



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2013년10월16일  
(11) 등록번호 10-1317094  
(24) 등록일자 2013년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 11/08 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)  
A61L 27/38 (2006.01) A61F 2/14 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2010-7022953  
(22) 출원일자(국제) 2009년04월08일  
심사청구일자 2010년10월14일  
(85) 번역문제출일자 2010년10월14일  
(65) 공개번호 10-2010-0128329  
(43) 공개일자 2010년12월07일  
(86) 국제출원번호 PCT/GB2009/000917  
(87) 국제공개번호 WO 2009/127809  
국제공개일자 2009년10월22일  
(30) 우선권주장  
0806746.4 2008년04월14일 영국(GB)  
(56) 선행기술조사문헌  
Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, Vol.47.  
Abstract\*  
The Journal of Histochemistry and  
Cytochemistry, 1994, Vol.42, No.2, pp.  
277-282\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
유씨엘 비즈니스 피엘씨  
영국 더블유1티 4티피 런던 토텐햄 코트 로드 97  
더 네트워크 빌딩  
(72) 발명자  
코피, 피터  
영국, 이씨1브이 9이엘 런던, 배쓰 스트리트  
11-43, 유니버시티 칼리지 런던, 안과학 협회  
다 크루즈, 런던  
영국, 이씨1브이 2피디 런던, 시티 로드 162, 몰  
필드 안과 병원 엔에이치에스 재단 위원회  
치탐, 카렌  
영국, 더블유디6 3피이 하트퍼드셔, 보레햄우드,  
엘스트리, 타우버 클로즈, 1  
(74) 대리인  
김 순 영, 김영철

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **멤브레인**

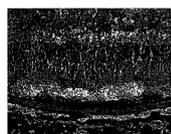
**(57) 요약**

본 발명은 지원 세포(supporting cell), 특히 RPE 세포를 위한 멤브레인과 관련한다. 상기 멤브레인은 연령 관련 황반 변성과 같은 상태의 치료에 유용하다.

**대표도** - 도1



1A



1B



1C

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

멤브레인으로서,  
 비-생분해성 및 다공성이며,  
 구멍은 0.2  $\mu\text{m}$  내지 0.5  $\mu\text{m}$ 의 직경이고,  
 상기에서 멤브레인의 구멍 밀도는  $\text{cm}^2$  당  $1 \times 10^7$  내지  $3 \times 10^8$  구멍(pores)이며,  
 상기 멤브레인은 멤브레인 상에 한 층의 망막 색소 상피 세포(retinal pigmented epithelial cell), 망막 색소 상피 세포 전구체 또는 망막 색소 상피 세포의 분화로부터 형성된 망막 파생물을 포함하는,  
 망막 색소 상피 세포 성장 지원(support)용 멤브레인.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,  
 상기 멤브레인의 멤브레인 유압 전도도(hydraulic conductance)는  $50 \times 10^{-10} \text{ m sec}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  이상인 것을 특징으로 하는 멤브레인.

### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 멤브레인은 감마선 조사, 에틸렌 옥사이드, 오토 클레이빙(autoclaving) 또는 저하 없는 UV 멸균에 의해 멸균될 수 있는 것을 특징으로 하는 멤브레인.

### 청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 멤브레인은 초음파 실링(ultrasonic sealing), 무선 주파수 실링(radio frequency sealing) 또는 인서트 몰딩(insert moulding)에 의해 실링될 수 있는 것을 특징으로 하는 멤브레인.

### 청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 멤브레인은 11  $\mu\text{m}$ 의 최대 두께를 가지는 것을 특징으로 하는 멤브레인.

### 청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 멤브레인은  $1.5\text{mg}/\text{cm}^2$ 의 최대 무게를 가지는 것을 특징으로 하는 멤브레인.

**청구항 7**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
상기 멤브레인은 친수성인 것을 특징으로 하는 멤브레인.

**청구항 8**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
상기 멤브레인은 4 내지 8의 pH를 가지는 것을 특징으로 하는 멤브레인.

**청구항 9**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
멤브레인은 한 번 이상의 코팅을 포함하는 것을 특징으로 하는 멤브레인.

**청구항 10**

제 9 항에 있어서,  
상기 코팅은 라미닌(laminin), 매트릭젤(matrigel), 피브로넥틴(fibronectin) 또는 PLGA인 것을 특징으로 하는 멤브레인.

**청구항 11**

제 9 항에 있어서,  
멤브레인은 코팅 성분에 결합한 약학적 또는 생물학적 제제를 포함하는 연령 관련 황반 변성(age related macular degeneration) 치료용 멤브레인.

**청구항 12**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
망막 색소 상피 세포는 인간 망막 색소 상피 세포(human retinal pigmented epithelial cell)인 멤브레인.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서,  
망막 색소 상피 세포는 무한 증식된 세포(immortalised cell)인 것을 특징으로 하는 멤브레인.

**청구항 14**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
상기 멤브레인은 폴리에스터, 폴리우레탄, 폴리우레아-우레탄, 폴리아마이드, 폴리에테르-에스터, 폴리카보네이트, 폴리아크릴레이트, 폴리(테트라플루오로에텐), 폴리실록산, 폴리올레핀 및 폴리옥시메틸렌으로부터 선택된 친수성 폴리머로 만들어지는 것을 특징으로 하는 멤브레인.

**청구항 15**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서  
세포 군락(colony) 지원(support)용 멤브레인.

**청구항 16**

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
연령 관련 황반 변성(age related macular degeneration) 치료용인 멤브레인.

**청구항 17**

제 16 항에 있어서,  
세포는 자가 유래(autologous)인 것을 특징으로 하는 멤브레인.

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

멤브레인으로서,  
실질적으로 비-생분해성이며 다공성이고 11  $\mu\text{m}$ 의 최대 두께를 가지며,  
상기에서 멤브레인의 구멍 밀도는  $\text{cm}^2$  당  $1 \times 10^7$  내지  $3 \times 10^8$  구멍(pores)이고,  
상기 멤브레인은 멤브레인 상에 한 층의 망막 색소 상피 세포(retinal pigmented epithelial cell), 망막 색소 상피 세포 전구체 또는 망막 색소 상피 세포의 분화로부터 형성된 망막 파생물을 포함하는,  
망막 색소 상피 세포 성장 지원(support)용 멤브레인.

**청구항 20**

멤브레인으로서,  
실질적으로 비-생분해성이며 당단백질(glycoprotein)을 포함하는 코팅으로 한 면 이상이 코팅된 다공성 지원층(support layer)을 포함하며,  
상기에서 지원층의 구멍 밀도는  $\text{cm}^2$  당  $1 \times 10^7$  내지  $3 \times 10^8$  구멍(pores)이고,  
상기 멤브레인은 멤브레인 상에 한 층의 망막 색소 상피 세포(retinal pigmented epithelial cell), 망막 색소 상피 세포 전구체 또는 망막 색소 상피 세포의 분화로부터 형성된 망막 파생물을 포함하는,  
망막 색소 상피 세포 성장 지원(support)용 멤브레인.

**청구항 21**

$\text{cm}^2$  당 200000 세포(cells) 이상의 밀도에서 멤브레인 상으로 세포를 시드(seed)하는 단계를 포함하며, 상기에

서 멤브레인의 구멍 밀도는  $\text{cm}^2$  당  $1 \times 10^7$  내지  $3 \times 10^8$  구멍(pores)이고,

상기 세포는 망막 색소 상피 세포(retinal pigmented epithelial cell), 망막 색소 상피 세포 전구체 또는 망막 파생물인

멤브레인 상에 세포를 시드하는 방법.

