



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0155390
(43) 공개일자 2021년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/38 (2006.01) A61B 17/00 (2006.01)
A61B 17/34 (2006.01) A61B 8/12 (2006.01)
A61F 2/02 (2006.01) A61K 35/26 (2015.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/3804 (2013.01)
A61B 17/00234 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7036664
(22) 출원일자(국제) 2020년04월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년11월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/027783
(87) 국제공개번호 WO 2020/210710
국제공개일자 2020년10월15일
(30) 우선권주장
62/832,492 2019년04월11일 미국(US)

(71) 출원인
유니버시티 오브 피츠버그-오브 더 커먼웰스 시스템 오브 하이어 에듀케이션
미국 15260 펜실베이니아 피츠버그 새커리 애비뉴
130 가드너 스틸 컨퍼런스 센터 1층
(72) 발명자
라가세 에릭
미국 15215 펜실베이니아주 피츠버그 델라필드 로드 1000
폰테스 파울로 아르투르 차베스
미국 15206 펜실베이니아주 피츠버그 비치우드 블러바드 1244
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) 발명의 명칭 생체내 장기형성의 발달을 유도하기 위한 최소 침습적 세포 이식 절차

(57) 요약

본원에는 대상체의 림프절에 세포를 이식하고 이소성 조직을 성장시키는 방법 및 시스템이 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 시스템은 최소 침습적 세포 이식을 필요로 하는 환자를 치료하기 위한 최소 침습적 세포 이식을 가능하게 한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 시스템은 초음파 내시경술의 사용을 포함한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61B 17/3468 (2013.01)
A61B 17/3472 (2013.01)
A61B 8/12 (2013.01)
A61F 2/022 (2013.01)
A61K 35/22 (2013.01)
A61K 35/39 (2013.01)
A61K 35/407 (2013.01)
A61K 35/42 (2013.01)
A61L 27/3839 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에 하나 이상의 세포를 이식하고 이소성 조직(ectopic tissue)을 성장시키는 최소 침습적 방법으로서,

(a) 내시경을 엔도루미날 방법(endoluminal approach)을 통해 대상체의 위장관, 기도, 또는 요로 내로 진행시키는 단계,

(b) 트랜스루미날 방법(transluminal approach)을 이용하여 내시경에 부착된 바늘을 내장 벽을 통해 대상체의 림프절 내로 삽입하는 단계, 및

(c) 바늘을 통해 하나 이상의 세포를 림프절 내로 전달하여, 림프절에서 하나 이상의 세포를 생착시키고 이소성 조직을 생성시키는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 내시경을 진행시키는 단계, 바늘을 삽입하는 단계, 또는 둘 모두가 방사선학적 영상화 또는 초음파 영상화의 도움으로 수행되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 방사선학적 영상화가 동적 방사선학적 영상화, 컴퓨터 단층촬영(CT), 자기 공명 영상화(MRI), 또는 모두를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 림프절이 대상체의 복강 또는 흉강에 존재하는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 림프절이 대상체의 종격동 또는 복막후 영역에 존재하는 것인 방법.

청구항 6

대상체에 하나 이상의 세포를 이식하고 이소성 조직을 성장시키는 최소 침습적 방법으로서,

(a) 초음파 영상화 또는 방사선학적 영상화의 도움으로 대상체의 복강 또는 흉강의 림프절에 바늘을 삽입하는 단계, 및

(b) 바늘을 통해 하나 이상의 세포를 림프절 내로 전달하여, 림프절에서 하나 이상의 세포를 생착시키고 이소성 조직을 생성시키는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 내시경을 대상체의 위장관, 기도, 또는 요로를 통해 진행시키고, 트랜스루미날 방법을 이용하여 내장 벽을 통해 바늘을 삽입하여 대상체의 림프절에 도달하게 하는 단계를 추가로 포함하고, 바늘은 내시경에 부착되어 있는 것인 방법.

청구항 8

제2항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 내시경을 진행시키는 단계, 바늘을 삽입하는 단계, 또는 둘 모두가 림프절의 초음파 영상화의 도움으로 수행되는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 방사선학적 영상화가 동적 방사선학적 영상화, 컴퓨터 단층촬영(CT), 자기 공명 영상화(MRI), 또는 모두를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제1항, 제2항 및 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 내시경이 림프절을 탐지하도록 구성된 초음파 프로브를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포가 간세포, 췌장 세포 또는 췌도, 신장 세포 또는 신장 조직 단편, 흉선 세포 또는 흉선 조직 단편, 또는 폐 세포 또는 폐 조직 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포가 대상체에 대해 자가, 동종, 또는 이종인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포가 대상체에 대해 동계인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 살아있는 도너 조직(live donor tissue)으로부터 하나 이상의 세포를 분리시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 전달 전에 냉동보존으로부터 하나 이상의 세포를 회복시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포를 복강 또는 흉강에서의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 림프절 내에 전달하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포의 면역 거부를 감소시키기 위해 대상체에 면역억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포가 약 20 μm 의 평균 직경의 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포가 간세포를 포함하며, 이소성 조직이 이소성 간 조직인 방법.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 하나 이상의 세포가 하나의 단일 림프절 내로의 전달 당 적어도 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 5천만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 바늘이 1 mL 당 적어도 약 1천만, 2천만, 2천5백만, 3천만,

4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 갖는 현탁 용액 (suspension solution) 중의 하나 이상의 세포를 전달하는 것인 방법.

청구항 22

제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 바늘이 1 mL 당 적어도 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 또는 5천만개의 생존 세포를 갖는 현탁 용액 중의 하나 이상의 세포를 전달하는 것인 방법.

청구항 23

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 집단에서 하나 이상의 세포가 림프절 내로 전달되며, 세포의 집단이 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 약 100%의 생존 세포를 갖는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 세포의 집단에서 하나 이상의 세포가 림프절 내로 전달되며, 하나 이상의 세포가 바늘을 통과할 때, 전달이 세포의 집단에서 약 20%, 15%, 10%, 9%, 8.5%, 8%, 7.5%, 7%, 6.5%, 6%, 5.5%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.5%, 1%, 또는 0.5% 미만의 세포 생존을 감소를 유발하는 것인 방법.

청구항 25

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 바늘의 내경이 약 700 μm , 600 μm , 500 μm , 450 μm , 400 μm , 300 μm , 260 μm , 250 μm , 또는 200 μm 이하인 방법.

청구항 26

제18항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 바늘의 내경이 약 260 μm 이하인 방법.

청구항 27

제18항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 바늘의 외경이 약 1 mm, 900 μm , 800 μm , 750 μm , 700 μm , 650 μm , 600 μm , 550 μm , 520 μm , 510 μm , 500 μm , 480 μm , 450 μm , 또는 400 μm 이하인 방법.

청구항 28

제18항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 바늘의 외경이 약 510 μm 이하인 방법.

청구항 29

제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 바늘의 크기가 약 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 또는 27 게이지 이하인 방법.

청구항 30

제18항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 바늘의 크기가 약 25 게이지 이하인 방법.

청구항 31

제18항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 바늘이 약 25 게이지 이하이고, 바늘이 1 mL 당 적어도 약 5천만개의 생존 세포를 갖는 현탁 용액 중의 하나 이상의 세포를 전달하며, 하나 이상의 세포가 적어도 약 65%의 생존 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제19항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 간 질환 또는 병태를 치료하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 간 질환 또는 병태가 알코올 소비와 관련된 말기 간 질환 또는 간 섬유증, A, B, C 또는 D형 간염 감염증, 비알코올성 지방간 질환, 자가면역 간염, 원발성 담즙 간경변, 원발성 경화 쓸개관염, 담도 폐쇄

증, 양성 섬유증, 알라질 증후군, 매독, 브루셀라병, 기생충 감염증, 화학적 노출, 만성 담도 질환, 버드-키아리 증후군, 오슬러병, 또는 우심부전인 방법.

청구항 34

제32항에 있어서, 간 질환 또는 병태가 티로신혈증, 단풍시럽뇨병, 페닐케톤뇨증, 크리글러-나자르 증후군, 옥살산증, 고옥살산뇨증, 혈색소침착증, 알파-1 항트립신 결핍, 윌슨병, 가족성 간내 담즙정체 증후군, 갈락토오스혈증, 글리코겐 축적병, 또는 가족성 아밀로이드 다발신경병증을 포함하는 대사 장애와 관련된 것인 방법.

청구항 35

제19항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 대상체의 간에 대한 혈액 공급을 감소시키고 대상체에서 간세포 기능장애를 유도하는 문맥대정맥 문합술 수술 절차 또는 경정맥경유 간내문맥 전신순환 문합술(TIPS)을 받았으며, 문맥대정맥 문합술 수술 절차가 단측 문맥대정맥 문합술, 측측 문맥대정맥 문합술, 삽입 H-이식 또는 C-이식을 포함하는 대정맥간막 문합술, 또는 중심 또는 원위 비정맥신정맥 문합술을 포함하는 것인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 대상체에서 말기 간 질환을 치료하는 방법.

청구항 37

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포가 신장 세포 또는 신장 조직 단편을 포함하며, 이소성 조직이 이소성 신장 조직인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 대상체에서 신장 질환 또는 병태를 치료하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 신장 질환 또는 병태가 말기 신장 질환인 방법.

청구항 40

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포가 췌장 세포 또는 췌도를 포함하며, 이소성 조직이 이소성 췌장 조직인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 대상체에서 인슐린 분비의 감소 또는 결여를 유발하는 내분비 췌장 질환 또는 병태를 치료하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 췌장 질환 또는 병태가 대상체에서 인슐린 분비의 감소를 유발하는 제I형 당뇨병, 제II형 당뇨병, 또는 만성 췌장염인 방법.

청구항 43

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포가 폐 세포 또는 폐 조직 단편을 포함하며, 이소성 조직이 이소성 폐 조직인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 대상체에서 폐 질환 또는 병태를 치료하는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 폐 질환 또는 병태가 만성 폐색성 폐 질환(COPD)인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, COPD가 담배 연기, 오염물질 및 매연, 알파-1-항트립신, 만성 섬유증, 만성 천식, 기종, 만성 기관지염, 또는 특발성 폐섬유증에 의해 유발되는 것인 방법.

청구항 47

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포가 흉선 세포 또는 흉선 조직 단편을 포함하며, 이소성 조직이 이소성 흉선 조직인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 흉선 세포 또는 흉선 조직 단편이 도너 대상체로부터 얻어지며, 이소성 흉선 조직이 도너 대상체로부터의 세포의 이식에 대한 대상체에서의 도너 특이적 내성을 유도하는 것인 방법.

청구항 49

제47항에 있어서, 질환 또는 병태가 연령 관련 면역계 기능장애이며, 이소성 흉선 조직이 대상체의 면역 기능을 조절하는 것인 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 림프절이 위장관의 근위에 존재하며, 내시경이 위장관을 따라 진행되는 것인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 림프절이 십이지장 주위 림프절, 위 주위 림프절, 췌장 주위 림프절, 장간막 림프절, 회결장 림프절, 결장간막 림프절, 위 림프절, 간 비장 림프절, 비장 폐문 림프절, 식도 주위 림프절, 심장 주위 림프절, 대동맥 주위 림프절, 대동맥후 림프절, 측대동맥 림프절, 전대동맥 림프절, 소만곡 림프절, 총간 림프절, 비장 동맥 림프절, 복강 축 림프절, 장골 림프절, 또는 복막후 림프절 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 림프절이 십이지장 주위 림프절을 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 림프절이 기도에 대해 근위에 존재하며, 내시경이 기도를 따라 진행되는 것인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 림프절이 종격동 영역의 하나 이상의 림프절을 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 림프절이 복장열 림프절, 늑간 림프절, 상횡경막 림프절, 상기관기관지 림프절, 하기관기관지 림프절, 기관지폐 림프절, 기관열 림프절, 또는 폐내 림프절 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 림프절이 요로에 대해 근위에 존재하며, 내시경이 요로를 따라 진행되는 것인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 림프절이 복막후 영역의 하나 이상의 림프절을 포함하는 것인 방법.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 림프절이 외부 장골 림프절, 내부 장골 림프절, 대정맥 요추 림프절, 대동맥 요추 림프절, 표재 서혜부 림프절, 깊은 서혜부 림프절, 대동정맥사이 방광 주위 림프절, 폐색 방광 주위 림프절, 또는 천골전 방광 주위 림프절 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 59

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 60

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 비-인간 동물인 방법.

청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포를 림프절 내에 전달한 후 이소성 조직이 약 5일, 10일, 15일, 20일, 25일, 30일, 35일, 40일, 45일, 50일, 55일, 60일, 65일, 70일, 75일, 80일, 85일, 90일, 95일, 100일, 110일, 120일, 130일, 140일, 150일, 160일, 170일, 180일, 190일, 또는 200일 내에 형성되는 것인 방법.

청구항 62

간 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 간 질환을 치료하는 방법으로서,

(a) 내시경을 엔도루미날 방법을 통해 대상체의 위장관, 기도, 또는 요로 내로 진행시키는 단계,

(b) 트랜스루미날 방법을 이용하여 내시경에 부착된 바늘을 내장 벽을 통해 초음파 영상화의 도움으로 대상체의 림프절 내에 삽입하는 단계, 및

(c) 하나 이상의 세포를 바늘을 통해 림프절 내로 전달하여, 림프절에서 하나 이상의 세포를 생착시키고 이소성 간 조직을 생성시키는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 림프절 내에 하나 이상의 세포를 전달한 후 이소성 조직이 약 5일, 10일, 15일, 20일, 25일, 30일, 35일, 40일, 45일, 50일, 55일, 60일, 65일, 70일, 75일, 80일, 85일, 90일, 95일, 100일, 110일, 120일, 130일, 140일, 150일, 160일, 170일, 180일, 190일, 또는 200일 내에 형성되는 것인 방법.

청구항 64

내시경, 및 바늘 및 그 안에 포함된 현탁 용액 중 세포의 집단을 갖는 주사기를 포함하는, 대상체에 간세포를 이식하고 이소성 간을 성장시키기 위한 시스템으로서, 현탁 용액은 1 mL 당 약 2천5백만 내지 약 1억개의 생존 간세포를 가지며, 바늘은 최대 약 25 게이지인 시스템.

청구항 65

제64항에 있어서, 내시경 및 바늘이 대상체의 위장관, 기도, 또는 요로를 따라 함께 진행하도록 구성되는 것인 시스템.

청구항 66

제64항 또는 제65항에 있어서, 주사기가 바늘을 통해 하나 이상의 세포를 전달하도록 구성되는 것인 시스템.

청구항 67

제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 내시경이 초음파 프로브를 포함하는 것인 시스템.

청구항 68

제64항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 초음파 프로브가 대상체의 복강에서 림프절을 탐지하도록 구성되

는 것인 시스템.

청구항 69

제64항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 현탁 용액이 1 mL 당 적어도 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 갖는 것인 시스템.

청구항 70

제64항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 주사기의 세포의 집단이 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 약 100%의 생존 세포를 갖는 것인 시스템.

청구항 71

제64항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 주사기의 세포의 집단이 적어도 약 65%의 생존 세포를 갖는 것인 시스템.

청구항 72

제64항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 주사기의 세포의 집단이 적어도 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 5천만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 포함하는 것인 시스템.

청구항 73

제64항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 주사기의 세포의 집단이 1 mL 당 적어도 약 5천만개의 생존 세포를 포함하며, 세포의 집단이 적어도 약 65%의 생존 세포를 포함하는 것인 시스템.

청구항 74

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항의 방법을 수행하기 위한 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 우선권 주장

[0002] 본 출원은 2019년 4월 11일에 출원된 미국 가출원 제62/832,492호를 우선권으로 주장하며, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 도입부

[0004] 본 개시는 기능적 이소성 조직 및 장기를 생성하기 위해 대상체의 림프절 내에 세포를 이식하기 위한 최소 침습적 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 장기 이식 및/또는 재생에 대한 수요가 많아지고 있다. 그러나, 말기 질환 환자에게 이식하기 위해 입수 가능한 장기의 부족은 전세계적으로 주요 의학적, 사회적 및 경제적 문제를 나타낸다. 또한, 전체 장기 이식은 수혜자의 건강 상태에 대한 엄격한 요건을 가질 수 있다. 예를 들어, 현재 미국에서는 연간 표준 간 이식의 자격을 얻지 못하는 대략 30,000명의 말기 간 질환(ESLD)을 갖는 환자가 존재한다.

[0006] 전체 장기 이식에 대한 대안적인 방법은 손상된 장기를 재생하기 위한 세포 이식을 포함할 수 있다. 예를 들어, 간세포 이식(hepatocyte transplantation; HT)은 표준 간 이식에 적합하지 않은 것으로 간주되고 추가 치료 옵션이 없는 ESLD를 갖는 환자의 삶을 연장하고 환자의 삶의 질을 향상시킬 수 있다. 그러나, 병에 걸린 장기에 대한 동소 세포(orthotopic cell)-기반 치료법은 말기 질환 동안 간경변 및 섬유증 간에서 적절한 환경이 없을 가능성부터 완전 디조지 증후군(complete DiGeorge syndrome)에서 흉선이 없는 경우까지 여러 이유로 실현 가능하지 않을 수 있다.

[0007] ESLD를 앓고 있는 환자에 대해, 중요한 문제가 존재할 수 있는데, 대부분의 세포 치료법은 본래 병에 걸린 간

내로의 세포 생착을 증진시키는 것에 관한 것이다. 이식된 간 세포는 일반적으로, 비장(환자에서 비장 동맥 또는 설치류에서 비장 실질(비장 실질조직)) 내로 또는 문맥 정맥을 통해 간내로 주사된다. 비장 동맥에 이식된 간 세포는 초기 비장 주사 후에 능동적으로 또는 수동적으로 병에 걸린 간으로 빠르게 이동할 수 있으며, 여기서, 이식된 간세포에 의한 간 재생이 일어날 것으로 예상된다. 그러나, 이러한 방법은 이식의 해부학적 부위로 인해 상당히 제한이 있다. ESLD를 갖는 이러한 환자들 대부분[Takahashi *et al.*, 2014]은 비장 비대 및 비장 비대증을 가지며, 여기서, 비장 동맥 순환을 통해 비장 실질조직으로 들어가는 모든 세포(예를 들어, 적혈구, 백혈구 및 혈소판)와 관련하여 비장에서 공격적 세포 포획 이후 식균작용 및 세포 파괴가 일어날 수 있다. 또한, 이식된 간세포는 문맥 정맥 공급의 주요 성분으로서 비장 정맥을 통해 간 실질조직으로 간을 추가로 유도될 수 있다. 이러한 세포는 문맥삼분지(portal triad)에서 간 동모양 혈관으로 순환할 수 있으며, 여기서, 간세포에 의한 작은 문맥 정맥 분기 및 간 동모양 혈관의 부분 폐색이 일시적 문맥고혈압, 초기 허혈 및 다수의 이식된 세포의 사멸을 초래한다(da Fonseca *et al.*, 2008). 이식된 간세포는 동모양 혈관 내피 세포 장벽을 극복하고 간 실질조직 내에 생착시키는 매우 제한된 능력을 가질 수 있다. 또한, ESLD를 갖는 환자는 상당한 정도의 간 섬유증 및 간경변을 가질 수 있으며, 이는 이미 진행성 세포구조 혼란에 의해 제한된 간소엽 내에서 후속 세포 성장에 대한 주요 제한 인자일 수 있다.

[0008] 이에 따라, 적절한 해부학적 특징을 갖는 기능적 장기를 생성시킬 수 있는 신규한 세포-기반 장기 재생 방법이 요구되고 있다. 또한, ESLD, 대사성 간 질환 및 급성 간 부전에 대한 신규한 치료법이 요구되고 있다.

