



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월16일  
(11) 등록번호 10-1319227  
(24) 등록일자 2013년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61L 27/34 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)  
A61L 27/56 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2006-7006944  
(22) 출원일자(국제) 2004년10월07일  
심사청구일자 2009년09월14일  
(85) 번역문제출일자 2006년04월10일  
(65) 공개번호 10-2007-0093020  
(43) 공개일자 2007년09월17일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/032934  
(87) 국제공개번호 WO 2005/037144  
국제공개일자 2005년04월28일  
(30) 우선권주장  
60/510,349 2003년10월10일 미국(US)  
(뒷면에 계속)  
(56) 선행기술조사문헌  
JP01249048 A  
전체 청구항 수 : 총 17 항

(73) 특허권자  
루이 게 밍  
미합중국 96813 하와이주 호놀룰루 에이퍼티 2810  
사우스 쿠쿠이 스트리트 55  
셀룰라 바이오엔지니어링 인코포레이티드  
미국 96826 하와이 호놀룰루 슈트 480 영 스트리트  
1946  
(72) 발명자  
루이, 게, 밍  
미합중국 96813 하와이주 호놀룰루 에이퍼티 2810  
사우스쿠쿠이 스트리트 55  
(74) 대리인  
양영준, 양영환

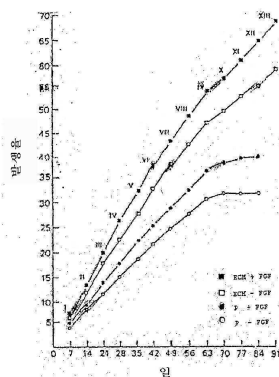
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **각막 내피세포 및 관련세포를 생체고분자 위에서성장시키고, 인공의 이식용 각막을 제조하는 방법 및조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 생체고분자로부터 합성된 각막기질의 내피 면 위에 배양한 인간 각막 내피세포의 단일층(monolayer)을 부착하고 성장시켜, 보다 생물학적으로 등가성(bio-equivalent)인 인공각막을 생성하는 방법을 개시한다. 이는 피브로넥틴, 라미닌, RGDS, 콜라겐 타입 IV, 폴리카보필과 결합된 bFGF 및 폴리카보필과 결합된 EGF와 같은 부착 및 성장촉진제의 사용을 포함한다. 또한, 본 발명은 절반 두께의 인공각막 또는 정상 두께의 버튼으로 교체하는 각막 이식을 위해 배양한 인간 각막 내피세포의 부착 및 증식을 지지하기 위해서 부착 분자와 성장인자를 포함하는 자립 고분자를 제조하는 방법을 기술한다. ARMD의 치료를 위해 배양한 RPE 세포를 망막 아래 공간으로 이식하는 방법 또한 본 발명에 기술된다. 이 방법은 단일층 세포의 판 내부로 이식된 RPE 세포를 전달할 수 있고, 생리학적 기능을 수행하기에 더욱 적절할 것이다.

**대표도 - 도1**



(30) 우선권주장

60/510,350 2003년10월10일 미국(US)

60/510,359 2003년10월10일 미국(US)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

각막 내피세포가 생체고분자의 오목면(concave side)에 부착하여 성장할 수 있도록 5분 내지 24시간 동안 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin), RGDS 펩타이드, 폴리카보필(polycarbophil)과 결합된 bFGF 및 폴리카보필과 결합된 EGF를 함유하는 부착 혼합물로 기저(base) 생체고분자를 코팅하는 단계를 포함하는, 내피세포의 부착 및 성장을 증진시키기 위한 생체고분자의 개질방법.

### 청구항 2

- (i) 기저(base) 생체고분자;
- (ii) 상기 생체고분자를 원하는 형태로 성형하는 단계;
- (iii) 상기 생체고분자의 오목면을 라미닌, 피브로넥틴, RGDS 펩타이드, 폴리카보필과 결합된 bFGF 및 폴리카보필과 결합된 EGF를 포함하는 부착 혼합물로 코팅하는 단계;
- (iv) 상기 생체고분자를 4°C에서 각막 내피세포의 부착을 향상시키도록 5분 내지 24시간 동안 상기 부착 혼합물과 함께 방치하는 단계;
- (v) 상기 부착 혼합물을 제거하는 단계; 및,
- (vi) 각막 내피세포를 상기 생체고분자의 오목면 위에 접종하는 단계를 포함하는, 인공 각막의 제조방법.

### 청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 생체고분자는 콜라겐 IV를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 접종 단계는 2,000 내지 5,000 세포/mm<sup>2</sup>로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

- (i) 기저(base) 생체고분자;
- (ii) 상기 생체고분자를 원하는 형태로 성형하는 단계;
- (iii) 상기 생체고분자의 오목면을 1) 성장에 적절한 배양배지 내의 송아지 각막 내피(BCE)세포의 개체군을 상기 생체고분자의 오목면 위에 접종하고, 2) 상기 BCE 세포를 상호접촉될 때까지 성장시키며, 3) 배지를 흡인하고, 상기 생체고분자를 상기 세포를 제거하도록 최소 5분 동안 수산화암모늄(ammonium hydroxide)으로 처리하여, BCE-ECM 코팅층으로 코팅하는 단계;
- (iv) 상기 생체고분자를 완충 식염수로 세척하는 단계; 및,
- (v) 상기 생체고분자의 오목면 위에 각막 내피세포를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는, 인공 각막의 제조방법.

### 청구항 6

- (i) 기저(base) 생체고분자;

- (ii) 상기 생체고분자를 원하는 형태로 성형하는 단계;
- (iii) 상기 생체고분자의 오목면을 탄소 플라즈마 증착(carbon plasma deposition)을 이용하여 다이아몬드-유사-탄소(Diamond-Like-Carbon)로 코팅하는 단계;
- (iv) 상기 생체고분자를 완충 식염수로 세척하는 단계; 및,
- (v) 상기 생체고분자의 오목면 위에 각막 내피세포를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는, 인공 각막의 제조방법.

**청구항 7**

- (i) 기저(base) 생체고분자;
- (ii) 상기 생체고분자를 원하는 형태로 성형하는 단계;
- (iii) 상기 생체고분자의 오목면을 완충 식염수 내의 라미닌, 피브로넥틴, RGDS 펩타이드 및 콜라겐 IV를 포함하는 부착인자(adhesion factor) 혼합물로 코팅하는 단계;
- (iv) 상기 생체고분자를 각막 버튼(button)에 도포하는 단계; 및,
- (v) 상기 생체고분자의 오목면 위에 각막 내피세포를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는, 각막에 사용하기 위한 내피세포를 성장시키는 방법.

**청구항 8**

- (i) 완충 식염수 내의 라미닌, 피브로넥틴, RGDS 펩타이드, 및 콜라겐 IV를 포함하는 부착인자(adhesion factor) 혼합물 및 완충 식염수 내의 bFGF, EGF 및 폴리카보필을 포함하는 성장인자(growth factor) 혼합물과 접촉하는 기저(base) 생체고분자를 제조하는 단계;
- (ii) 상기 생체고분자를 각막의 형태로 성형하는 단계;
- (iii) 상기 생체고분자의 오목면을 각막 버튼에 도포하는 단계; 및,
- (iv) 상기 생체고분자의 오목면 위에 각막 내피세포를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는, 각막에 사용하기 위한 내피세포를 성장시키는 방법.

**청구항 9**

실험실 조건에서 각막 내피세포가 생체고분자 위에서 성장하도록 라미닌, 피브로넥틴, RGDS 펩타이드, 폴리카보필과 결합된 1 ng/ml 내지 500ng/ml 범위의 bFGF 및 폴리카보필과 결합된 10 ng/ml 내지 1,000ng/ml 범위의 EGF를 포함하는 부착 혼합물.

**청구항 10**

- (i) PBS에 용해된 10 내지 500 $\mu$ g/ml의 피브로넥틴;
  - (ii) PBS에 용해된 10 내지 500 $\mu$ g/ml의 라미닌;
  - (iii) PBS에 용해된 1 내지 100 $\mu$ g/ml의 RGDS 펩타이드;
  - (iv) 0.1M 아세트산에 용해된 10 내지 1000 $\mu$ g/ml의 콜라겐 타입 IV;
  - (v) PBS에 용해된 1 내지 500ng/ml의 b-FGF; 및,
  - (vi) PBS에 용해된 1 내지 500ng/ml의 EGF를 포함하며,
- 실험실 조건에서 각막 내피세포가 생체고분자 위에서 성장하도록 하는 부착 혼합물.

**청구항 11**

각막 내피세포가 생체고분자 위에서 성장하도록 하는 라미닌, 피브로넥틴, RGDS 펩타이드, 폴리카보필과 결합된 bFGF, 폴리카보필과 결합된 EGF 및 헤파린 설페이트(heparin sulfate) 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착제를, 평균적 각막의 두께를 가지는 기저(base) 생체고분자의 합성중에 그의 오목면 내부로 투입하고, 상기 생

체고분자를 각막의 형태로 성형하는 단계를 포함하여 제조된, 정상두께를 가지는 각막 이식용 인공 지지체.

**청구항 12**

제 11항에 있어서,

상기 생체고분자는 콜라겐 IV를 포함하는 것을 특징으로 하는

지지체.

**청구항 13**

라미닌, 피브로넥틴, RGDS 펩타이드, 폴리카보필과 결합된 bFGF, 폴리카보필과 결합된 EGF 및 헤파린 설페이트 (heparin sulfate) 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착제를, 평균적 각막의 두께를 가지는 기저(base) 생체고분자의 합성중에 그의 오목면 내부로 투입하고, 상기 생체고분자를 각막의 형태로 성형한 다음, 상기 생체고분자의 오목면 위에 인간 각막 내피세포(HCEC)를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된, 정상두께를 가지는 인공의 이식용 각막.

**청구항 14**

각막 내피세포가 생체고분자 위에서 성장하도록 하는 라미닌, 피브로넥틴, RGDS 펩타이드, 폴리카보필과 결합된 bFGF, 폴리카보필과 결합된 EGF 및 헤파린 설페이트(heparin sulfate) 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착제를, 평균적 각막의 두께를 가지는 기저(base) 생체고분자의 합성중에 그의 오목면 내부로 투입하고, 상기 생체고분자를 각막의 형태로 성형하는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된, 절반의 두께를 가지는 각막 이식용 인공 지지체.

**청구항 15**

라미닌, 피브로넥틴, RGDS 펩타이드, 폴리카보필과 결합된 bFGF, 폴리카보필과 결합된 EGF 및 헤파린 설페이트 (heparin sulfate) 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착제를, 평균적 각막의 두께를 가지는 기저(base) 생체고분자의 합성중에 그의 오목면 내부로 투입하고, 상기 생체고분자를 각막의 형태로 성형한 다음, 상기 생체고분자의 오목면 위에 인간 각막 내피세포(HCEC)를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된, 절반의 두께를 가지는 인공 각막 이식물.

**청구항 16**

제 15항에 있어서,

상기 생체고분자는 콜라겐 IV인 것을 특징으로 하는

절반의 두께를 가지는 인공 각막 이식물.

**청구항 17**

제 15항에 있어서,

상기 생체고분자는 배양배지의 존재하에 팽윤되지 않는 것을

특징으로 하는

절반의 두께를 가지는 인공 각막 이식물.