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 세포의 성장을 지원(support)하는 멤브레인과 관련한다. 또한 본 발명은 세포를 성장시키고, 멤브레인을 생산하며 세포를 사용하는 방법과 관련한다. 구체적으로 상기 세포는 연령 관련 황반 변성(age-related macular degeneration)의 치료에 사용될 수 있다.

**배경기술**

[0002] 연령 관련 황반 변성(AMD)은 망막의 황반 부분이 얇아지고 위축되며 출혈이 있어 고통받는 노인에게서 발견되는 상태이다. 이는 망막(central area of vision)에서 시각의 상실, 특히 읽거나 얼굴을 인식하기 위한 미세한 세부 사항을 볼 수 있는 능력의 상실을 야기한다.

[0003] AMD는 건성(비-신생 혈관) 또는 습성(신생 혈관) 중 하나로 분류된다. 습성 AMD는 그들이 있을 것으로 추정되지 않는 영역에서의 새로운 혈관의 성장과 관련한다. 건성 형은 습성 형보다 더 흔하여, 약 85-90 퍼센트의 AMD 환자가 건성 AMD로 진단받았다. 대개 습성 형 질환은 보다 심각한 시력 상실을 야기한다.

[0004] 건성 AMD는 질환의 초기 단계이고, 노화 및 망막 조직의 얇아짐, 망막에서 색소의 침착 또는 두 과정의 조합으로부터 야기될 수 있다. 건성 황반 변성은 드루젠(drugnen)이라고 알려진 황색 점이 침전물 또는 주로 망막 영역에 있는 악화된 조직으로부터의 잔해로부터 증가하기 시작할 때 진단된다. 점진적인 망막 시력 상실은 건성 황반 변성으로 발생할 수 있다.

[0005] 건성 AMD는 새로운 혈관이 망막 아래에서 자라고 혈액 및 유액이 새는 습성 AMD로 진행될 수 있다. 이러한 누수는 광-민감한 망막 세포에 영속적인 손상을 야기하며, 죽어서 망막에서 맹점을 만든다.

[0006] AMD 치료는 현재 제한되어 있지만, 몇몇 치료 방법이 그것의 진행을 지연시키거나 시력을 개선시킬 수 있다. 황반 변성(mascular degeneration)에 대한 치료는 질환이 초기 단계인지 또는 건성 형인지 또는 심각한 시력 상실을 야기할 수 있는 더 진행된 습성 형인지 여부에 달려 있다. 한 치료 방법은 습성 AMD를 앓고 있는 환자 눈의 건강한 주변부로부터 감염된 영역으로 세포를 이식하는 것이다. 이는 효과적인 반면, 치료될 수 있는 감염된 영역의 크기가 제한되고 수술이 매우 길며 매우 나이 많은 환자들에게 부적당하다. 이는 AMD 두 가지 형의 개선된 치료를 제공하기에 유리할 것이다.

[0007] 본 발명자들은 대체 망막의 상피 세포가 수득되고 이식될 수 있는, 구체적으로 획득한 세포를 생산하기 위해 줄기 세포를 사용하는, 방법을 연구해 왔다. 본 발명자들은 그러한 세포가 성장될 수 있고 그 세포와 함께 눈으로 이식될 수 있는 멤브레인을 개발했다. 멤브레인은 특히 망막 색소 상피(RPE) 세포 및 그 파생물의 성장에 유용하지만 다른 세포 타입 또한 성장될 수 있다.

[0008] 이전에, 세포는 멤브레인 상에서 성장해왔다. 윌리엄 등(Journal of Materials Science: Matrials in Medicine

16(2005) 1087-1092)은 RPE 세포를 배양하기 위해 폴리우레탄 멤브레인을 사용했지만, 멤브레인의 표면이 대부분 세포 부착을 가능하게 하기 위한 처리를 요구한다는 것이 발견되었다. 다른 그룹은 폴리에스터 멤브레인을 사용하였다.

**발명의 내용**

**도면의 간단한 설명**

[0009] 본 발명은 지금 실시예를 통한 도면과 관련하여서만 상세하게 설명될 것이다.

도 1은 이식 한 달 후 돼지 눈에 HESC-RPE 인 시츄(in situ)를 가진 바이오폴리머 패치를 보여준다 (A). B: A의 광 현미경 사진은 바이오폴리머 상 HESC-RPE 부근 내부/외부 부분의 광수용기를 보여준다. C: 돼지 눈에 이식된 폴리머 단독, 광수용기는 저하된다. 염색: 크레실 바이올렛. 크기 바: A, 1 mm; B, 100  $\mu$ m. 이는 생체 내 폴리머의 생체 적합성 및 RPE 세포의 단일층이 생존 가능한 광수용기를 유지하는데 필수적이라는 것을 나타낸다.

도 2는 1개월 생존, 돼지 눈의 바이오폴리머 상 HESC-RPE의 공초점 이미지이다. HESC-RPE는 돼지 광수용기(로돕신, FITC) 부근이고 돼지 RPE에 가로놓인 균일하고, 염색된 시트를 형성한다. 몇몇 광수용기 물질은 HESC-RPE 세포 내에 존재한다(A). B는 제공사 RPE 세포가 RPE65(TRITC)를 발현하는 것을 보여준다.

이는 이식된 HESC-RPE가 생체 내에서 정상으로 기능한다는 것을 나타낸다.

도 3은 사이클로스포린 상 5주 후 3주령 영양 실조 RCS 쥐로 이식된 분리된 HESC-RPE를 보여준다. 이식된 인간 세포는 우리의 독특한 항-인간 표면 마커(HSM) 항체로 붉게 표지된다. HESC-RPE-유래된 세포의 표지된 과정은 외부 경계 멤브레인을 우회하고 호스트 시냅스 층 내로 통합한다. A의 박스된 영역은 B에서 확대된다. 이는 이식된 세포가 이식된 눈에서 우수한 정도의 시각 기능을 유지할 수 있었다는 것을 보여준다(동일한 동물의 이식되지 않은 눈과 비교).

도 4는 다양한 멤브레인 상 세포 성장을 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0010] [발명의 요약]

[0011] 본 발명에 따라, 세포 성장을 지원(support)하는 멤브레인이 제공되고 상기 멤브레인은 실질적으로 비-생분해성이며 다공성이고, 구멍은 약 0.2  $\mu$ m 내지 0.5  $\mu$ m의 직경이다. 바람직하게 구멍 직경은 0.3  $\mu$ m 내지 0.45  $\mu$ m이다.

[0012] 상기 멤브레인은 일단 눈으로 이식되면 세포를 지원(support)하도록 유지되는 것을 보장하기 위해 비-생분해성이다. 실질적으로 비-생분해성이라는 점에서, 이는 멤브레인이 신체에 삽입된 후 5년 이상, 더 바람직하게는 10년 이상, 더욱 더 바람직하게는 15년 이상 분해되지 않는다는 것을 의미한다.

[0013] 본 직경의 구멍은 폴리머를 통해 세포의 이동을 막는 한편 모든 영양분과 단백질의 확산은 허용하는 것이다.

[0014] 구멍 밀도는 바람직하게 cm 당 약  $1 \times 10^7$  내지  $3 \times 10^8$  구멍, 더 바람직하게는 cm 당 약  $5 \times 10^7$  내지  $1 \times 10^8$  구멍이다. 본 밀도는 바람직한 투과성 정도를 가능하게 하고 혈관 신생을 또한 가능하게 한다. 구체적으로, 구멍의 사이즈 및 밀도는 멤브레인의 한쪽 면으로부터 다른 쪽으로 영양분의 이동 및 멤브레인을 통한 혈관 신생을 또한 가능하게 하기 위해 중요하다. 이는 특히 중요한 후-착상(post implantation)이다. 폴리머 바디(polymer body)는 풍부한 맥락막 상(choroidal bed)으로부터 혈관 신생을 받을 수 있다. 이는 눈 외부의 풍부한 혈관 상에서 보여졌으나(카셀 등, 2002; 패트릭 등 1999; 삭세나 등 1999, 피터 등 1998), 다공성이 필요한 만큼 충분한 경우에만 일어날 수 있다(벤거 등 1990).