발명의 내용

[0009] 일 양태에서, 본 개시는 대상체에서 하나 이상의 세포를 이식하고 이소성 조직을 성장시키는 최소 침습적 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 방법은 내시경을 엔도루미날 방법을 통해, 예를 들어, 대상체의 위장관, 기도, 또는 요로 내로 진행시키는 단계, 트랜스루미날 방법을 이용하여 내시경에 부착된 바늘을 내장 벽을 통해 대상체의 림프절 내로 삽입하는 단계, 및 하나 이상의 세포를 바늘을 통해 림프절 내로 전달하여, 림프절에서 하나 이상의 세포를 생착시키고 이소성 조직을 생성시키는 단계를 포함한다.

[0010] 특정 구현예에서, 내시경을 진행시키는 단계, 바늘을 삽입하는 단계, 또는 둘 모두는 방사선학적 영상화 또는 초음파 영상화의 도움으로 수행된다. 특정 구현예에서, 방사선학적 영상화는 동적 방사선학적 영상화, 컴퓨터 단층촬영(CT), 자기 공명 영상화(MRI) 또는 모두를 포함한다. 특정 구현예에서, 림프절은 대상체의 복강 또는 흉강에 있다. 특정 구현예에서, 림프절은 대상체의 종격동 또는 복막후 영역에 있다.

[0011] 특정 구현예에서, 본 개시의 대상체에서 하나 이상의 세포를 이식하고 이소성 조직을 성장시키는 최소 침습적 방법은 초음파 또는 방사선학적 영상화의 도움으로 바늘을 대상체의 복강 또는 흉강의 림프절(들) 내로 삽입하는 단계, 및 하나 이상의 세포를 바늘을 통해 림프절 내로 전달하여, 하나 이상의 세포를 림프절에서 생착시키고, 확장시키고, 이소성 조직으로 분화시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 내시경을 대상체의 위장관, 기도, 또는 요로를 통해 진행시키는 단계, 및 트랜스루미날 방법을 이용하여 대상체의 림프절에 도달하도록 바늘을 내장 벽을 통해 삽입하는 단계를 추가로 포함하며, 바늘은 내시경에 부착된다. 특정 구현예에서, 내시경을 진행시키는 단계, 바늘을 삽입하는 단계, 또는 둘 모두는 림프절의 초음파 영상화의 도움으로 수행된다. 특정 구현예에서, 방사선학적 영상화는 동적 방사선학적 영상화, 컴퓨터 단층촬영(CT), 자기 공명 영상화(MRI) 또는 모두를 포함한다. 특정 구현예에서, 내시경은 림프절을 탐지하도록 구성된 초음파 프로브를 포함한다.

[0012] 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 간세포, 췌장 세포 또는 췌도, 신장 세포 또는 단편, 흉선 세포 또는 단편, 또는 폐 세포 또는 단편을 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 대상체에 대해 자가, 동종, 또는 이종이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 대상체에 대해 동계이다.

[0013] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 살아있는 도너 조직으로부터 하나 이상의 세포를 분리시키는 것을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 전달 전에 냉동보존으로부터 하나 이상의 세포를 회복시키는 것을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 세포의 면역 거부를 감소시키기 위해 대상체에 면역억제제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0014] 특정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 세포를 복강 또는 흉강의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 림프절 내로 전달하는 것을 포함한다.

[0015] 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 약 20 μ m의 평균 직경의 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 하나의 단일 림프절 내로의 전달 당 적어도 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 5천만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 바늘은 1 mL 당 적어도 약 1천만, 2천만, 2천5백

만, 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 갖는 현탁 용액 중의 하나 이상의 세포를 전달한다. 특정 구현예에서, 바늘은 1 mL 당 적어도 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 또는 5천만개의 생존 세포를 갖는 현탁 용액 중의 하나 이상의 세포를 전달한다. 특정 구현예에서, 세포의 집단에서 하나 이상의 세포는 림프절 내로 전달되며, 세포의 집단은 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 약 100%의 생존 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 세포의 집단에서 하나 이상의 세포는 림프절 내로 전달되며, 전달은 하나 이상의 세포가 바늘을 통과할 때, 세포의 집단의 약 20%, 15%, 10%, 9%, 8.5%, 8%, 7.5%, 7%, 6.5%, 6%, 5.5%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.5%, 1%, 또는 0.5% 미만의 세포 생존율 감소를 유발한다.

[0016] 특정 구현예에서, 바늘의 내경은 최대 약 700 μm , 600 μm , 500 μm , 450 μm , 400 μm , 300 μm , 260 μm , 250 μm , 또는 200 μm 이다. 특정 구현예에서, 바늘의 내경은 최대 약 260 μm 이다. 특정 구현예에서, 바늘의 외경은 최대 약 1 mm, 900 μm , 800 μm , 750 μm , 700 μm , 650 μm , 600 μm , 550 μm , 520 μm , 510 μm , 500 μm , 480 μm , 450 μm , 또는 400 μm 이다. 특정 구현예에서, 바늘의 외경은 최대 약 510 μm 이다. 특정 구현예에서, 바늘은 최대 약 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 또는 27 게이지이다. 특정 구현예에서, 바늘은 최대 약 25 게이지이다. 특정 구현예에서, 바늘은 최대 약 25 게이지이며, 바늘은 1 mL 당 적어도 약 5천만개의 생존 세포를 갖는 현탁 용액 중의 하나 이상의 세포를 전달하며, 하나 이상의 세포는 적어도 약 65%의 생존 세포를 포함한다.

[0017] 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 간세포를 포함하며, 이소성 조직은 이소성 간 조직이다. 특정 구현예에서, 방법은 대상체에서 간 질환 또는 병태를 치료한다. 특정 구현예에서, 간 질환 또는 병태는 알코올 소비와 관련된 말기 간 질환 또는 간 섬유증, A, B, C 또는 D형 간염 감염증, 비알코올성 지방간 질환, 자가면역 간염, 원발성 담즙 간경변, 원발성 경화 쓸개관염, 담도 폐쇄증, 낭성 섬유증, 알라질 증후군, 매독, 브루셀라병, 기생충 감염증, 화학적 노출, 만성 담도 질환, 버드-키아리 증후군, 오슬러병, 또는 우심부전이다. 특정 구현예에서, 간 질환 또는 병태는 티로신혈증, 단풍시립뇨병, 페닐케톤뇨증, 크리글러-나자르 증후군, 옥살산증, 고옥살산뇨증, 혈액소침착증, 알파-1 항트립신 결핍, 윌슨병, 가족성 간내 담즙정체 증후군, 갈락토오스혈증, 글리코겐 축적병, 또는 가족성 아밀로이드 다발신경병증을 포함하는 대사 장애와 관련된다. 특정 구현예에서, 대상체는 대상체의 간에 혈액 공급을 감소시키고 대상체에서 간세포 기능장애를 유도하는 문맥대정맥 문합술 수술 절차 또는 경정맥경유 간내문맥 전신순환 문합술(TIPS)을 받았으며, 문맥대정맥 문합술 수술 절차는 단측 문맥대정맥 문합술, 측측 문맥대정맥 문합술, 삽입 H-이식 또는 C-이식을 포함하는 대정맥간막 문합술, 또는 중심 또는 원위 비정맥신정맥 문합술을 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 대상체에서 말기 간 질환을 치료한다.

[0018] 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 신장 세포 또는 신장 단편을 포함하며, 이소성 조직은 이소성 신장 조직이다. 특정 구현예에서, 방법은 대상체에서 신장 질환 또는 병태를 치료한다. 특정 구현예에서, 신장 질환 또는 병태는 말기 신장 질환이다.

[0019] 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 췌장 세포 또는 췌도를 포함하며, 이소성 조직은 이소성 췌장 조직이다. 특정 구현예에서, 방법은 대상체에서 인슐린 분비의 감소 또는 결여를 유발하는 내분비 췌장 질환 또는 병태를 치료한다. 특정 구현예에서, 췌장 질환 또는 병태는 대상체에서 인슐린 분비의 감소를 유발하는 제I형 당뇨병, 제II형 당뇨병, 또는 만성 췌장염이다.

[0020] 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 폐 세포 또는 폐 단편을 포함하며, 이소성 조직은 이소성 폐 조직이다. 특정 구현예에서, 방법은 대상체에서 폐 질환 또는 병태를 치료한다. 특정 구현예에서, 폐 질환 또는 병태는 만성 폐색성 폐 질환(COPD)이다. 특정 구현예에서, COPD는 담배 연기, 오염물질 및 매연, 알파-1-항트립신, 낭성 섬유증, 만성 천식, 기종, 만성 기관지염, 또는 특발성 폐섬유증에 의해 유발된다.

[0021] 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 흉선 세포 또는 흉선 단편을 포함하며, 이소성 조직은 이소성 흉선 조직이다. 특정 구현예에서, 흉선 세포 또는 단편은 도너 대상체로부터 얻어지며, 이소성 흉선 조직은 도너 대상체로부터의 세포의 이식에 대한 대상체의 도너 특이적 내성을 유도한다. 특정 구현예에서, 질환 또는 병태는 연령 관련 면역계 기능장애이며, 이소성 흉선 조직은 대상체의 면역 기능을 조절한다.

[0022] 특정 구현예에서, 림프절은 위장관에 대해 근위에 있으며, 내시경은 위장관을 따라 진행된다. 특정 구현예에서, 림프절은 십이지장 주위 림프절, 위 주위 림프절, 췌장 주위 림프절, 장간막 림프절, 회결장 림프절, 결장간막 림프절, 위 림프절, 간 비장 림프절, 비장 폐문 림프절, 식도 주위 림프절, 심장 주위 림프절, 대동맥 주위 림프절, 대동맥후 림프절, 측대동맥 림프절, 전대동맥 림프절, 소만곡 림프절, 총간 림프절, 비장 동맥 림프절,

복강 축 림프절, 장골 림프절, 또는 복막후 림프절 중 하나 이상을 포함한다. 특정 구현예에서, 림프절은 십이지장 주위 림프절을 포함한다. 특정 구현예에서, 림프절은 기도에 대해 근위에 있으며, 내시경은 기도를 따라 진행된다. 특정 구현예에서, 림프절은 종격동 영역의 하나 이상의 림프절을 포함한다. 특정 구현예에서, 림프절은 복장열 림프절, 늑간 림프절, 상형경막 림프절, 상기관기관지 림프절, 하기관기관지 림프절, 기관지폐 림프절, 기관열 림프절, 또는 폐내 림프절 중 하나 이상을 포함한다. 특정 구현예에서, 림프절은 요로에 대해 근위에 있으며, 내시경은 요로를 따라 진행된다. 특정 구현예에서, 림프절은 복막후 영역의 하나 이상의 림프절을 포함한다. 특정 구현예에서, 림프절은 외부 장골 림프절, 내부 장골 림프절, 대정맥 요추 림프절, 대동맥 요추 림프절, 표재 서혜부 림프절, 깊은 서혜부 림프절, 대동정맥사이 방광 주위 림프절, 폐색 방광 주위 림프절, 또는 천골전 방광 주위 림프절 중 하나 이상을 포함한다.

[0023] 특정 구현예에서, 대상체는 인간이다. 특정 구현예에서, 대상체는 비-인간 동물이다.

[0024] 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포를 림프절 내에 전달한 후 이소성 조직은 약 5일, 10일, 15일, 20일, 25일, 30일, 35일, 40일, 45일, 50일, 55일, 60일, 65일, 70일, 75일, 80일, 85일, 90일, 95일, 100일, 110일, 120일, 130일, 140일, 150일, 160일, 170일, 180일, 190일, 또는 약 200일 내에 형성된다.

[0025] 본 개시는 또한, 간 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 간 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 방법은 내시경을 엔도루미날 방법을 통해 대상체의 위장관, 기도, 또는 요로 내로 진행시키는 단계, 트랜스루미날 방법을 이용하여 내시경에 부착된 바늘을 초음파 영상화의 도움으로 내장 벽을 통해 대상체의 림프절 내로 삽입하는 단계, 및 하나 이상의 세포를 바늘을 통해 림프절 내로 전달하여, 림프절에서 하나 이상의 세포를 생착시키고 이소성 간 조직을 생성시키는 단계를 포함한다. 비제한적인 구현예에서, 림프절 내에 하나 이상의 세포를 전달한 후 이소성 조직은 약 5일, 10일, 15일, 20일, 25일, 30일, 35일, 40일, 45일, 50일, 55일, 60일, 65일, 70일, 75일, 80일, 85일, 90일, 95일, 100일, 110일, 120일, 130일, 140일, 150일, 160일, 170일, 180일, 190일, 또는 약 200일 내에 형성된다.

[0026] 본 개시는 대상체에서 간세포를 이식하고 이소성 간을 성장시키기 위한 시스템으로서, 내시경, 및 바늘 및 그 안에 포함된 현탁 용액 중 세포의 집단을 갖는 주사기를 포함하며, 현탁 용액은 1 mL 당 약 2천5백만 내지 약 1억개의 생존 간세포를 가지며, 바늘은 최대 약 25 게이지인, 시스템을 제공한다. 특정 구현예에서, 내시경 및 바늘은 대상체의 위장관, 기도, 또는 요로를 따라 함께 진행하도록 구성된다. 특정 구현예에서, 주사기는 바늘을 통해 하나 이상의 세포를 전달하도록 구성된다. 특정 구현예에서, 내시경은 초음파 프로브를 포함한다. 특정 구현예에서, 초음파 프로브는 대상체의 복강에서 림프절을 탐지하도록 구성된다. 특정 구현예에서, 현탁 용액은 1 mL 당 적어도 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 주사기의 세포의 집단은 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 약 100%의 생존 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 주사기의 세포의 집단은 적어도 약 65%의 생존 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 주사기의 세포의 집단은 적어도 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 5천만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 주사기의 세포의 집단은 1 mL 당 적어도 약 5천만개의 생존 세포를 포함하며, 세포의 집단은 적어도 약 65%의 생존 세포를 포함한다.

[0027] **참조문헌 포함**

[0028] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은, 각 개별 간행물, 특허, 또는 특허 출원이 참조문헌에 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 명시되는 것과 동일한 정도로 참조문헌으로 본원에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0029] 본 개시의 신규한 특징은 첨부된 청구범위에서 구체적으로 기술된다. 본 개시의 특징 및 장점의 더 나은 이해는 본 개시의 원리가 사용되는 예시적인 구현예를 기술하는 하기 상세한 설명, 및 첨부된 도면을 참조로 하여 얻어질 것이다.

도 1a는 림프절 내로의 EUS-유도 세포 전달을 위한 실험 동물에 대해 초음파 내시경술을 수행하는 내시경 의학자의 사진이다.

도 1b는 근처 림프절(LN)에 도달하는 세침 흡인 바늘의 초음파 이미지를 도시한 초음파 검사의 사진이다.

도 2는 수술 외과이에 의해 수행된 실험 동물의 십이지장 주위 림프절 내로의 간세포의 직접 주사의 사진을 도시한 것이다.

도 3은 도너 동물로부터 단리되고 상이한 게이지의 바늘을 통과한 상이한 배치의 간세포의 세포 생존율을 요약한 막대 그래프이다.

도 4는 문맥대정맥 문합술 절차 전 및 후 실험 동물의 열린 복강의 사진뿐만 아니라 문맥대정맥 문합술 절차의 다이어그램(최우측)을 도시한 것이다.

도 5는 본 개시에 따른 전임상 연구의 실험 설계를 도시한 다이어그램이다.

도 6a는 정상 간 조직에서 간세포의 마커인 CK-18의 양성 염색을 도시한 것이다.

도 6b는 전임상 연구에서 간세포의 내시경 초음파(EUS) 주사를 수용한 후 6일에 림프절에서의 CK-18 면역염색 신호의 존재를 도시한 것이다.

도 6c는 전임상 연구에서 간세포의 직접 주사를 수용한 후 6일에 림프절에서의 CK-18 면역염색 신호의 존재를 도시한 것이다.

도 7a는 내시경 초음파(EUS) 주사에 의한 림프절 내로의 자가 간세포의 이식 후 약 90일에 림프절에 간 조직의 존재를 도시한 것이다.

도 7b는 내시경 초음파(EUS) 주사에 의한 림프절 내로의 동종 간세포의 이식 후 약 90일에 림프절에 간 조직의 존재를 도시한 것이다.

도 7c는 내시경 초음파(EUS) 주사에 의한 림프절 내로의 자가 간세포의 이식 후 약 60일에 림프절에 간 조직 및 푸마릴아세토아세테이트-하이드롤라아제(FAH) 양성 간세포의 존재를 도시한 것이다.

도 7d는 내시경 초음파(EUS) 주사에 의한 림프절 내로의 동종 간세포의 이식 후 약 150일에 림프절에 간조직 및 FAH 양성 간세포의 존재를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 명확성을 위해, 그러나, 제한 없이, 본 발명에 개시된 주제의 상세한 설명은 하기 하위섹션으로 나뉘어진다:

[0031] 1. 개론;

[0032] 2. 정의;

[0033] 3. 세포 전달 절차;

[0034] 4. 이식된 세포로부터 이소성 조직의 생성;

[0035] 5. 질환 및 병태;

[0036] 6. 대상체;

[0037] 7. 시스템; 및

[0038] 8. 키트.

[0039] 1. 개론

[0040] 개론으로서, 본 개시는 생체내 장기형성의 발달을 유도하기 위한 최소 침습적 절차를 위한 방법 및 시스템에 관한 것이다. 본원에는 대상체의 림프절 내로 세포를 전달함으로써 대상체에 세포를 이식하고 이소성 조직을 성장시키기 위한 방법 및 시스템이 제공된다. 적절한 해부학적 및 기능적 특징을 갖는 림프절 내측에 전달된 세포 또는 조직 단편으로부터의 이소성 조직을 성장시키는 공정은 생체내 기관 형성으로 지칭된다. 본 개시에 의해 가능한 최소 침습적 절차는 대상체에 대한 하나 이상의 장기의 정상 기능을 보안하거나 증대시킬 수 있는 이소성 조직(들)의 생성을 유발할 수 있다.

[0041] 상기에서 논의된 바와 같이, 현재의 이식 치료법, 특히 동소 장기 이식과 관련된 하나의 문제는 말기 간 또는 신장 질환과 같은 말기 질환을 갖는 여러 환자가 동소 장기 이식 또는 다른 타입의 세포 이식을 위해 필요로 할 수 있는 대수술에 더 이상 적합하지 않을 수 있다는 것이다. 대수술과 관련하여 상당한 위험이 있을 수 있으며, 이러한 환자의 예후는 이의 악화된 건강 상태를 고려할 때 나쁠 수 있다. 일 양태에서, 본 개시는 이러한 문제를 해결하기 위한 최소 침습적 절차(예를 들어, 내시경 초음파(EUS))를 제공한다. 방법 및 시스템은 자연적 생물반응기로서 림프절을 사용하여 이소성 부위에서 해부학적으로 온전하고 완전히 또는 적어도 부분적으로 기능

하는 장기를 생성할 수 있다. 본원에 제공된 방법 및 시스템은 종종 추가 수술 절차와 관련될 수 있는 말기 장기 질환을 갖는 환자에 대한 질병률 및 사망률을 최소화할 수 있다. 본 개시는 또한, 본원에 기술된 수술 절차들 중 적어도 일부를 외래 환자 기준으로 수행할 수 있고, 이에 따라, 초기 절차 비용을 감소시킬 수 있다.

