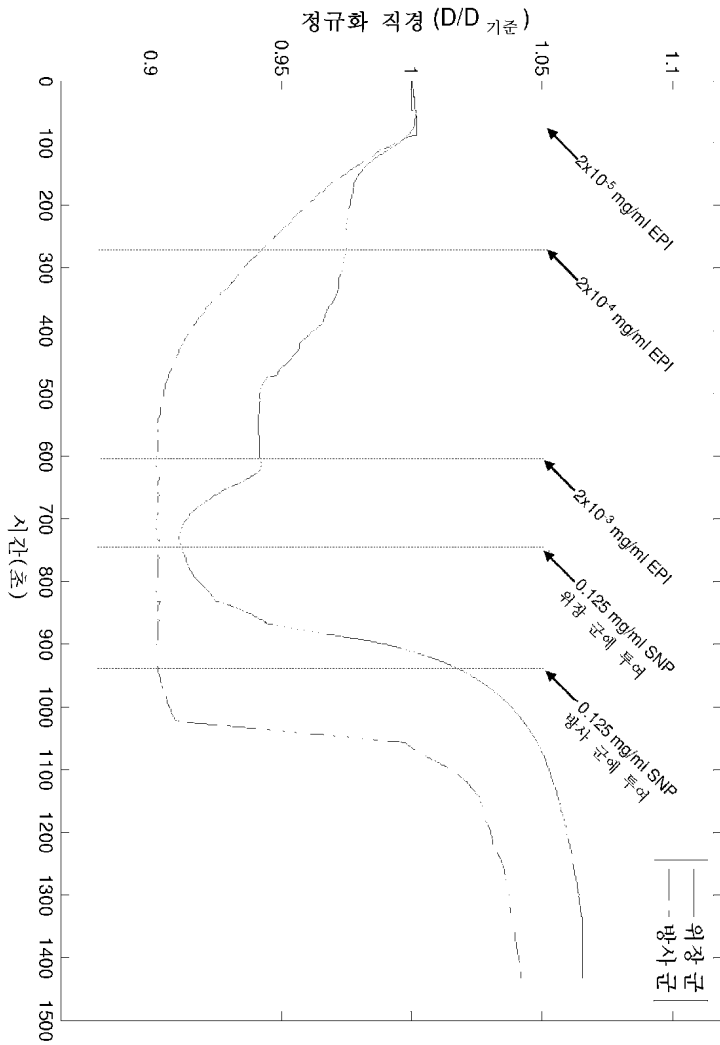
도면11



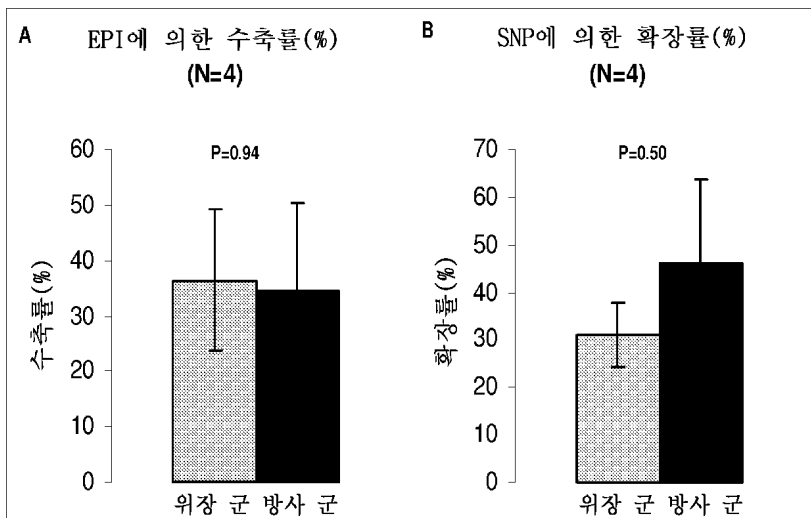
도면12



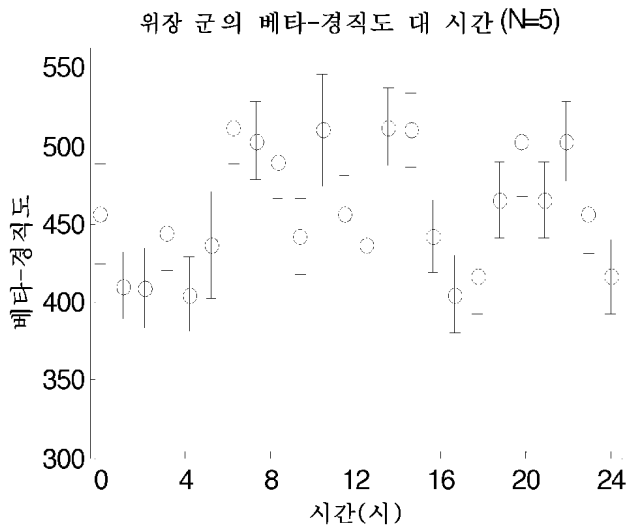