[0015] 바람직하게 멤브레인 유압 전도도(hydraulic conductance)는  $50 \times 10^{-10}$  m sec<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup> 이상이다. 구체적으로, 멤브레인 유압 전도도는 바람직하게 약 33 L/분/cm<sup>2</sup>이다. 이는 어린 황반 사체 브루흐 멤브레인(young macular cadaveric Bruch's membrane) 유압 전도도의 8배인  $801.21 \times 10^{-10}$  m sec<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>과 동등하다. 본 잉여 전도도는 인공 멤브레인이 전적으로 수동 처리에 의존하기 때문에 유용하다. 영양분 확산의 관점에서 가로지른 세포의 수

요를 만족할 수 있을 뿐만 아니라, 이는 또한 RPE 세포의 기저 면으로부터 유체 수송에 방해가 되지 않아야만 하고 그렇지 않으면 RPE가 폴리머 표면으로부터 분리될 것이다. 이는 AMD의 경우 노인에게서 브루흐 맴브레인의 감소된 유압 전도도가 색소 상피 박리를 야기한다고 추측되고 있기 때문에 중요하다(버드 & 마샬 1986).

- [0016] 바람직하게, 맴브레인은 감마선 조사, 에틸렌 옥사이드, 오토 클레이빙(autoclaving) 또는 저하 없는 UV 멸균에 의해 멸균될 수 있다.
- [0017] 바람직하게 맴브레인은 초음파 실링(ultrasonic sealing), 무선 주파수 실링(radio frequency sealing) 또는 인서트 몰딩(insert moulding)에 의해 실링될 수 있다. 이는 부착한 약학적 또는 맴브레인의 코팅층을 예로 들 수 있는 맴브레인에 부착된 다른 층을 허용한다. 전달을 돕는 맴브레인에 단단함을 제공하기 위해, 예를 들어, PLGA와 같은 더 단단한 생분해성 층을 부착하기 원할 수 있다. 선택적으로, 층은 약학적 또는 생물학적 제제를 포함하거나 다른 세포를 지원(support)하는 층이 부착될 수 있다.
- [0018] 맴브레인은 바람직하게 약 11  $\mu\text{m}$ 의 최대 두께를 가진다. 더 바람직하게 맴브레인 두께는 9  $\mu\text{m}$  내지 11  $\mu\text{m}$ 이다. 맴브레인의 두께는 영양분의 발산을 가능하게 하고, 혈관 신생을 가능하게 하며, 또한 맴브레인이 눈에 쉽게 삽입되는 것을 가능하게 하기 위해 선택된다.
- [0019] 따라서, 세포 성장을 지원(support)하기 위한 맴브레인이 제공되며, 맴브레인은 실질적으로 비-생분해성이고, 다공성이며, 약 11  $\mu\text{m}$ 의 최대 두께를 가진다. 맴브레인은 바람직하게 실질적으로 평면이고, 그것의 가장 작은 치수는 바람직하게 약 11  $\mu\text{m}$ 보다 작다. 치수의 관점에서 두께는 다양할 수 있지만, 바람직하게 9  $\mu\text{m}$  내지 11  $\mu\text{m}$  두께이다.
- [0020] 맴브레인은 바람직하게 약 1.5mg/cm<sup>2</sup>의 최대 무게를 가진다. 더 바람직하게 맴브레인의 무게는 1.0 mg/cm<sup>2</sup> 내지 1.4 mg/cm<sup>2</sup>이다. 맴브레인의 최소 인장 강도는 바람직하게 100 바(bar)이고, 수술 동안 적절하도록 충분한 강도를 제공한다. 최대 인장 강도는 바람직하게 300 바이고, 또한 맴브레인을 수술 동안 쉽게 다루는 것을 가능하게 한다. 맴브레인의 파열 강도는 바람직하게 100psi 이상이다.
- [0021] 바람직하게, 맴브레인은 친수성이다. 이는 맴브레인에게 우수한 수분 보유력을 제공하고, 쉽게 세포 및 다른 바람직한 코팅의 부착을 가능하게 한다.
- [0022] 맴브레인은 바람직하게 4 내지 8의 pH를 가지며, 이는 생리학적으로 허용 가능한 pH이다.
- [0023] 맴브레인은 바람직하게 한 면 이상에 코팅을 포함한다. 코팅은 바람직하게 라미닌(laminin), 매트리지겔(matrigel), 콜라겐, 피브로넥틴(fibronectin) 및 PLGA폴리(락틱-코-글리콜산)과 같은 단백질 또는 당단백질(glycoprotein)이다. 코팅은 또한 코팅 성분에 결합한 약학적 또는 생물학적 제제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 코팅은 신경 성장 제제, 항-염증 제제 또는 항혈관신생 제제를 포함할 수 있다.
- [0024] 구체적으로 코팅은 바람직하게 라미닌, 특히 IgVAV와 같은 라미닌-1 또는 그의 절편을 포함한다. 구체적으로, 코팅은 바람직하게 다른 단백질 또는 당단백질보다 더 라미닌-1을 포함한다. 바람직하게 코팅은 30% 이상, 더 바람직하게 40% 이상, 특히 라미닌-1을 포함한다. 코팅은 바람직하게 약 40 - 45  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 맴브레인 상의 라미닌-1 농도를 생산하도록 적용된다.
- [0025] 따라서, 세포 성장을 지원(support)하는 맴브레인이 제공되며, 맴브레인은 실질적으로 비-생분해성이고 라미닌-1을 포함하는 코팅으로 한 면 이상이 코팅된 다공성 지원층(support layer)을 포함한다.
- [0026] 맴브레인은 바람직하게 친수성 폴리머로 만들어진다. 또한 폴리머 상으로 UV 빛을 비추으로써 친수성으로 만들어지는 소수성 폴리머도 사용될 수 있다. 구체적으로 바람직한 폴리머는 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리부틸렌 테레프탈레이트와 같은 폴리에스터; 폴리우레탄 및 폴리우레아-우레탄, 구체적으로 폴리카보네이트 및 폴리실록산을 포함하는 것 및 폴리에스터 기반의 또는 폴리에테르 기반의 것; 나일론과 같은 폴리아마이드; 심파텍스(Sympatex)와 같은 폴리에테르-에스터; 마크로론(Makrolon)와 같은 폴리카보네이트; 펄스펙스(Perspex)와 같은 폴리아크릴레이트; 폴리(테트라플루오로에텐)(PTFE); 폴리실록산; 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌과 같은 폴리올레핀; 및 듀퐁(DuPont)의 브랜드 네임 델린(Delrin)으로 일반적으로 알려진 폴리옥시메틸렌(POM)을 포함한다. 특히 폴리에틸렌 테레프탈레이트 또는 폴리부틸렌 테레프탈레이트에서 만들어진 맴브레인이 바람직하다. 다른 바람직한 실시예에서, 맴브레인은 폴리에스터로 만들어진다.
- [0027] 맴브레인은 세포 층의 성장에 유용하다. 맴브레인은 바람직하게 맴브레인 위에 세포 층을 포함한다. 세포는 맴브레인 및 세포의 의도된 용도에 따라 선택된 임의의 세포가 될 수 있다. 세포 종류는 단일층(monolayer)으로