[0042] 본원에서 사용되는 용어 "이소성 조직"은 신체의 이소성(비-본래) 위치에 존재하고 일반적으로, 신체의 본래 위치에서 발견될 수 있는 건강한 기관 또는 조직과 유사하거나 동일한 하나 이상의 형태학적 및/또는 기능적 특성을 갖는 조직을 지칭할 수 있다. 용어 "기능성 이소성 조직"은 신체의 본래 위치에서 일반적으로 발견될 수 있는 건강한 기관 또는 조직의 기능들 중 하나 이상을 갖는 이소성 조직을 지칭할 수 있다. 용어 "이소성 위치"는 대상체의 본래 위치에 상대적인 위치를 기술하기 위해 이용될 수 있으며, 예를 들어, 이소성 위치는 대상체의 신체에서 본래 위치와는 상이한 위치를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 림프절에서 간은 이소성이고, 즉, 간 조직이 통상적으로 림프절에서 발견되지 않기 때문에 건강한 정상 포유류 신체에서 이소성 간이다. 본 개시의 일부 양태에 따르면, 이소성 조직은 형태학적으로 간세포와 닮은 세포의 집단을 포함하는 림프절에서 성장할 수 있고, 총괄적으로, 건강한 고유 간이 수행할 수 있는 하나 이상의 기능을 수행할 수 있다.

[0043] 특정 구현예에서, 방법은 내시경을 대상체의 체강 또는 폐쇄된 체강 내로 진행시키는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 내시경을 대상체의 위장(GI)관, 기도, 또는 요로 내로 진행시키는 것을 포함한다.

[0044] 특정 구현예에서, 내시경은 엔도루미날 방법을 통해 대상체의 체강 내로 진행된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에서 사용되는 용어 "엔도루미날 방법"은 임의의 방법, 예를 들어, 대상체의 체강 내로 내시경을 삽입하기 위한 당해 분야에 공지된 방법 및 디바이스를 지칭한다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 방법은 내시경을 엔도루미날 방법을 통해 대상체의 위장(GI)관, 기도, 또는 요로 내로 진행시키는 것을 포함한다.

[0045] 특정 구현예에서, 방법은 또한, 바늘을 대상체의 림프절 내로 삽입하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서, 바늘은 내시경에 부착된다. 특정 구현예에서, 내시경에 부착된 바늘은 내장 벽을 통해 림프절 내로 삽입된다. 내장 벽의 비제한적인 예는 관(tract), 예를 들어, 위, 십이지장, 기관, 기관지, 또는 방광을 따라 속이 빈 내장 및/또는 기관을 둘러싸는 해부학적 구조를 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 또한, 바늘을 트랜스루미날 방법을 통해 삽입하는 것을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "트랜스루미날 방법"은 임의의 방법, 예를 들어, 내시경을 사용을 통해 강(lumen)을 가로질러 작업 기구(예를 들어, 바늘)를 삽입하기 위한 당해 분야에 공지된, 방법 및 디바이스를 지칭한다.

[0046] 특정 구현예에서, 방법은 또한, 하나 이상의 세포를 바늘을 통해 림프절 내로 전달하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 하나의 단일 세포를 림프절 내로 전달하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 세포의 집단을 림프절 내로 전달하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 세포의 집단은 하나의 세포 타입을 포함한다. 특정 구현예에서, 세포의 집단은 적어도 2개의 세포 타입을 포함한다. 특정 구현예에서, 림프절 내로 전달된 하나 이상의 세포는 림프절에서 생착하고, 이소성 조직을 생성할 수 있다.

[0047] 특정 구현예에서, 내시경의 진행, 바늘의 삽입, 또는 둘 모두는 최소 침습적 또는 비-침습적 방법에 의해 수행된다. 예를 들어, 초음파-매개 이미지화 또는 다른 탐지 방법은 타겟 림프절의 위치를 위해 본원에 제공된 방법에서 적용될 수 있다. 과정 동안에, 초음파 영상화 또는 다른 방법, 예를 들어, 최소 침습적 또는 비침습적 탐지 방법은 내시경의 진행, 적합한 타겟 림프절의 위치화, 또는 내장 벽을 통해 또는 타겟 림프절 내로의 바늘 삽입의 모니터링 중 어느 하나에 대해 적용될 수 있다.

[0048] 다른 양태에서, 본 개시는 초음파의 도움으로 대상체의 복부, 골반 또는 흉강에서의 림프절 내로 바늘을 삽입하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 방법은 또한, 바늘을 통해 림프절 내로 하나 이상의 세포를 전달하는 것을 포함할 수 있다. 림프절의 초음파-유도 위치는 이용 가능한 임의의 기술에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 세포의 주사를 위해 적합한 림프절을 동정하고 위치시키기 위해 초음파 영상화가 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, 초음파 분광법은 림프절을 탐지하기 위해 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, 초음파 영상화 또는 분광법은 림프절의 국소화를 위한 다른 탐지 방법과 함께 이용될 수 있다.

[0049] 특정 구현예에서, 방법은 대상체의 림프절 내로 세포의 집단을 전달하는 것을 포함하며, 여기서, 간세포의 집단은 림프절에서 생착시키고 이소성 간을 생성시킨다. 특정 구현예에서, 방법은 또한, 대상체의 간으로 혈액 공급을 감소시키는 것을 포함한다. 본 개시에 의해, 대상체의 간으로의 혈액 공급의 감소가 림프절에서 이소성 간의 성장에 유익하다는 것이 발견되었다.

[0050] **2. 정의**

[0051] 본 출원에서, 단수 형태의 사용은 달리 구체적으로 기술하지 않는 한 복수 형태를 포함한다. 본 명세서에서 사

용되는, 단수 형태("a," "an" 및 "the")가 문맥이 달리 명확하게 명시하지 않는 한, 복수 지시대상을 포함한다는 것이 주지되어야 한다.

[0052] 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 기술하지 않는 한, "및/또는"을 의미한다. 본원에서 사용되는 용어 "및/또는" 및 "이들의 임의의 조합" 및 문법적으로 이에 대응하는 용어는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 이러한 용어들은 임의의 조합이 구체적으로 고려됨을 전달할 수 있다. 오로지 예시 목적을 위해서만, 하기 구 "A, B, 및/또는 C" 또는 "A, B, C, 또는 이들의 임의의 조합"은 "개별적으로, A; 개별적으로, B; 개별적으로, C; A 및 B; B 및 C; A 및 C; 및 A, B, 및 C"를 의미한다. 용어 "또는"은 문맥이 구체적으로 분리 사용(disjunctive use)을 지칭하지 않는 한, 결합하여 또는 분리하여 사용될 수 있다.

[0053] 또한, 용어 "포함하는(including)"뿐만 아니라, "포함하다(include, includes)" 및 "포함된(included)"과 같은 다른 형태의 사용은 제한적이지 않다.

[0054] 본 명세서에서 "일부 구현예," "특정 구현예," "구현예," "하나의 구현예," 또는 "다른 구현예"는 구현예와 관련하여 기술된 특징의 특성, 구조 또는 특징이 적어도 일부 구현예에 포함되지만, 반드시 본 개시의 모든 구현예는 아님을 의미한다.

[0055] 본 명세서 및 청구항(들)에서 사용되는 단어 "포함하는(comprising)"(및 "포함하다(comprise, comprises)"와 같은 포함하는의 임의의 형태), "갖는(having)"(및 "가지다(have, has)"와 같은 갖는의 임의의 형태), "포함하는(including)"(및 "포함하다(contains, include)"와 같은 포함하는의 임의의 형태) 또는 "함유하는(containing)"(및 "함유하다(contains, contain)"와 같은 함유하는의 임의의 형태)은 포괄적이거나 개방형이고, 추가적인, 인용되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 본 명세서에 논의된 임의의 구현예가 본 개시의 임의의 방법 또는 조성물과 관련하여 구현될 수 있으며, 그 반대도 마찬가지라는 것이 고려된다. 또한, 본 개시의 조성물은 본 개시의 방법을 달성하기 위해 사용될 수 있다.

[0056] 본원에서 사용되는 기준 수치 및 문법적으로 이에 대응하는 것과 관련하여 용어 "약"은 수치 자체 및 그러한 수치값에서 플러스 또는 마이너스의 값의 범위를 포함할 수 있다.

[0057] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 측정하는 경우 특정 값에 대한 허용 가능한 오차 범위 내임을 의미하며, 이는 부분적으로, 값이 어떻게 측정되거나 결정되는 지, 즉, 측정 시스템의 한계에 의존적일 것이다. 예를 들어, "약"은 당분야의 관행에 따라 1 또는 1 초과의 표준 편차 내를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 제공된 값의 최대 20%, 최대 10%, 최대 5%, 또는 최대 1%의 범위를 의미할 수 있다. 다른 예에서, "약 10"의 양은 10 및 9 내지 11의 임의의 양을 포함한다. 또 다른 예에서, 참조 수치 값과 관련하여 용어 "약"은 또한, 값 플러스(plus) 또는 마이너스(minus) 그러한 값으로부터의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1%의 범위를 포함할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정과 관련하여, 용어 "약"은 값의 10배(an order of magnitude) 내, 바람직하게는, 5배 내, 및 더욱 바람직하게는, 2배 내임을 의미할 수 있다. 특정 값이 출원 및 청구범위에 기술된 경우에, 달리 기술하지 않는 한, 특정 값에 대한 허용 가능한 오차 범위 내를 의미하는 용어 "약"이 가정되어야 한다.

[0058] 3. 세포 전달 절차

[0059] 특정 구현예에서, 대상체의 림프절 내로 세포의 트랜스루미날 전달을 위해 내시경을 이용한다. 특정 구현예에서, 림프절은 내시경의 이용을 통해 도달될 수 있는 신체 내강 또는 폐쇄 체강에 대해 근위에 또는 신체 내강 또는 폐쇄 체강 내에 위치되어 있다. 특정 구현예에서, 림프절은 대상체의 복부, 골반 또는 흉강에 위치되어 있다.

[0060] 본원에서 사용되는 용어 "내시경"은 대상체, 예를 들어, 인간 대상체 또는 비-인간 포유류 대상체, 예를 들어, 개, 돼지, 말, 당나귀, 토끼, 소, 마우스, 또는 래트의 신체 내에 도입될 수 있고 대상체의 내부 부분의 관찰을 제공할 수 있는 임의의 기구를 지칭할 수 있다. 때때로, 관찰(view)은, 예를 들어, 내시경에 조명 광학이 장착되거나 달리 조명이 보조될 때 육안 검사를 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시의 내시경은 하나 이상의 탐지 프로브를 포함하거나, 하나 이상의 탐지 프로브에 부착되거나 결합되고, 대상체의 내부 부분의 검사를 위한 상이한 탐지 모드를 제공한다. 예를 들어, 내시경은 육안 검사를 위한 조명 광학, 초음파-매개 탐지(예를 들어, 초음파 영상화)를 위한 초음파 프로브, 또는 방사선, 적외선 신호, 고주파 신호, 또는 형광 신호를 위한 탐지기를 가질 수 있다.

[0061] 본원에 기술된 내시경은 하기 부분들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 대상체의 루미날 관(luminal tract)(예를 들어, GI관, 기도, 또는 요로)을 따라 이동시키기 위한 강성 또는 가요성 튜브; 검사 시에 기관 또는 물체를 조

명하기 위한 광 전달 시스템; 이미지를 대물 렌즈에서 뷰어(viewer), 접안 렌즈 또는 바디의 내측의 내시경에 의해 포착된 이미지를 나타내는 비디오 시스템으로 전송하기 위한 렌즈 시스템; 의료 기구 또는 조작기의 진입을 허용하는 하나 이상의 채널. 광원은 바디의 외측에 또는 미니 사이즈로 존재할 수 있고, 내시경의 내측에 장착될 수 있다. 광원이 바디 외측에 있을 때, 광은 광섬유 시스템을 통해 전송될 수 있다. 바디 내측에 포착된 광 이미지를 전송하기 위한 광학 시스템, 예를 들어, 광섬유가 존재할 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 본원에 제공된 내시경에는 상이한 목적을 위한 다른 탐지 기구가 장착될 수 있다(예를 들어, 이를 부분으로서 포함하거나, 여기에 부착될 수 있다).

[0062] 본원에 제공된 방법은 대상체의 신체 내강 또는 폐쇄 체강에 내시경을 진행시키는 것을 포함할 수 있다. 신체 내강의 비제한적인 예는 위장(GI)관(예를 들어, 식도, 위, 십이지장, 소장, 대장, 결장, 담관, 직장, 항문), 기도(예를 들어, 코, 하부 기도), 귀, 요로, 자궁경부, 자궁, 및 나팔관을 포함한다. 폐쇄 체강의 비제한적인 예는 복강, 및 골반강을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 대상체의 위장관, 기도, 또는 요로에 내시경을 진행시키는 것을 포함한다.

[0063] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 신체 내강 또는 폐쇄 체강에 대해 근위에 또는 신체 내강 또는 폐쇄 체강에 위치한 적어도 하나의 림프절 내로 세포를 전달하기 위해 대상체의 신체 내강을 따라 또는 폐쇄 체강에 내시경을 진행시키는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 림프절의 위치는 세포 이식의 목적을 기반으로 하여 선택된다. 특정 구현예에서, 내강 및/또는 폐쇄 체강은 세포 이식에 적합한 림프절을 기반으로 하여 선택된다.

[0064] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 GI관에 대해 근위에 있는 하나 이상의 림프절 내로 세포를 전달하기 위해 GI관을 따라 내시경을 진행시키는 것을 포함한다. GI관의 상부 부분 또는 하부 부분에 대해 근위에 있는 림프절 내로 세포를 전달하기 위해 내시경(예를 들어, 식도경 또는 위내시경)이 이용될 수 있다. 예를 들어, 식도에 가까운 림프절 내로 세포를 전달하기 위해 식도경이 이용될 수 있으며, 위 주위 및/또는 십이지장 주위 림프절 내로 세포를 전달하기 위해 위내시경이 이용될 수 있다. 본원에 제공된 방법을 이용하여 세포가 전달될 수 있는 GI관에 대해 근위에 있는 림프절의 비제한적인 예는 십이지장 주위 림프절, 위 주위 림프절, 체장 주위 림프절, 장간막 림프절, 회결장 림프절, 결장간막 림프절, 위 림프절, 간 비장 림프절, 비장 폐문 림프절, 식도 주위 림프절, 심장 주위 림프절, 대동맥 주위 림프절, 대동맥후 림프절, 측대동맥 림프절, 전대동맥 림프절, 소만곡 림프절, 종간 림프절, 비장 동맥 림프절, 복강 측 림프절, 장골 림프절, 및 복막후 림프절을 포함한다. 내시경은 대상체의 입으로부터, 또는 특정 구현예에서, 대상체의 코로부터 도입될 수 있다. 대안적으로, 내시경은 대상체의 항문으로부터 도입될 수 있으며, 예를 들어, 직장경, S자 결장경, 또는 결장경은 직장 또는 결장에 가까운 림프절 내로 세포를 전달하기 위해 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, 내시경은 위장관을 따라 유연하게 이동할 수 있으며, 세포 이식의 목적을 위해 적합한 림프절을 위치시키기 위해 조사 검사가 수행된다.

[0065] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 기도에 대해 근위에 있는 하나 이상의 림프절 내로 세포를 전달하기 위해 대상체의 기도를 따라 내시경을 진행시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 대상체의 기관 또는 폐의 기관지, 또는 후두에 가까운 림프절을 타겟으로 하기 위해 기관지경 또는 후두경이 사용된다. 본원에 제공된 방법을 이용하여 세포가 전달될 수 있는 기도에 대해 근위에 있는 림프절의 비제한적인 예는 복장열 림프절, 늑간 림프절, 상형경막 림프절, 상기관기관지 림프절, 하기관기관지 림프절, 기관지폐 림프절, 기관열 림프절, 및 폐내 림프절을 포함한다. 기관지경 또는 후두경은 대상체의 입으로부터, 또는 특정 구현예에서, 대상체의 코로부터 도입될 수 있다.

[0066] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 요로에 대해 근위에 있는 하나 이상의 림프절 내로 세포를 전달하기 위해 대상체의 요로를 따라 내시경을 진행시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 요도 또는 방광에 가까운 림프절을 타겟으로 하기 위해 방광경이 이용된다. 방광경은 대상체의 요도로부터 도입될 수 있다. 본원에 제공된 방법을 이용하여 세포가 전달될 수 있는 요로에 대해 근위에 있는 림프절의 비제한적인 예는 외부 장골 림프절, 내부 장골 림프절, 대정맥 요추 림프절, 대동맥 요추 림프절, 포개 서혜부 림프절, 깊은 서혜부 림프절, 대동정맥사이 방광 주위 림프절, 폐색 방광 주위 림프절, 또는 천골전 방광 주위 림프절 중 하나 이상을 포함한다.

[0067] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 세포를 폐쇄된 체강 내측 또는 부근의 적어도 하나의 림프절 내로 전달하기 위해 내시경을 폐쇄된 체강(예를 들어, 복강, 골반강) 안으로 진행시키는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 내시경은 최소 절개를 통해, 예를 들어, 복부의 표면 상의 최소 절개를 통해 폐쇄된 체강 내로 도입된다. 특정 구현예에서, 폐쇄된 체강은 복강 또는 골반강이다. 복강 또는 골반강 내측 또는 부근의 림프절의 비제한적인 예는 비장 림프절, 간 림프절, 낭포 림프절, 추간공 림프절, 우/좌측 위 림프절, 유문 림프절, 상유

문 림프절, 하유문 림프절, 레트로 유문 림프절, 상췌장 림프절, 하위 림프절, 상/하위 췌십이지장 림프절, 하위 장간막 림프절, S상 림프절, 상직장 림프절, 결장간막 림프절, 좌결장 림프절, 우결장 림프절, 중간 결장 림프절, 충수 림프절, 회결장 림프절, 막창자뒤 림프절, 덮개앞 림프절, 상장간막 림프절, 좌측 요추 림프절, 측대동맥 림프절, 및 전대동맥 림프절을 포함한다.

[0068] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법 및 시스템은 세포가 이식되는 림프절을 위치시키기 위해 및/또는 체강 또는 폐쇄된 체강을 통해 내시경을 진행시키는 단계, 바늘을 삽입시키는 단계 또는 이들의 임의의 조합을 유도하기 위해 초음파를 이용한다. 초음파는 인간 가정의 상한선보다 높은 주파수를 갖는 음파이며, 이는 약 20 kHz 초과 내지 수 기가헤르츠일 수 있다. 초음파 영상화(또는 초음파 검사)는 본원에 제공된 방법 및 시스템을 적용하는 의도된 목적에 따라 다양한 방식으로 수행될 수 있다. 초음파 검사의 비제한적인 예는 도플러 초음파 검사, 콘트라스트 초음파 검사, 분자 초음파 검사, 탄성 초음파, 중재적 초음파 검사, 및 압박 초음파 검사를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에서 사용되는 초음파 영상화 기술은 국제특허공개 WO2018222724A1호 및 WO2018134729A1호에 기술된 것과 같은 기술을 이용하여, 주사를 위해 적합한 림프절을 위치시킬 목적을 위해 높은 공간적 및/또는 시간적 해상도를 가지며, 이러한 문헌 각각은 본원에 참고로 포함된다.

[0069] 본 개시의 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 초음파 영상화와 조합하여 내시경을 이용하며, 여기서, 내시경은 초음파 프로브에 (예를 들어, 내시경의 일부로서 또는 별도의 조각으로서) 부착된다. 본원에서 상호 교환 가능하게 사용되는, 용어 "초음파 내시경술," "내시경 초음파," 또는 "EUS"는 내시경이 흉부, 복부 및 골반, 또는 신체의 다른 내부 구조에서의 내부 장기를 탐지하고/하거나(예를 들어, 이의 이미지를 얻고/얻거나) 이를 조작하기 위해 초음파와 결합되는 의학적 절차를 지칭할 수 있다. 본원에 제공된 방법 및 시스템에서 이용되는 EUS 기구 및 기술은 현재 상업적으로 입수 가능한 것, 및/또는 미국특허공개 US20060106306A1호 및 US20070237373A1호, 및 국제특허공개 WO1998009247A1호에 기술된 것일 수 있으며, 이러한 문헌들 각각은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0070] 특정 구현예에서, 타겟 림프절(예를 들어, 하나 이상의 세포가 전달되는 림프절)의 초음파 영상화는 방사선학적 영상화와 같은 다른 이미지화 기술의 도움으로 수행된다. 방사선학적 영상화는 동적 방사선학적 영상화(형광투시법), 컴퓨터 단층촬영(CT), 또는 자기 공명 영상화(MRI)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 컴퓨터 단층촬영(CT)은 대상체의 전체 신체 또는 일부 국소 장기(들) 또는 조직(들)의 해부학적 정보를 얻기 위해 수행된다. 특정 구현예에서, 자기 공명 또는 이용 가능한 임의의 다른 의료 기술은 대상체의 복부, 골반 또는 흉강에 타겟 림프절을 위치시키기 위한 초음파 영상화와 함께 또는 대신에 이용된다.