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

## 명세서

### 기술분야

- [0001] 본 특허출원은 2003년 10월 10일자 출원된 미국특허출원 제 60/510,359호, 2003년 10월 10일자 출원된 미국특허출원 제 60/510,350호 및 2003년 10월 10일자 출원된 미국특허출원 제 60/510,349호를 우선권으로 하고, 이들 문헌은 전체적으로 본 명세서의 참고문헌으로 포함하였다.
- [0002] 본 발명은 세포외 기질(extracellular matrix)에서의 인간 각막 내피세포의 배양물 및 망막색소상피세포(retinal pigment epithelial cell)의 절제, 접종 및 이후 증식의 개량된 방법 및 인공의 이식용 각막을 제조하는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

- [0003] 다양한 이유로, 눈의 각막 부위는 외과적으로 치료 또는 교체되어야 할 필요가 있다. 예를 들면, 각막이 활궤어 상처가 나거나, 흉터가 생기거나 또는 다른 물리적인 방법으로 손상을 입으면, 시력이 크게 감퇴된다. 또한, 각막은 다양한 퇴행성 질환에 영향을 받으며, 그러한 환자가 각막을 교체하면 정상 또는 정상 근처의 시력을 갖는다.
- [0004] 인간 눈의 각막은 대체로 평행한 상대적으로 탄탄한 조직의 층으로 구성된 특화된 구조이다. 각막의 가장 바깥쪽 또는 대부분의 표면층은 상피층이다. 이는 상해시에 재생되는 조직의 보호층이다. 눈 내부로 들어가면 보우만막(Bowman's membrane)이라 알려진 상피층의 기저(base) 표면이 나온다. 산존하는(scattered) 케라토사이트(keratocyte)가 있는 세포외 콜라겐 구조 기질인 각막의 각막기질(stroma)은 보우만막에 바로 가까이에 인접해 있다. 각막기질층은 데스메막(Descemet's membrane)이라 불리워지는 표피의 세포막에 의해서, 각막기질의 맨 아래에서 경계지어지고, 각막의 후부(posterior) 표면을 형성하는 특화된 내피세포의 단일세포 두께를 가지는 단일층(monolayer)이 이어진다. 내피층은 재생되지 않아서, 그것이 병들거나 활궤어 상처입거나 또는 다른 방법으로 상해를 입으면, 반드시 교체되어야만 한다.
- [0005] 인간을 포함한 몇 개의 동물종에서, 각막 내피는 생체조건에서 정상적으로 복제되지 않아서, 상해 또는 노화로 인해 손실된 세포를 교체해야 한다(참조: Murphy C, et al., Invest. Ophthalmology Vis. Sci. 1984; 25:312-322; Laing R A, et al., Exp. Eye Res. 1976; 22:587-594). 그러나, 인간의 각막세포는 정상적인 조직배양

조건하에서 성장인자가 풍부하고 우태아혈청을 포함하는 배양액으로 실험실 조건(in vitro)에서 배양될 수 있다 (참조: Baum JL, et al., Arch. Ophthalmol. 97:1136-1140, 1979; Engelmann K, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 29:1656-1662, 1998; Engelmann K, and Friedl P; In vitro Cell Develop. Biol. 25:1065-1072, 1989). 만일 배양된 세포가 각막 내피세포의 손실을 대체하는데 이용될 수 있다면, 인간 각막의 공여 풀(donor pool)을 크게 증대시킬 것이다. 이는 이식과정에서 부적당한 내피세포 수로 인해 현재 거부되는 공여 각막을 증가시킬 수 있어 중요하다(참조: Gospodarowicz D, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:464-468, 1979; Gospodarowicz D, et al., Arch. Ophthalmol. 97:2163-2169, 1979). 낮은 내피세포 밀도로 인해 거부된 각막의 풀은 매년 기부된 전체 각막의 30%를 차지한다(참조: National Eye Institute: Summary report on the cornea task force. Invest Ophthalmol Vis Sci 12:391-397, 1973). 아울러, 낮은 초기밀도에서 인간의 각막 내피세포를 배양하는 방법 및 절개된 각막 버튼(denuded corneal button) 위에 실험실 조건에서 성장시킨 세포를 재접종하는 능력은, 알로-세포(allo-cell) 및 오토-각막기질(auto-stroma) 형태의 이식에 있어서, 수령인의 손상되지 않은 각막기질을 사용할 수 있게 할 것이다(참조: Inslar MS, and Lopez JG, Cornea 10:136-148, 1991).

[0006] 조직배양 기술은 조직 및 기관의 등가물(equivalent)의 개발에 성공적으로 이용되고 있다. 이러한 기술의 기초는 살아 있는 세포, 영양분 및 배양조건의 적절한 조합을 이용함으로써, 기능적인 조직 및 기관으로 개조될 수 있는 능력을 가진 콜라겐 기질구조와 관련된다. 조직 등가물(tissue equivalent)은 본 명세서에 참고문헌으로 인용된 미국특허 제 4,485,096; 4,485,097; 4,539,716; 4,546,500; 4,604,346; 4,837,379; 및 5,827,641을 포함한 많은 특허에서 충분히 기술되었다. 조직 등가물의 한가지 성공적인 적용은 실제 인간의 피부와 유사한 형태를 가지는 살아 있는 피부 등가물이다. 살아 있는 피부 등가물은 콜라겐 기질 내 인간 피부 섬유아세포의 두꺼운 아랫층을 덮는 분화되고 층화된 인간 상피 케라토사이트로 이루어진 윗부분을 포함하는, 2개의 층으로 구성된다(참조: Bell, et al., "Recipes for Reconstituting Skin", J. of Biochemical Engineering, 113:113-119, 1991).

[0007] 각막 상피세포 및 내피세포의 배양에 대한 연구들이 이루어져왔다(참조: Xie, et al., In Vitro Cell. Develop. Biol., 25:20-22, 1989 및 Simmons, et al., Tox. App. Pharmacol., 88:13-23, 1987).

[0008] 공여 인간 각막의 전세계적인 만성적 부족으로 인하여, 각막의 내피 및 상피 질병을 앓는 환자뿐만 아니라, 사고로 인해 각막이 외상 파열되어 전체 각막의 교체가 요구되는 환자의 이식을 위한 인공의 각막기질의 제조에 대한 관심이 증가하고 있다.

[0009] 현재, 각막기질 대체물을 제조하려는 대부분의 시도들은 천연물 또한 고분자 내 단백질 일부분을 교차결합시킨 합성물 조합체로부터 유래된 고분자젤의 이용에 의존한다. 대부분의 고분자젤은 액상(aqueous phase)에서 전체 부피의 80%까지 포함할 수 있으므로, 인공의 각막기질이 체액과 접촉하여 위치하면, 고분자젤은 팽윤될 것이다. 이 경우, 이식된 인공의 각막기질은 외부 챔버(exterior chamber)의 액상환경에 끊임없이 놓여질 것이다. 고분자젤의 이후 팽윤은 고분자젤의 혼탁뿐만 아니라, 인공의 각막기질의 증가된 두께로 인한 시각의 왜곡도 초래할 것이다. 그러므로, 배양된 인간 내피세포 층을 인공의 각막기질의 내부에 위치시켜, 체액 침투에 대한 장벽(barrier)으로서 작용하고, 또한 기저(base)에서 체액을 정점 방향으로 끊임없이 배출함으로써 정확한 두께로 각막기질을 유지해서, 인공의 각막기질을 얇게 하고, 높은 투명도를 유지시켜 주는 것이 바람직하다.

[0010] 각막 이식을 위한 인공의 각막기질을 제조할 때, 세포 부착과 증식을 유도하고 지속시켜 주는 작용제(agent)를 생체고분자의 합성중에 생체고분자의 내부로 포함시키는 것은 유익하다. 세 가지 다른 세포형, 즉, 불룩한 경사면 위의 각막 상피세포, 내부에 있는 케라토사이트(keratocyte) 및 오목한 면 위의 각막 내피세포를 지지할 수 있는 인공 각막은 단순한 장치보다 더욱 더 충실하게 각막 등가물로서 작용할 수 있다. 각막 내피층은 끊임없이 밖으로 체액을 배출하는 체액 장벽(barrier)으로 작용한다. 상처에서 생겨나고, 적소(in place)에 이식된 인공 각막인 각막 대체물을 고정시키는 케라토사이트는 이식과정 이후에 투명하고 안정성있게 남아있게 해주는 정상 천연 각막에 의해 유지되는 상대적인 탈수 상태를 조성할 수 있다.

[0011] 각막 외상에 더하여, 가령성 황반변성(age-related macular degeneration)이 노화 질병처럼 자연적으로 인간에서 발생한다(참조: Gartner S, and Henkind P., Br. J. Ophthalmol. 1981 Jan;65(1):23-8; J Marshall et al., Br. J. Ophthalmol. 1979, Vol 63, 181-187). 망막색소상피(RPE)는 간균 외부 절편의 식균작용 및 유독인

자의 누적된 노출과 같은 끊임없는 세포활동에 의해 초래된 높은 스트레스의 결과처럼, 생물학적 및 생리학적 기능의 손실에 의한 퇴행성 질병과 깊은 관련이 있다고 제안된다(참조: Dorey CK., et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1989 Aug; 30(8):1691-9; Hogan MJ, Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol. 1972;7:64-80). RPE 세포이식은 인간의 황반변성 및 말초망막 질병에 대한 가능한 치료법으로 제안되었다(참조: Li, L. and Turner, JE., Exper. Eye Res. 47:911(1989); Lane, C., et al., Eye. 1989;3 (Pt1):27-32). 이러한 제안의 결과는 세포이식과정 동안 인간 RPE 세포를 망막아래 공간(sub-retinal space)으로 전달하는 것에 관한 외과적 시각의 필요성을 창출하게 되었다.

[0012] RPE 세포이식 방법과 같이, 망막아래 공간으로의 RPE 세포 현탁액의 직접적 주입은 주입된 세포가 응집하여, 적절히 기능하기에 필요한 조건인 단일층(monolayer)으로 자리잡는 대신 덩어리(clump)를 형성하기 때문에 기대했던 임상적 결과에 어긋났다(참조: Gouras PG., et al., Curr. Eye Res. 1985; 4:253-265; Lopez R., et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1987;28:1131-1137). 생분해성 고분자막판 위에 존재하는 단일층(monolayer)으로 배양된 RPE 세포를 이식하는 것은 상기 문제를 해결할 것이다.

[0013] 본 발명의 출현에 이르기까지, 인간의 각막 내피세포(HCEC)를 배양하는 선행기술은 HCEC 세포를 고세포밀도(2000 내지 5000세포/mm<sup>2</sup>)로만 접종할 수 있어 적은 시료로 일차배양을 수행할 가능성을 제한하고, 저세포밀도(50 내지 100세포/mm<sup>2</sup>)로 HCEC 세포를 연속적으로 계대접종할 수 없어 보관 및 추후 사용을 위한 HCEC 스톡(stock)의 확장을 제한한다는 문제점들에 직면하였다.

[0014] 발명의 요약

[0015] 본 발명은 배양된 각막 내피세포의 생체고분자 위에서의 부착 및 성장을 증진시키기 위해 생체고분자 표면을 제공하는 방법을 제공한다. 특히, 배양된 세포는 생체고분자 표면에 부착되어 남아 있고, 견고연접(tight junction)과 같은 생리학적 기능을 수행하여, 체액이 생체고분자 내부로 들어와 팽윤을 초래하는 것을 막을 뿐만 아니라, 활성화한 나트륨/칼륨 펌프(Na/K pump)로 작용하여 초과된 체액을 생체고분자로부터 기저(base)에서 정점 방향으로 제거하므로 각막기질 대체물(생체고분자)의 투명도를 유지한다.