성장될 수 있는 임의의 세포이며 망막 세포, 피부 세포와 상피 세포 및 유도 만능 줄기 세포(induced pluripotent stem cell)을 포함한다. 세포는 다양한 근원에서 유래될 수 있으며, 예를 들어 세포는 개인에게 다시 이식하기 위해 개인으로부터 취해진 자가 조직(autoologous) 세포이거나 구체적으로 의도된 목적을 위해 성장된 세포일 수 있다. 세포는 줄기 세포, 구체적으로 인간 배아 줄기 세포로부터 유래될 수 있다. 세포가 배아 줄기 세포로부터 유래된 경우, 세포는 세포 은행과 같은 비-배아성 근원으로부터 입수 가능한 것이 바람직하다. 바람직한 실시예에서, 발명의 인간 배아 줄기 세포는 론자 등, Nature, 444:481-485, 11월 2006에 개시된 분리 hESC의 방법과 같은 인간 배아의 파괴 외의 방법으로 획득된다. 세포는 ARP-19 세포와 같은 무한 증식 세포가 될 수 있다. 구체적으로, 본 발명은 특히 망막의, 퇴행성 질환의 치료에 유용하다. 따라서, 세포는 망막 색소 상피 세포(RPE 세포), 또는 RPE 세포를 형성하기 위해 분화하거나 RPE 세포(망막 과생물) 또는 그것의 전구체의 분화로부터 형성된 세포와 같은 관련된 세포일 수 있다. 그러한 세포는 광수용기(photoreceptor) 세포, 수평(horizontal) 세포, 아마크린(amacrine) 세포 또는 망막 신경절(retinal ganglion) 세포를 포함할 수 있다. 다른 매우 분화된 세포 또한 사용될 수 있다.

- [0028] 멤브레인과 세포의 층은 바람직하게 길이 및 폭이 3 mm × 5 mm 이상이다. 바람직하게 막과 세포의 층은 4 mm × 6 mm 이상이다.
- [0029] 멤브레인이 세포가 적용될 때, 세포 미-분화(de-differentiating) 가능성을 줄이기 위해, 세포를 뾰뾰하게 시드(seed)하는 것이 유리하다. 이상적으로, 세포는 200000 세포/cm<sup>2</sup>, 더 바람직하게 250000 세포/cm<sup>2</sup>의 밀도, 또는 300000 또는 350000 세포/cm<sup>2</sup>과 같은 더 높은 밀도로 시드되어야 한다.
- [0030] 따라서, 세포 군락(cell colony)을 지원(support)하기 위한 다공성, 비-생분해성 멤브레인이 제공되며, 멤브레인은 적어도 한 면 위에 세포 층을 가지고, 세포는 200000 세포/cm<sup>2</sup>의 밀도로 시드된다.
- [0031] 또한 제공된 것은 200000 세포/cm<sup>2</sup> 또는 그 이상의 밀도로 멤브레인 상으로 세포를 시드하는 단계를 포함하는 멤브레인 상에 세포를 시드하는 방법이다.
- [0032] 멤브레인은 바람직하게 본 발명에 따른 멤브레인이다. 나아가, 세포는 바람직하게 RPE 세포와 같이 매우 분화된 세포이다.
- [0033] 또한 본 발명에 의해 제공된 것은 세포 군락을 지원(support)하는 본 발명에 따른 멤브레인의 용도이다.
- [0034] 더 제공된 것은 치료용으로 사용되는 본 발명에 따른 멤브레인이다. 구체적으로, 연령 관련 황막 변성, 망막 열공(retinal tears), 황반 디스트로피(distrophy), 맥락막 결여(choroidemia), 레버 선천성 흑내장(Lber Congenital Amariosis) 및 스타르가르트(Stargardt) 질환의 치료에의 멤브레인의 사용이 제공된다.
- [0035] 또한 제공되는 것은 다음 단계를 포함하는 세포 배양 방법이다:
- [0036] a) 1.2×10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> 이상의 시드 밀도로 미토마이신(mitomycin) C 불활성화된 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 피더(feeder) 또는 6×10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>의 시드 밀도로 인간 섬유아세포 피더로 인간 배아 줄기 세포를 시드하는 단계; 및
- [0037] b) 다음 성분 또는 그들의 동등물을 포함하는 배지에 세포를 유지하는 단계: 20% 녹아웃 세럼 교체물(인비트로젠), 1% 비-필수적인 아미노산 용액, 1mM L-글루타민(인비트로젠), 4ng/mL 인간 bFGF(인비트로젠) 및 0.1 mM β-말캅토에탄올(시그마)을 가진 높은 글루코즈(4.8g/L) 녹아웃 둘베코 변형된 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, 인비트로젠).
- [0038] 성장 세포는 바람직하게 매 2일마다 피드(feed)된다. 10일 후 패세지(passage)에서, 피드 용법은 바람직하게 인간 배이직 섬유아세포 성장 인자 없는 배지를 사용하는 정례적인 매일 피드로 변경된다.
- [0039] 성장 세포는 바람직하게 30일 이상, 더 바람직하게 35일 이상 배양된다.
- [0040] 배양 배지는 바람직하게 15% 이상, 더 바람직하게 18% 이상 또는 20% 이상 KSR을 포함한다. 또한, 배지는 바람직하게 플라즈마네이트(plasmanate), 인간 LIF 및/또는 bFGF를 포함하지 않는다.
- [0041] 세포는 염색된 초점을 형성한다. 초점은 바람직하게 제거되며 단일층의 부착 및 확장을 가능하게 하기 위해 세포외 매트릭스 상으로 놓여진다.