[0071] 본원에 제공된 방법 및 시스템은 하나 이상의 세포를 림프절 내로 전달하기 위한 바늘을 이용하는 것을 포함할 수 있다. 바늘은 주사기의 일부일 수 있으며, 이는 전달되는 세포를 수용하고 전달을 위해 세포를 바늘을 통해 밖으로 밀어내도록 구성될 수 있다. 본원에 제공된 바늘은 특정 정도의 침예도 및 강성도를 갖도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 바늘은 림프절 내로 삽입되어야 한다. 특정 구현예에서, 바늘은 또한, GI관(예를 들어, 식도, 위, 장, 또는 결장의 벽), 기도, 요로(예를 들어, 요도 또는 방광의 벽)의 벽을 침투하도록 구성되며, 이에 따라, 바늘은 관 외측으로 림프절에 도달할 수 있다. 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 바늘은 본원에 개시된 방법과 함께 이용될 수 있다.

[0072] 특정 구현예에서, 바늘은 내시경에, 예를 들어, 내시경의 일부로서 또는 별도의 기구로서 부착된다. 바늘은 미세 바늘 흡입(FNA) 절차에서 사용되는 것일 수 있다. FNA 바늘은 본 개시의 교시를 적용할 목적으로 상업적으로 입수 가능하거나 구체적으로 설계될 수 있다. FNA 바늘은 통상적으로 생검 목적을 위해 이용되어, 예를 들어, 진단 목적을 위해 조직으로 절단하고 조직 단편을 흡인한다. 본원에 제공된 방법 및 시스템에서, FNA 바늘은 대신에 세포 전달 목적을 위해 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, FNA 바늘은 선형 어레이 내시경 초음파 EUS/FNA 장치를 통해 작동된다. 예시적인 EUS/FNA 장치는 반강성 보호 외피 내에 FNA 바늘(예를 들어, 단단한 탈착식 스타일렛을 갖는 중공 바늘)의 제어되고 측정된 진행을 위해 구성될 수 있다. EUS/FNA 장치는 또한, 스타일렛 삽입 또는 회수를 위한 및 살아있는 세포가 삽입될 수 있는 시린지의 부착을 위한 포트를 구비한 핸들을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 바늘은 보호 외피 내에서, 내시경 초음파 장치로부터 EUS 프로브로 음향적으로 동정된 림프절 내로 삽입된다. 이후에, 바늘은 외피 밖으로 진행되고, 직접 초음파 유도 하에서 타겟 림프절 내로 트랜스루미날로 삽입될 수 있다. 시린지의 침단에 부착된 스톱콕은 바늘 바디 내에 진공을 생성시키고 유지시키는 데 도움을 줄 수 있다. 바늘 침단이 타겟 림프절에 있고 스타일렛이 제거된 직후에, 배양 배지 중에 살아있는 세포를 포함하는 시린지는 바늘 핸들에 연결될 수 있다. 스톱콕이 개방된 직후에, 림프절 실질조직 내에 배치된 바늘은 세포를 즉시 및 직접 관찰 하에서 주입할 수 있게 한다. 바늘은 핸들의 원위 부분에 조정 가능한 스페이서/슬라이더를 가질 수 있어 내시경에 존재하는 외피의 길이의 변형할 수 있으며, 이는 근처 림프절에 주사할

때 추가 수준의 안전성 및 정확성을 보장할 수 있다.

- [0073] 특정 구현예에서, 바늘, 예를 들어, 바늘의 크기는 림프절 내로 세포를 용이하게 주입하도록 구성된다. 특정 구현예에서, 바늘의 크기(예를 들어, 게이지)는 타겟 림프절의 위치, 전달되는 세포의 타입, 및 전달되는 세포의 양을 기초로 하여 선택된다. 특정 구현예에서, 바늘이 작을수록, 타겟 림프절에 도달하고 삽입하는 데 더 유연하다. 특정 구현예에서, 비교적 큰 바늘 둘레에 벌려 둘 수 있는, 작은 타겟 림프절 내에 비교적 작은 바늘이 더 용이하게 삽입된다. 특정 구현예에서, 바늘의 크기, 예를 들어, 바늘의 내경은 바늘을 막지 않으면서 세포를 밀어낼 수 있도록 구성된다. 본원에서 사용되는, 바늘의 크기는 바늘이 주사기의 다른 부분과 결합하는 바늘의 허브가 아닌, 바늘의 침단의 크기를 지칭한다. 본원에 개시된, 바늘의 외경은 침단으로부터 바늘의 벽의 외측의 제1의 전체 직경을 지칭하며, 바늘의 내경은 침단으로부터 바늘의 벽의 내측의 제1의 전체 직경을 지칭한다.
- [0074] 특정 구현예에서, 바늘은 최대 약 700 μm , 600 μm , 500 μm , 450 μm , 400 μm , 300 μm , 260 μm , 250 μm 또는 200 μm 의 내경을 갖는다. 특정 구현예에서, 바늘은 최대 약 260 μm 의 내경을 갖는다. 특정 구현예에서, 바늘의 내경은 약 700 μm , 600 μm , 500 μm , 450 μm , 400 μm , 300 μm , 260 μm , 250 μm , 또는 200 μm 일 수 있다. 특정 구현예에서, 바늘의 내경은 약 260 μm 이다. 바늘은 최대 약 1 mm, 900 μm , 800 μm , 750 μm , 700 μm , 650 μm , 600 μm , 550 μm , 520 μm , 510 μm , 500 μm , 480 μm , 450 μm , 또는 400 μm 의 외경을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 바늘의 외경은 최대 약 510 μm 이다. 특정 구현예에서, 바늘의 외경은 약 1 mm, 900 μm , 800 μm , 750 μm , 700 μm , 650 μm , 600 μm , 550 μm , 520 μm , 510 μm , 500 μm , 480 μm , 450 μm , 또는 400 μm 이다. 특정 구현예에서, 바늘의 외경은 약 510 μm 이다. 특정 구현예에서, 바늘은 ISO 7864:2016에 따라 규정된 바와 같이, 특정 게이지를 갖는다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 바늘은 약 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 또는 27 게이지(ga)이다. 특정 구현예에서, 바늘은 최대 약 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 또는 27 ga이다. 바늘은 최대 약 25 ga일 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 특정 게이지 크기와 비교하여 바늘의 크기가 비교될 때, ISO 7864:2016에 의해 규정된 바와 같이 그러한 특정 게이지의 표준화된 피하 주사기 바늘의 외경과 바늘의 외경을 비교한다. 특정의 다른 구현예에서, 바늘은 비교적 작은 외경 및 비교적 큰 내경을 갖는다. 특정 구현예에서, 바늘은 비-표준 크기를 가지고, 예를 들어, 큰 내경 및 작은 외경을 유지하면서 얇은 벽을 갖는다.
- [0075] 바늘의 주사기 내측의 세포의 총수 및 세포 농도는 여러 인자, 예를 들어, 주사되는 세포의 크기, 생성되는 이소성 조직의 타입, 세포의 증식 능력, 이소성 조직의 타겟 질량, 주사용 바늘의 크기, 및 타겟 림프절의 크기를 기초로 하여 선택된다.
- [0076] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 주사를 위한 적어도 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 5천만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 1억, 2억, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 8억, 9억, 10억, 30억, 50억, 80억, 100억, 200억, 500억, 또는 1000억개의 세포를 수용한다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 주사를 위한 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 5천만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 1억, 2억, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 8억, 9억, 10억, 30억, 50억, 80억, 100억, 200억, 500억, 또는 1000억개의 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 주사를 위한 최대 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 5천만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 1억, 2억, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 8억, 9억, 10억, 30억, 50억, 80억, 100억, 200억, 500억, 또는 1000억개의 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 주사기는 주사를 위한 약 5천만 내지 약 2억개의 세포를 수용한다.
- [0077] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 이소성 간의 생성을 위한, 적어도 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 5천만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 간세포를 수용한다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 이소성 간의 생성을 위한 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 5천만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 간세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 이소성 간의 생성을 위한, 최대 약 1천만, 2천만, 3천만, 4천만, 5천만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 간세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 주사기는 이소성 간의 생성을 위한 약 5천만 내지 약 2억개의 세포를 수용한다.
- [0078] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 1 mL 당 적어도 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 1억, 2억, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 8억, 9억, 10억, 30억, 50억, 80억, 또는 100억개의 세포를 갖는 세포의 현탁 용액을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 1 mL 당 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 1억, 2억, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 8억, 9억, 10억, 30억, 50억, 80억, 또는 100억개의 세포를 갖는 세포의 현탁 용액을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 1 mL 당 최대 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백

만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 1억, 2억, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 8억, 9억, 10억, 30억, 50억, 80억, 또는 100억개의 세포를 갖는 세포의 현탁 용액을 갖는다.

[0079] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 이소성 간의 생성을 위한, 1 mL 당 적어도 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 갖는 간세포의 현탁 용액을 수용한다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 이소성 간의 생성을 위한, 1 mL 당 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 갖는 간세포의 현탁 용액을 수용한다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 이소성 간의 생성을 위한, 1 mL 당 최대 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 갖는 간세포의 현탁 용액을 수용한다.

[0080] 특정 구현예에서, 간세포의 주사를 위한 바늘은 최대 약 25 게이지인 것으로 선택되며, 바늘은 1 mL 당 적어도 약 5천만개의 생존 세포를 갖는 현탁 용액 중에서 간세포를 전달한다. 특정 구현예에서, 주사기 내측의 세포의 집단은 적어도 약 65%의 생존 세포를 갖는다.

[0081] 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 림프절 내로 전달된 세포의 생존력은 이소성 조직의 형성 및 기능에 대해 중요할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포의 집단에서 생존력 백분율은 제어되어야 한다. 주사기, 예를 들어, 바늘은 전달 과정 동안 세포의 생존력을 유지하도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 바늘 크기 및 현탁 용액의 세포 농도는, 세포가 세포 전달 과정 동안 바늘을 통과할 때 생존력 백분율이 크게 감소하지 않도록 구성될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포 전달은 세포가 바늘을 통과할 때 세포의 집단에서 세포 생존율의 약 20%, 15%, 10%, 9%, 8.5%, 8%, 7.5%, 7%, 6.5%, 6%, 5.5%, 5%, 4.5%, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.5%, 1%, 또는 0.5% 미만의 감소를 초래한다. 특정 구현예에서, 세포 생존율의 감소는 세포가 세포 전달 동안 바늘을 통과할 때(예를 들어, 주사 전 세포의 생존력과 비교하여) 약 10% 미만이다.

[0082] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 대상체의 간에 대한 혈액 공급을 감소시키고, 대상체의 림프절 내로 하나 이상의 간세포를 전달하는 것을 포함한다. 대상체의 간에 대한 혈액 공급의 감소는 간세포 기능장애, 예를 들어, 적어도 일부의 간세포의 기능장애 또는 사멸, 및 결과적으로, 간 기능의 감소 또는 상실을 유도할 수 있다. 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 간으로의 혈액 공급의 감소 후에 대상체에서 간 기능의 감소 또는 상실은 림프절 내로의 간세포 이식 후 림프절에서 이소성 간의 성장에 보완적 영향을 미칠 수 있다. 다시 말해서, 간으로부터의 혈액 공급을 감소시키는 단계는, 특정 구현예에서, 림프절에서 이소성 간의 형성을 촉진시키고/시키거나, 특정 구현예에서, 림프절에서 이소성 간의 기능적 성능을 개선시킨다. 방법의 특정 구현예에서, 세포 전달은 간으로의 혈액 공급을 감소시키는 단계와 조합하여 수행될 때, 간세포의 직접 주사(예를 들어, 대수술 또는 경피 수술을 통해) 또는 간세포의 EUS-유도 주사에 의해 수행된다.

[0083] 문맥 정맥으로부터 혈액 유입을 재유도하는 것을 포함할 수 있는, 간으로의 혈액 공급을 감소시키기 위해 수술 방법이 이용될 수 있다. 예를 들어, 경정맥경유 간내문맥 전신순환 문합술(TIPS) 절차는 유입 문맥정맥과 유출 간 정맥 간에 직접 소통을 확립시키기 위해 수행되며, 이에 따라, 간을 통한 혈류가 감소될 수 있다. TIPS는 문맥 정맥과 간 정맥 간에 소통을 확립시키는 간 내의 인공 채널을 지칭한다. TIPS는 말기 간 질환으로 인한 진행성 문맥고혈압의 해로운 내장 및 전신 혈액역학 영향을 완화시키기 위해 단독 요법으로서 이용되었다. 특정 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 림프절에서 이소성 간을 생성하기 위해 림프절에서 간세포 이식과 함께 TIPS를 이용하는 것을 포함한다.

[0084] 경정맥경유 간내 문맥전신 문합술은 복강을 개방하는 것을 포함하는 대수술 또는 최소 침습적 절차를 통해 간에서 외과적으로 배치될 수 있다. 특정 구현예에서, 경정맥경유 간내 문맥전신 문합술은 형광 유도 하에서 배치된다. 간으로의 접근은 목의 내부 경정맥을 통해 얻어질 수 있다. 경정맥으로의 접근이 확인된 직후에, 가이드와 이어 및 유도관(introducer sheath)은 문합술의 배치를 용이하게 하기 위해 배치될 수 있다. 이러한 단계는 상대 정맥을 하대 정맥으로 및 마지막으로 간 정맥으로 이동시킴으로써 환자의 간 정맥으로의 접근을 가능하게 할 수 있다. 카테터가 간 정맥에 있으면, 간에서 압력 구배를 계산하기 위해 웨지 압력이 얻어질 수 있다. 이후에, 문맥 정맥을 위치시키기 위해 이산화탄소가 주입될 수 있다. 이후에, Colapinto로서 공지된 특수 바늘은 간의 중심 부근에서, 큰 문맥 정맥에 간 정맥을 연결하기 위해, 간 실질조직을 통해 진행될 수 있다. 문합술을 위한 채널은 다음으로 바늘에 의해 생성된 관을 따라 간 내에 혈관성형 벌룬을 팽창시킴으로써 생성될 수 있다. 고압 문맥 정맥과 저압 간 정맥 사이에 관을 유지시키기 위해 스텐트 또는 내부 이식편으로서 공지된 특수 메시 튜브를 배치시킴으로써 문합술이 완료될 수 있다. 절차 후에, 배치를 나타내기 위해 형광투시 이미지가 만들어질 수 있다.

- [0085] 특정의 다른 구현예에서, 문맥대정맥 문합술 절차는 간에 대한 혈액 공급을 감소시키기 위해, 문맥 정맥과 하대 정맥 간에 소통을 확립하기 위해 수행된다. 문맥대정맥 문합술은 비제한적으로, 실시예 2에 기술된 절차와 같은 외과적 방법에 의해 배치될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 수술 절차는 단측 또는 측측 문맥대정맥 문합술(SSPCS), 삽입 H- 또는 C-이식을 포함하는 대정맥간막 문합술(MCS), 및 비정맥신정맥 문합술(SRS)(중심 또는 원위 중 어느 하나)을 포함할 수 있다.
- [0086] 특정 구현예에서, 간세포는 간에 대한 혈액 공급이 감소된 후에 림프절로 전달된다. 특정 구현예에서, 간세포 이식은 간에 대한 혈액 공급을 감소시키는 단계 직후에 수행된다. 특정 구현예에서, 간세포 이식은 간에 대한 혈액 공급을 감소시키는 단계 후 소정 기간에, 예를 들어, 약 1시간, 2시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 7일, 10일, 2주, 3주, 또는 4주에 수행된다. 특정 구현예에서, 이러한 간격은 생명을 위협할 수 있는 완전한 간 부전을 피하기 위해, 특정 시간보다 더 길 수 없다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 간격은 약 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 7일, 10일, 2주, 3주, 또는 4주보다 더 짧다. 대안적으로, 간세포 이식은 또한, 간에 대한 혈액 공급을 감소시키는 단계 직전에 수행될 수 있다. 특정 구현예에서, 간격은 약 1시간, 2시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 7일, 10일, 2주, 또는 3주보다 짧을 수 있다. 2개의 단계 간의 간격은 간으로의 혈액 공급의 감소 정도 및 절차를 받는 대상체의 건강 상태에 따라 달라질 수 있다. 사례별 의사의 의학적 평가는 본원에 기술된 바와 같은 2개의 단계 간의 간격을 결정하는 데 포함될 수 있다.
- [0087] 이식 거부는 비-자가 장기 또는 세포의 이식체를 포함하는 임의의 이식 절차와 관련된 문제일 수 있다. 면역억제는 본 개시의 방법에 따라 절차에 의해 유도된 이식 거부를 예방하거나 개선시키기 위해 적용될 수 있다. 예를 들어, 면역억제제약물은 대상체에, 세포 이식이 완료되기 직전 또는 직후에, 또는 절차 후 약 1시간, 2시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 7일, 10일, 2주, 4주, 6주, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월, 2년, 3년, 4년, 또는 심지어 더 긴 시간에 투여될 수 있다.
- [0088] 본원에는 상이한 면역억제의 방법이 적용될 수 있다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 대상체에는 면역억제의 유도를 위한 면역억제제가 투여되며, 이는 급성 거부 반응을 예방할 목적으로 이식 직후에 가중된 용량(intensified dose)으로 제공되는 모든 약제를 포함할 수 있다. 관련된 약제의 비제한적인 예는 메틸프레드니솔론, 아트감, 티모글로불린, OKT3, 바실릭시맙, 슬루메드롤, 및 다클리주맙을 포함할 수 있다. 대상체에는 또한, 면역억제의 유지를 위한 면역억제제가 투여될 수 있으며, 이는 장기간 유지시키기 위한 의도로 이식 전, 동안, 또는 후에 제공되는 모든 면역억제 약제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 본원에 기술된 바와 같은 면역억제 유지를 위해 프레드니손, 사이클로스포린, 타크롤리무스, 미코페놀레이트, 모페틸, 아자티오프린, 프로그래프, 또는 라파마이신이 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 대상체에는 또한, 항-거부 면역억제를 위한 면역억제제가 투여될 수 있으며, 이는 초기 이식후 기간 동안 또는 특정 추적 기간 동안, 예를 들어, 급성 거부 반응의 진단 후 최대 30일 동안 급성 거부 에피소드를 치료할 목적으로 제공되는 모든 면역억제 약제를 포함할 수 있다. 관련된 약제의 비제한적인 예는 메틸프레드니솔론, 아트감, OKT3, 티모글로불린, 바실릭시맙, 또는 다클리주맙을 포함할 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 면역억제제의 다른 예는 또한, 다른 스테로이드(예를 들어, 코르티코스테로이드, 텍사메타손, 및 프레드니손), Cox-1 및 Cox-2 억제제, 마크롤라이드 항생제(예를 들어, 파라마이신 및 타크롤리무스), 및 B-세포, T-세포, 및/또는 다른 선천성 면역 활성을 제한하거나, 감소시키거나, 억제하는 다른 물질을 포함할 수 있다.
- [0089] **4. 이식된 세포로부터의 이소성 조직의 생성**
- [0090] 본원에 제공된 방법 및 시스템은 간세포, 신장 세포 또는 신장 조직 단편, 췌장 세포 또는 췌도, 흉선 세포 또는 흉선 단편, 또는 폐 세포 또는 폐 조직 단편을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 다양한 타입의 세포를 이식하기 위해 적용될 수 있다. 림프절 내에 이식된 세포는 생착시키고, 대상체의 정상 장기의 하나 이상의 기능을 보완하거나 증가시킬 수 있는 이소성 조직을 형성할 수 있다.
- [0091] 림프절 내로 이식되는 세포는 세포 이식의 목적에 따라, 동종 세포 집단 또는 이종 세포 집단일 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 동종 간세포의 집단은 이소성 간을 생성하기 위해 림프절 내로 전달된다. 특정 구현예에서, 이소성 간을 성장시킬 때, 이종 세포의 집단, 예를 들어, 추가의 다른 간 실질조직 세포를 갖는 간세포는 림프절 내로 전달된다. 특정 구현예에서, 이종 신장 세포의 집단 또는 신장 단편은 림프절에서 이소성 신장을 생성시킬 목적으로 림프절 내로 전달된다. 특정 구현예에서, 시험관내 분화 방법(예를 들어, 국제특허공개 WO2014182885A2호, WO2019006127A1호, 및 WO2018227101A1호에 기술된 것, 이러한 문헌 각각은 본원에 참고로 포함됨)에 의해 생성된 도너 대상체로부터의 배아 신장 또는 신장 오가노이드가 얻어지고, 작은 단편으로 처리

되고(예를 들어, 다져지거나 그라인딩되고), 림프절로 전달되는 용액을 형성하기 위해 액체 중에 재현탁된다. 용액은 배아 신장 또는 신장 오가노이드를 구성하는 상이한 타입의 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 이중 체장 세포의 집단은 이소성 체장을 발생시키기 위해 림프절 내로 전달된다.