도면13



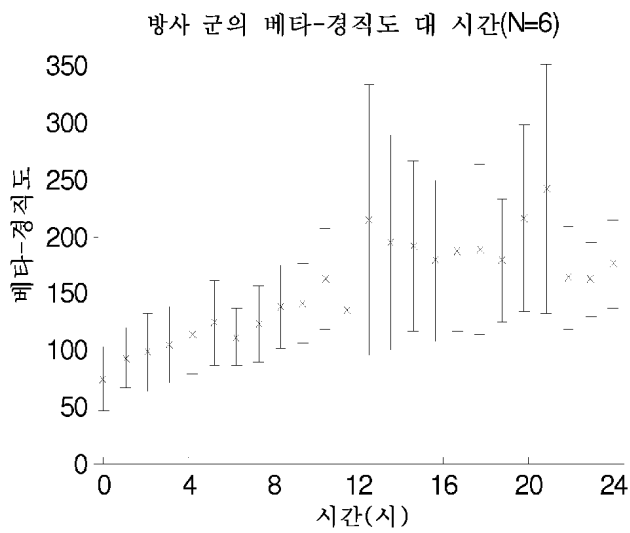
도면14



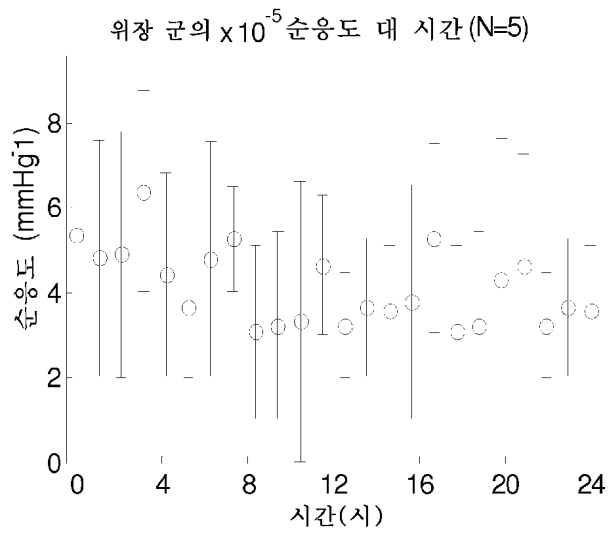
도면15a