- [0042] [발명의 상세한 설명]
- [0043] 실시예 1
- [0044] 멤브레인의 제조
- [0045] 얇은 폴리에스터 필름이 핵 반응기로부터 콜리메이트되고(collimate) 대전된 입자로 노출된다. 이러한 입자들이 폴리에스터 물질을 통과할 때, 그들은 민감화된 트랙을 떠난다. 다음으로, 폴리머 트랙은 에칭 용액(etching solution)과 용해되고 실린더 형 구멍을 형성한다. 에칭 용액의 온도 및 강도, 그리고 그것에의 노출 시간을 다양하게 하면, 정확하게 조절된 구멍 사이즈를 생산한다.
- [0046] 결과 멤브레인은 조절된 직경 및 숫자의 구멍을 포함하는 부드럽고 평평한 표면을 가진 얇고, 반투명하며, 마이크로다공성의 폴리에스터 필름이다.
- [0047] 인간 배아 줄기 세포(hESC)로부터 인간 망막 색소 상피 세포(hRPE)의 생산
- [0048] 세포 배양
- [0049] hESC는 0.1% 젤라틴으로 코팅된 플라스크에서 유지되고 미토마이신(mitomycin) C 불활성화된 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 피더(feeder)( $1.2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 의 시드 밀도로) 또는 동등한 인간 섬유아세포 피더로 시드된다. 세포는 다음 성분으로 구성된 베이직 HESC-배지에서 유지된다: 20% 녹아웃 세럼 대체(인비트로젠), 1% 비-필수 아미노산 용액, 1mM L-글루타민(인비트로젠), 4ng/ml 인간 bFGF(인비트로젠) 및 0.1mM  $\beta$ -말캅토에탄올(시그마)을 가진 높은 글루코즈(4.8g/L) 녹아웃 둘베코의 변형된 이글 배지(DMEM, 인비트로젠). 일단 냉동 보존에서 제거되면, HESC 라인은 2일마다 배지 교환을 하면서 최대 74 패시지(passage) 유지된다. 세포는 분화되지 않은 HESC의 균락을 유지하기 위해 규칙적으로(1:5) 흘려진다.
- [0050] (이는 마커 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 및 TRA-181에 대한 염색으로 평가된다. 셰필드(Sheffield) 대학에서의 정례 스크리닝은 사용된 HESC가 핵형 정상(Shef1(46XY) 및 She(46XX))이라는 것을 확인했다.)
- [0051] HESC-RPE의 분화 및 확장
- [0052] 우리는 hESC 균락이 MEFs 상에 슈퍼 융합성(superconfluent)이 되는 것이 가능하게 될 때 hESC-hRPE가 신뢰할 수 있게 형성된다는 것을 발견했다. 각 hESC 균락의 경계가 함께 융합될 때(10 일 포스트-패시지) 배지 교체 체계는 상기 상세화된 베이직 hESC 배지(마이너스 bFGF)를 사용하여 매 2일마다 한 번에서 매일 한 번으로 변경된다. 본 요소는 bFGF와 RPE 사양 억제 간의 기록된 연관 때문에 배지에서 회수되었다. 염색된 초점은 매일 피드 체계 실행 이후 1-2주 사이에 슈퍼 융합성 hESC 배지에 나타난다.
- [0053] 그들의 형성 이후, 염색된 초점(pigmented foci)은 글래스 패스추어(glass pasture) 피펫의 끝 및 마이크로서지 칼 블레이드(microsurgical blade)를 사용하여 기계적으로 잘라내어진다. 본 접근은 초점이 1mm 이상의 직경을 수득하는 경우에만 실용적이다. 본 과정 동안 성장 인자 감소된 매트릭셀™(BD 바이오사이언스, 1:30 희석됨) 또는 라미닌으로 코팅된 35mm 조직 배양 디쉬 상으로 염색된 초점이 배치되기 전에 인근의 비-염색된 물질을 나누기 위한 모든 노력이 이루어진다. 총 10 염색된 초점이 각 디쉬에 놓여지고 RPE 세포는 추가 35일 동안 매트릭셀 상에 확장되는 것을 가능하게 했다(즉, 베이직 HESC-배지 마이너스 bFGF에서 5주). 본 단계 동안 배지 교체는 매 2-3일 마다 수행된다. 본 기간은 2-3 mm 범위의 염색된 세포 단일층 시트를 수득하기에 충분하다. 본 방법을 사용하여, RPE 시트(1 cm에 근접)는 우리 실험실의 생체 외(in vitro)에서 최대 4개월 유지되었다.
- [0054] khES-1 및 khES-3 세포 라인으로부터 RPE 세포를 유도하는 방법(오사카다 등, (2008) Nat Biotechnol, 26, 215-224) 및 H1, H7 및 H9 세포로부터 RPE를 유도하는 방법(클리만스카야 등, (2004) 클로닝 및 줄기 세포, 6, 217-245)을 포함하는 당업계에 알려진 다른 분화 방법 및 기술이 관심 대상의 세포를 생산하는데 사용될 수 있다.
- [0055] 멤브레인 상으로 인간 ES 세포 시드(seeding) 및 이후 배양 방법
- [0056] 세포 수확:

- [0057] 조직 배양 플라스크 내에서 비-염색된 세포군(cell population)으로부터 그들을 분리하기 위해 멸균 외과 나이프를 사용하여 염색된 세포 클러스터 주변에서 절개가 이루어진다. 클러스터는 이후 피펫 끝 또는 멸균 글래스 피펫을 사용하여 제거된다. 몇몇 경우에 있어, 이는 그들을 당겨 뽑는 것을 돕기 위해 동시에 흡입하면서 이루어진다.
- [0058] 염색된 클러스터는 이후 에펜도르프 시험관(eppendorf tube) 내 그들의 성장 배지와 함께 모아진다. 클러스터가 확고히 정착되는 것을 보장하는 12,000 - 13,500 rpm으로 3-5분 동안 원심분리 한 후, 분리 용액과 배지의 교환이 수행된다. 분리 용액은 다음과 같이 이루어진다: 칼슘 또는 마그네슘이 없는 PBS 내 90% 비-효소성 세포 분리 용액(시그마-알드리히) 및 0.25% 트립신. 잔여물은 칼슘 또는 마그네슘 없는 돌베코 포스페이트 완충된 생리 식염수이다. 세포 클러스터는 37°C에서 5-15분 동안 본 분리용액에서 배양된다.
- [0059] 세포 집괴(clump)의 철저한 분쇄가 염색 클러스터가 용해될 때까지 피펫으로 수행된다. 원심 분리가 12,000 - 13,500 rpm으로 5분 동안 반복된다. 분리 용액은 펠렛을 건드리지 않고 흡입된다. 성장 배지는 이제 부가되고 세포 펠렛은 이후 분쇄에 의해 재현탁된다. 세포 밀도의 측정이 본 단계에서 혈구계(haemocytometer)로 행해지고 시드 밀도가 그에 따라 계산된다.
- [0060] 멤브레인 제조:
- [0061] 멤브레인은 각 면 상에서 라미나 플로우 후드(laminar flow hood) UV 램프를 사용하여 30분 동안 멸균된다. 그들은 이후 배양 디쉬 내에 놓여지고 적절한 삼입이 그들을 누르기 위해 사용된다. 본 구성을 사용하여, 멤브레인은 이후 37°C에서 30분 동안(두꺼운 겔 방법) 또는 4°C에서 밤새(얇은 겔 방법) 1:30 매트릭겔(BD 바이오사이언스)로 코팅된다. 라미닌 또한 1-10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 표면 농도에서 성공적으로 사용되었다. 라미닌의 장점은 인간 라미닌이 상업적으로 입수 가능하며 임상 등급 기준을 달성하기에 중요한 제노 없는(xeno-free) 방법을 가능하게 한다는 것이다(레이 등, 2007).
- [0062] 멤브레인의 패치는 돼지 눈 및 쥐 눈으로 이식되었다. 이식의 결과는 도 1 내지 3에 보여진다. 도 1은 이식 한 달 후 돼지 눈 내 인 시츄(in situ) HESC-RPE를 가진 바이오폴리머 패치를 보여준다. 이는 생체 내 폴리머의 생체 적합성 및 RPE 세포의 단일층이 생존 가능한 광수용기를 보유하는데 필수적이라는 것을 나타낸다.
- [0063] 도 2는 1개월 생존 후 돼지 눈 내 바이오폴리머 상 HESC-RPE 이미지를 보여준다. 이는 이식된 HESC-RPE가 생체 내에서 정상으로 기능한다는 것을 나타낸다.
- [0064] 도 3은 사이클로스포린 상 5주 후 3주령 영양 실조 RCS 쥐 내로 이식된 분리된 HESC-RPE를 보여준다. 이는 이식된 세포가 이식된 눈의 우수한 정도의 시각 기능을 유지하는 것을 가능하게 했음을 보여준다(동일한 동물로부터 이식되지 않은 눈과 비교). 시각의 예리함은 우리의 시각성 운동(optokinetic) 장비를 사용하여 측정되었고 정도(degree) 당 사이클로 보고된다(c/d).