[0092] 본원에 제공된 방법 및 시스템은 대상체의 림프절 내로 치료학적 유효량의 세포를 전달하는 것을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "치료학적 유효량"은 이식되거나 전달되는 세포의 집단을 지칭할 때, 임의의 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 이익/위험 비율로 림프절에 세포 이식을 받은 대상체에서 원하는 치료 효과를 형성하는 데 효과적인, 세포의 집단에서의 관련 세포, 예를 들어, 이식되는 세포, 또는 이식되는 세포를 포함하는 조성물의 양을 의미할 수 있다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 대상체 내에 이식된 세포의 집단의 양은 예를 들어, 말기 간 질환 또는 신장 질환을 치료하기 위해 이식이 의도되는 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상의 통계학적으로 유의미한, 측정 가능한 변화를 생성하기에 충분하다. 치료학적 유효량의 결정은 본 발명의 방법 또는 시스템을 적용하는 의도된 의학 적 목적에 따른다. 치료학적 유효량은 대상체의 병력, 연령, 상태, 성 별뿐만 아니라 대상체에서의 의학 적 병태의 중증도 및 타입, 및 다른 약제학적 활성제의 투여에 따라 달라질 수 있다.

[0093] 본원에 제공된 방법 및 시스템을 적용할 의도된 목적에 따라, 상이한 양의 세포는 이소성 조직을 성장시키기 위해 림프절 내로 전달될 수 있다. 림프절 당 적어도 약 1백만, 2백만, 3백만, 4백만, 5백만, 7백만, 9백만, 1천 만, 1천5백만, 2천만, 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 1억, 1억5천만, 2억, 3억, 5억, 7억5천만, 8억, 9억, 10억, 50억, 100억, 200억, 300억, 500억, 또는 심지어 그 이상의 세포가 전달될 수 있다. 특정 구현예에서, 약 1천만, 1천5백만, 2천만, 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천 만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포는 단일 림프절 내로 전달될 수 있다. 특정 구현예에서, 약 5천만 내지 약 2억개의 세포는 단일 림프절에서 전달될 수 있다.

[0094] 전달되는 세포의 집단은 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 약 100%의 생존 세포를 가질 수 있다. 세포 생존력을 증진시키기 위해 이 용 가능한 수단이 전달되는 세포의 집단에서 세포 생존력 수준을 유지하기 위해 적용될 수 있다. 특정 구현예에 서, 세포 전달 전에, 세포 집단의 생존력 상태(예를 들어, 생존력 백분율 또는 다른 세포 생존력 파라미터)는 생존 세포 집단을 전달하기 위해 측정될 수 있으며, 결과적으로, 기능성 이소성 조직이 림프절에서 생성될 수 있다.

[0095] 비제한적인 구현예에서, 이소성 조직은 림프절 내로 개시된 다양한 타입의 세포의 이식 후 적어도 약 5일, 10일, 15일, 20일, 25일, 30일, 35일, 40일, 45일, 50일, 55일, 60일, 65일, 70일, 75일, 80일, 85일, 90일, 95일, 100일, 110일, 120일, 130일, 140일, 150일, 160일, 170일, 180일, 190일, 또는 약 200일에 형성될 수 있다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 간세포는 EUS를 통해 림프절 내로 전달될 수 있으며, 생착된 간세포는 간세포의 이식 후 약 60, 약 90, 또는 약 150일에 간 조직을 형성할 수 있다. 비제한적인 구현예에서, 이 소성 조직은 림프절 내로 개시된 다양한 타입의 세포의 이식 후 약 5일, 10일, 15일, 20일, 25일, 30일, 35일, 40일, 45일, 50일, 55일, 60일, 65일, 70일, 75일, 80일, 85일, 90일, 95일, 100일, 110일, 120일, 130일, 140 일, 150일, 160일, 170일, 180일, 190일, 또는 약 200일 내에 형성될 수 있다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 간세포는 EUS를 통해 림프절 내로 전달될 수 있으며, 생착된 간세포는 간세포의 이식 후 약 60, 약 90, 또는 약 150일 내에 간 조직을 형성하기 시작할 수 있다.

[0096] 전달되는 세포는 상이한 공급처로부터 및 여러 상이한 방법을 통해 얻어질 수 있다. 세포는 대상체에 대해 동종, 이종, 또는 자가일 수 있다. 세포는 살아있는 도너 조직으로부터 직접적으로 얻어질 수 있다. 예를 들어, 간세포는 미국특허 제9125891B2호 및 제6610288B1호, 미국특허공개 제20120045764A1호 및 제20040110289A1호에 기술된 방법에 따라 이식을 위해 분리되고 제조되며, 이러한 문헌 각각은 본원에 참고로 포함된다. 특정 구현예 에서, 전달되는 세포는 시험관내 공급원으로부터 얻어진다. 줄기 세포, 예를 들어, 배아 줄기 세포, 유도된 다 능성 줄기 세포, 영양막 줄기 세포, 또는 임의의 다른 타입의 다능성 또는 만능성 줄기 세포는 시험관내에서 배 양되고 본원에 제공된 방법 및 시스템을 적용할 목적을 위해 적합한 특정 타입의 세포 또는 세포 집단으로 분화 될 수 있다. 예를 들어, 상기에 기술된 바와 같이, 신장 오가노이드 또는 체장 섬은 시험관내 분화 방법을 이용 하여 얻어지며, 이러한 것은 본원에 기술된 이식 절차를 위해 제조된다. 전달되는 세포는 또한, 이식 이전에, 저장되고, 예를 들어, 저온보존될 수 있다. 세포 생존력 수준이 림프절에서 후속 세포 전달 및 이소성 조직 형 성에 적합한 한, 표준 냉동보존 및 회복 프로토콜이 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, 전달되는 세포는 세포의 하나 이상의 유전자가 변형되거나 세포가 하나 이상의 외인성 유전자를 발현시키기 위해 변형되도록 유전적으로 변형된다. 임의의 입수 가능한 유전자 편집 방법, 예를 들어, 상동 재조합, 트랜스포사아제/트랜스포손, 아연

핑거 뉴클레아제, TALEN, 및 CRISPR, 예를 들어, CRISPR-Cas9 기술은 전달되는 세포의 유전자 변형을 위해 적용될 수 있다.

[0097] 세포는 이식을 위한 용액 중에서 제조되고 현탁될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포 집단을 함유한 현탁 용액은 약제학적으로 허용되는 부형제, 희석제, 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는"은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 대상체(예를 들어, 인간 대상체 또는 비-인간 동물)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고 합리적인 이익/위험 비율과 잘 맞는 그러한 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투약 형태를 지칭할 수 있다.

[0098] 본원에서 사용되는 용어 "용액"은 본 발명의 세포가 생존 가능한 상태로 유지되는 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체 및 희석제는 염수, 수성 완충 용액, 용매, 및/또는 분산 매질을 포함한다. 이러한 담체 및 희석제의 사용은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 용액은 바람직하게는 멸균되고 주사가능성의 용이성이 존재하는 정도까지 유통성이다. 용액은 제조 및 저장 조건 하에서 안정하고, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등의 사용을 통해 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존될 수 있다. 본 개시의 용액은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제 및 필요한 경우, 상기에 나열된 다른 구성성분들에 본원에 기술된 바와 같은 생존 가능한 기능성 세포를 도입하고 이후에 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다.

[0099] 본 개시의 목적을 위해 약제학적으로 허용되는 부형제로서 역할을 할 수 있는 물질 또는 재료의 비제한적인 예는 당, 예를 들어, 락토오스, 글루코오스 및 수크로오스; 전분, 예를 들어, 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로오스, 및 이의 유도체, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트; 분말화된 트래거캔스; 맥아; 젤라틴; 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 라우릴 설페이트 및 탈크; 코코아 버터 및 좌제 왁스; 오일, 예를 들어, 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예를 들어, 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG); 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트; 아가; 완충제, 예를 들어, 마그네슘 하이드록사이드 및 알루미늄 하이드록사이드; 알긴산; 무발열원 수(pyrogen free water); 등장성 염수; 링거액; 에틸 알코올; pH 완충된 용액; 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리언하이드라이드; 벌크화제, 예를 들어, 폴리펩타이드 및 아미노산; 혈청 성분, 예를 들어, 혈청 알부민, HDL 및 LDL; C₂-C₁₂ 알코올, 예를 들어, 에탄올; 및 약제학적 제형에서 사용되는 다른 비독성 혼화 가능한 물질을 포함할 수 있다. 습윤화제, 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 착향제, 퍼폼제, 보존제 및 항산화제가 또한, 제형에 존재할 수 있다. "부형제", "담체", "약제학적으로 허용되는 담체" 등은 본원에서 상호교환 가능하게 사용된다. 본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는 부형제"는 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클, 예를 들어, 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 담체, 제조 보조제(예를 들어, 윤활제, 탈크 마그네슘, 칼슘 또는 아연 스테아레이트, 또는 스테아르산), 또는 신체의 장기 또는 부분으로 본 발명의 화합물, 물질, 또는 세포를 전달하거나 이동시키는 것에 관련된 용매 캡슐화 물질을 지칭할 수 있다. 각 부형제는 제형의 다른 구성성분, 예를 들어, 이식될 세포와 양립 가능하고 대상체에 해를 끼치지 않는다는 의미에서 "허용 가능"해야 한다.

[0100] 림프절 내로 전달된 후에, 본 개시의 세포는 림프절에서 생착하고, 증식하고, 이소성 조직을 생성할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "생착시키다" 또는 문법적으로 이에 대응하는 용어는 하나 이상의 세포가 타겟 림프절에 이식되고 림프절 내에서 생존하고 생물학적으로 활성화되는(예를 들어, 세포 기능을 수행하는) 과정을 지칭할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "증식하다" 또는 문법적으로 이에 대응하는 용어는 세포가 하나 이상의 일련의 유사분열을 경험하고 다수의 자손 세포를 생성하는 과정을 지칭할 수 있으며, 증식 과정은 세포 수의 기하급수적 증가를 초래할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 높은 수준으로 증식하며, 이에 따라, 최종적으로 생성되는 이소성 조직의 질량은 림프절로 전달된 세포의 본래 질량보다 현저하게 더 높다. 특정 구현예에서, 세포 증식은 중간 수준이다. 특정 구현예에서, 질량 증가는 예를 들어, 원래 이식된 세포의 질량과 비교하여, 적어도 약 1.2배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 7.5배, 8배, 9배, 10배, 12배, 15배, 17.5배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 120배, 150배, 200배, 300배, 400배, 500배, 또는 1000배이다. 특정 구현예에서, 세포의 수는 예를 들어, 원래 이식된 세포의 수와 비교하여 적어도 약 1.2배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 7.5배, 8배, 9배, 10배, 12배, 15배, 17.5배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 120배, 150배, 200배, 300배, 400배, 500배, 또는 1000배 만큼 증가한다.

[0101] 특정 구현예에서, 혈관형성은 세포 이식을 받은 림프절에서 일어날 수 있으며, 예를 들어, 림프절 내에, 특정 구현예에서, 이소성 조직 내에 혈관 네트워크를 침투시키고 형성하는 혈관이 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 침투하는 혈관 네트워크는 이소성 조직에 대한 혈액 공급의 근거를 형성할 수 있다. 특정 구현예에서, 침투하는 혈관 네트워크는 대사 산물 또는 물질을 이소성 조직으로 및/또는 이소성 조직으로부터 운반하는 데 도움을 줄 수 있다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 이소성 간은 글리코젠, 글루코오스, 및/또는 담즙을 생성할 수 있는데, 이는 이식 부위(림프절) 내측에 형성된 혈관 네트워크에 의해 주요 혈류 내로 운반될 수 있다. 특정 구현예에서, 이소성 췌장은 인슐린, 글루카곤, 및/또는 소마토스타틴을 생성하고 분비할 수 있으며, 이는 또한, 림프절 내측에 형성된 혈관 네트워크를 통해 대상체의 신체의 주요 혈류 내로 도입될 수 있다. 특정 구현예에서, 림프 순환계는 또한, 이소성 조직에 의해 생성된 물질에 대한 운반 채널로서 역할을 한다. 이에 따라, 림프계는 특정 구현예에서, 신체의 다른 부분에서 이의 누화(crosstalk)를 통해 혈액순환계로 이러한 물질의 공급을 제공할 수 있다.

[0102] 5. 질환 및 병태

[0103] 방법 및 시스템은 대상체에서 질환 또는 병태를 치료하기 위해 적용될 수 있다. 특정 구현예에서, 방법 및 시스템은 림프절에서 하나 이상의 이소성 조직을 성장시키는 데 사용되며, 이는 대상체에 대한 장기의 기능을 보완하거나 증가시키고, 결과적으로, 대상체가 겪고 있는 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상을 개선시키거나 이러한 질환 또는 병태를 치료할 수 있다.

[0104] A. 간 질환 및 병태

[0105] 특정 구현예에서, 방법 및 시스템은 대상체의 림프절 내로 간세포를 전달하여 간세포를 생착시키고, 림프절에서 이소성 간을 생성시키기 위해 이용될 수 있다. 이소성 간은 비제한적으로, 소화 동안 소장에서 노폐물을 제거하고 지방을 분해하는 데 도움을 줄 수 있는, 담즙의 생성; 혈장 단백질, 예를 들어, 알부민의 생성; 신체를 통해 지방을 운반하는 데 도움을 주기 위한 콜레스테롤, 인지질, 및 지질단백질의 생성; 과잉 글루코오스의 저장을 위한 글리코젠으로의 전환(당생성) 및 글루코오스가 필요할 때 글리코젠의 해중합(당분해)에 의한 혈당 조절; 과잉 탄수화물 및 단백질의 지방산 및 트리글리세라이드로의 전환; 아미노산의 탈아미노화 및 아미노전이; 아미노산의 비-질소 부분의 글루코오스 또는 지질로의 전환; 에너지를 생산하기 위한 트리글리세라이드의 산화; 이의 철분 함량(간은 철분을 저장함)의 사용을 위한 헤모글로빈의 처리; 독성 암모니아의 우레아로의 전환; 특정 약물 및 다른 독성 물질을 제거하기 위한 혈액 투석; 혈액 응고를 위해 필요한 응혈 인자의 합성; 면역 인자의 생성 및 혈류로부터 박테리아의 제거에 의한 감염증에 대한 저항; 적혈구로부터 빌리루빈의 제거와 같은, 정상 의 건강한 간 장기가 수행할 수 있는 하나 이상의 기능을 가질 수 있다.

[0106] 특정 구현예에서, 방법 및 시스템은 여러 상이한 간 질환 또는 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 간 질환 또는 병태는 간부전 또는 간 기능들 중 하나 이상의 감소를 수반할 수 있다. 본 개시의 방법에 의해 치료될 수 있는 간 질환 및/또는 장애의 비제한적인 예는 급성 간부전, 간경변, 간암, 간염, 지방간 질환 및 비알코올성 지방간 질환을 포함한다. 간 질환은 티로신혈증, 단풍시럽노병, 페닐케톤노증, 크리글러-나자르 증후군, 옥살산증, 고옥살산노증, 혈색소침착증, 알파-1 항트립신 결핍, 윌슨병, 가족성 간내 담즙정체 증후군, 및 가족성 아밀로이드 다발신경병증을 포함하지만, 이로 제한되지 않는, 대사 장애(예를 들어, 소아 대사 장애)와 관련될 수 있다. 본 방법 및 시스템은 특히, 말기 간 질환 및/또는 간 섬유증, 예를 들어, B형 간염 감염증, C형 간염 감염증, 알코올 소비, 간경변, 비알코올성 지방간염, 또는 혈색소침착증에 의해 유발된 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0107] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 시스템은 이를 필요로 하는 대상체에 적용할 때, 간 질환 또는 병태와 관련된 하나 이상의 증상, 예를 들어, 하나 이상의 간 기능의 회복을 개선시키고/시키거나 특정 구현예에서, 세포 이식 전 생명을 위협하는 간 질환 또는 병태를 경험한 대상체의 생존 기간을 연장시킨다. 예를 들어, 본 개시에 따른 간세포 이식을 받은 대상체는 알려진 아미노전이효소(ALT) 검사, 아스파르테이트 아미노전이효소(AST) 검사, 알칼리성 포스파타아제(ALP) 검사, 알부민 검사, 빌리루빈 검사와 같은 이의 간 기능 검사의 결과를 개선시킬 수 있다. 이러한 개선은 다른 건강한 대상체와 비교하여 또는 간 질환 또는 병태를 갖기 전 동일한 대상체의 검사 결과와 비교하여 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 약 100% 회복일 수 있다. 특정 구현예에서, 간세포 이식을 받은 대상체의 수명은 적어도 약 6개월, 9개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 18년, 20년, 25년, 30년, 40년, 50년, 60년, 또는 심지어 그 이상 동안 연장된다.

[0108] **B. 신장 질환 및 병태**

[0109] 특정 구현예에서, 방법 및 시스템은 대상체의 림프절 내로 신장 세포 또는 신장 조직 단편을 전달하여, 신장 세포를 생착시키고, 림프절에서 이소성 신장을 생성시키기 위해 이용될 수 있다. 이소성 신장은 정상의 건강한 신장 장기가 수행할 수 있는 하나 이상의 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 이소성 신장은 하기 주요 신장 기능을 어느 정도까지 또는 완전한 정도까지 수행할 수 있다: 혈액 중에 세포 및 큰 단백질을 보유하면서 결국 소변이 되는 한외여과액을 생성하기 위해 혈액으로부터 작은 분자량의 물질(예를 들어, 대사 폐기물)의 여과를 포함할 수 있는 소변의 생성; 및 한외여과액으로부터 세뇨관 주위 모세관으로의 특정 물질(예를 들어, 이온, 글루코오스)의 재흡수. 특정 구현예에서, 이소성 신장은 또한, 비제한적으로, 산-염기 균형, 전해질 농도, 세포의 체액 용량, 및 혈압과 같은, 정상 신장이 수행할 때 전신 항상성의 유지에 참여할 수 있다.