[0016] 본 발명의 접근은 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin), RGDS, 폴리카보필(polycarbophil)과 결합된 bFGF 및 폴리카보필과 결합된 EGF와 같은 단백질을 부착시키는 것과 관련이 있다. 폴리카보필은 약하게 교차결합된 고분자이다. 교차결합제는 디비닐 글리콜(divinyl glycol)이다. 폴리카보필은 또한 음전하 원(negative charge source)인 다수의 카르복시산 라디칼을 포함하는 약폴리산(weak poly-acid)이다. 이 산라디칼(acid radical)은 세포 표면과 수소결합을 가능하게 한다. 폴리카보필은 뮤신(mucin)과 수중에서 자기 중량의 40 내지 60배 흡착할 수 있는 능력을 공유하고, 일반적으로 처방전이 필요없는 완하제(laxative)로 사용된다(참조: Equalactin, Konsyl Fiber, Mitrolan, Polycarb; Park H et al., J. Control Release 1985;2:47-57). 폴리카보필은 매우 거대한 분자이므로, 흡수되지 않는다. 그것은 또한 실험실에서도 비면역성이어서, 고분자의 항체를 형성할 수 없다.

[0017] 본 발명의 일 실시태양에 따르면, 라미닌, 피브로넥틴, RGDS, 폴리카보필과 결합된 bFGF, 폴리카보필과 결합된 EGF 및 헤파린 설페이트(heparin sulfate) 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착제를, 생체고분자의 합성중에 그의 내부로 함입 또는 투입하는 자립(self-sustaining) 고분자를 제공한다. 생체고분자는 원하는 형태로, 바람직하게는 각막의 형태로 성형될 수 있고, 배양된 인간 각막 내피세포는 오목한 표면에 접종되고 상호접촉될 때까지 증식된다.

[0018] 또한, 본 발명은 인간 정상 각막의 절반 두께로 성형될 수 있고, 심부표층각막이식(Deep Lamellar Endothelial



Keratoplasty: DLEK)의 과정에서 절반 두께의 이식을 위한 배양된 인간 각막 내피세포로 덮힐 수 있는 자립 고분자를 제공한다(참조: Terry, M.A., Eye. 2003 Nov;17(8):982-8; Lowenstein A, and Lazar M., Br. J. Ophthalmol. 1993;77:538).

[0019] 다른 실시태양에 따르면, 자립 고분자는 각막의 정상 또는 절반 두께로 성형될 수 있으며, 직경 11mm 버튼(button)이 관상톱(trephine)에 의해 천공된 후, 배양된 인간 각막 내피세포는 인공의 각막기질의 오목한 표면에 접종될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 목적은 생체고분자의 표면을 다이아몬드-유사-탄소 및 부착 혼합물로 코팅하여, 실험실 조건에서 각막 내피세포가 성장하기에 적절한 생체고분자 표면을 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 다른 실시태양은 가령성 황반변성(ARMD)의 치료를 위해 눈의 망막 아래 공간 내부로 망막색소상피세포를 이식하기 위한 담체로서, 10 내지 100 $\mu$ m 두께의 얇은 생체고분자판(biopolymer sheet)을 사용하는 것과 관련이 있다. 선택적으로, 생분해성 고분자의 얇은 판은 이식과정을 위한 배양된 RPE 세포의 담체로 사용될 수 있다. 생분해성 시스템을 사용하는 장점은 고분자가 분해되면 곧 바로 RPE 세포가 브루크막(Bruch's membrane) 및 맥관구조(vasculature) 시스템에 접촉할 수 있고, 그의 운반과 식균작용(phagocytosis)이 곧 바로 수행된다는 것이다.

[0022] 이하의 실시예를 참조하면, 본 발명의 목적뿐만 아니라 그의 수반된 많은 장점들은 명확해질 것이다.

본 명세서에서 사용된 바와 같이, "RGDS"라는 용어는 테트라펩티드인 Arg-Gly-Asp-Ser의 일문자(single letter) 아미노산 약어를 나타낸다. 본 출원의 출원일 당시, RGDS" 테트라펩티드 및 용어는 세포배양 및 세포 접착물질 연구분야에서 인테그린(integrin)과 같은 세포 표면 단백질에 대한 인식서열(recognition molecule)로서 잘 알려져 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "b-FGF" 및 "bFGF"라는 용어는 염기성 섬유아세포 증식인자(basic Fibroblast Growth Factor)를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "EGF"라는 용어는 상피성장인자(Epithelial Growth Factor)를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "HCEC"라는 용어는 사람 각막 내피세포(human corneal endothelial cell)를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "in vitro"(Latin: *within glass*)라는 용어는 전체 생체를 가지고 행해지는 것보다 더 세밀하거나 더 편리한 분석이 가능하도록 통상적인 생물학적 의미(biological context)로 분리된 생체의 구성요소를 이용하여 행하는 실험 생물학에서의 연구를 의미한다. 이와는 대조적으로, "실험실 조건(in vivo)"이라는 용어는 정상적이고 온전한 상태의 살아있는 개체 내에서 행해지는 작업을 의미한다. 이들 용어는 본 출원 당시 당업계에 잘 알려져 있다.

각막 내피세포가 생체고분자의 내피/오목면(endothelial/concave side)에 부착하여 성장할 수 있도록 20분 내지 14일 동안 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin), RGDS, 폴리카보필(polycarbophil)과 결합된 bFGF 및 폴리카보필과 결합된 EGF를 함유하는 부착 혼합물로 기저(base) 생체고분자를 코팅하는 단계를 포함하는, 내피세포의 부착 및 성장을 증진시키기 위한 생체고분자의 개질방법.

(i) 기저(base) 생체고분자;

(ii) 상기 생체고분자를 원하는 형태로 성형하는 단계;

(iii) 상기 생체고분자의 내피/오목면을 라미닌, 피브로넥틴, RGDS, 폴리카보필과 결합된 bFGF 및 폴리카보필과 결합된 EGF를 포함하는 부착 혼합물로 코팅하는 단계;

(iv) 상기 생체고분자를 대략 4°C에서 각막 내피세포의 부착을 향상시키도록 20분 내지 14일 동안 상기 부착 혼합물과 함께 방치하는 단계;

(v) 상기 부착 혼합물을 제거하는 단계; 및,

(vi) 각막 내피세포를 상기 생체고분자의 내피/오목면 위에 접종하는 단계를 포함하는, 인공 각막의 제조방법.

(i) 기저(base) 생체고분자;

(ii) 상기 생체고분자를 원하는 형태로 성형하는 단계;

(iii) 상기 생체고분자의 내피/오목면을 1) 성장에 적절한 배양배지 내의 송아지 각막 내피(BCE)세포의 개체군을 상기 생체고분자의 내피/오목면 위에 저밀도로 접종하고, 2) 상기 BCE 세포를 상호접촉될 때까지 성장시키며, 3) 배지를 흡인하고, 상기 생체고분자를 상기 세포를 제거하도록 최소 5분 동안 수산화암모늄(ammonium hydroxide)으로 처리하여, BCE-ECM 코팅층으로 코팅하는 단계;

(iv) 상기 생체고분자를 완충 식염수로 세척하는 단계; 및,

(v) 상기 생체고분자의 내피/오목면 위에 각막 내피세포를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는, 인공 각막의 제조방법.

(i) 기저(base) 생체고분자;

(ii) 상기 생체고분자를 원하는 형태로 성형하는 단계;

(iii) 상기 생체고분자의 내피/오목면을 탄소 플라즈마 증착(carbon plasma deposition)을 이용하여 다이아몬드-유사-탄소(Diamond-Like-Carbon)로 코팅하는 단계;

(iv) 상기 생체고분자를 완충 식염수로 세척하는 단계; 및,

(v) 상기 생체고분자의 내피/오목면 위에 각막 내피세포를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는, 인공 각막의 제조방법.

(i) 기저(base) 생체고분자;

(ii) 상기 생체고분자를 원하는 형태로 성형하는 단계;

(iii) 상기 생체고분자의 내피/오목면을 완충 식염수 내의 라미닌, 피브로넥틴, RGDS 및 콜라겐 IV를 포함하는 부착인자(adhesion factor) 혼합물로 코팅하는 단계;

(iv) 상기 생체고분자를 각막 버튼(button)에 도포하는 단계; 및,

(v) 상기 생체고분자의 내피/오목면 위에 각막 내피세포를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는, 각막에 사용하기 적절한 내피세포를 성장시키는 방법.

(i) 완충 식염수 내의 라미닌, 피브로넥틴, RGDS, 및 콜라겐 IV를 포함하는 부착인자(adhesion factor) 혼합물 및 완충 식염수 내의 bFGF, EGF 및 폴리카보필을 포함하는 성장인자(growth factor) 혼합물과 접촉하는 기저(base) 생체고분자를 제조하는 단계;

(ii) 상기 생체고분자를 각막의 형태로 성형하는 단계;

(iii) 상기 생체고분자의 내피/오목면을 각막 버튼에 도포하는 단계; 및,

(iv) 상기 생체고분자의 내피/오목면 위에 각막 내피세포를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는, 각막에 사용하기 적절한 내피세포를 성장시키는 방법.

실험실 조건에서 각막 내피세포가 생체고분자 위에서 성장하도록 라미닌, 피브로넥틴, RGDS, 폴리카보필과 결합된 1 ng/ml 내지 500ng/ml 범위의 bFGF 및 폴리카보필과 결합된 10 ng/ml 내지 1,000ng/ml 범위의 EGF를 포함하는 부착 혼합물.

(i) PBS에 용해된 10 내지 500 $\mu$ g/ml의 피브로넥틴;

(ii) PBS에 용해된 10 내지 500 $\mu$ g/ml의 라미닌;

(iii) PBS에 용해된 1 내지 100 $\mu$ g/ml의 RGDS;

(iv) 0.1M 아세트산에 용해된 10 내지 1000 $\mu$ g/ml의 콜라겐 타입 IV;

(v) PBS에 용해된 1 내지 500ng/ml의 b-FGF; 및,

(vi) PBS에 용해된 1 내지 500ng/ml의 EGF를 포함하며,

실험실 조건에서 각막 내피세포가 생체고분자 위에서 성장하도록 하는 부착 혼합물.

라미닌, 피브로넥틴, RGDS, 폴리카보필과 결합된 bFGF, 폴리카보필과 결합된 EGF 및 헤파린 설페이트(heparin

sulfate) 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착제를, 대략 평균적 각막의 두께를 가지는 기저(base) 생체고분자의 합성중에 그의 내피/오목면 내부로 투입하고, 상기 생체고분자를 각막의 형태로 성형하는 단계를 포함하여 제조된, 정상두께를 가지는 각막 이식용 인공 지지체.

라미닌, 피브로넥틴, RGDS, 폴리카보필과 결합된 bFGF, 폴리카보필과 결합된 EGF 및 헤파린 설페이트(heparin sulfate) 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착제를, 대략 평균적 각막의 두께를 가지는 기저(base) 생체고분자의 합성중에 그의 내피/오목면 내부로 투입하고, 상기 생체고분자를 각막의 형태로 성형한 다음, 상기 생체고분자의 내피/오목면 위에 HCEC를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된, 정상두께를 가지는 인공의 이식용 각막.