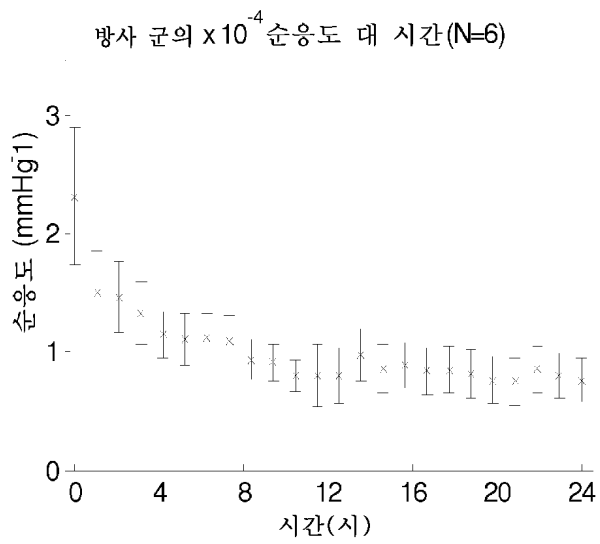
도면15b



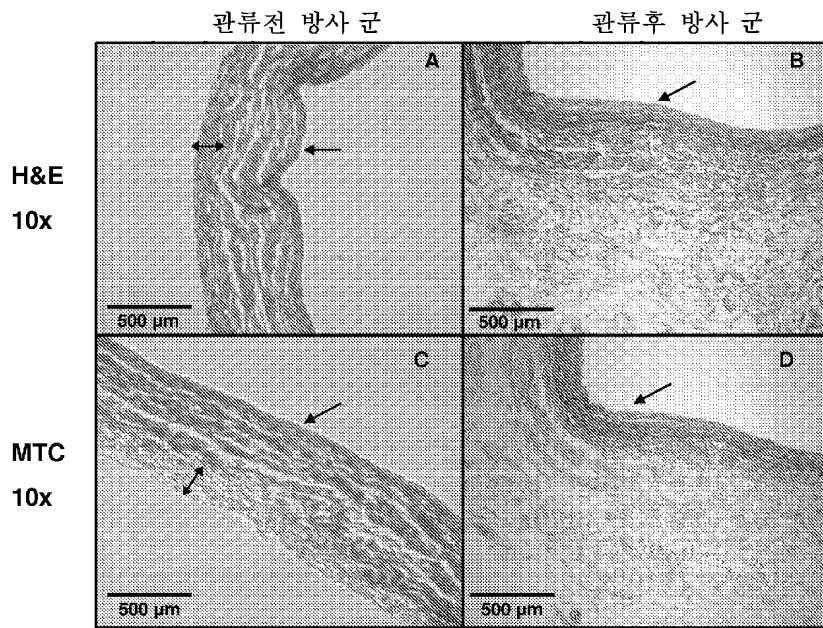
도면15c



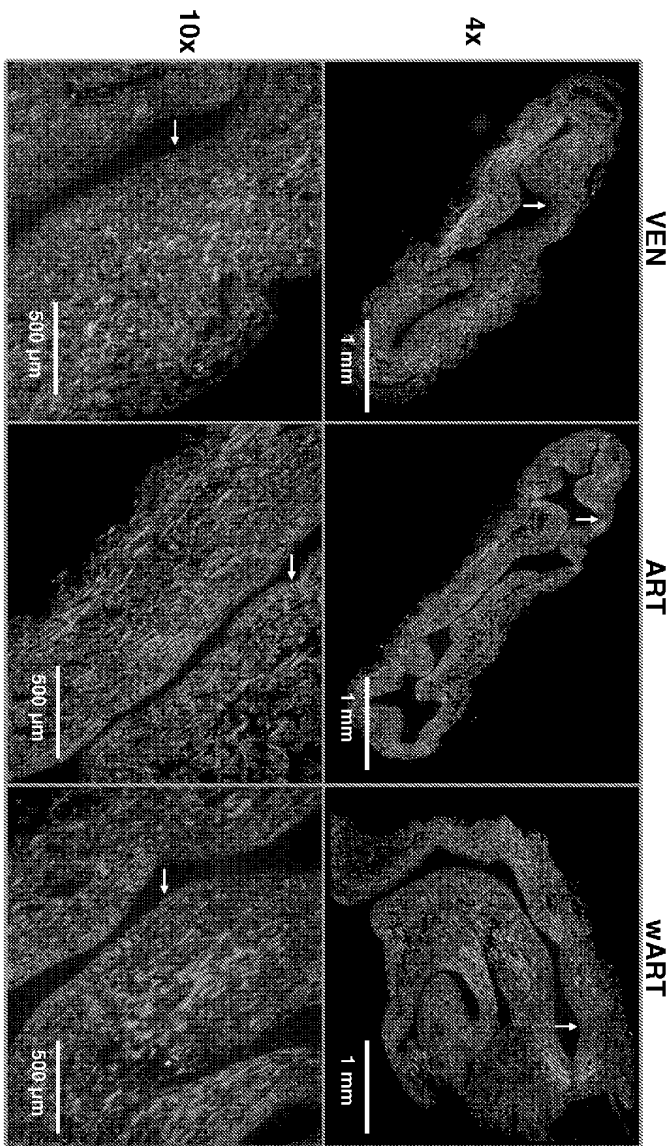
도면15d