[0065] 실시예 2

[0066] 시드 멤브레인

[0067] RPE 세포는 매우 분화된 세포를 위한 시드의 최적 밀도를 찾기 위해 다양한 밀도로 멤브레인 상으로 시드되었다. 세포는 염색 및 조약돌 형태학(cobblestone morphology)과 같은 RPE 세포의 특징에 대해 관찰되었다. 그 결과는 아래 표에 나타난다:

표 1

[0068]

시드 밀도(세포/cm <sup>2</sup> )	육안으로 볼 때의 염색	현미경 실험	
		40×현미경으로 보이는 면적당 염색된 세포의 수	규칙적인 형태학(완벽한 6각형이 최상 = 최고)*
70,000	닐(Nil)	16	계산하기에는 너무 드문 세포
212,000	밝음	>400	0.023
270,000	어두움(좋음)	>400	0.024
391,000	어두움(가장 좋음)	>500	0.0175

[0069] 실시예 3

[0070] 다른 멤브레인 상 성장 세포

[0071] 여러 다른 멤브레인이 세포 성장을 지원(support)하는 능력에 대해 테스트되었다. 그 결과는 아래 표에 주어진다:

표 2

	TC 폴리스티렌	PLGA	테플론(PTFE)	폴리-우레탄	다크론(Dacron) 폴리에스터
성질	탁월하게 잘 투과된 성장 표면	우수한 성장 표면	강하고, 유연하며, 다공성	강하고, 유연하며, 다공성	강하고, 유연하며, 충분히 다공성이고, 탁월한 성장 표면. 계공자 및 호스트 면역 세포 양자의 세포 이동을 차단하기에 충분히 작은 구멍 사이즈. 매우 얇음에도 불구하고 탁월한 외과적 조작 특성
두께	얇은 필름 이용 불가	700-900 $\mu\text{m}^+$	900-150 $\mu\text{m}$	60-200 $\mu\text{m}$	5-12 $\mu\text{m}$
구멍 사이즈	N/A	17-50 $\mu\text{m}$	약 0.3-0.5 $\mu\text{m}$	20-200 $\mu\text{m}$	0.4 $\mu\text{m}$
구멍 밀도	N/A	높음	높음	낮음	$1 \times 10^8 / \text{cm}^2$
소수성	없음	없음	강함	없음	없음
세포 친화성	높음	높음	매우 낮음	낮음 - 중간	높음

[0073] 실시예 4

[0074] RPE 세포 성장

[0075] 형태학: 이 위상차 가능한 도치된 현미경(phase contrast enabled inverted microscope) 상에서 라이브 이미지 캡처를 사용하여 투명한 폴리머에 대해 평가되었다. 불-투명한 폴리머 형태학에 대해서는 연결 지점 마커(junctional marker)(대개 ZO-1)에 대한 면역 염색에 의해 평가되었다.

[0076] 세포 성장에 대한 테스트:

[0077] 광 현미경, 공초점 현미경에 의한 면역화학, 전자 현미경 및 세포 생존력 평가의 조합이 세포 성장을 평가하는데 사용되었다.

[0078] 세포 생존력 평가(알라마르 블루(Alamar blue) 분석):

[0079] 다양한 폴리우레탄 폴리머가 PLGA에 대해 조직 배양 상업적인 삽입물로서 장착되었다. 요약하면, 본래 필터는 제거되었고, 잔여 물질은 사포로 사포질되었다. PBS로 철저히 행군 후에 실험의 폴리머는 가정용 시아노아크릴레이트 접착제(록다이트, 헨켈 코오포레이션, 아본, 오하이오)로 삽입물 상에 끼워졌다. 폴리우레탄 기반 폴리머의 적합성을 테스트하기 위해 알라마르 블루 세포 생존력 평가가 다음과 같이 수행되어 살아 있는 세포 밀도를 측정하였다: 평가는 다음과 같이 수행되었다: 세포는 최적의 부착이 가능하도록 배지를 포함하는 세럼을 사용하여 낮은 밀도에서 다른 표면 상으로 시드된다. 세포는 충분한 부착이 가능하도록 37°C에서 24시간 동안 배양된다. 그들은 이후 부착되지 않은 세포를 세척해 내도록 세럼-없는 배지에서 두 번 헹구고 이후 세포를 동시에 발생하기 위해 세럼 없는 배지에서 적어도 12-24시간 동안 배양된다. 배지는 이후 의도된 시간 동안 성장된다. 측정하기 위해, 배지가 페놀 레드-없는 헵스 발란스드 솔트 용액(phenol red-free Hank's Balanced Salt Solution, PRF-HBSS) 내 특정 부피의 10% 용액의 알라마르 블루를 적용하기 전에 PRF-HBSS에 한 번 헹구

진다. 배지는 37°C에서 45분 동안 배양된다. 블루 상층액은 살아 있는 세포의 숫자에 비례하여 형광 붉은 색상으로 바뀔 것이다. 상층액은 96 웰 플레이트에 수집되고 형광에 대한 플레이트 리더기에서 분석된다(여기 530-560 nm 방출 590 nm).

[0080] 다양한 물질에 대한 알라마르 블루 생존력 평가 결과는 아래 표에 보여진다. 추가로, 폴리우레탄 및 폴리에스터 상의 세포 성장이 비교되었고 그 결과는 도 4에 보여진다. 모든 폴리우레탄 기반 폴리머는 우리의 폴리에스터 필터와 비교할 때 감소된 세포 성장을 보였다.

표 3

[0081]	TC 폴리스티렌	PLGA	테플론(PTFE)	폴리우레탄	상업적인 배지-등급 폴리에스터	폴리에스터
세포 성장	탁월함	탁월함	열악함	중간	탁월함	탁월함
형태학	열악함	열악함	N/A	우수함	우수함	우수함
전자 현미경	-	-	드문 분리된 세포	분리된/말린 세포의 시트. 이는 또한 열악한 세포 부착의 추가 증거이다	융합성의 부착된 세포	융합성의 부착된 세포
연결부위 염색(공초점 현미경)	예	예	N/A	예(고체 폴리머만)	예	예
극성(공초점 현미경)	예	예	N/A	부분적?(고체 폴리머만)	예	예

[0082] 이러한 발견은 대부분의 폴리우레탄 기반한 폴리머에서 매우 드문 세포 존재를 보였던 면역세포화학 및 공초점 현미경으로 확인되었다. 폴리우레탄 기반 폴리머(고체 폴리머) 중 하나는 세포 성장 및 연결 부위 염색이 우수하였지만 세포 시트가 쉽게 폴리머 표면에서 분리되었다.

[0083] 상기 표에서 보이는 바와 같이, 폴리에스터가 다른 가능한 멤브레인 물질에 비해 의미 있는 장점을 가진다는 평가의 결과는 명백하다.

[0084] **PLGA 방법:**

[0085] PLGA 멤브레인은 E.B. 라빅과 R. 랑거(화학 엔지니어링과, MIT, 캠브리지, 매사추세츠)로부터의 친절한 선물이었다. PLGA 물질은 레소머® 503H(베링거-인겔하임, 잉겔하임, 독일)로서 본래 구입되었고, 불균형 PLGA 멤브레인은 이 저자(루 등, 2000a과 2000b; 라빅 등, 2001과 2002)들에 의해 설명된 대로 합성되었다. 본 불균형 프로파일은 세포가 부드러운 상위 표면에 부착되도록 함과 동시에, 또한 세포가 폴리머의 더 낮은 다공성 쪽을 통해 기저 환경과 통하도록 한다.

[0086] PLGA 불균형 멤브레인은 본래 멤브레인이 제거된 후에 6.5 mm 코닝 트랜스웰®(Corning Transwell®) 삽입물이 장착되었다. 장착은 가정용 시아노아크릴레이트 접착제(로시타이트, 헨켈 코오포레이션, 아본, 오하이오)를 사용하여 이루어졌다. 이러한 삽입물은 30-60분 동안 라미나 플로우 후드에서 UV 램프에 대한 각 면의 노출에 의해 멸균되었다. 패시지 28 ARPE-19 세포는 90,000 세포/cm<sup>2</sup>의 밀도로 멤브레인 상으로 시드되었다.

[0087] 다른 시리즈에서, 불균형 PLGA 멤브레인은 빈 삽입물(상기와 같은) 상으로 정착되었다. 삽입물뿐만 아니라 조직 배양 폴리스티렌 디쉬(대조군)가 표준 작동 농도의 라미닌으로 코팅되었다(시그마-알드리히, 쥐 엔겔브레스-호움-스웬 중앙으로부터 유래). 디쉬 및 삽입물 양자 모두 이후 융합 시간을 줄이기 위해 180,000 세포/cm<sup>2</sup>의 더 높은 밀도로 p30 ARPE19로 시드되었다. 배양은 일주일에 두 번 DMEM 고 글루코즈 기반 RPE 배지로 유지되었다.