라미닌, 피브로넥틴, RGDS, 폴리카보필과 결합된 bFGF, 폴리카보필과 결합된 EGF 및 헤파린 설페이트(heparin sulfate) 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착제를, 대략 평균적 각막의 두께를 가지는 기저(base) 생체고분자의 합성중에 그의 내피/오목면 내부로 투입하고, 상기 생체고분자를 각막의 형태로 성형하는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된, 절반의 두께를 가지는 각막 이식용 인공 지지체.

라미닌, 피브로넥틴, RGDS, 폴리카보필과 결합된 bFGF, 폴리카보필과 결합된 EGF 및 헤파린 설페이트(heparin sulfate) 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착제를, 대략 평균적 각막의 두께를 가지는 기저(base) 생체고분자의 합성중에 그의 내피/오목면 내부로 투입하고, 상기 생체고분자를 각막의 형태로 성형한 다음, 상기 생체고분자의 내피/오목면 위에 HCEC를 접종하고, 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된, 절반의 두께를 가지는 인공 이식용 각막.

(i) HCEC를 내피/오목면 위에 접종하고 상기 HCEC가 상호접촉할 때까지 성장하게 한, 정상두께를 가지는 인공 각막을 수득하는 단계;

(ii) (i) 단계의 정상두께를 가지는 각막을 손상된 각막에 이식하는 단계; 및,

(iii) 상기 각막을 외과적 또는 다른 수단으로 보호하는 단계를 포함하는 공정에 의해 생산되는, 손상된 각막 치료제.

(i) 정상두께를 가지는 인공 각막을 수득하는 단계;

(ii) 상기 각막 표면을 상호접촉하는 HCEC를 가지며 내피/오목면을 가지는 생체고분자로 씌우는 단계;

(iii) (i) 단계의 정상두께를 가지는 인공 각막을 손상된 각막에 이식하는 단계; 및,

(iv) 상기 각막을 외과적 또는 다른 수단으로 보호하는 단계를 포함하는 공정에 의해 생산되는, 손상된 각막 치료제.

(i) HCEC를 내피/오목면 위에 접종하고 상기 HCEC가 상호접촉할 때까지 성장하게 한, 정상두께를 가지는 인공 각막을 수득하는 단계;

(ii) (i) 단계의 인공의 절반의 두께를 가지는 각막을 손상된 각막에 이식하는 단계; 및,

(iii) 상기 각막을 외과적 또는 다른 수단으로 보호하는 단계를 포함하는 공정에 의해 생산되는, 손상된 각막 치료제.

(i) 절반의 두께를 가지는 인공 각막을 수득하는 단계;

(ii) 상기 각막 표면을 상호접촉하는 HCEC를 가지는 생체고분자로 상기 생체고분자의 내피/오목면 위에 씌우는 단계;

(iii) (i) 단계의 절반의 두께를 가지는 인공 각막을 손상된 각막에 이식하는 단계; 및,

(iv) 상기 각막을 외과적 또는 다른 수단으로 보호하는 단계를 포함하는 공정에 의해 생산되는, 손상된 각막 치료제.

(i) 상면 및 하면을 구비하고, 두께가 약 10 내지 100 $\mu$ m인 생체고분자를 수득하는 단계;

(ii) 실험실 조건(in vitro)에서 망막색소상피(retinal pigment epithelial: RPE) 세포의 성장에 적절한 배지 내에 상기 생체고분자를 위치시키는 단계;

(iii) 상기 RPE 세포를 2,000 내지  $2 \times 10^6$  세포/ml의 밀도로 상기 생체고분자판의 상면 위에 접종하고, 상기

RPE 세포를 상호접촉될 때까지 성장시키는 단계; 및,

(iv) 상기 생체고분자판을 제거하고, 원하는 크기로 절단하는 단계를 포함하는 공정에 의해 생산되는, 망막색소 상피세포를 이용한 망막 치료제의 제조방법.

(i) 치료할 망막의 손상부위를 확인하는 단계;

(ii) 손상된 망막 부위로부터 남아 있는 RPE 세포를 흡인하는 단계;

(iii) 망막으로의 이식에 적절한 망막색소 상피세포를 수득하는 단계;

(iv) 상면에 RPE세포가 있는 생체고분자를 캐놀러(cannula) 또는 다른 적절한 흡인 수단의 내부로 흡인하는 단계;

(v) 적절한 크기의 공기방울을 치료할 망막의 손상 부위에 주입하는 단계;

(vi) 상면에 RPE세포가 있는 생체고분자를 상면에 RPE세포가 있는 손상 부위 위에 위치시키는 단계; 및,

(vii) 망막 공간(retinal space)에서 공기방울을 흡인하는 단계를 포함하는 공정에 의해 생산되는, 망막색소 상피세포를 이용한 생체조건에서의 망막 치료제의 제조방법.

### 발명의 상세한 설명

- [0023] 본 발명의 바람직한 실시태양을 기술함에 있어서, 명료한 기제를 위하여 특정 용어가 재분류될 것이다. 그러나, 본 발명은 선택된 특별한 단어에 제한되지 않고, 각각의 특정된 용어는 유사한 목적을 달성하기 위한 유사한 방법에서 다루어지는 모든 기술적 등가물을 포함하는 것으로 이해된다.
- [0024] 예전의 연구 결과는 인간 각막 내피세포(HCEC)가 고분자 위에서 성장할 수 있음을 증명하였다(참조: T. Mimura et al., 2004 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. Vol. 45. No. 9 2992-2997; F. Li et al., 2003 Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 100. 15346-15351). 그러나, 이러한 세포는 최대 12 내지 14주 동안 고분자 비드(bead)에 부착되어 남아있을 수 있다(참조: M.S. Insler and J. G. Lopez, 1989 Curr. Eye Res. Vol. 9:23-30).
- [0025] 본 발명은 인공의 각막기질의 내피 표면을 개질하는 방법을 기술한다. 이는 배양된 HCEC의 장기적 부착 및 증대한 생물학적 기능을 수행하는 능력에 의해서 인공 각막의 완전성과 투명성을 유지시킨다. 이를 위하여, 본 발명은 앞서 정의된 부착 단백질과 성장인자의 혼합물(부착 혼합물) 즉, PBS에 용해된 0.1 내지 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 피브로넥틴, PBS에 용해된 0.1 내지 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 라미닌, PBS에 용해된 0.1 내지 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 RGDS, 0.01M 아세트산에 용해된 1 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 콜라겐 타입 IV, 0.01M 아세트산에 용해된 1 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 콜라겐 타입 I, PBS에 용해된 1 내지 500ng/ml의 폴리카보필(0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )과 결합된 b-FGF 및 PBS에 용해된 1 내지 500ng/ml의 폴리카보필과 결합된 EGF를 개시한다.
- [0026] 앞서 정의된 부착 혼합물은 각막의 형태로 성형된 고분자젤의 오목한 표면에 가해진다. 그런 다음, 고분자젤을 20분 내지 24시간 동안 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 방치한다. 후에 남아 있는 부착 혼합물을 제거하고, 각막은 배양된 각막 내피 세포를 접종할 준비가 된다. 다른 실시태양에 따르면, 송아지 내피세포에서 얻은 천연의 세포외 기질은 고분자 위에 직접적으로 증착될 수도 있다.
- [0027] 송아지 기원의 각막 내피세포는 각막 형태의 고분자의 내피 표면 위에 접종된다. 이는 웰공간(well space)에서 접종된 세포가 있는 35mm 배양디쉬에 오목한 면을 위로 향하게 하여, 2시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10% 이산화탄소 배양기에서 배양한다. 10% 소혈청, 5% 우태아혈청 및 2% w/v 텍스트란(MV 40,000)을 포함하는 배양액을 대략 2ml 가하여, 인공 각막을 전체적으로 침지한다. 송아지 내피세포를 7일 동안 상호접촉될 때까지 성장시킨다. 그런 다음, 내피세포층을 증류수 내의 20mM 수산화암모늄으로 5분동안 처리하고, PBS로 10번 세척하면, 인공의 각막 기질은 배양된 인간 각막 내피세포로 코팅될 준비가 된다. 다른 실시태양에 따르면, 인공의 각막기질은 진공 환경에서 각막 형태의 고분자 위에 얇은 탄소층을 증착하기 위해 플라즈마 건(plasma gun)을 이용하여 다이아몬드-유사-탄소(DLC)로 코팅될 수 있다.
- [0028] 다른 실시태양에 따르면, 내피층을 형성하기 위해 사용할 각막 내피세포를 다양한 포유동물원으로부터 얻을 수 있다. 양, 토끼 및 소로부터 얻어진 형질전환되지 않은 각막 내피세포가 사용되었다. 쥐 각막 내피세포는 SV40의 큰 T 항원으로 형질전환되었다(참조: Muragaki, Y., et al., Eur. J. Biochem. 207(3):895-902, 1992). 사용될 수 있는 비인간 세포형은 형질전환된 쥐 각막 내피세포주 또는 양 및 토끼로부터 얻어진 정상 각막 내피

세포를 포함한다. 정상 토끼 각막 내피세포는 효소적으로 분리된 각막 상피 또는 각막의 체외이식조직(explant)으로부터 얻어질 수 있고, 헤파린 50 $\mu$ g/ml 및 헤파린 결합 성장인자-1 0.4 $\mu$ g/ml이 가해진 변형된 MSBM 배양액(MSBME; 참조: Johnson, W.E. et al., In Vitro Cell. Dev. Biol. 28A:429-435, 1992)에서 연속적으로 배양된다.

[0029] 또 다른 실시태양에 따르면, 비각막 기원(origin)으로부터 얻어진 내피세포 또한 본 발명에 이용될 수 있다. 본 발명에서 이용된 비각막 기원 내피세포는 양 및 개과동물의 도관(vascular) 및 인간 배꼽 정맥(umbilical vein) 내피세포를 포함한다. 내피세포는 SV40의 큰 T 항원을 포함하는 재조합 레트로바이러스로 형질전환될 수 있다(참조: Muragaki, et al., 1992, supra). 형질전환된 세포는 각막 등가물에서 계속적으로 자라게 하고, 접촉제한(contact inhibition)이 없으므로 무세포(acellular)층의 윗면에 세포더미(mound)를 형성한다. 비형질전환된 세포는 각막기질세포-콜라겐층 아래에 놓여 있는 단일층(monolayer)을 형성한다. 선택적으로, 정상 내피세포는 상술한 바와 같이 형질도입될 수 있고, 열에 민감한 유전자를 발현시키는 재조합체를 가함으로써 형질도입될 수도 있다. 이러한 형질전환된 세포는 낮은 온도하에서 연속적인 배양으로 키워진다. 상호접촉된 내피세포층을 t수립한 후에, 형질전환 유전자를 비활성화시키기 위해 온도를 높여, 세포가 정상적인 조절기작을 되찾고 접촉제한을 나타내게 만들어, 비형질전환된 세포와 유사한 내피세포 단일층을 형성하게 한다. 열충격(heat shock) 단백질을 제외한 대부분의 펩타이드는 열에 민감하여, 배양 온도를 높임으로써 비활성화되는 펩타이드들을 광범위하게 선택할 수 있다. 또한, 이러한 방식의 형질전환은 배양 및 수득이 어려운 인간의 각막 내피세포와 같은 세포형태의 이용을 용이하게 한다.