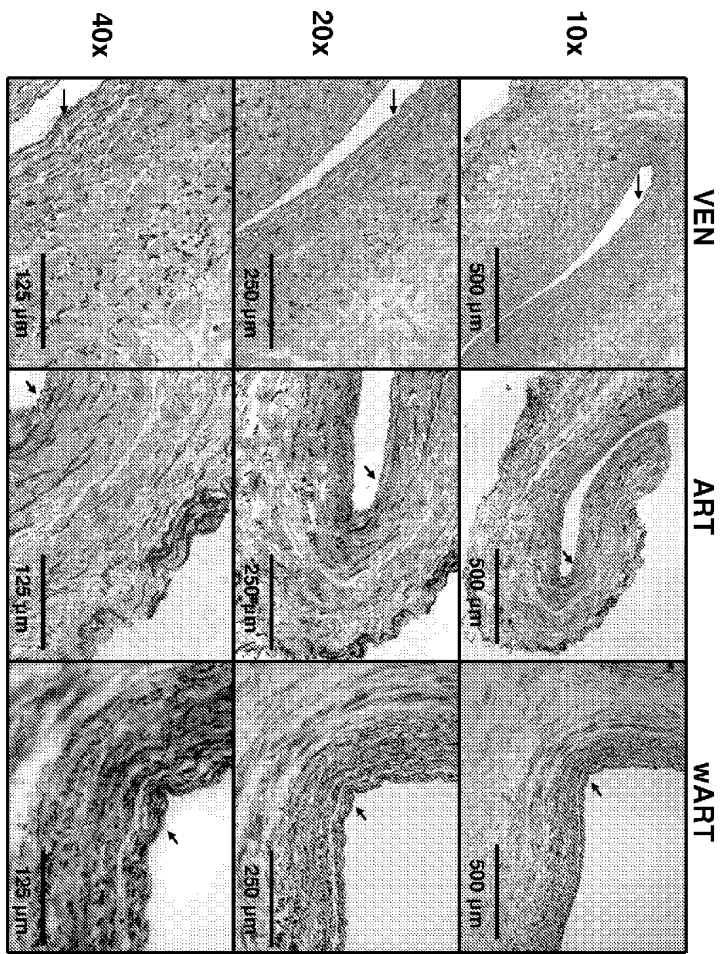
도면16



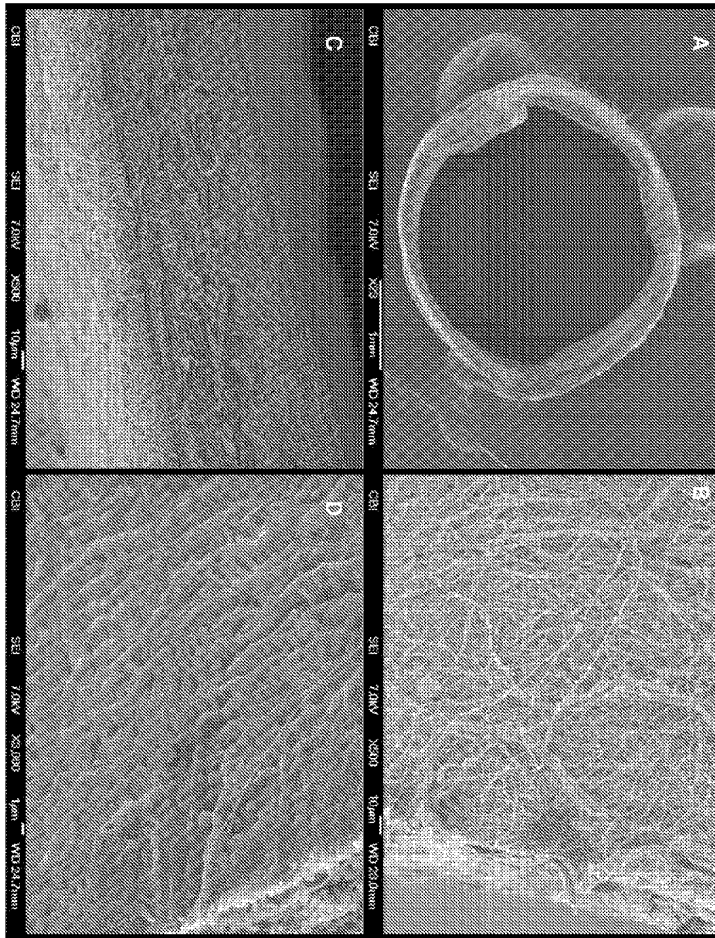
도면17



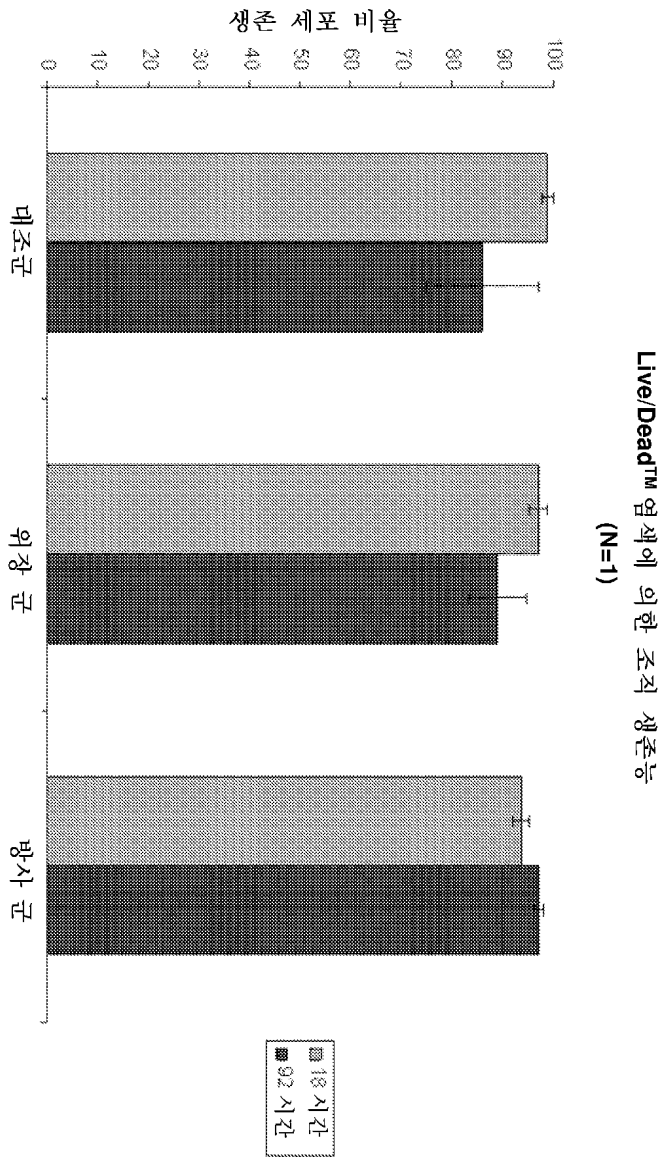