[0088] **실시예 5**

[0089] **코팅**

- [0090] HESC 배양 방법:
- [0091] HESC 라인 Shef1 및 Shef7는 0.1% 젤라틴으로 코팅된 플라스크에서 유지되었고 불활성화된 마우스 배아 섬유아 세포(MEF) 피더(드라퍼 등, 2002)로 시드되었다. 세포는 20% 녹아웃 세럼 대체(인비트로젠), 1% 비-필수 아미노산 용액, 1mM L-글루타민(인비트로젠), 4ng/ml 인간 bFGF(인비트로젠) 및 0.1 mM  $\beta$ -말캅토에탄올(시그마)를 포함하는 고 글루코즈 녹아웃 세럼 돌베코 변형된 이글 배지(DMEM, 인비트로젠)에 기초된 인간 배이직 HESC-배지에서 유지되었다. 일단 냉동 보존으로부터 제거되면, HESC 라인은 2일 마다 배지를 바꾸면서 최대 74 패시지 유지되었다. 세포는 미분화된 HESC 군락의 유지를 위해 규칙적으로(1:4) 흘려졌다.
- [0092] 다음 코팅은 다른 언급이 없는 한 그들의 표준 제조자 프로토콜에 따라 적용되었다: 매트릭셀(1:30), 라미닌, 콜라겐 IV, 인간 콜라겐 I, 푸라메트릭스®, 플라스마네이트, 폴리-L-라이신 및 대조군으로 코팅 없음. 요약하면, 각 코팅은 4°C에서 해동되었고 PBS 또는 세럼-없는 배지 중 하나에서 희석되었다. 플레이트/삽입물은 각 제조자의 가이드라인에 따라 4°C, 실온 또는 37°C 중 하나에서 코팅되었다. 매트릭스 용액은 이후 제거되었고 플레이트는 표준 과정과 같이 세척되거나 공기-건조되었다. HESC-RPE 군락(주요 군락)은 배양 플라스크에서 빼내졌고 이후 그들이 플레이트/삽입물 상으로 시드되었던 배지 내에 놓여졌다.
- [0093] 배양의 직접 관찰은 HESC 군락의 접촉 및 그들의 퍼짐에 대해 평가하기 위해 이용되었다. 최근 시드된 HESC 24 시간 내지 72시간까지의 시드 후 관찰은 오직 매트릭셀과 라미닌만이 HESC-RPE 군락 접촉, 즉 군락이 잘 고정되고 철저한 배지 행군에도 분리되는 경향이 없다는 결과를 낳는다는 것을 나타내었다. 인간 웹신화된 태반 라미닌의 한 배치(batch)는 HESC-RPE 군락의 고정을 달성한 반면, 다른 배치(batch)는 실패했다. 모든 다른 코팅(콜라겐 IV, 인간 콜라겐 I, 폴리-L-라이신, 푸라메트릭스®, 플라스마네이트)은 본 측면에서 완전하게 실패했다.
- [0094] **실시예 6**
- [0095] **Shef1 HESC로부터의 RPE 배양**
- [0096] *세포 배양*
- [0097] Shef1 HESC는 0.1% 젤라틴으로 코팅된 T25 플라스크에서 유지되고 인간 섬유아세포 피더로 시드된다( $T25(9 \times 10^3/cm^2)$  당  $2.25 \times 10^5$  세포의 최적 시드 밀도). 세포는 다음 성분으로 이루어진 배이직 HESC-배지에서 유지된다: 20% 녹아웃 세럼 대체(인비트로젠), 1% 비-필수 아미노산 용액, 1mM L-글루타민(인비트로젠), 4ng/ml 인간 bFGF(인비트로젠) 및 0.1 mM  $\beta$ -말캅토에탄올(시그마)를 포함하는 고 글루코즈(4.8g/L) 녹아웃 세럼 돌베코 변형된 이글 배지(DMEM, 인비트로젠). 일단 냉동 보존으로부터 나오면, Shef1 HESC는 매 2일마다 배지 변경을 겪고 미분화된 HESC 군락의 유지를 위해 규칙적으로(1:4) 흘려진다(마커 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 및 TRA-181에 대한 염색에 의해 평가됨).
- [0098] *HESC-RPE의 분화 및 확장*
- [0099] 우리는 피더 상에서 Shef1 HESC 군락이 상층액으로 되는 것이 가능하게 될 때 HESC-RPE가 신뢰할 수 있게 형성된다는 것을 발견하였다. 각 HESC 군락의 경계가 함께 융합되는 경우(약 10일 후-패시지) 배지 교체 체계는 상기 설명된 배이직 HESC 배지(마이너스 bFGF)를 사용하여 매 2일마다 한 번에서 매일마다 한번으로 변경된다. 본 요소는 bFGF와 RPE 사양 억제 간의 기록된 연관 때문에 배지에서 회수되었다. 염색된 초점은 매일 피드 체계 실행 이후 1-2주 사이에 슈퍼 융합성 hESC 배지에 나타난다.
- [0100] 세포는 염색된 초점(pigmented foci)이 글래스 패스추어(glass pasture) 피켓의 끝 및 마이크로서지칼 블레이드(microsurgical blade)를 사용하여 기계적으로 잘라내어진 후 5주 더 배양되었다. 본 접근은 초점이 1mm 이상의 직경을 수득하는 경우에만 실용적이므로, 이것은 5주 이상 세포를 배양하기에 유용할 수 있다. 본 과정 동안 라미닌으로 코팅된 35mm 조직 배양 디쉬 상으로 염색된 초점이 배치되기 전에 인근의 비-염색된 물질을 나누기 위한 모든 노력이 이루어진다, 총 10-20 염색된 초점이 각 디쉬에 놓여지고 RPE 세포는 추가 35일 동안 2 ml 배지에 확장되도록 한다(즉, 배이직 HESC-배지 마이너스 bFGF에서 5주). 본 단계 동안 배지 교체는 매 2-3일 마다 수행된다. 본 기간은 2-3 mm 범위의 염색된 세포 단일층 시트를 수득하기에 충분하다.
- [0101] 본 방법은 다음과 같이 다른 공개된 프로토콜과 다르다: 1. 우리는 더 높은 표준화된 농도의 KSR(란자 그룹에

의해 8-15% 변동 가능한 것에 비해 20%) 상태를 사용한다. 2. 우리는 슈퍼-융합성 HESC 배양으로부터 RPE 세포 생산 동안 플라즈마네이트(Plasmanate), 인간 LIF 또는 bFGF를 사용하지 않는다.

[0102] HESC-RPE의 분리 및 현탁

[0103] 염색된 HESC-RPE는 피더 상에 HESC-RPE 군락을 포함하는 T2 플라스크(패시지 0) 또는 피더 상 확장 HESC-RPE 시트(패시지 1)로부터 수확된다. 세포의 제거는 멸균 마이크로블레이드로 그들 주변을 자르고 멸균 피펫 끝으로 그들을 모아냄에 의했다. HESC 군락/시트는 이후 흡입되고 추가 사용 때까지 HES 배지-bFGF(bFGF 없음) 내에 현탁되었다.