[0030] 본 발명의 자립 고분자는 고분자젤 내의 0.1 내지 500 $\mu$ g/ml의 피브로넥틴, 고분자젤 내의 0.1 내지 500 $\mu$ g/ml의 라미닌, 고분자젤 내의 0.1 내지 100 $\mu$ g/ml의 RGDS, 고분자젤 내의 1 내지 500ng/ml의 폴리카보필과 결합된 b-FGF, 고분자젤 내의 10 내지 1000ng/ml의 폴리카보필과 결합된 EGF 및 고분자젤 내의 1 내지 500 $\mu$ g/ml의 헤파린 설페이트(heparin sulfate) 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착 및 성장 촉진제를, 생체고분자의 합성중에 그의 내부로 함유 또는 투입시키는 것에 의해서 생성된다. 그런 다음, 상기 생체고분자는 정상 두께를 가지는 각막 대체물 또는 정상 각막의 절반의 두께를 가지는 각막 대체물의 형태로 성형된다. 배양된 각막 내피세포는 약 200 내지 150,000세포/ml, 바람직하게는 20,000세포/ml의 저밀도로 인공의 각막기질의 오목한 표면 위에 집중되고, 7 내지 10일 동안 37 $^{\circ}$ C에서 10% 이산화탄소 배양기에서 배양된다.

[0031] 도립현미경 아래에서 관찰하여 결정된, 각막 내피세포가 상호접촉될 때, 각막 대체물을 PBS로 3번 세척하면, 이식할 준비가 된다.

[0032] 다른 실시태양에 따르면, 정상의 두께 또는 절반의 두께를 가지는 각막 대체물은 약  $0.5 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^7$  세포/ml, 바람직하게는  $10^6$  세포/ml의 포화밀도로 세포를 집중함으로써 배양된 인간 각막 내피세포가 상호접촉되는 층을 가지고, 11mm 관상톱으로 천공된 버튼 위에 집중된다. 세포 200 $\mu$ l을 분주하여 버튼에 가하고, 시료는 2 내지 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 10% 이산화탄소 배양기에서 배양된다. 각막 대체물을 PBS로 3번 세척하면, 각막 이식할 준비가 된다.

[0033] 망막색소상피세포를 성장시키기 위해서, 조성물과 합성이 당업계에서 잘 알려진 생분해성 고분자를 1 내지 1000 $\mu$ m, 바람직하게는 10 내지 100 $\mu$ m의 두께를 가지는 얇은 판으로 성형한다. RPE 세포가 막 위에서 상호접촉될 때까지 성장하거나 또는 고점밀도로 막 위에 코팅되어, 막 표면의 95%를 덮는다. 이 RPE 코팅된 고분자판은 눈의 뒤쪽으로 이식하기 위한 담체 시스템으로 사용된다.

[0034] 본 발명의 상기 과정을 수행하기 위해서, RPE 코팅판은 브루크막 위의 손상된 RPE 주위를 덮기에 충분한 크기로 절단된다. 그런 다음, 그 조각은 RPE 세포 위에 위치하고, 캐놀러(cannula)의 내부로 흡인된다. 상기 판은 RPE 세포가 있는 면이 안쪽이 되게 접는다. 망막 아래 공간에서 이식을 위한 시술 부위를 정돈하기 위해서, 공기방울을 손상이 확인된 host RPE 세포가 있는 부위에 주입한다. 이 부위는 존재하는 손상된 RPE 세포를 흡인

바늘로 흡인함으로써 청결해진다. 그 공간을 BSS(balanced salt solution)로 세척하고, 접혀진 RPE 코팅 고분자판을 그 자리에 증착시킨다. 공기방울을 다시 흡인하여 망막을 정상 형태로 되돌려서 그 자리에 RPE판을 고정시킨다.

[0035] 다른 실시태양에 따르면, 담체판은 조성물과 합성이 당업계에 잘 알려진 생분해성 고분자로 합성될 수 있다. 배양된 RPE 세포를 막 위에서 상호접촉될 때까지 성장시키거나 또는 고집중밀도로 증착시켜, 고분자판의 전체 표면을 덮는다. 그런 다음, 판을 원하는 크기로 절단하고, 상술한 바처럼, 눈의 망막 아래 공간에 이식한다.

[0036] 본 발명에 대하여, 생체고분자 또는 생체고분자의 생분해성 형태는 피브로넥틴, 라미닌, RGDS, 콜라겐 타입 IV, 폴리카보필이 결합된 bFGF, 폴리카보필이 결합된 EGF 및 헤파린 설페이트(heparin sulfate) 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착제를, 생체고분자의 합성중에 그의 내부로 함유 또는 투입시킬 수 있다. 그러한 고분자판 위에서 배양된 RPE 세포를 상호접촉될 때까지 성장시키거나, 고집중밀도로 증착시켜, 전체 표면을 덮는다. RPE 세포가 표면 위에 있는 판을 원하는 넓이로 절단하고, 상술한 바처럼, 망막 아래 공간에 이식한다.

### 실시예

[0040] 실시예 1: 인간의 일차 각막 내피 세포의 비효소적 절제

[0041] 중앙부분을 이식을 위해 제거한 후 기증자로부터 기증받은 각막 림(rim) 또는 기증된 각막 전체를 PBS 50ml로 세척한다. 그런 다음, 그것들을 용기(holder)에서 내피쪽이 위를 향하도록 위치시킨다. 섬유주(trabecular meshwork)와 홍채 잔여물은 미세절제 방법으로 조심스럽게 제거한다. 어떠한 깔려진 각막기질 조직도 포함되지 않도록, 날카롭고 뾰족한 줄러 집게(jeweler's forcep)를 이용하여 내피세포층과 데스메막을 매우 조심스럽게 분리한다. 이 단계는 도립현미경 아래에 절제된 데스메막을 관찰하여, 단지 한쪽 면에만 각막 내피세포가 있고, 다른쪽 면에는 아무것도 없음을 눈으로 확인할 수 있다. 전기 분리된 조직을 ECM 코팅된 35mm 조직배양용 디쉬 또는 유사한 적절한 용기에 놓고, b-FGF 250ng/ml이 포함된 15% 소혈청이 함유된 약 0.5 ml의 배양 배지를 채웠다. 상기 배양용 디쉬를 24시간 동안 37°C에서, 10% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 그 후, 배양액을 1ml 더 가한다. 각막 내피 세포의 콜로니가 상기 조직 시료에서 바깥쪽으로 이동하였는지 살펴보면, 상기 시료(sample)를 아무런 방해 없이 약 7일 동안 배양하고, 상기 시료가 배양된 지 7 내지 14일이 경과한 시점에서 상기 배양액을 세포수가 200 내지 500에 이르기까지 이틀마다 교체한다.

[0042] 실시예 2: 인간의 각막 내피세포의 고분주율로의 배양

[0043] 조직 시료 증식물에서 일차 배양된 세포수가 200 내지 500에 달할 때, 전기 세포를 STV 용액(0.05% 트립신 및 0.02% EDTA를 포함하는 생리식염수)을 이용하여 디쉬에서 이탈시킨다. 상기 세포가 모이지지만 여전히 배양용 디쉬에 부착되어 있을 때, 상기 STV 용액을 제거한다. 남아 있는 STV는 15% 우태아혈청이 함유된 성장배지에 의해 불활성화되므로, 원심분리 단계는 필요하지 않다. 각막세포를 60mm의 ECM 코팅된 디쉬상에 디쉬당 약 500세포수로 위치시킨다. 배양액을 이틀마다 교체하고, 배양액 교체시에 b-FGF를 250ng/ml의 농도로 추가한다. 상호접촉될 때(위치시킨 후 약 7 내지 10일), 상기 세포를 동일한 분주율(약 1:16 내지 1:64)로 계대접종하거나 또는 앰플(ampoule) ml당  $10^6$  세포의 밀도로 10% DMSO 및 15% FCS에서 동결시키고, 다음 사용을 위해 액체 질소에 보관한다. 세포의 기능 또는 형태학적 보존의 손실 없이 상기 계대접종을 8번까지 수행할 수 있다.

[0044] HCEC 스타크의 동결

[0045] 수득된 HCEC 5ml의 각각을 위하여, 전기 세포 현탁액에 DMSO 0.5ml를 가한다. 혼합물의 각 1.1ml을 바이알(vial)당 약 백만 세포수의 최종 농도로 만들어 1.5ml의 냉동보존 튜브에 분주한다. 그런 다음, 전기 바이알을

스티로폼 박스 안에 넣고 24시간 동안 -80℃ 냉동고에서 방치한다. 하루가 경과한 후, 장기간 저장을 위해서 전기 앰플들을 액체 질소로 옮긴다.

[0046] 실시예 3 : 각막 버튼의 절개

[0047] 인간의 공여 각막 버튼을 안구은행으로부터 수득하였다. 이들 각막 버튼은 불충분한 내피세포 수 때문에, 이식하기에 부적절하다고 여겨졌으나, 다른 시각에서 보자면 건강하고 질병이 없으며 안구은행의 지침에 따라 수집된다.

[0048] 상기 각막 버튼을 용기에 내피 면을 위로하여 위치시키고, PBS로 3번 세척한다. 그런 다음, 10 내지 200mM 농도의 수산화암모늄 용액을 위쪽에 흘리지않으면서 전기 각막 버튼의 내부에 조심스럽게 가한다. 상기 각막을 약 10 내지 25℃의 온도에서 5분 내지 2시간 동안 유지시킨다. 이어, 수산화암모늄을 제거하고, 각막 버튼의 내부를 PBS로 약 10번 정도 세척한다. 면봉으로 내피 표면을 가로질러 닦아주어, 남아 있는 모든 세포 골격이나 파편을 제거한다. 상기 각막 버튼을 PBS로 다시 3번 세척하고, 11mm의 관상톱(trephine)으로 천공한 다음, 배양된 인간의 각막 내피세포로 코팅하기 위하여 준비한다.

[0049] 또 다른 방법으로는, 천연의 각막 내피를 5분 내지 2시간 동안 10℃를 유지한 증류수에 0.5 내지 5% 농도로 희석된 Triton-X100을 가하여 제거하고, 그 이후에는 상술한 방법으로 처리할 수 있다. 아울러, 상기 각막 내피를 4 내지 25℃의 온도에서 20분 내지 2시간 동안 증류수로 처리할 수 있다. 그런 다음, 면봉으로 내피 표면을 가로질러 닦아주어, 남아 있는 모든 세포 골격이나 파편을 제거한다. 이어, 전기 각막을 11mm의 관상톱으로 천공한다.

[0050] 실시예 4 : 부착 단백질 및 성장인자를 이용한, 절개된 각막의 처리

[0051] 천공한 후, 절개된 각막 버튼을 다시 용기에 내피 면을 위로하여 위치시킨다. PBS에 10 내지 500 $\mu$ g/ml의 농도로 용해된 피브로넥틴, PBS에 10 내지 500 $\mu$ g/ml의 농도로 용해된 라미닌, PBS에 1 내지 100 $\mu$ g/ml의 농도로 용해된 RGDS, 0.1M 아세트산에 10 내지 1000 $\mu$ g/ml의 농도로 용해된 콜라겐 타입 IV, PBS에 1 내지 500ng/ml의 농도로 용해된 b-FGF, PBS에 1 내지 500ng/ml의 농도로 용해된 EGF를 포함하는 부착 단백질 용액(부착 혼합물)을 상기 절개된 각막 버튼 위에 조심스럽게 가한다. 상기 표본을 4℃에서 5분내지 2시간 동안 방치하고, 끝으로 콕테일(cocktail)을 제거하며, 각막을 PBS로 3번 세척한다.