도면18



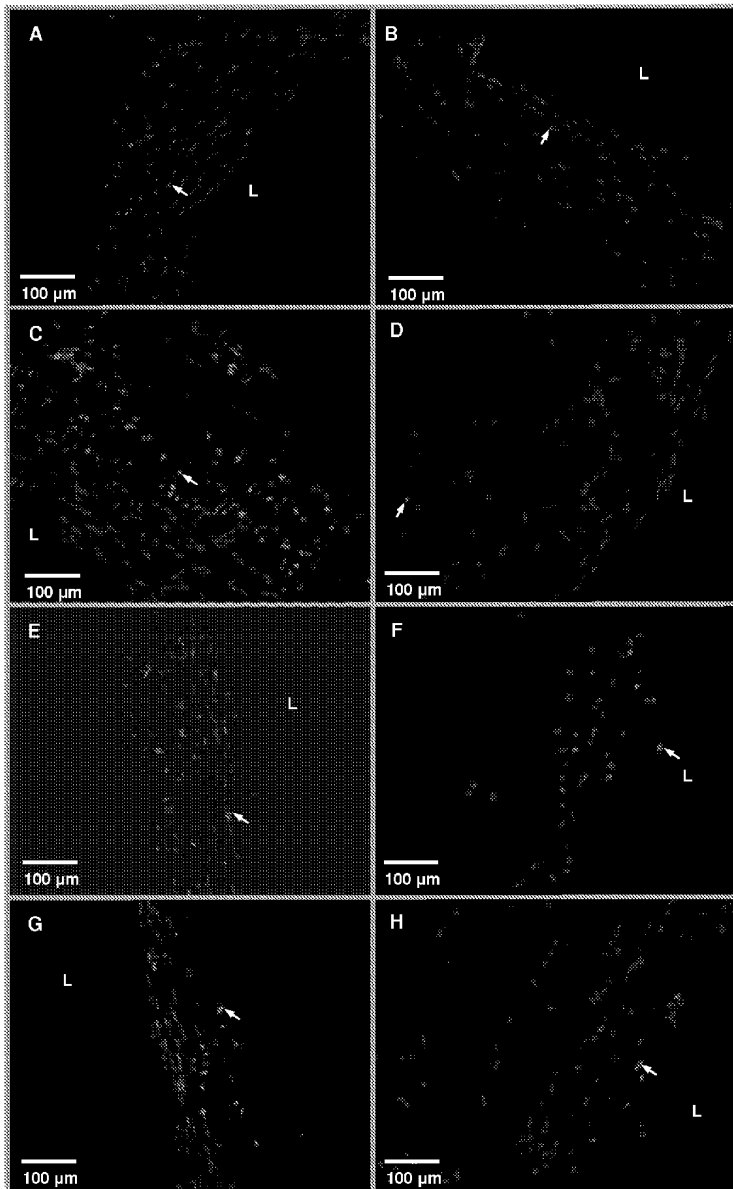
도면19



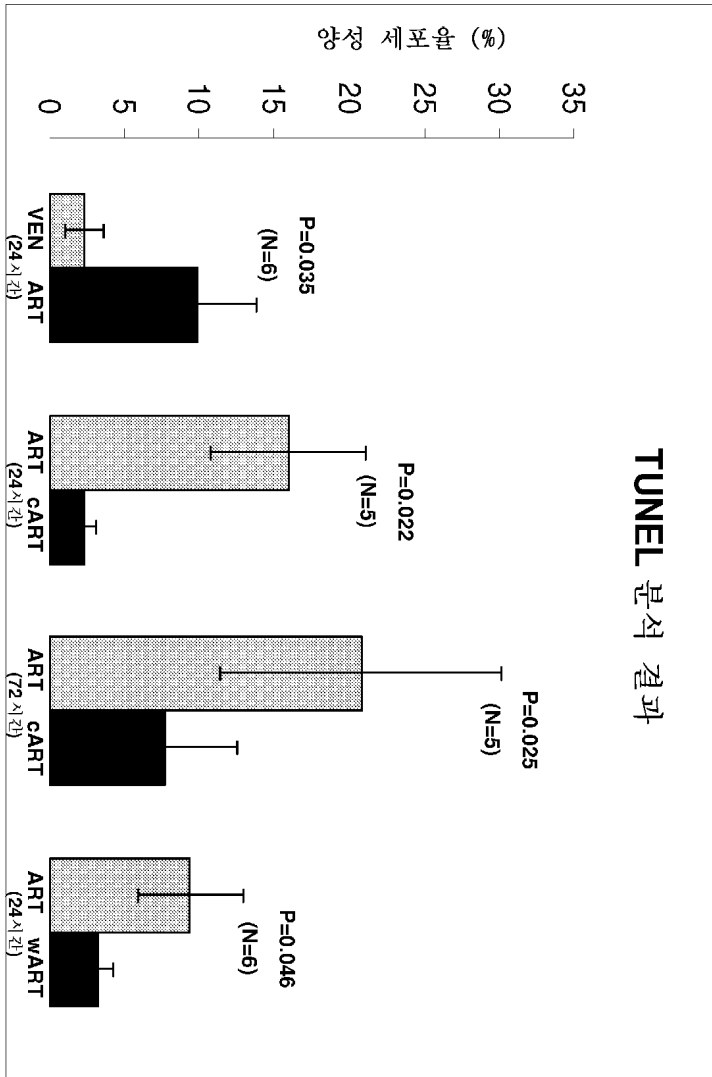
도면20