[0104] 바람직한 양의 클러스터가 시험관 내 그들의 성장 배지와 함께 놓여지고 상청액 배지의 제거가 가능하도록 2400 내지 3600 rpm에서 5분 동안 원심분리된다. 원심 분리는 다음과 같이 용액 교환이 가능하기에 필요할 정도로 반복되었다: 세포는 PBS로 두 번 세척되고 이후 PBS 내 90% 비-효소성 분리 버퍼(시그마 #C5914) 및 PBS 내 10% 트립신 10×(패지 판크레아제로부터의 트립신, 시그마; 최종 트립신 농도 0.25%)에서 20분 동안 37°C로 배양되었다. 본 배양 기간 이후, 세포는 완전하게 현탁될 때, 즉 보이는 세포 집괴가 없을 때까지 철저히 분쇄된다. 그들은 다음으로 세포가 HES 배지-bFGF에서 재현탁된 후 분리 버퍼의 제거가 가능하도록 다시 원심 분리되고 추가 사용 때까지 37°C 배양기에 놓여진다.

[0105] 배양 삽입물 상으로 폴리머 시트의 조립

[0106] 0.4 μm의 구멍 사이즈 및 약 1 × 10<sup>8</sup> 구멍/cm<sup>2</sup>의 구멍 밀도를 가진 13 mm 폴리에스터 필터 디스크가 생물학 등급 비닐-기반된 실리콘 엘라스토머(Kwik-Sil, 월드 프레시전 인스트루먼트 인크 사라소타, 플로리다)를 사용하여 본래 필터 대신 트랜스웰(Transwell) 삽입물에 부착되었다. 삽입물은 5 내지 12 μm 두께였다. 폴리에스터는 1.2 mg/cm<sup>2</sup>의 무게를 가졌다. 삽입물은 PBS로 한 번 헹구지고 공기-건조되며, 멸균을 위해 각 면을 30분 동안 라미나-플로우 후드에서 UV 램프로 조사되었다. 멸균된 삽입물은 이후 멸균 라미나 플로우 후드에 저장되었다.

[0107] 제조된 배양 삽입물의 코팅 및 시드

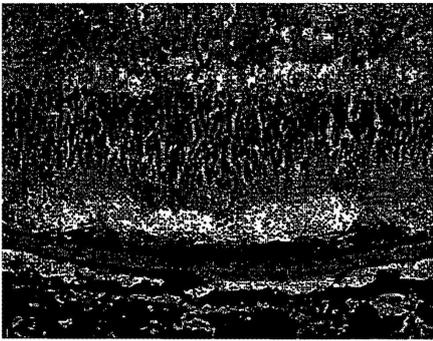
[0108] 멸균된 삽입물은 30분 동안 37°C에서 1:30 희석된 라미닌-1으로 코팅되었다. 라미닌(43 μg/cm<sup>2</sup>의 농도이고 37°C에서 30분 동안 배양됨). 라미닌은 세포 시드 전에 즉시 흡입되었다. HESC-RPE 현탁액의 세포 밀도는 트립판 블루 1:1 희석으로 Neubauer® 혈구계를 사용하여 측정되었다. 트립판 블루 염색은 모든 경우에서 93% 이상이었던 세포 생존력을 확인하기 위해 사용되었다. 세포는 200,000 - 400,000 세포/cm<sup>2</sup>의 최적 밀도에서 시드되었다. 시드된 세포는 적어도 24시간 및 첫 번째 배지 교환 전에 전형적으로 48시간 동안 부착하도록 했다. 배지는 이후 한 주에 3번 교체되었다.

도면

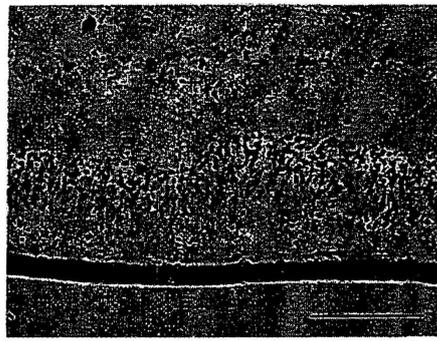
도면1



1A

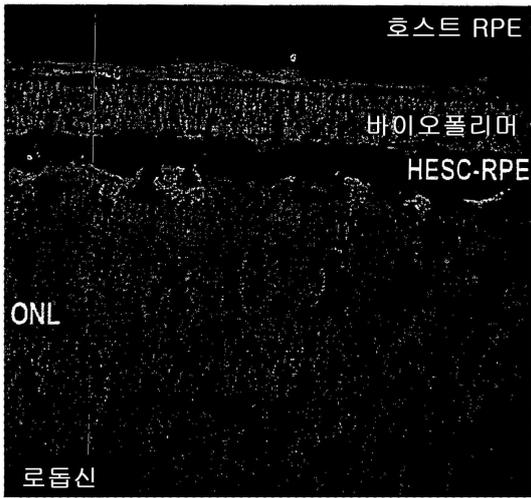


1B

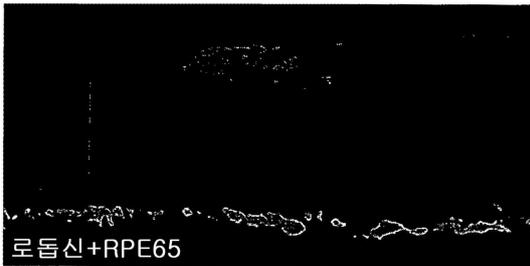


1C

도면2

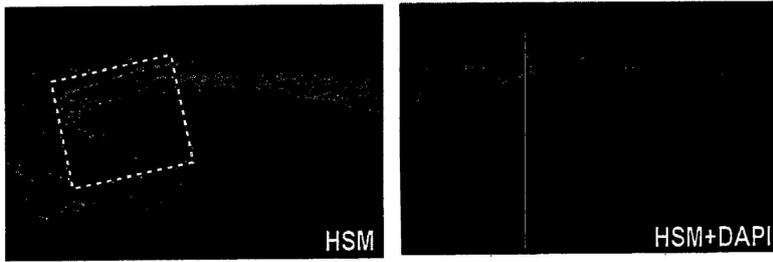


2A

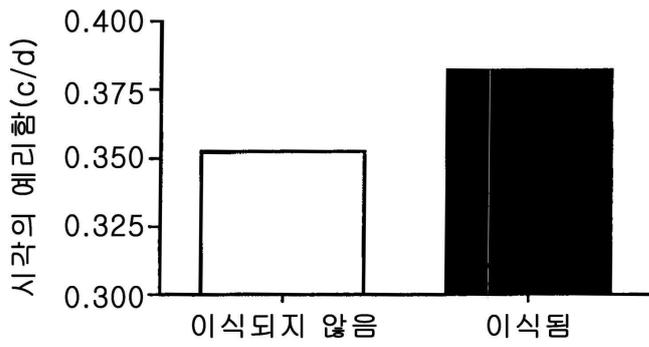
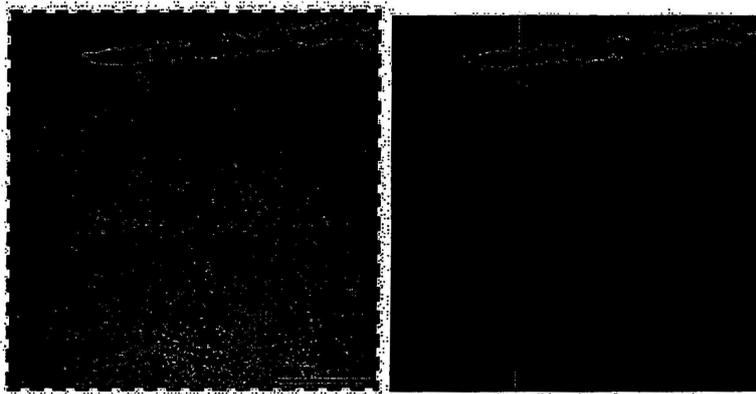


2B

도면3



3A



3B

도면4

알라마르 블루 분석은 폴리우레탄 기반 폴리머가  
열악한 세포 성장을 가진다는 것을 나타낸다