[0052] 실시예 5: 부착제 및 성장인자의 혼합물 및 고밀도 세포접종을 이용한 고분자의 코팅

[0053] 인공의 각막기질의 특성을 충족시키는 생체고분자 또는 고분자 겔을 각막의 형태로 성형한다. 상기 인공의 각막기질을 오목한 표면이 위를 향하게 위치시키고, PBS로 습윤시킨다. 부착 혼합물(PBS에 용해된 0.1 내지 500 $\mu$ g/ml의 피브로넥틴, PBS에 용해된 0.1 내지 500 $\mu$ g/ml의 라미닌, PBS에 용해된 0.1 내지 200 $\mu$ g/ml의 RGDS, 0.01M 아세트산에 용해된 1 내지 1000 $\mu$ g/ml의 콜라겐 타입 IV, 0.01M 아세트산에 용해된 1 내지 1000 $\mu$ g/ml의 콜라겐 타입 I, PBS에 용해된 1 내지 500ng/ml의 폴리카보필(0.01 $\mu$ g/ml)과 결합된 b-FGF 및 PBS에 용해된 1 내지 500ng/ml의 폴리카보필과 결합된 EGF를 포함)의 약 0.5 내지 0.8ml 분주물을 각막 형태를 갖는 고분자의 오목한 표면의 내부로 점적한 다음, 상기 시료를 4 내지 25℃에서 10분 내지 2시간 동안 방치한다. 부착 혼합물을 제거하고, 인공의 각막기질을 PBS로 3번 세척하며, 배양된 인간의 각막 내피세포를 접종하기 위하여 준비한다.

[0054] STV 용액(0.05% 트립신 및 0.02% EDTA를 포함하는 생리식염수)으로 전기 배양된 각막 내피세포를 디쉬로부터 이탈시킨다. 전기 내피세포를 2000rpm으로 5분 동안 원심분리하고, 세포 펠렛을 0.1 내지 5% 농도의 우태아혈청이 부가된 DME-H16 배양액 1ml에 현탁시킨다. 세포수를 세포계수기(Coulter Particle Counter)로 측정하고, 약 10<sup>6</sup> 세포/ml로 조절한다. 그런 다음, 인공 각막을 11mm 관상톱으로 천공하고, 2000 내지 2 X 10<sup>6</sup> 세포 수, 바람직하게는 150,000 내지 250,000 세포수의 현탁액 200ml의 분주물을 상기 각막 형태의 각막기질 위에 접종하

여, 표면의 95%를 덮는다.

[0055] 이식에 사용하기에 앞서, 인공 각막을 20분 내지 24시간 방치한다. 보호제로서, 0.2 내지 0.5ml의 1% 히알루론산나트륨(Healon® Advanced Medical Optics, Santa Ana, CA)층을 세포층 위에 덮는다.

[0056] 실시예 6: 배양된 인간의 각막 내피세포를 희박한 농도로 접종하기 위한, 부착제 및 성장인자를 이용한 생체고분자의 코팅

[0057] 또 다른 실시예에 따르면, 상기 생체고분자를 각막의 형태로 성형한다. 실시예 5에서 상술한 바와 같이, 충분한 양의 부착 혼합물을 가하여, 인공의 각막기질의 오목한 표면을 코팅한다. 4°C에서 방치한 후에, 부착 혼합물을 제거하고 상기 고분자 각막을 PBS로 3번 세척한다. 그런 다음, 고분자 각막을 35mm 조직배양용 디쉬에서 PBS로 수화시키는 동안, 11mm 관상톱으로 천공한다. 상술한 방법에 의하여, 배양된 인간의 각막 내피세포를 배양용 디쉬로부터 이탈시켰다. 전기 내피세포를 2000rpm으로 원심분리하여 침전시키고, 15% 우태아혈청이 부가된 배양액 5ml에 재현탁시킨다. 상기 세포의 양을 세포계수기로 측정하고, 세포밀도는 배양액 1ml당 100,000 세포 수로 적정한다. 대략 20,000 세포 수를 포함하는 현탁액 100 $\mu$ l의 분주물을 인공 각막의 위에 접종하고, 37°C에서 10% 이산화탄소 배양기에서 배양한다. 2시간이 경과한 후, 배양액(15% 우태아혈청 및 250ng/ml의 bFGF가 부가된 DME-H16 배양액) 2ml을 디쉬에 가하여, 고분자 각막 및 세포를 전체적으로 침지한다. 처음에는 인간의 각막 내피세포가 고분자 각막의 전체 표면의 약 10%를 덮도록 한다. 세포를 7일 동안 증식시키면서 그 동안 이틀마다 배양액을 교체하고, 배양액의 교체시에 250ng/ml의 bFGF를 추가한다. 상기 세포는 6 내지 7일 내에 세포가 100% 상호접촉되면, 이때 인공 각막은 이식할 준비가 된다.

[0058] 실시예 7: 배양된 인간의 각막 내피세포를 이용한 고밀도 세포 접종을 위한, 송아지 각막 내피세포로부터의 세포외 기질의 증착을 이용한 고분자의 코팅

[0059] 다른 실시태양에 의하면, 상기 생체고분자를 각막의 형태로 성형한다. 그런 다음, 시료를 11mm 관상톱으로 천공하고, 35mm 조직배양용 디쉬내에서 오목한 표면을 위로 향하도록 위치시킨다. 배양한 송아지 각막 내피세포를 배양용 디쉬로부터 떼어내고, ml당 20,000세포의 밀도로 적정한다. 세포 현탁액 약 200 $\mu$ l을 분주하여 고분자 각막에 가하고, 37°C에서 2시간 동안 10% 이산화탄소 배양기에서 배양한다. 그런 다음, 10% 소혈청, 5% 우태아혈청, 2% 텍스트란(40000MV) 및 50ng/ml의 bFGF가 부가된 DME-H16을 포함하는 배양액 약 2ml을 25mm 배양용 디쉬에 가하여, 인공각막을 완전히 침지시킨다. 송아지 내피세포를 이틀마다 배양액에 250ng/ml의 bFGF를 가하면서 7일 동안 증식시킨다. 7일째, 배양액을 제거하고, 수산화암모늄(증류수에 20mM로 용해된) 2ml을 가하고, 25°C에서 5분간 방치한다. 그런 다음, 상기 인공각막을 디쉬당 2ml의 PBS로 10번 세척한다.

[0060] 상술한 바와 같이 준비된, 배양된 인간의 각막 내피세포 현탁액을 100,000세포/ml의 최종밀도로 적정한다. 인간 세포 현탁액을 200 $\mu$ l 분주하여, 충분한 세포 수로 인공 각막에 가하여 표면의 95%를 덮는다. 예방보호제로서 1% 히알루론산나트륨(Healon® Advanced Medical Optics, Santa Ana, CA)층 0.2 내지 0.5ml을 세포층 위에 깔고, 인공 각막을 37°C에서 20분 내지 2시간 동안 10% 이산화탄소 배양기로 배양한다. 고분자 각막은 이식할 준비가 된다.

[0061] 실시예 8: 배양된 인간의 각막 내피세포를 이용한 희박한 세포 접종을 위한, 송아지 각막 내피세포로부터 유래된 세포외 기질을 이용한 고분자의 코팅

[0062] 상술한 바와 같이, 생체고분자 각막을 송아지 내피세포에 의해 증착된 세포외 기질로 코팅한다. 인공 각막을 11mm 관상톱으로 천공하고, 35mm 조직배양용 디쉬에 오목한 부분이 위를 향하도록 위치시킨다. 배양된 인간의 각막 내피세포를 상술한 바와 같이, 세포 현탁액으로 준비한다. 전기 세포 현탁액의 최종 세포밀도를 20,000세포/ml로 적정한다. 세포 200 $\mu$ l(4000세포를 포함) 분주물을 고분자 각막에 코팅된 세포외 기질에 가한다. 전기 시료를 37°C에서 10% 이산화탄소 배양기로 배양하고, 그 동안 배양액을 이틀마다 교체한다. 7일째, 표면의



100%을 덮도록 인간의 각막 내피세포를 증식시킨다. 그런 다음, 인공각막을 PBS로 3번 세척하고, 이식할 준비가 된다.

- [0063] 실시예 9: 배양된 인간의 각막 내피세포의 고밀도 세포 접종을 위한, 다이아몬드-유사-탄소(DLC)를 이용한 생체 고분자의 코팅
- [0064] 생체고분자를 각막 형태로 성형한다. 그런 다음, 생체고분자는 탄소 플라즈마(plasma) 증착 과정을 거친다. 플라즈마 장비는 높은 전력 및 온도집적의 문제를 최소화하도록 반복적인 펄스 모드에서 작동이 가능한 진공 아크 플라즈마 건(vacuum arc plasma gun ; Lawrence Berkely National Laboratory, Berkely, CA)으로 구성된다. 탄소양극이 구비된 플라즈마 건은 약 10eV의 직류 에너지를 갖는 순수 탄소 플라즈마의 밀집된 플룸(plume)을 형성한다. 상기 플라즈마는 90° 자기필터(굽은 솔레노이드)로 주입되어, 양극으로부터 모든 물질을 제거한 다음, 방사상의 플라즈마 형태를 평평하게 하는 거대 영구자석 다공성 구조체를 통하여 운반되며; 이러한 방법으로 상기 탄소 플라즈마 증착이 넓은 증착영역에서 공간적으로 균일하게 된다. 필름의 균일성을 추가적으로 향상시키지는 않지만, DLC 코팅된 기관은 저속으로 회전하는 디스크 상에 위치하여, 방위각의(azimuthal) 불균등성(inhomogeneity)을 해소한다. 플라즈마 건, 진공 챔버(chamber) 및 회전하는 디스크의 조립체는 약 20 내지 400Å, 바람직하게는 200 내지 400Å의 두께의 DLC 필름을 형성하는데 이용된다. 플라즈마 건은 디쉬, 슬라이드(slide), 블록(block), 비드(bead), 미세담체(microcarrier), 인공 각막의 오목면(concave) 및 볼록면(convex) 및 고분자판을 코팅하는데 이용된다.
- [0065] DLC 증착 후, 상기 인공 각막을 11mm 관상튜브로 천공하고, PBS로 3번 세척한다. 상술한 바와 같이, 배양된 인간의 각막 내피세포 현탁액을 준비하고, 약 10<sup>6</sup> 세포/ml의 최종밀도로 적정한다. 200,000세포 수를 포함하는 인간 세포 현탁액 200μl 분주물을 인공 각막의 코팅된 오목한 면에 가하여 표면의 95% 이상을 덮는다. 시료를 37℃에서 20분 내지 24시간 동안 10% 이산화탄소 배양기로 배양한다. 인공 각막은 이식할 준비가 된다.
- [0066] 실시예 10: 인간의 각막 내피세포의 희박한 개체군의 접종을 위한, 다이아몬드-유사-탄소(DLC)를 이용한 생체고분자의 코팅
- [0067] 생체고분자를 각막 형태로 성형하고, 탄소 플라즈마(DLC)를 실시예 9에서 상술한 바와 같이 오목한 표면에 증착시킨다. 20,000세포/ml의 최종 농도를 가지는 배양된 인간의 각막 내피세포의 200μl 분주물을 35mm 조직배양용 디쉬 안에 위치한 인공의 각막기질에 가한다. 전기 시료를 37℃에서 2시간 동안 10% 이산화탄소 배양기에 방치한다. 그런 다음, 10% 소혈청 및 250ng/ml의 bFGF가 부가된 DME-H16을 포함하는 배양액 약 2ml을 가한다. 실시예 5에서 상술한 바와 같이, 인간의 각막 내피세포를 7일 동안 증식시킨다. 7일째, 세포가 증식되어 인공 각막의 표면을 100% 덮을 때, 고분자 각막을 PBS로 3번 세척하고, 이식할 준비가 된다.
- [0068] 실시예 11: 부착 또는 성장 촉진제가 투입되고, 오목한 표면 위에 접종된 인간의 각막 내피세포의 희박한 배양물을 가지는 인공의 정상 두께의 각막 대체물
- [0069] 본 실시태양에 의하면, 고분자젤의 0.1 내지 500μg/ml의 피브로넥틴, 고분자젤의 0.1 내지 500μg/ml의 라미닌, 고분자젤의 0.1 내지 100μg/ml의 RGDS, 고분자젤의 1 내지 500ng/ml의 폴리카보필과 결합된 b-FGF, 고분자젤의 10 내지 1000ng/ml의 폴리카보필과 결합된 EGF 및 고분자젤의 1 내지 500μg/ml의 헤파린 설페이트 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착 및 성장 촉진제를, 생체고분자의 합성중에 그의 내부로 함유 또는 투입한다. 그런 다음, 전기 생체고분자를 건강한 정상 각막의 두께인 약 0.4 내지 0.8mm와 동일한 두께를 가지는 각막의 형태로 성형하는데, 필요에 따라 두께를 더 얇게 하거나 두껍게 할 수 있다.
- [0070] 약 2000 내지 2 X 10<sup>6</sup> 세포/ml, 바람직하게는 20,000세포/ml의 밀도로 배양된 인간의 각막 내피세포를 각막 대체