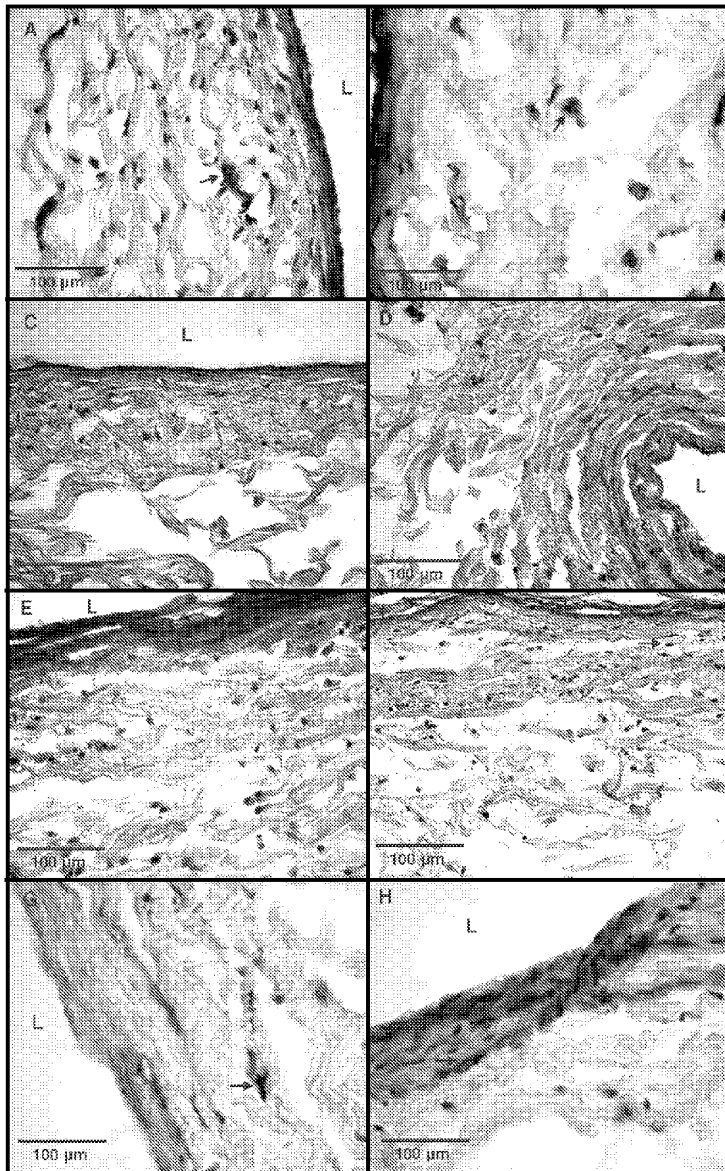
도면21



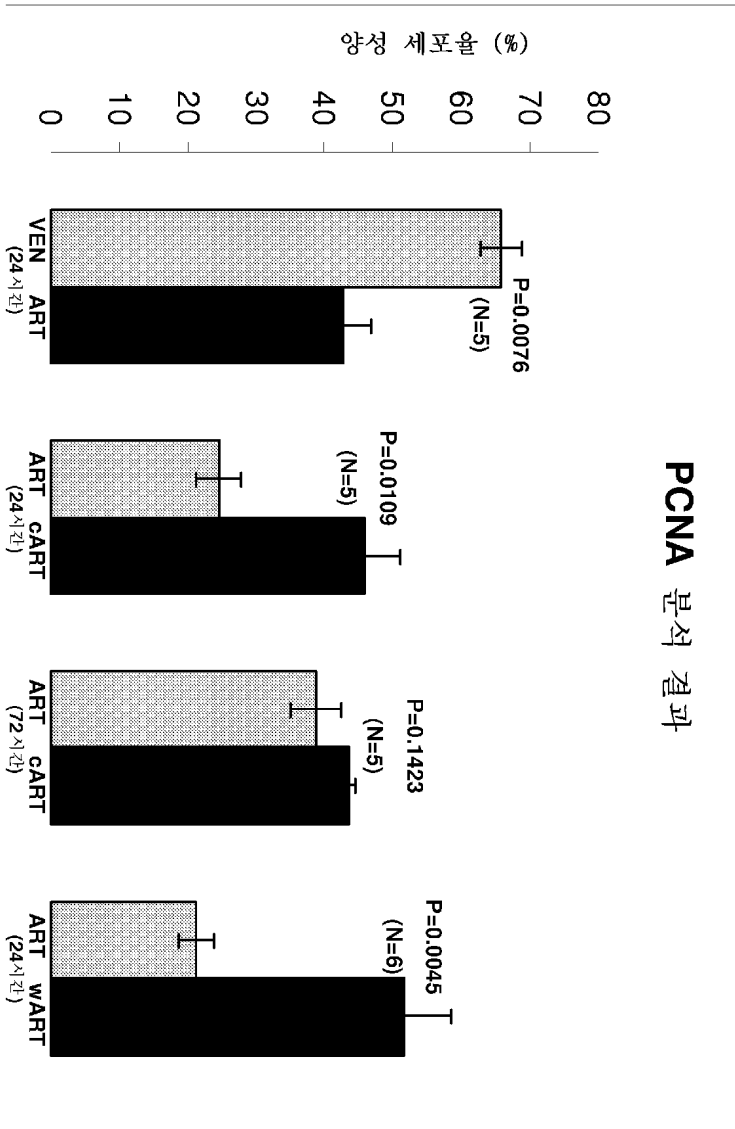
도면22



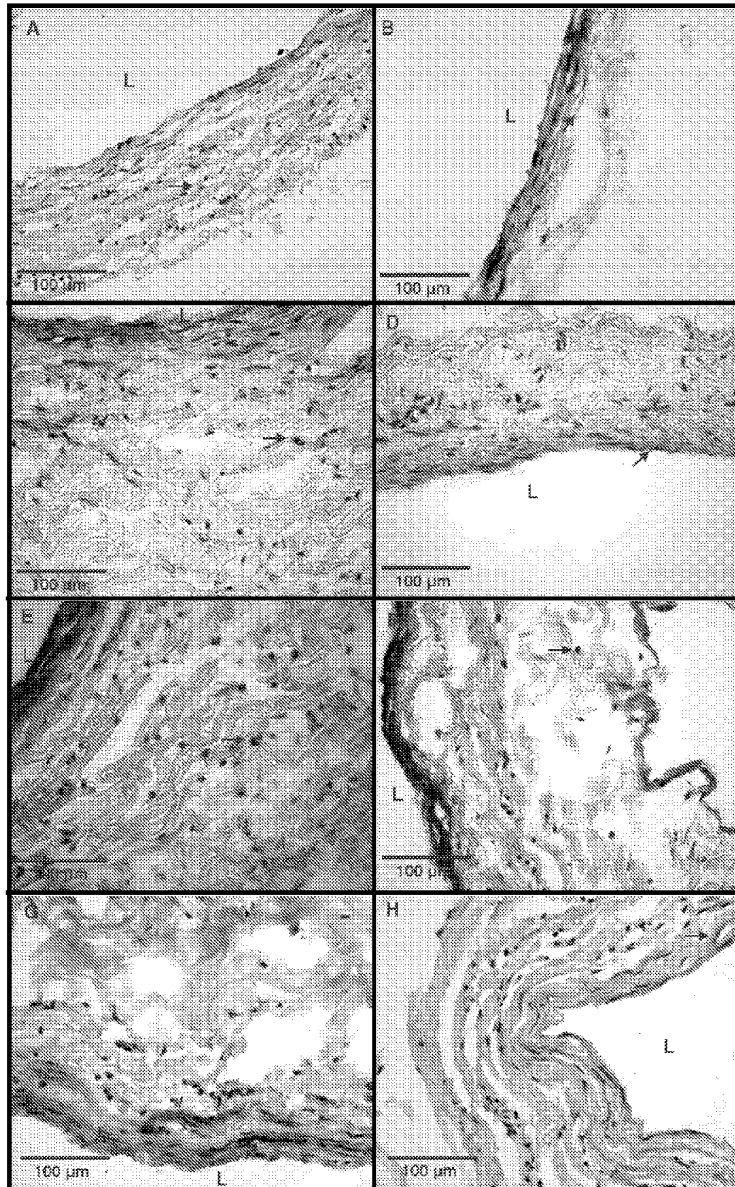