[0110] 특정 구현예에서, 방법 및 시스템은 여러 상이한 신장 질환 또는 병태를 치료하는 데 사용된다. 이러한 신장 질환 또는 병태는 신부전 또는 신장 기능들 중 하나 이상의 감소를 수반할 수 있다. 본 개시의 방법에 의해 치료될 수 있는 신장 질환 및/또는 장애의 비제한적인 예는 급성 신부전, 만성 신장 질환, 사구체 신염, 루푸스, 다낭성 신장 질환, 신증, 신장증, 신장 기형 및 신장암을 포함한다. 본 방법 및 시스템은 특히, 말기 신장 질환(신부전), 예를 들어, 당뇨병, 자가면역 질환(예를 들어, 루푸스 및 IgA 신증), 유전 질환(예를 들어, 다낭성 신장 질환), 신증후군, 및 요로 문제에 의해 유발된 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0111] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 시스템은 이를 필요로 하는 대상체에 적용될 때, 신장 질환 또는 병태와 관련된 하나 이상의 증상, 예를 들어, 하나 이상의 신장 기능의 회복을 개선시키고/시키거나, 특정 구현예에서, 세포 이식 전 생명을 위협하는 신장 질환 또는 병태를 경험한 대상체의 생존 기간을 연장한다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 본 개시에 따른 신장 세포 또는 단편의 이식을 받은 대상체는 이의 신장 기능 검사, 예를 들어, 혈청 크레아티닌, 사구체 여과율(GFR), 혈중 요소 질소(BUN)에 대한 혈액 검사의 결과를 개선시킨다. 이러한 개선은 다른 건강한 대상체와 비교하여 또는 신장 질환 또는 병태를 갖기 전 동일한 대상체의 검사 결과와 비교하여 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 약 100% 회복될 수 있다. 특정 구현예에서, 신장 세포 또는 단편의 이식을 받은 대상체의 수명은 적어도 약 6개월, 9개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 18년, 20년, 25년, 30년, 40년, 50년, 60년, 또는 심지어 그 이상 동안 연장될 수 있다.

[0112] **C. 췌장 질환 및 병태**

[0113] 특정 구현예에서, 방법 및 시스템은 대상체의 림프절 내로 췌장 세포(예를 들어, 췌장 β , α , δ , ζ , 또는 γ 세포) 또는 췌도를 전달하여 췌장 세포 또는 췌도를 생착시키고, 림프절에서 이소성 췌장을 생성시키기 위해 이용된다. 이소성 췌장은 정상의 건강한 췌장 장기가 수행할 수 있는 하나 이상의 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 이소성 췌장은 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴 또는 췌장 폴리펩타이드 중 하나 이상을 분비한다. 특정 구현예에서, 이소성 췌장은 생리학적 자극에 반응하여 하나 이상의 내분비 호르몬을 적절하게 분비한다. 특정 구현예에서, 이소성 췌장은 혈당 농도의 증가에 반응하여 인슐린을 분비하고/하거나 혈당 농도의 감소에 반응하여 글루카곤을 분비하는데, 이는 혈당 수준의 항상성을 유지하는 데 도움을 줄 수 있다. 이러한 분비 반응은 생리학적 자극의 변화에 비례할 수 있다. 예를 들어, 혈당의 증가가 클수록, 이소성 췌장에 의해 더 많은 인슐린이 분비되며, 이의 비율은 다른 건강한 대상체에서의 정상의 건강한 췌장 또는 췌장 질환을 겪기 전의 동일한 대상체의 췌장과 적어도 부분적으로 동일하거나 이와 유사할 수 있다.

[0114] 특정 구현예에서, 방법 및 시스템은 여러 상이한 췌장 질환 또는 병태를 치료하는 데 사용된다. 이러한 췌장 질환 또는 병태는 췌장 부전 또는 췌장 기능 중 하나 이상의 감소를 수반할 수 있다. 본원에 제공된 방법 및 시스템에 의해 치료되는 췌장 질환 또는 병태는 내분비 췌장 질환 또는 병태일 수 있다. 본 개시의 방법에 의해 치료될 수 있는 췌장 질환 및/또는 장애의 비제한적인 예는 급성 췌장염, 만성 췌장염, 유전성 췌장염, 및 췌장암을 포함한다. 본 방법 및 시스템은 특히, 췌장 부전 또는 췌장 이식이 필요한 다른 상황을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0115] 특정 구현예에서, 본원에 제공되는 방법 및 시스템은 이를 필요로 하는 대상체에 적용될 때, 췌장 질환 또는 병태와 관련된 하나 이상의 증상, 예를 들어, 하나 이상의 췌장 기능의 회복을 개선시키고/시키거나, 특정 구현예에서, 세포 이식 전 생명을 위협하는 췌장 질환 또는 병태를 경험한 대상체의 생존 기간을 연장한다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 본 개시에 따른 췌장 세포 또는 췌도의 이식을 받은 대상체는 혈당 조절을 개선시킬 수 있다. 이러한 개선은 다른 건강한 대상체와 비교하여 또는 췌장 질환 또는 병태를 갖기 전 동일한 대상체의 검사 결과와 비교하여 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 약 100% 회복될

수 있다. 특정 구현예에서, 체장 세포 또는 체도의 이식을 받은 대상체의 수명은 적어도 약 6개월, 9개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 18년, 20년, 25년, 30년, 40년, 50년, 60년, 또는 심지어 그 이상 동안 연장될 수 있다.

[0116] **D. 면역계 기능 장애/면역결핍 장애 및 병태**

[0117] 특정 구현예에서, 방법 및 시스템은 대상체의 림프절 내로 흉선 세포 또는 흉선 단편을 전달하여 흉선 세포 또는 단편을 생착시키고, 림프절에서 이소성 흉선을 생성하기 위해 이용된다. 특정 구현예에서, 이소성 흉선은 정상적인 건강한 흉선 장기가 수행할 수 있는 하나 이상의 기능을 보완하거나 강화한다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 이소성 흉선은 T 세포 성장, 발달, 성숙, 및 선택에 참여하기 위해 신체의 면역조절에 참여할 수 있다. 본 개시에 따른 이소성 흉선의 생성은 면역계 기능 장애를 갖는 대상체, 예를 들어, 노년층 또는 고령의 대상체(예를 들어, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 또는 85세 이상), 또는 면역결핍 장애 또는 병태, 예를 들어, X-연관 무감마글로불린혈증(XLA), 공통 가변성 면역결핍(CVID), 중증 복합형 면역결핍(SCID), 중증 화상, 화학요법, 방사선, 당뇨병, 영양실조, 후천성 면역결핍 증후군(AIDS), 백혈병, 중증 바이러스 감염증, 및 다발성 골수종을 갖는 대상체에서 면역계 기능을 증가시키거나 조절하는 데 사용할 수 있다.

[0118] 특정 구현예에서, 도너 대상체로부터의 흉선 세포 또는 단편은 동일한 도너 대상체로부터의 장기 또는 다른 세포 이식 전에 수용자 대상체의 림프절 내에 도입된다. 림프절에서 이소성 흉선의 생성은 도너 대상체에 대한 수용자 대상체의 내성을 유도할 수 있으며, 이는 후속 장기 또는 세포 이식에 유리할 수 있다. 흉선 세포 이식은, 일부 구현예에서, 장기 또는 다른 세포 이식 전 적어도 약 5일, 1주, 2주, 3주, 4주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 6개월, 9개월, 또는 1년에 수행될 수 있으며, 이에 따라, 도너 대상체에 대한 적절한 면역 내성이 수용자에서 확립될 수 있다. 본원에 기술될 수 있는 흉선 세포 이식은 임의의 타입의 장기 이식 또는 임의의 다른 세포 타입의 이식과 함께 적용될 수 있고, 본 개시에 따른 흉선 세포 이식 없는 것을 제외하고 그밖에 동일한 장기 또는 세포 이식을 받은 수용자에서 나타나는 이식 거부 반응을 감소시킬 수 있다.

[0119] 본 개시에 따른 세포의 이식을 받은 대상체의 수명은 적어도 약 6개월, 9개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 12년, 15년, 18년, 20년, 25년, 30년, 40년, 50년, 60년, 또는 심지어 그 이상 동안 연장될 수 있다.

[0120] **E. 폐 질환 및 병태**

[0121] 특정 구현예에서, 방법 및 시스템은 대상체의 림프절 내로 폐 세포 또는 폐 조직 단편을 전달하여 폐 세포 또는 단편을 생착시키고 림프절에서 이소성 폐를 생성시키기 위해 이용된다. 이소성 폐는 정상적인 건강한 체장 폐가 수행할 수 있는 하나 이상의 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 이소성 폐는 만성 폐색성 폐 질환(COPD)을 갖는 환자일 수 있다. 이소성 폐는 COPD를 갖는 환자에서 진행성 섬유증에 의해 심각하게 감소될 수 있는 폐 기능 질량을 증가시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 표준 폐 이식을 위한 후보가 아닌 폐 축소 절차를 경험한 환자는 기관지 주위 림프절 내에 폐 세포의 이식을 위해 적합할 수 있다.

[0122] 특정 구현예에서, 방법 및 시스템은 여러 상이한 폐 질환 또는 병태를 치료하는 데 사용된다. 이러한 폐 질환 또는 병태는 폐부전 또는 폐 기능들 중 하나 이상의 감소를 수반할 수 있다. 본 개시의 방법에 의해 치료될 수 있는 폐 질환 및/또는 장애의 비제한적인 예는 만성 폐색성 폐 질환(COPD)을 포함한다. COPD는 담배 연기 및 추가 담배 사용, 공해(화학물질, 먼지 또는 독성 물질) 및 흙(fume), 유전적 장애(예를 들어, 알파-1-항트립신, 남성 섬유증), 만성 천식, 기종, 만성 기관지염, 또는 특발성 폐섬유증에 의해 유발될 수 있다.

[0123] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법 및 시스템은 폐 질환 또는 병태와 관련된 하나 이상의 증상을 개선시킬 수 있고, 예를 들어, 하나 이상의 폐 기능의 회복을 개선시킬 수 있고/있거나, 특정 구현예에서, 대상체의 생존의 연장은 세포 이식 전에 생명을 위협하는 폐 질환 또는 병태를 경험한다.

[0124] **6. 대상체**

[0125] 본 개시에 따른 세포 이식을 받을 수 있는 대상체는 임의의 인간 환자, 예를 들어, ESLD 환자, 신부전을 갖는 환자, 제I형 당뇨병을 갖는 환자, 또는 장기 이식을 기다리고 있는 환자일 수 있다. 특정 구현예에서, 대상체는 의학적 치료의 특정 단계에 있다.

[0126] 본 개시에 따른 세포 이식을 받고 있는 대상체는 임의의 연령일 수 있고, 성인, 신생아, 유아 또는 어린이일 수 있다. 특정 구현예에서, 대상체는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44,

45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99세이거나, 그 안의 범위 내에 있다(예를 들어, 2 내지 20세, 20 내지 40세, 또는 40 내지 90세). 또한, 대상체는 남성 또는 여성일 수 있다.

[0127] 본 개시에 따른 세포 이식을 받는 것에 대한 대상체의 적합성은 공인된 의사에 의해 결정될 수 있다. 특정 구현예에서, 대상체의 건강 상태의 종합적인 평가는 세포 이식을 수행하기 전에 필요할 수 있다. 특정 구현예에서, 대상체의 건강 상태에 대한 요건은 다른 장기 또는 세포 이식 절차에 비해 현저히 낮을 수 있다. 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 본 개시에 따른 최소 침습적 절차는 장기 이식을 위해 통상적으로 수행되는 주요 수술에 비해 수술 절차의 위험성을 현저히 낮출 수 있다. 또한, 세포가 병에 걸린 장기보다는 하나 이상의 림프절 내에 이식되는 것을 고려할 때, 요건은 병에 걸린 장기에 대한 전제 조건이 없을 수 있기 때문에 현저히 더 낮을 수 있다.

[0128] 본원에 개시된 임의의 방법 및 시스템은 또한, 비-인간 대상체, 예를 들어, 연구 목적 또는 수의학 목적을 위한 실험실 또는 농장 동물에서 사용될 수 있다. 비-인간 대상체의 비제한적인 예는 개, 염소, 기니 피그, 햄스터, 마우스, 돼지, 비-인간 영장류(예를 들어, 고릴라, 유인원, 오랑우탄, 여유원숭이, 또는 개코원숭이), 래트, 양, 또는 소를 포함한다.

[0129] 7. 시스템

[0130] 본 개시는 또한 림프절에서 세포를 이식하고 기능성 이소성 조직을 성장시키기 위한 시스템을 제공한다. 시스템은 바늘 및 그 안에 포함된 현탁 용액 중 하나 이상의 세포를 갖는 주사기 및 내시경을 포함할 수 있다. 내시경 및 바늘은 대상체의 체강(예를 들어, GI관, 기도, 또는 요로) 또는 폐쇄된 체강(예를 들어, 복강, 골반강, 또는 흉강)과 함께 진행하도록 구성될 수 있으며, 주사기는 바늘을 통해 하나 이상의 세포를 전달하도록 구성될 수 있다.

[0131] 상기에 논의된 바와 같이, 특정 구현예에서, 현탁 용액은 1 mL 당 적어도 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 1억, 2억, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 8억, 9억, 10억, 30억, 50억, 80억, 또는 100억개의 세포를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 1 mL 당 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 1억, 2억, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 8억, 9억, 10억, 30억, 50억, 80억, 또는 100억개의 세포를 갖는 세포의 현탁 용액을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 1 mL 당 최대 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 1억, 2억, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 8억, 9억, 10억, 30억, 50억, 80억, 또는 100억개의 세포를 갖는 세포의 현탁 용액을 갖는다.

[0132] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 이소성 간의 생성을 위한 1 mL 당 적어도 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 갖는 간세포의 현탁 용액을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 이소상 간의 생성을 위한 1 mL 당 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 갖는 간세포의 현탁 용액을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 주사기는 이소상 간의 생성을 위한 1 mL 당 최대 약 3천만, 4천만, 4천5백만, 5천만, 5천5백만, 6천만, 7천만, 8천만, 9천만, 또는 1억개의 세포를 갖는 간세포의 현탁 용액을 갖는다.

[0133] 상기에 논의된 바와 같이, 특정 구현예에서, 바늘은 최대 약 700 μm , 600 μm , 500 μm , 450 μm , 400 μm , 300 μm , 260 μm , 250 μm , 또는 200 μm 의 내경을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 바늘은 최대 약 260 μm 의 내경을 갖는다. 특정 구현예에서, 바늘의 내경은 약 700 μm , 600 μm , 500 μm , 450 μm , 400 μm , 300 μm , 260 μm , 250 μm , 또는 200 μm 이다. 특정 구현예에서, 바늘의 내경은 약 260 μm 이다. 바늘은 최대 약 1 mm, 900 μm , 800 μm , 750 μm , 700 μm , 650 μm , 600 μm , 550 μm , 520 μm , 510 μm , 500 μm , 480 μm , 450 μm , 또는 400 μm 의 외경을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 바늘의 외경은 최대 약 510 μm 이다. 특정 구현예에서, 바늘의 외경은 약 1 mm, 900 μm , 800 μm , 750 μm , 700 μm , 650 μm , 600 μm , 550 μm , 520 μm , 510 μm , 500 μm , 480 μm , 450 μm , 또는 400 μm 이다. 특정 구현예에서, 바늘의 외경은 약 510 μm 이다. 특정 구현예에서, 바늘은 ISO 7864:2016에 따라 규정된 바와 같은 특징의 게이지를 갖는다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 바늘은 약 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 또는 27 게이지(ga)이다. 특정 구현예에서, 바늘은 최대 약 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 또는 27 ga이다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 시스템의 바늘은 최대 약 25 ga일 수 있다. 특정 구현예에서, 바

늘은 예를 들어, 큰 내경 및 작은 외경을 유지하면서 얇은 벽을 갖는, 비-표준화된 크기를 갖는다.

[0134] 본원에 제공된 시스템 및 방법은 약 20 μm 의 평균 직경의 세포, 예를 들어, 간세포에 특히 유용할 수 있다. 특정 이론에 의해 제한하고자 하는 것은 아니지만, 전달될 세포의 크기는 현탁 용액 중 작업 세포 농도, 세포 전달을 위해 사용되는 바늘의 내경, 및 세포 전달 전 및 세포 전달 후 주사기에서의 세포 생존력 수준을 결정하기 위한 기여 인자일 수 있다. 20 μm 미만의 평균 직경의 세포에 대하여, 바늘 크기는 25 ga보다 더 작을 수 있으며, 현탁 용액 중 세포 농도 및 총 세포수는 약 20 μm 의 평균 직경, 예를 들어, 상기에 논의된 바와 같은 파라미터의 세포와 비교하여 더 높을 수 있다. 다른 한편으로, 20 μm 초과인 평균 직경의 세포에 대하여, 바늘 크기는 예를 들어, 25 ga보다 더 클 수 있으며, 현탁액 중 세포 농도 및 총 세포수는 약 20 μm 의 평균 직경, 예를 들어, 상기에 논의된 바와 같은 파라미터의 세포와 비교하여 더 낮을 수 있다.

[0135] 8. 키트

[0136] 본 개시는 또한, 본원에 개시된 임의의 방법을 수행하는 데 유용한 물질을 포함하는 키트를 제공한다. 특정 구현예에서, 키트는 본원에 개시된 하나 이상의 세포를 포함하는 용기를 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 냉동 용기에 제공될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 용액, 예를 들어, 매질 중에 제공될 수 있다. 특정 구현예에서, 용기는 약 1천만 내지 약 5억개의 세포를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 용기는 균질한 세포 집단을 포함할 수 있다. 대안적으로, 용기는 불균질한 세포 집단을 포함할 수 있다. 용기에 제공될 수 있는 세포의 비제한적인 예는 간세포, 신장 세포 또는 신장 조직 단편, 췌장 세포 또는 췌도, 흉선 세포 또는 흉선 조직 단편, 또는 폐 세포 또는 폐 조직 단편을 포함한다.

[0137] 특정 구현예에서, 키트는 본원에 개시된 바와 같이, 세포를 림프절에 도입하기 위한 용액을 포함하는, 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다.

[0138] 특정 구현예에서, 키트는 본원에 개시된 바와 같은 림프절에 세포를 전달하기 위한 디바이스(또는 시스템)를 추가로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 키트는 본원에 개시된 바와 같은 내시경을 추가로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 내시경은 바늘에 결합된다. 예를 들어, 그러나, 제한을 두지 않고, 키트는 본원에 개시된 바와 같은 림프절에 세포를 전달하기 위한 바늘 및/또는 내시경을 포함할 수 있다. 이러한 전달 디바이스의 비제한적인 예는 상기 시스템 섹션에 개시되어 있다.

[0139] 실시예

[0140] 하기 실시예는 본 발명의 일부 구현예를 추가로 예시하기 위해 제공되지만, 이는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 이의 예시적인 특성에 의해 당업자에게 공지된 다른 절차, 방법론, 또는 기술이 대안적으로 이용될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0141] 실시예 1. 이식 및 생존력 검사를 위한 간세포 단리

[0142] 본 실시예는 세포 현탁액이 본 개시에 따라 특정 크기의 바늘을 통해 전달될 때 단리된 간세포의 생존력이 유의미하게 영향을 받지 않음을 나타낸다. 본 실시예는 본 개시의 하나의 예시적인 방법에 따라 단리되고 전달된 간세포가 이식을 위해 적합한 생존력을 가질 수 있음을 나타낸다.