물의 오목한 표면에 삽입한다. DME-H16(15% 우태아혈청, 및 250ng/ml의 bFGF를 함유하고 20,000세포/ml의 밀도를 갖는)을 포함하는 배양액의 충분한 양을 25mm 배양용 디쉬 안에 있는 인공의 각막기질의 오목한 표면에 가한다. 약 37°C에서 2시간 동안 10% 이산화탄소 배양기에 방치한 후, 동일한 배양액 2ml을 배양용 디쉬에 가하여 각막 등가물을 완전히 침지시킨다. 배양액을 이틀마다 교체하고, 배양액을 교체한 후 매번 250ng/ml의 bFGF를 가한다. 7 내지 10일에, 인간의 각막 내피세포가 상기 인공 각막 위에서 상호접촉된다. 인공 각막을 PBS로 3번 세척하면 이식할 준비가 된다.

[0071] 환자를 치료하기 위해서, 본 발명은 알려진 외과 기술을 이용한 이식받을 환자의 손상된 각막의 제거, 인공의 정상 두께를 가지는 각막의 이식 및 외과적 또는 다른 수단에 의한 상기 각막의 보호를 필요로 한다.

[0072] 실시예 12: 부착 또는 성장 촉진제가 투입되고, 오목한 표면 위에 접종된 인간의 각막 내피세포의 희박한 배양물을 가지는 인공의 절반 두께의 각막 대체물

[0073] 본 실시태양에 의하면, 실시예 1에 기재된 부착 혼합물을, 생체고분자의 합성중에 그의 구조물 내부로 함입 또는 투입시킨다. 생체고분자를 건강한 정상 각막의 두께인 약 0.4 내지 0.8mm의 절반의 두께를 가지는 각막의 형태로 성형하는데, 필요에 따라 두께를 더 얇게 하거나 두껍게 할 수 있다. 약 2000 내지  $2 \times 10^6$  세포/ml, 바람직하게는 20,000세포/ml의 희박한 밀도로 배양된 인간의 각막 내피세포를 인공의 각막기질의 오목한 표면에 접종하고, 세포가 상호접촉될 때까지 대략 7 내지 10일 동안 성장시킨다. 절반의 두께를 가지는 인공 각막을 PBS로 3번 세척하면 이식할 준비가 된다.

[0074] 본 실시태양의 외과적 과정은 라멜라(lamellar) 패션(fashion)에서 손상되거나 또는 질병에 걸린 내피와 연관된 이식받을 각막기질의 내층의 절반만을 제거하는 단계, 및, 오목한 표면 위에서 성장시킨 배양된 인간의 각막 내피세포를 가지고, 외과적 또는 다른 수단에 의하여 보호되는 절반 두께의 인공 각막을 제거된 부분에 대체하는 단계를 포함한다.

[0075] 실시예 13: 부착 및/또는 성장 촉진제가 투입되고, 오목한 표면 위에 접종된 인간의 각막 내피세포의 포화된 밀도를 가지는 인공의 정상 두께의 각막 대체물

[0076] 본 실시태양에 의하면, 실시예 1에 기재된 부착 혼합물을, 생체고분자의 합성중에 그의 구조물 내부로 함입 또는 투입시킨다. 그런 다음, 생체고분자를 건강한 정상 각막의 두께를 가지는 각막의 형태로 성형한다. 배양된 인간의 각막 내피세포의 현탁액을  $10^4$  내지  $5 \times 10^6$  세포/ml( $10^6$  세포/ml)의 고밀도로 1 내지 5% 우태아혈청이 부가된 DME-H16을 포함하는 배양액에서 준비한다. 인공의 각막기질을 11mm 관상톱으로 천공한다. 세포 현탁액의 약 200 $\mu$ l 분주물을 11mm 직경의 버튼의 오목한 표면에 가한다. 전기 시료를 37°C에서 20분 내지 24시간 동안 10% 이산화탄소 배양기로 배양한다. 인공 각막을 PBS로 3번 세척하고, 이식할 준비가 된다.

[0077] 각막 대체물이 준비되면, 공지된 외과 기술로 수령자의 손상된 각막 버튼을 제거하고, 그런 다음, 인공 각막으로 대체하며, 외과적 또는 다른 수단으로 보호한다.

[0078] 실시예 14: 부착 및/또는 성장 촉진제가 투입되고, 오목한 표면 위에 접종된 인간의 각막 내피세포의 포화된 밀도를 가지는 인공의 절반 두께의 각막 대체물

[0079] 본 실시태양에 의하면, 실시예 1에 기재된 부착 혼합물을, 생체고분자의 합성중에 그의 구조물 내부로 함입 또는 투입시킨다. 그런 다음, 생체고분자를 건강한 정상 각막의 절반의 두께를 가지는 각막의 형태로 성형한다. 배양된 인간의 각막 내피세포의 현탁액을  $10^4$  내지  $5 \times 10^6$  세포/ml, 바람직하게는  $10^6$  세포/ml의 고밀도로 실시예 3에 상술한 바와 같이, 11mm 직경의 버튼의 천공된 표면에 가한다. 각막 대체물을 배양한 후, PBS로 3번 세척하면, 이식할 준비가 된다.

- [0080] 외과적 과정은 환자로부터 라멜라(lamellar) 패션(fashion)의 손상되거나 또는 질병에 걸린 내피와 연관된 이식받을 각막기질의 내층의 절반을 제거하는 단계, 오목한 표면 위에서 성장시킨 배양된 인간의 각막 내피세포를 가지고 있고 절반 두께의 인공 각막을 제거된 부위에 대체하는 단계 및 외과적 또는 다른 수단에 의하여 새로운 각막 이식물을 보호하는 단계를 포함한다.
- [0081]
- [0082] 실시예 15: RPE 세포 이식을 위하여 눈의 망막 아래 공간으로 전달되기 위한, 배양된 RPE 세포의 부착을 위한 플랫폼(platform)으로서의 약 10 내지 100 $\mu$ m의 균일한 두께를 가지는 생체고분자판
- [0083] 약 1 내지 100 $\mu$ m, 바람직하게는 10 내지 100 $\mu$ m의 균일한 두께를 가지는 생체적합 고분자의 박판을 배양된 RPE 세포로 코팅한다. 이 단계를 수행하기 위하여, 다양한 동물 종 또는 인간 기원의 배양된 RPE 세포를 STV 용액(0.05% 트립신 및 0.02% EDTA를 포함하는 생리식염수)을 이용하여 배양용 디쉬에서 이탈시킨다. STV의 대부분은 RPE 세포를 수거하는 즉시 제거되지만 여전히 플레이트에 붙어 있다. 그런 다음, 여전히 STV가 남아 있는 얇은 필름을 이용하여 배양물을 37 $^{\circ}$ C에서 2 내지 3분 동안 10% 이산화탄소 배양기로 배양시킨다. 15% 우태아혈청이 부가된 DME-H16을 포함하는 배양액 5ml을 가하고, 1ml 피펫으로 부드럽게 세척하여 RPE 세포를 제거한다. 세포 현탁액을 2000 내지 2 X 10<sup>6</sup> 세포/ml, 바람직하게는 20,000세포/ml의 밀도로 맞춘다. 충분한 양을 생체고분자판의 표면에 가하여, 25mm 배양용 디쉬 안에 메니스커스(meniscus)를 형성한다. 전기 시료를 37 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 10% 이산화탄소 배양기로 방치한다. 15% 우태아혈청 및 250ng/ml의 bFGF를 함유한 배양액 2ml을 디쉬에 가하여, RPE 세포가 붙어있는 고분자판을 완전히 침지시킨다. 상기 판은 배양액 내에서 뜨지만 접착제를 붙여 바닥에 부착시킬 수 있다. 배양액을 이틀마다 교체하고, 배양액을 교체한 후 매번 100ng/ml의 bFGF를 가한다. RPE 세포가 7 내지 10일 사이에 상호접촉되면, 독립현미경으로 관찰함으로써 확인할 수 있다. 그런 다음, 상기 판을 망막 아래 공간에 이식할 부위를 덮을 수 있는 원하는 넓이로 절단한다. RPE 세포가 덮인 판을 캐놀러 내부로 흡인한다. 판의 상면에 RPE 세포가 위치하도록 상기 판을 접는다. 상술한 바처럼 이식할 부위를 준비한 후에, 상기 판을 손상된 부위 위에 놓는다.
- [0084] 다른 실시태양에 의하면, 배양된 RPE 세포를 2 X 10<sup>6</sup> 세포/ml의 고집중밀도로 고분자판 위에 증착시킨다. 전기 시료를 37 $^{\circ}$ C에서 2 내지 24시간 동안 10% 이산화탄소 배양기에서 배양한다. 상기 판을 많은 부피(각 세척당 1ml)의 BSS로 광범위하게 3 내지 5회 세척하여, 단일 층을 형성하지 않는 여분의 세포를 제거한다. 그런 다음, 상기 판을 원하는 넓이로 절단하고, 상술한 바처럼 이식한다.
- [0085] 실시예 16: 눈의 망막 아래 공간으로의 이식을 위하여 배양된 RPE 세포를 가지는 약 10 내지 100 $\mu$ m의 균일한 두께를 가지는 생분해성 생체고분자판의 코팅
- [0086] 약 10 내지 100 $\mu$ m의 균일한 두께를 가지는 생분해성 고분자를 35mm 배양용 디쉬에 위치시킨다. 배양된 RPE 세포를 상술한 바와 같이, 2000 내지 2 X 10<sup>6</sup> 세포/ml, 바람직하게는 20,000세포/ml의 밀도를 갖는 현탁액에 준비한다. 전기 세포 현탁액의 충분한 양을 메니스커스를 형성하는 판에 가한다. 37 $^{\circ}$ C에서 약 2시간 동안 10% 이산화탄소 배양기로 배양한 후에, 15% 우태아혈청 및 100ng/ml의 bFGF가 부가된 DME-H16을 포함하는 배양액 2ml을 가한다. RPE층을 실시예 15에서 상술한 바와 같이, 상호접촉될 때까지 성장시키고, RPE 이식을 수행한다. 다른 방법으로는, 전기 생분해성 고분자판에 37 $^{\circ}$ C에서 2 내지 24시간 동안 10% 이산화탄소 환경에서 배양된 RPE 세포를 포화밀도로 증착시킬 수 있다. 배양 후에, BSS 10ml로 광범위하게 3 내지 5회 세척하고, 그런 다음, 실시예 15에서 상술한 바와 같이 이식한다.
- [0087] 실시예 17: 눈의 망막 아래 공간으로의 이식을 목적으로, 배양된 RPE 세포를 이용한, 부착 및 성장 촉진제가 생체고분자의 합성중에 그의 내부로 함유 또는 투입되는 생체고분자의 코팅
- [0088] 본 실시태양에 의하면, 약 1 내지 100 $\mu$ m, 바람직하게는 10 내지 100 $\mu$ m의 균일한 두께를 가지는 생체고분자에는