도면23



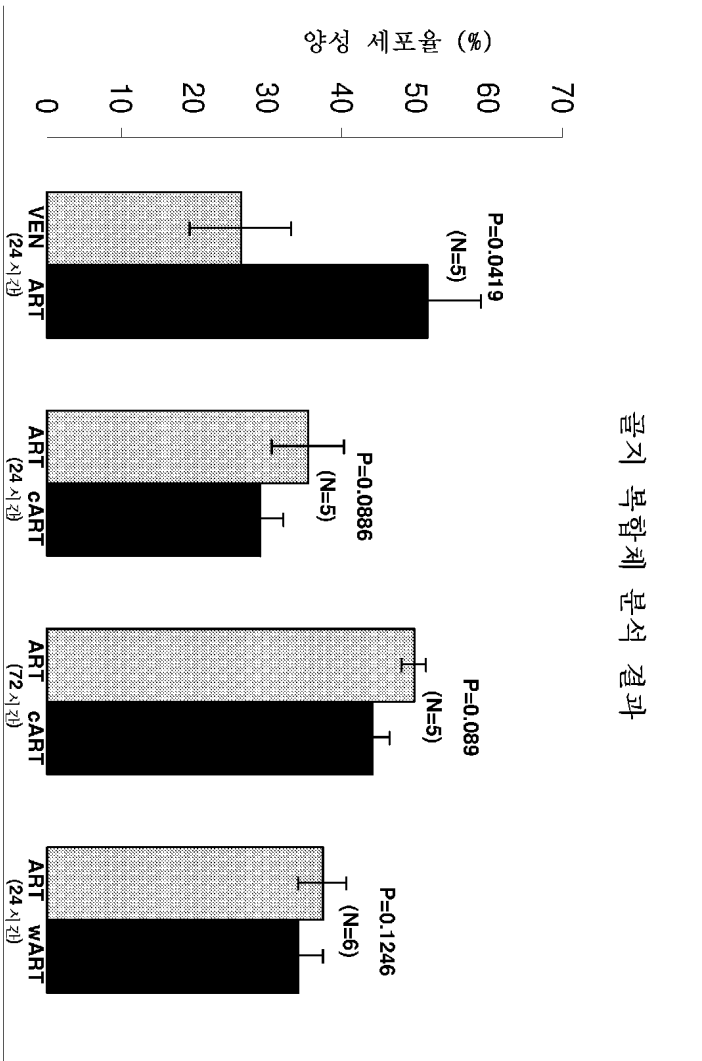
도면24



도면25



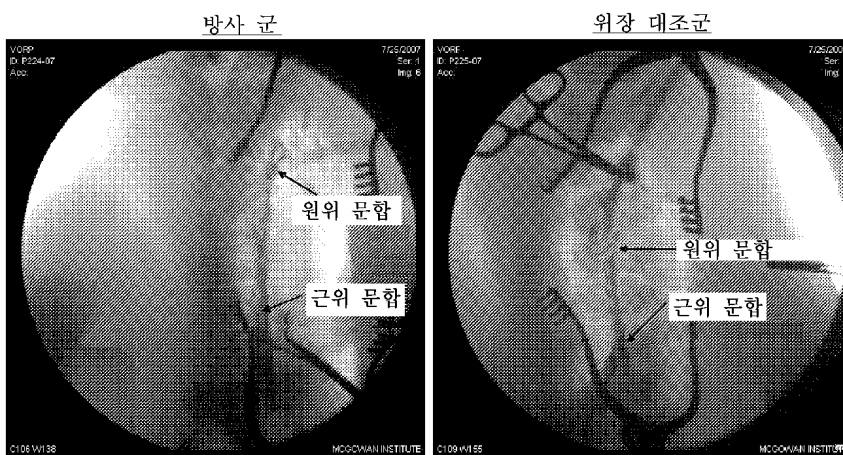
도면26