[0143] 간 세포를 하기 프로토콜에 따라 단리하였다. 첫째로, 좌측 간엽을 도너 개로부터 외과적으로 얻었고, 추가 처리를 위해 얼음이 포함된 이중 백 용기에서 저온 저장 기술(4°C에서 Belzer 용액으로 정적 보존) 하에서 이동시켰다. 간 세포를 문헌[Seglen PO, Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol, 1976; 13:29-63]에 기술된 2-단계 콜라게나아제 관류 방법을 이용하여 단리하였다. 간단히 말해서, 문맥 캐놀라 또는 임의의 큰 용기에서의 캐놀라를 배치하였다. 배양 접시에 37°C에서 10분 동안 분당 50 mL의 유량으로 EDTA 용액(0.02%)을 간에 관류시켰다. 후속하여, 콜라게나아제 용액(37°C)을 동일한 유량으로 간 샘플을 통해 재순환시켰다. 10분 후에, 간 캡슐을 파쇄하고, 소화된 간 실질조직을 칼슘 글루코네이트 및 인간 혈청 알부민을 함유한 얼음-냉각 Hanks 용액 또는 Plasma-Lyte A 용액 중에 현탁시켰다. 얻어진 간 세포 현탁액을 3회 여과 및 세척하였다.

[0144] 하기에 기술되는 실험 전반에 걸쳐 상이한 단계에서 현탁 용액에서의 단리된 간세포의 생존력을 확인하기 위해 트리판 블루 배제 검사를 이용하였다. 이러한 실험에서, 상이한 세포 농도를 갖는 현탁 용액의 상이한 배치를 상이한 게이지의 EUS FNA 바늘을 통과하기 전 및 후에 세포 생존력에 대해 검사하였다. 도 3은 세포의 2개의 배치의 실험으로부터 얻어진 세포 생존력 결과를 요약한 플롯이다. 도면에 도시된 바와 같이, 모든 검사된 용액은 아니더라도, 대부분의 검사된 용액은 임의의 검사된 EUS 바늘을 통과하기 전 및 후에, 유사한 세포 생존력 수준

을 갖는다.

[0145] 실험에서 사용되는 바늘:

[0146] 19 게이지(19 ga) 바늘(Covidien: Ref# DSN-19-01): 대략 불용 체적은 1.2 mL임.

[0147] 22 게이지(22 ga) 바늘(Covidien: Ref# N22-05): 대략 불용 체적은 0.5 mL임.

[0148] 25 게이지(25 ga) 바늘(Covidien: Ref# DSN-25-01): 대략 불용 체적은 1.1 mL임.

[0149] 배치 #1:

[0150] 도너 ID#: 6303.

[0151] 간 소화 및 단일 세포 간세포 단리 후 초기 생존력: 59.5%. 총 42억4천만개의 살아있는 간세포에 대해(총 800 mL 용액을 갖는 경우 5.3 M/mL).

[0152] 3회 세척 사이클 후 및 이식을 위해 준비된 세포 생존력: 72.04%. 총 4억2천9백만개의 살아있는 간세포에 대해(800 mL 중 총 150 mL 용액이 사용하는 경우 2.86 M/mL).

[0153] 4억2천9백만개의 살아있는 간세포를 대략 20 ml 중에 재현탁시키고, 19, 22 및 25 ga EUS 바늘을 이용하여 생존력에 대해 검사하였다. 표 1은 이러한 실험에서 검사된 상이한 그룹에서 얻어진 생존력 스코어를 요약한 것이다. 대조군은 어떠한 EUS 바늘을 통해 밀어내지 않고 검사후 생존력 평가 전에 그밖에 동일하게 처리한 용액을 나타낸다.

[0154] 표 1. 배치 #1의 생존력 결과

EUS 바늘 게이지	세포 생존력		바늘로부터의 세포 농도
	검사전	검사후	
대조군	72.4%	72.04%	20 M/mL
19		68.2%	15 M/mL
22		67%	18.6 M/mL
25		72.2%	20.1M/mL

[0155]

[0156] 배치 #2:

[0157] 도너 ID#: 6302.

[0158] 간 소화 및 단일 세포 간세포 단리 후 초기 생존력: 67.5%. 총 약 50억개의 살아있는 단리된 간세포에 대해(총 900 mL 용액을 갖는 5.5 M/mL), 실험을 위해 600 ml 용액(약 33억개의 세포)을 사용하였다.

[0159] 3회 세척 사이클 후 및 이식을 위해 준비된 세포 생존력:

[0160] 총 6억2천4백만개의 살아있는 간세포에 대한 71.7% 생존력(150 mL 용액 중 4.16 M/mL).

[0161] 다음날 이식을 위해 UW 중에서 밤새 저장하였다.

[0162] 총 5억6천7백만개의 살아있는 간세포에 대한 76.3% 생존력(70 ml 용액 중 8.1 M/ml).

[0163] 107개의 간세포/ml의 14개의 튜브, 저온보존된 튜브 당 2 ml.

[0164] 총 13억개의 세포에 대한 69.7% 생존력(150 ml 용액 중 9.1 M/ml).

[0165] 간세포를 25 M/ml 및 50 M/ml로 재현탁시키고, 19, 22 및 25 ga EUS 바늘을 이용하여 생존력에 대해 검사하였다. 표 2 및 표 3은 이러한 실험에서 검사된 상이한 그룹에서 얻어진 생존력 스코어를 요약한 것이다. 대조군은 어떠한 EUS 바늘을 통해 밀어내지 않고 검사후 생존력 평가 전에 그밖에 동일하게 처리한 용액을 나타낸다.

[0166] 표 2. 25 M/mL 용액을 갖는 배치 #2의 생존력 결과

EUS 바늘 게이지	세포 생존력		바늘로부터의 세포 농도
	검사전	검사후	
대조군	69.7%	64.5%	16.8M/mL
19		71.6%	15.4M/mL
22		67.4%	18.2M/mL
25		70.7%	13.6M/mL

[0167]

[0168] 표 3. 50 M/mL M/mL 용액을 갖는 실험 #2의 생존력 결과

EUS 바늘 게이지	세포 생존력		바늘로부터의 세포 농도
	검사전	검사후	
대조군	69.7%	73.1%	43.9M/mL
바늘 없음			
19		77.3%	42.9M/mL
22		78.7%	50.3M/mL
25		77.2%	40.6M/mL

[0169]

[0170] 실시예 2. 간 부전의 모델로서 개에서의 문맥대정맥 문합술

[0171] 본 실시예는 간 부전의 치료를 위한 재생 의학을 연구하기 위한 동물 모델을 생성하는 예시적인 수술 절차를 기술한다.

[0172] 도 4에 예시된 바와 같이, 완전한 문맥대정맥 문합술은 간 내로 주요 혈류를 차단하기 위해 수행될 수 있으며, 이는 간 손상을 유발시킬 수 있다. 적절한 수술용 스테이플러를 사용하면 이러한 절차를 거의 출혈 없이 수행할 수 있을 것이다. 간문 내 주요 문맥 정맥(PV)의 동원 이후에, 총 담관(CBD) 및 주요 간 동맥(HA)을 단리시켰다. 상부 장간막 정맥(SMV)과 비장 정맥(SV) 간의 컨플루언스에 대한 주요 PV의 근위부 박리를 또한 수행하였다. 신장 정맥을 향한 원위 절개와 함께 하부-간 하대 정맥(IVC)의 추가 동원을 수행하였다. 분기 전(우측 및 좌측 분지) 주요 PV의 완전한 절찰 및 횡단을 IVC를 향해 미골부로 PV의 동원 전에 관절형 혈관내 스테이플로 수행하였다. IVC를 향한 PV의 완전한 미동부 동원(caudal mobilization)을 수행하고, PV와 IVC 사이의 종단간 문합(6-0 프롤렌의 연속 봉합사)을 수행하였다. 이러한 단계는 IVC의 부분 클램핑 및 근위 PV의 총 클램핑을 포함한다. 완전 지혈이 달성된 후에, 복강을 닫았다. 전신 마취로부터 완전히 회복한 후 동물을 OR에서 발관화하였다.

[0173] 실시예 3. 림프절에서 장기형성을 위한 간세포의 EUS-유도 전달의 전임상 연구

[0174] 본 실시예는 십이지장 주위 림프절(LN) 내로 간세포의 EUS-유도 전달에 의한 큰 동물(개) 모델에서 간 부전의 치료를 예시한 것이다.

[0175] 본원에 기술된 큰 동물 모델(개)에서 전임상 실험은 USDA 지침에 따라 IACUC 프로토콜에 의해 승인받았고, Allegheny Health Network(Highmark, Pittsburgh, PA 소재)의 서비스 실험실에서 유료로 수행되었다. 이러한 실험에서, 간세포 이식을, 완전한 문맥대정맥 문합술(PCS)이 외과적으로 발달된 후에 간 부전이 유도된 개 모델에서 수행하였다.

[0176] 간단하게, 십이지장 주위 림프절(PDLN) 내로의 간세포 이식이 정상 간 세포 구조 및 전체 기능성과 함께 새로운 이소성 간 돌기(bud)의 생성(장기형성)을 유도함을 확인하기 위해 2 동물 그룹을 검사하였다. 대조군은 완전한 외과적 PCS를 받고, 이후에, LN 내에 일반 염수의 모의 주입이 이루어졌다. 연구 그룹은 EUS 방법을 통해 PDLN 내로의 자가 또는 동종 간세포 이식 전에 동일한 초기 PCS 절차를 받았다. 두 그룹 모두는 타크롤리무스 및 프레드니손으로 이루어진 비-특이적 면역억제 요법을 받았다. 두 그룹 모두는 초기 절차 후 6개월 동안 추적하였다. 대조군 동물은 본 연구의 기간에 걸쳐 30% 사망률과 함께 진행성 간 부전을 경험하였다. 연구 그룹 동물은 간 부전의 장기간 징후를 나타내지 않고 사망률을 나타내지 않는다. 이러한 동물들은 간세포가 초기에 이식되는 PDLN 부위의 확대된 징후를 나타낸다. 연구 부검의 종료 동안에, 이러한 동물은 정상 해부학적 및 조직학적 특

징을 갖는 이러한 PDLN에서 이소성 간 조직의 발달을 나타낸다. PDLN에서 이소성 간은 본 연구 기간 동안 지속 가능한 간 기능의 임상적 및 실험실 증거를 나타낸다.

[0177] **도 5**의 연구 다이어그램에 도시된 바와 같이, 그룹 1은 그룹 4 내지 그룹 7에 대한 도너 그룹으로서 역할을 하며, 이는 간세포의 동종 이식편을 수용한 것이다. 그룹 2는 이의 LN 내로 플라시보 주입(염수)과 함께 PCS 절차를 받았다. 그룹 3은 자가 대조군이다. 그룹 4 및 그룹 5는 저용량 수준(75 M HT; 25 M 간세포/mL, 3개의 LN 각각 내에 1 mL의 용액이 주사됨) 또는 중간 용량 수준(150 M HT; 50 M 간세포/mL, 3개의 LN 각각 내에 1 mL의 용액이 주사됨)으로 LN 내에 HT의 직접 주사(도 2에 도시된 바와 같음)를 수용하였다. 그룹 6 및 그룹 7은 최소 침습적 내시경 초음파(EUS)(방법)(**도 1a** 및 **도 1b**에 도시된 바와 같음)를 통해 이의 HT 이식을 받았으며, 상기에 개략된 저용량 및 중간 용량 둘 모두를 갖는다.

[0178] 1차 종점은 90일에 이루어졌으며(그룹 2 내지 7 각각으로부터 N=2 희생), 91일 내지 180일에 추가 장기 안전성 추적을 수행하였으며, 120일(그룹 2 내지 7 각각으로부터 N=1), 150일(그룹 2 내지 7 각각으로부터 N=1) 및 180일(그룹 2 내지 7 각각으로부터 N=1)의 연구 종료에 연구 동물을 중간에 희생시켰다.

[0179] 림프절을 각 시점에 희생된 동물로부터 수확하고, 파라포르말데하이드에 고정시키고, 최적의 절단 온도 화합물 또는 파라핀에 임베딩하였다. 섹션을 제조하고, 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 또는 항-푸마릴아세토아세테이트-하이드롤라아제(FAH) 면역염색과 함께 헤마톡실린으로 염색하였다. FAH는 간세포에서 고도로 발현되고, 이에 따라, 간세포를 동정하기 위해 사용될 수 있다. 섹션을 이미지화하고, 생착된 간세포의 존재 및 이소성 간 조직의 형성에 대해 조직학적으로 평가하였다.

[0180] 통계 분석

[0181] 1차 종점은 90일에 새로이 생착된 간세포를 갖는 림프절의 크기 및 중량(g)이다. 중대형견(23.7 kg)에 대한 전체 크기의 간은 대략 767 ± 48 g으로 계량되는데, 이는 또한, 완전히 생착된 이소성 간의 중량에 대한 추정치 및 치료 그룹 내의 간 중량의 표준 편차로서 역할을 한다. 6개의 처리 그룹 중 4개는 이의 림프절 내로의 직접 주사 또는 내시경 주입에 의한 75 M(저용량) 또는 150 M(중간 용량)의 용량의 동종 간세포를 수용하였다. 주요 효과의 종점 차이 및 용량 수준과 주입 타입의 상호작용을 검사하기 위해 동물의 총 중량(kg)을 조정하는, 4개의 동종 그룹의 공분산의 이원 분석(ANCOVA)을 이용하였다. 치료 그룹 당 5마리의 개는 $\alpha = 0.05$ (양측)를 갖는 F 검사를 이용하여, 각 주요 효과의 2개의 수준 간에 종점의 77 g 차이(0.8 효과 크기)를 탐지하는 데 92% 검정력을, 및 효과 크기가 0.6일 때 주입 타입과 개 수준 간의 상호작용을 탐지하는 데 75% 검정력을 제공한다. 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 간 중량과 이전에 보고된 결과(Kam et al., 1987, Sohlenius-Sternbeck, 2006)를 기초로 한 총 중량 간에 기본적인 선형 관계뿐만 아니라 유의 상관 관계가 존재할 수 있다. 이는 공변량 조정을 고려하지 않기 때문에, 전체 검정력의 보수적인 추정치이다.

[0182] 6개의 그룹 간의 관련된 쌍별 비교뿐만 아니라 치료 그룹 차이에 대한 전체 F 검사를 수행하기 위해 또한, 동일한 종점 및 공변량을 갖는 일원 ANOVA를 이용하였다. 6개의 그룹은 상술된 4개의 동종 그룹 및 내시경 주입을 통한 75 M 자가 간세포를 수용한 하나의 그룹, 및 염수 용액의 내시경 주입을 수용한 하나의 대조군을 포함한다. 그룹 당 5마리의 개는 $\alpha=0.05$ (양측)을 갖는 전체 F 검사를 이용한 동일 평균의 널(null) 가설에 대해 154 g(20% 생착)의 적어도 하나의 차이를 탐지하는 데 100% 검정력을 제공할 수 있다. 이러한 샘플 크기는 0.05 유의 수준을 유지하기 위해 Tukey Kramer(쌍별) 다중 비교 절차를 이용하여 모든 스텝다운 검사에 대해 적어도 230 g(30% 생착)의 차이를 탐지하는 데 90% 검정력을 달성할 수 있다. 이러한 검정력 계산을 PASS 12(Hintze, 2013)를 통해 유도하였다.

[0183] 수술 방법 및 실험 방법

[0184] (I) 라인 배치 및 동물 지원

[0185] 우측 경정맥에 PE 카테터를 삽입하고, 0.9% NaCl IV 지원 유체를 공급하였다. 마비제를 절차의 기간 전반에 걸쳐 시린지 펌프 또는 볼루스 요법을 통해 투여하고 유지하였다. 말초 동맥에 PE 카테터를 삽입하였다. 이중 내강, 장기 중심 정맥 접근(상대 정맥)을 우측 경부절제술 및 외부 우측 경정맥으로의 직접 접근을 통해 추가로 배치시켰다. 영구 중심선 접근을 삽입하고, 복부 절차의 완료 후 후방 경부 영역에서 삽입하고 외부화하였다. 동물의 신체 표면 상에 배치된 전극을 통해 심전 레지스터를 모니터링하였다. 직장 온도를 연속적으로 모니터링하였다. 동물 지원은 SOP ANI-017(USDA 규제 중에서 생존 수술을 수행하기 위한 지침) 및 ANI-032(마취된 환자의 열 규정)에 따른다.

- [0186] (II) 후속 간세포 단리를 위한 좌측 간엽 섹션 절제술
- [0187] 동물을 전신 마취 하에서 안정하게 한 후에, 멸균 방식으로 수술 준비하고 드레이핑하였다. 정중 절개를 통해 복강으로 들어갔다. 간문을 초기에 해부하고 좌측 측면 섹션(LLS)을 단리하였다. 좌측 문맥 정맥(PV) 및 좌측 간 동맥(HA)을 단리하고, 혈관 테이프로 둘러쌌다. LLS를 관절형 혈관내 스테이플의 이용과 함께 제어된 실질 조직 절단을 통해 절제하였다. 좌측 측면 섹션절제술은 전체 간 용적의 대략 20% 제거를 초래한다. 간 좌측 측면 섹션이 수술 부위로부터 제거된 직후에, 시편을 멸균 조건 하에서 백 테이블(BT) 절차로 처리하였다. BT는 모든 혈액을 제거하기 위해 좌측 PV 및 좌측 HA를 차가운 락테이트 링거(LR)로 플러싱하고(플러싱 단계), 이후에, 후속 간 보존을 위해 Belzer 용액을 주입하는 것을 포함한다. 간 섹션을 이중 플라스틱 백에 패키징하고, (간 세포를 얻기 위해) 후속 세포 단리가 수행되는 실험실로의 후속 이동을 위해 얼음 냉각기 상에 배치시켰다.
- [0188] (III) 문맥대정맥 문합술
- [0189] 좌측 측면 섹션 절개술의 완료 후 간문의 확장된 외과적 절개를 수행하였다. 완전한 문맥대정맥 문합술을 실시예 2에 기술된 바와 같은 절차에 따라 수행하였다.
- [0190] (IV) 이식을 위한 간세포 단리
- [0191] 간 세포를 실시예 1에 기술된 절차에 따라 단리하였다. 얻어진 간 세포 현탁액을 여과하고, 세척하였다. 단리된 간세포의 생존력을 확인하기 위해 트리판 블루 배제 검사를 이용하였다. 동물이 간세포 자체를 수용한 자가-이식 그룹에서, 동물은 추가 5시간 동안 전신 마취를 한 상태에서 유지시키면서 세포를 단리시키고, 후속 주입을 위해 준비하였다.
- [0192] (V) 직접 외과적 주입을 통한 간세포 이식
- [0193] 품질 관리(세포 생존력, 세포수, 배양, 및 민감도)를 위한 샘플을 획득한 후 수술 외과이에 의해 간세포 이식을 수행하였다. 장간막 및 십이지장 주위 림프절을 할당된 실험 그룹에 의해 결정된 바와 같이, 직접 외과적 방법을 통해 또는 내시경 주사(하기에 기술됨)를 통해 직접 실질조직 세포내 주입(세포는 주입 매질 중 작은 용량(1 내지 3 ml) 내에서 25×10^6 내지 50×10^6 개의 생존 세포/ml을 수득함)을 받았다. 림프절 내로의 이소성 간세포 주입 후 적절한 지혈이 완전히 달성되었다. 세심한 지혈을 달성한 후 복강에 항생제 및 항진균제(네오마이신 500mg/L, 폴리믹신 15,000 단위/kg/L, 바시트라신 1000 단위/kg/L, 및 암포테리신 B 4 mg/kg/L) 용액을 충분히 관주하였다. 복부 벽을 3층 방식으로 봉합하고, 배출관을 이용하지 않았다. 봉합 수술 드레싱을 피부 봉합 위에 배치시켰다. 동물은 전신 마취 절차로부터 적절히 회복되었으며, 수술실에서 추가로 발판되었다. 동물을 후속하여, 이의 수술후 관리를 받기 위해 적절하게 구비된 동물 시설로 옮겼다.
- [0194] (VI) 관내 내시경 방법을 통한 간세포 이식
- [0195] PCS의 완료 후 전신 마취 하에 동물에 내시경 주사를 수행하였다. EUS에서 풍부한 경험을 갖는 공인된 담도-췌장 내시경 의학자는 이러한 절차를 수행하였다. 선형 내시경 초음파(Olympus GF-UCT 180)를 이러한 실험을 위해 이용하였다. 내시경을 동물의 입을 통해 도입하고, 위 및 십이지장으로 진행시켰다. 내시경 초음파(EUS) 프로브는 십이지장 주위 림프절(LN)의 위치화를 보조하고 유도하였다. LN을 경위장관 및/또는 경십이지장 방법을 통해 직접적으로 도달시켰다. LN을 미세 바늘 흡인(FNA) 바늘(Boston scientific, 19 내지 25 G 범위 바늘)로 적절히 진입시킨 후에, 이러한 EUS 유도 절차를 통해 LN 내로 성공적인 바늘 삽입 후 간세포 이식을 수행하기 위해 수술 외과이는 내시경 의학자를 지정하였다. 이전에 단리된 간세포를 25×10^6 또는 50×10^6 개의 세포/mL를 함유한 용액 중에서 유지시켰다. 용액 중 간세포를 미세 바늘 흡인(FNA) 바늘(Boston scientific, 19 내지 25 G 범위 바늘)을 이용하여 십이지장 주위 LN 내로 직접적으로 이식하였다. 수술 절차가 완료된 직후에, 동물을 전신 마취 절차로부터 적절하게 회복시키고, 수술실에서 추가로 발판하였다. 동물을 후속하여 이의 수술후 관리를 받기 위해 적절히 갖춘 동물 시설로 옮겼다.
- [0196] (VII) 회복 및 수술후 관리
- [0197] 동물은 자발적 환기를 재개하면서 적절한 모니터링을 통해 마취로부터 회복되었다. 동물을 훈련된 전임상 시설 스태프에 의해 수술후 첫 2 내지 3일 동안(명시된 경우 더 긴 시간 동안) 하루에 24시간 모니터링하고, 이후에, 연구 기간 동안 적어도 매일 모니터링하였다. 동물의 수술후 관리는 수의사와 상의하여 연구 책임자의 지시 하에서 이루어졌다.
- [0198] 동물을 면밀하게, 자주 모니터링하였다. 각 동물을 통증의 평가 및 완화를 위한 하기 중-특이적 기준을 기초로

하여 평가하였다: 발성, 우울, 호흡 > 50% 증가(20/분을 기준으로, 개에서 평균 호흡률). 또한, 심박수를 모니터링하였다. 온도를 또한 모니터링하였다.