고분자젤의 1 내지 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 피브로넥틴, 고분자젤의 1 내지 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 라미닌, 고분자젤의 0.1 내지 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 RGDS, 고분자젤의 40 내지 500 $\text{ng}/\text{ml}$ 의 폴리카보필과 결합된 b-FGF, 고분자젤의 100 내지 1000 $\text{ng}/\text{ml}$ 의 폴리카보필과 결합된 EGF 및 고분자젤의 0.1 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 헤파린 설페이트 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착 및 성장 촉진제가, 생체고분자의 합성중에 그의 내부로 함입 또는 투입된다. 그런 다음, 상술한 바와 같이, 배양된 RPE 세포를 낮은 집종밀도( $10^4$  내지  $5 \times 10^6$  세포/ $\text{ml}$ , 바람직하게는 200,000 세포/ $\text{ml}$ )로 7일 동안 고분자판 위에서 성장시키거나, 또는  $2 \times 10^6$  세포/ $\text{ml}$ 의 포화밀도로 고분자판 위에 증착시킨다. 그런 다음, 눈의 망막 아래 공간으로의 RPE 이식을 위해서, 실시예 15에서 상술한 바와 같이, 이식과정을 수행한다.

[0089] 실시예 18: 눈의 망막 아래 공간으로의 이식을 목적으로, 배양된 RPE 세포를 이용한, 부착 및 성장 촉진제가 생체고분자의 합성중에 그의 내부로 함입 또는 투입되는 생체고분자의 코팅

[0090] 의도한 다른 실시태양에 의하면, 약 1 내지 1000, 바람직하게는 10 내지 100 $\mu\text{m}$ 의 균일한 두께를 가지는 생체고분자에는 고분자젤의 1 내지 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 피브로넥틴, 고분자젤의 1 내지 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 라미닌, 고분자젤의 0.1 내지 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 RGDS, 고분자젤의 40 내지 500 $\text{ng}/\text{ml}$ 의 폴리카보필과 결합된 b-FGF, 고분자젤의 100 내지 1000 $\text{ng}/\text{ml}$ 의 폴리카보필과 결합된 EGF 및 고분자젤의 0.1 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 헤파린 설페이트 중의 하나 또는 그 이상을 포함하는 부착 및 성장 촉진제가, 생체고분자의 합성중에 그의 내부로 함입 또는 투입된다. 실시예 15에서 상술한 바와 같이, 배양된 RPE 세포를 2000 내지  $2 \times 10^6$  세포/ $\text{ml}$ , 바람직하게는 200,000 세포/ $\text{ml}$ 의 낮은 집종밀도로 7일 동안 상기 생분해성 고분자판 위에서 성장시키거나, 또는 포화밀도( $2 \times 10^6$  세포/ $\text{ml}$ )로 상기 생분해성 고분자판 위에 증착시킨다. 상술한 바와 같이, 이식과정은 눈의 망막 아래 공간에 RPE 코팅된 고분자판을 삽입시켜서 수행된다.

### 산업상 이용 가능성

[0091] 본 발명을 설명하였지만, 이들의 다양한 변형은 첨부된 특허청구범위의 범위에 의하여 정의되는 본 발명의 기술적 사상으로부터 벗어남이 없이 관련된 당업계의 통상의 지식을 가진자에게 자명할 것이다.

[0092] 상기 인용된 미국특허, 특허출원 및 모든 다른 참고문헌 전체는 본 명세서에서 인용문헌으로 삽입되었다.

명세서 전반에 걸쳐 문맥상 다른 요구사항이 없으면, "포함하다(comprise)" 또는 "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변형어는 어떤 다른 숫자(number)나 항목(item)을 배제하는 것이 아니고, 서술된 숫자 또는 항목, 혹은 숫자의 범주(range) 또는 항목의 군(group)을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

각 문서, 참조문헌, 특허출원 또는 본 명세서에 언급된 특허는 전문이 참고문헌으로 본 명세서에 포함되는데, 이는 곧 본 명세서의 일부로서 독자들에게 의해 읽히고 고려되어야 할 것이다. 각 문서, 참조문헌, 특허출원 또는 본 명세서에 언급된 특허가 본 명세서에 반복되지 않는 것은 단순히 간결함을 유지하기 위해서다.

본 명세서에 포함된 인용문헌 또는 정보의 참고문헌은 상기 인용문헌 또는 정보가 상식적인 지식의 일부이거나, 혹은 대한민국 또는 다른 국가에 알려져 있었다는 것을 인정한다는 의미로 해석되어서는 아니 된다.

### 도면의 간단한 설명

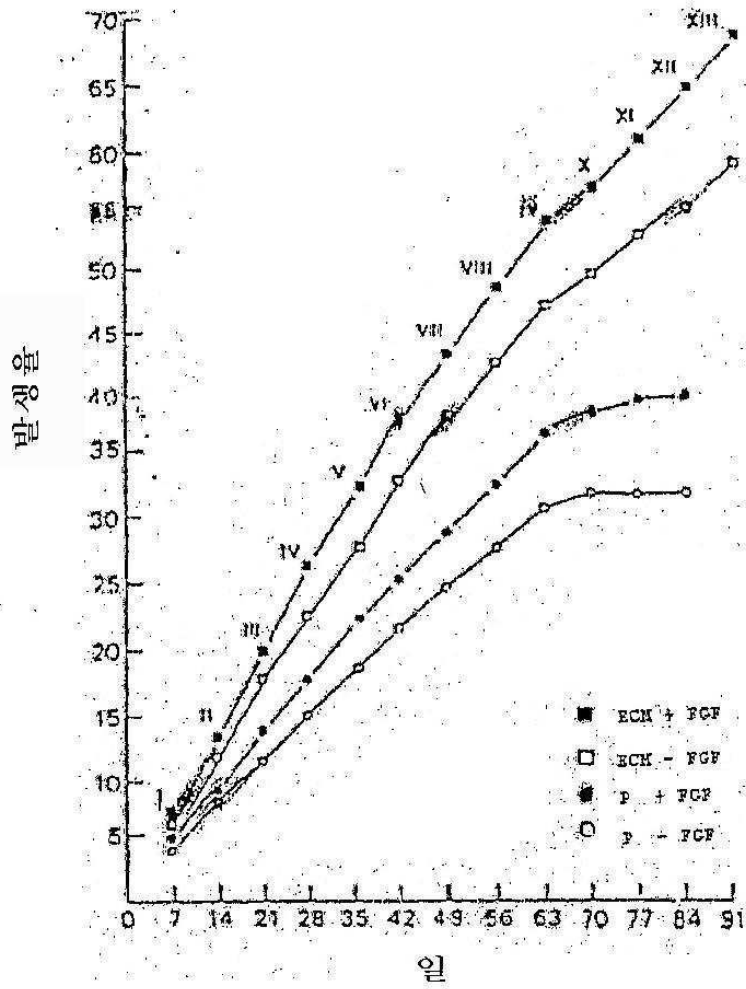
[0037] 도 1은 다른 기질들 위에서 배양된 인간 내피세포의 장기적 연속 증식에 대한 발생곡선(generation curve)이다.

[0038] 도 2는 bFGF의 유무하에, 배양된 인간의 각막 내피세포의 성장에 대한 다양한 부착인자들의 영향을 나타내는 그래프이다.

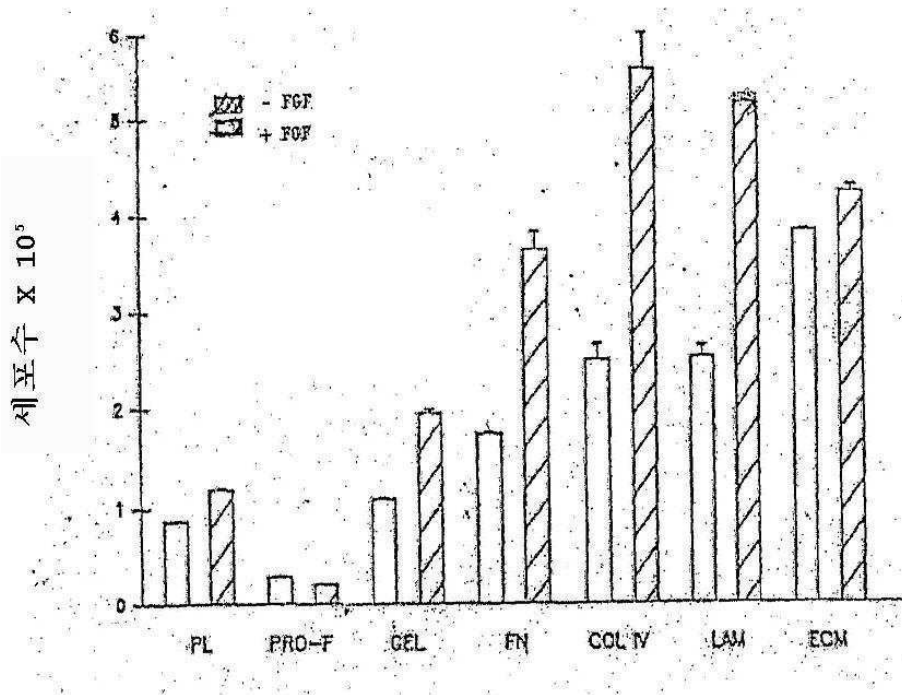
[0039] 도 3은 시간의 경과에 따른, 부착제로 코팅된 절개된(denuded) 인간의 각막 버튼 위에 배양된 인간의 각막 내피세포의 부착을 나타내는 그래프이다.

도면

도면1



도면2



도면3