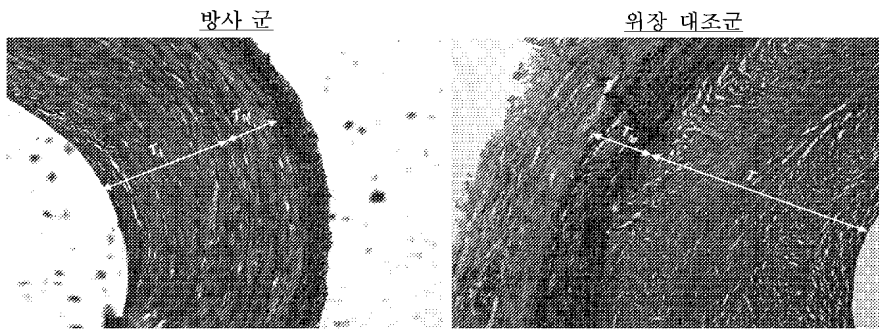
도면27



도면28

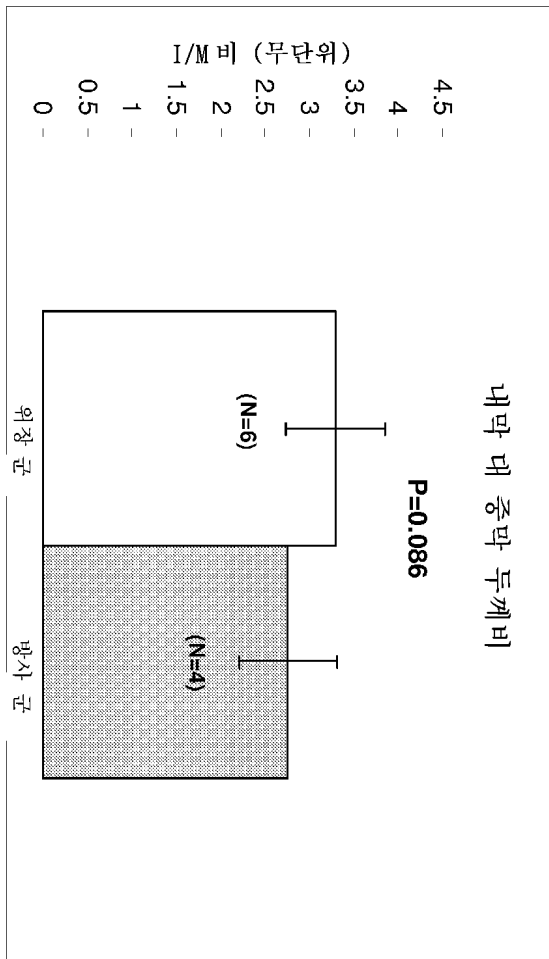


도면29



$$T_{I:M} = \frac{T_I}{T_M}$$

도면30



도면31