[0199] 통증 관리 및 모니터링

[0200] 동물을 초기에, 전반적인 활동 수준, 수술 상처, 식욕, 및 식이에 대한 태도를 포함하지만, 이로 제한되지 않는 통증 스코어링 시스템을 이용하여, 수술후 통증 및 고통의 다음 지표에 대해 시간별로 모니터링하였다.

[0201] 수술후 통증을 하기 지표를 기반으로 기술된 진통제 투여로 치료하였다: 약 10 내지 15%의 심박수 증가; 및 약 40%의 호흡률 증가. 통증을, 부프레노르핀 또는 부토르파놀 및 케토프로펜, 또는 수의사와 상의하여 결정된 다른 보조 진통제의 예정된 투여로 관리하였다.

[0202] 모든 동물은 수술후 부프레노르핀(0.01 mg/kg IV q6-8h) 진통제를 수용하였다. 여기에 추가 또는 대안적인 진통제가 필요한 경우에 케토프로펜(1 내지 2 mg/kg IV) 및 부토르파놀(0.1 mg/kg IV q6h)을 보충하였다.

[0203] 추가 지원 및 예방적 조치

[0204] 동물은 1주 동안 매일 IV 항생제, 및 수술후 기간 동안 추가 약제를 수용하였다. 수술후 동물은 임상 및 실험실 파라미터에 따라 조정된 유지 IV 유체를 수용하였다.

[0205] 또한, 수술후 기간 전반에 걸쳐, 위 운동성(장폐색 등)을 모니터링하였다.

[0206] 중심선을 수술 절차의 마지막에 배치시켰다. 감염의 징후, 동물에 대한 고통 또는 개에게 가해진 외상이 없는 경우에, 본 연구 기간 동안 이러한 IV 접근을 제거하고 유지하였다.

[0207] 면역억제(IS) 요법:

[0208] 동물은 간세포 이식 전에 수술실에서 솔루메드롤(1 g IV)을 투여받았다. 수술 후 IS 요법은 하기와 같다:

[0209] 본 연구의 기간 동안 Prograf(대략 0.3 mg/kg) Po q 12시간 모니터링하고, 이에 따라 독성을 예방하도록 조정하였다.

[0210] 프레드니손 20 mg po qd x 1주

[0211] 프레드니손 10 mg po qd x 1주

[0212] 프레드니손 5 mg po qd, 본 연구의 기간 동안.

[0213] 실시예 4. 림프절에서 장기형성을 위한 간세포의 EUS-유도 전달의 전임상 연구

[0214] 본 실시예는 십이지장 주위 림프절(LN) 내로의 간세포의 EUS-유도 전달에 의해 큰 동물(개) 모델에서 간 부전의 치료를 예시한 것이다.

[0215] 본원에 기술된 큰 동물 모델(개)에서의 전임상 실험은 USDA 지침에 따라 IACUC 프로토콜에 의해 승인되었고, Allegheny Health Network(Highmark, Pittsburgh, PA 소재)에서 서비스 실험실에서 유료로 수행되었다. 이러한 실험에서, 간세포 이식을, 완전한 문맥대정맥 문합술(PCS)이 외과적으로 발달된 후에 간 부전이 유도된 개 모델에서 수행하였다.

[0216] 간단하게, 십이지장 주위 림프절(PDLN) 내로의 간세포 이식이 정상 간 세포 구조 및 전체 기능성과 함께 새로운 이소성 간 돌기의 생성(장기형성)을 유도함을 확인하기 위해 동물 그룹을 검사하였다. 연구 그룹은 EUS 방법을 통해 또는 직접 주사를 통해 PDLN 내로의 자가 또는 동종 간세포 이식 전에 동일한 초기 PCS 절차를 받았다. 모든 그룹은 타크롤리무스 및 프레드니손으로 이루어진 비-특이적 면역억제 요법을 받았다. 그룹을 초기 절차 후 150일 동안 추적하였다.

[0217] 동물은 (도 2에 도시된 바와 같이) HT를 LN 내로 직접 주사를 통해 또는 (도 1a 및 도 1b에 도시된 바와 같이) 최소 침습적 내시경 초음파(EUS)를 통해 수용하였다. 동물은 7천5백만개의 HT(25 M 간세포/mL, 1 mL의 용액이 3개의 LN 각각 내에 주사됨), 또는 1억5천만개의 HT(50 M 간세포/mL, 1 mL의 용액이 3개의 LN 각각 내에 주사됨)를 수용하였다.

[0218] 동물을 6일, 60일, 90일, 또는 150일에 희생시켰다.

[0219] 도 6a는 정상 간 조직에서 간세포의 마커인 CK-18의 양성 염색을 도시한 것이며, 도 6b 및 도 6c는 각각 EUS 및 직접 주사에 의한 이식 후 6일에 림프절에 CK-18 면역염색된 간세포의 존재를 도시한 것이다. 이러한 초기 결과

는 직접 주사 및 EUS 주사 그룹 둘 모두에서 림프절에 간세포의 존재를 나타낸다. EUS를 통해 림프절 내로 전달된 1차 간세포는 성공적으로 간 조직을 형성하였다.

[0220] **도 7a 내지 도 7d**는 EUS에 의해 간세포의 이식 후 간 조직의 형성을 도시한 것이다. 림프절을 각 시점에 희생된 동물로부터 수확하고, 파라포름알데하이드에서 고정시키고, 파라핀에 임베딩하였다. 섹션을 제조하고, 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 또는 항-푸마릴아세토아세테이트-하이드롤라아제(FAH) 면역염색을 갖는 헤마톡실린으로 염색하였다. FAH는 간세포에서 고도로 발현되고, 이에 따라, 간세포를 동정하기 위해 사용될 수 있다. 섹션을 이미징화하였고, 생성된 간세포의 존재 및 이소성 간 조직의 형성에 대해 조직학적으로 평가하였다.

[0221] **도 7a**는 EUS에 의한 자가 간세포의 이식 후 림프절의 조직학 이미지를 도시한 것이다. 림프절 당 약 25×10^6 개의 자가 간세포를 EUS에 의해 이식하고, 림프절을 이식 후 약 90일 동안 수집하였다. 림프절의 섹션을 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다. 더 높은 배율의 H&E 염색(우측)은 간 조직(화살표)이 생성된 간세포로부터 형성되었음을 나타낸다.

[0222] **도 7b**는 EUS에 의한 동종 간세포의 이식 후 림프절의 조직학 이미지를 도시한 것이다. 림프절 당 약 50×10^6 개의 동종 간세포를 EUS에 의해 이식하고, 림프절을 이식 후 약 90일 동안 수집하였다. 림프절의 섹션을 H&E로 염색하였다. 간 조직(화살표)은 림프절의 다양한 부분에 형성되었다.

[0223] **도 7c**는 EUS에 의한 자가 간세포의 이식 후 림프절의 조직학 이미지를 도시한 것이다. 림프절 당 약 50×10^6 개의 자가 간세포를 EUS에 의해 이식하고, 림프절을 이식 후 약 60일 동안 수집하였다. 림프절의 섹션을 H&E(우측 패널) 또는 항-푸마릴아세토아세테이트-하이드롤라아제(FAH) 면역염색을 갖는 헤마톡실린(좌측 패널)으로 염색하였다. 간 조직(화살표)은 림프절의 다양한 부분에 형성되었고, FAH-양성 간세포를 포함하였다.

[0224] **도 7d**는 EUS에 의한 동종 간세포의 이식 후 림프절의 조직학 이미지를 도시한 것이다. 림프절 당 약 25×10^6 개의 동종 간세포를 EUS에 의해 이식하고, 림프절을 이식 후 약 150일 동안 수집하였다. 림프절의 섹션을 H&E(우측 패널) 또는 항-푸마릴아세토아세테이트-하이드롤라아제(FAH) 면역염색을 갖는 헤마톡실린(좌측 패널)으로 염색하였다. 간 조직(화살표)은 림프절의 다양한 부분에 형성되었고, FAH-양성 간세포를 포함하였다.

[0225] 연구 그룹 동물은 간 부전의 장기간 징후를 나타내지 않고 사망률을 나타내지 않는다. 이러한 동물들은 간세포가 초기에 이식되는 PDLN 부위의 확대된 징후를 나타낸다. 연구 부검의 종료 동안에, 이러한 동물은 정상 해부학적 및 조직학적 특징을 갖는 이러한 PDLN에서 이소성 간 조직의 발달을 나타낸다. PDLN에서 이소성 간은 본 연구 기간 동안 지속 가능한 간 기능의 임상적 및 실험실 증거를 나타낸다.

[0226] **수술 방법 및 실험 방법**

[0227] (I) 라인 배치 및 동물 지원

[0228] 우측 경정맥에 PE 카테터를 삽입하고, 0.9% NaCl IV 지원 유체를 공급하였다. 마비제를 절차의 기간 전반에 걸쳐 시린지 펌프 또는 볼루스 요법을 통해 투여하고 유지하였다. 말초 동맥에 PE 카테터를 삽입하였다. 이중 내강, 장기 중심 정맥 접근(상대 정맥)을 우측 경부절제술 및 외부 우측 경정맥으로의 직접 접근을 통해 추가로 배치시켰다. 영구 중심선 접근을 삽입하고, 복부 절차의 완료 후 후방 경부 영역에서 삽입하고 외부화하였다. 동물의 신체 표면 상에 배치된 전극을 통해 심전 레지스터를 모니터링하였다. 직장 온도를 연속적으로 모니터링하였다. 동물 지원은 SOP ANI-017(USDA 규제 중에서 생존 수술을 수행하기 위한 지침) 및 ANI-032(마취된 환자의 열 규제)에 따른다.

[0229] (II) 후속 간세포 단리를 위한 좌측 간엽 섹션 절제술

[0230] 동물을 전신 마취 하에서 안정하게 한 후에, 멸균 방식으로 수술 준비하고 드레이핑하였다. 정중 절개를 통해 복강으로 들어갔다. 간문을 초기에 해부하고 좌측 측면 섹션(LLS)을 단리하였다. 좌측 문맥 정맥(PV) 및 좌측 간 동맥(HA)을 단리하고, 혈관 테이프로 둘러쌌다. LLS를 관절형 혈관내 스테이플의 이용과 함께 제어된 실질 조직 절단을 통해 절제하였다. 좌측 측면 섹션절제술은 전체 간 용적의 대략 20% 제거를 초래한다. 간 좌측 측면 섹션이 수술 부위로부터 제거된 직후에, 시편을 멸균 조건 하에서 백 테이블(BT) 절차로 처리하였다. BT는, 모든 혈액을 제거하기 위해 좌측 PV 및 좌측 HA를 차가운 락테이트 링거(LR)로 플러싱하고(플러싱 단계), 이후에, 후속 간 보존을 위해 Belzer 용액을 주입하는 것을 포함한다. 간 섹션을 이중 플라스틱 백에 패킹하고, (간 세포를 얻기 위해) 후속 세포 단리가 수행되는 실험실로의 후속 이동을 위해 얼음 냉각기 상에 배치시켰다.

- [0231] (III) 문맥대정맥 문합술
- [0232] 좌측 측면 섹션 절개술의 완료 후 간문의 확장된 외과적 절개를 수행하였다. 완전한 문맥대정맥 문합술을 실시 예 2에 기술된 절차에 따라 수행하였다.
- [0233] (IV) 이식을 위한 간세포 분리
- [0234] 간 세포를 실시예 1에 기술된 절차에 따라 분리하였다. 얻어진 간 세포 현탁액을 여과하고, 세척하였다. 분리된 간세포의 생존력을 확인하기 위해 트리판 블루 배제 검사를 이용하였다. 동물이 간세포 자체를 수용한 자가-이식 그룹에서, 동물은 추가 5시간 동안 전신 마취를 한 상태에서 유지시키면서 세포를 분리시키고, 후속 주입을 위해 준비하였다.
- [0235] (V) 직접 외과적 주입을 통한 간세포 이식
- [0236] 품질 관리(세포 생존력, 세포수, 배양, 및 민감도)를 위한 샘플을 획득한 후 수술 외과이에 의해 간세포 이식을 수행하였다. 장간막 및 십이지장 주위 림프절은, 할당된 실험 그룹에 의해 결정된 바와 같이, 직접 외과적 방법을 통해 또는 내시경 주사(하기에 기술됨)를 통해 직접 실질조직 세포내 주입(세포는 주입 매질 중 작은 용량(1 내지 3 ml) 내에서 25×10^6 내지 50×10^6 개의 생존 세포/ml을 수득함)을 받았다. 림프절 내로의 이소성 간세포 주입 후 적절한 지혈이 완전히 달성되었다. 세심한 지혈을 달성한 후 복강에 항생제 및 항진균제(네오마이신 500mg/L, 폴리믹신 15,000 단위/kg/L, 바시트라신 1000 단위/kg/L, 및 암포테리신 B 4 mg/kg/L) 용액을 충분히 관주하였다. 복부 벽을 3층 방식으로 봉합하고, 배출관을 이용하지 않았다. 봉합 수술 드레싱을 피부 봉합 위에 배치시켰다. 동물은 전신 마취 절차로부터 적절히 회복되었으며, 수술실에서 추가로 발판되었다. 동물을 후속하여, 이의 수술후 관리를 받기 위해 적절하게 구비된 동물 시설로 옮겼다.
- [0237] (VI) 관내 내시경 방법(EUS)을 통한 간세포 이식
- [0238] PCS의 완료 후 전신 마취 하에 동물에 내시경 주사를 수행하였다. EUS에서 풍부한 경험을 갖는 공인된 담도-췌장 내시경 의학자는 이러한 절차를 수행하였다. 선형 내시경 초음파(Olympus GF-UCT 180)를 이러한 실험을 위해 이용하였다. 내시경을 동물의 입을 통해 도입하고, 위 및 십이지장으로 진행시켰다. 내시경 초음파 프로브(EUS) 프로브는 십이지장 주위 림프절(LN)의 위치화를 보조하고 유도하였다. LN을 경위장관 및/또는 경십이지장 방법을 통해 직접적으로 도달시켰다. LN을 미세 바늘 흡인(FNA) 바늘(Boston scientific, 19 내지 25 G 범위 바늘)로 적절히 진입시킨 후에, 이러한 EUS 유도 절차를 통해 LN 내로 성공적인 바늘 삽입 후 간세포 이식을 수행하기 위해 수술 외과이는 내시경 의학자를 보조하였다. 이전에 분리된 간세포를 25×10^6 또는 50×10^6 개의 세포/mL를 함유한 용액 중에서 유지시켰다. 용액 중 간세포를 미세 바늘 흡인(FNA) 바늘(Boston scientific, 19 내지 25 G 범위 바늘)을 이용하여 십이지장 주위 LN 내로 직접적으로 이식하였다. 수술 절차가 완료된 직후에, 동물을 전신 마취 절차로부터 적절하게 회복시키고, 수술실에서 추가로 발판하였다. 동물을 후속하여 이의 수술후 관리를 받기 위해 적절히 갖춘 동물 시설로 옮겼다.
- [0239] (VII) 회복 및 수술후 관리
- [0240] 동물은 자발적 환기를 재개하면서 적절한 모니터링을 통해 마취로부터 회복되었다. 동물을 훈련된 전임상 시설 스태프에 의해 수술후 첫 2 내지 3일 동안(명시된 경우 더 긴 시간 동안) 하루에 24시간 모니터링하고, 이후에, 연구 기간 동안 적어도 매일 모니터링하였다. 동물의 수술후 관리는 수의사와 상의하여 연구 책임자의 지시 하에서 이루어졌다.
- [0241] 동물을 면밀하게, 자주 모니터링하였다. 각 동물을 통증의 평가 및 완화를 위한 하기 중-특이적 기준을 기초로 하여 평가하였다: 발성, 우울, 호흡 > 50% 증가(20/분을 기준으로, 개에서 평균 호흡률). 또한, 심박수를 모니터링하였다. 온도를 또한 모니터링하였다.
- [0242] 통증 관리 및 모니터링
- [0243] 동물을 초기에, 전반적인 활동 수준, 수술 상처, 식욕, 및 식이에 대한 태도를 포함하지만, 이로 제한되지 않는 통증 스코어링 시스템을 이용하여, 수술후 통증 및 고통의 다음 지표에 대해 시간별로 모니터링하였다.
- [0244] 수술후 통증을 하기 지표를 기반으로 기술된 진통제 투여로 치료하였다: 약 10 내지 15%의 심박수 증가; 및 약 40%의 호흡률 증가. 통증을, 부프레노르핀 또는 부토르파놀 및 케토프로펜, 또는 수의사와 상의하여 결정된 다른 보조 진통제의 예정된 투여로 관리하였다.

- [0245] 모든 동물은 수술후 부프레노르핀(0.01 mg/kg IV q6-8h) 진통제를 수용하였다. 여기에 추가 또는 대안적인 진통제가 필요한 경우에 케토프로펜(1 내지 2 mg/kg IV) 및 부토르파놀(0.1 mg/kg IV q6h)을 보충하였다.
- [0246] 추가 지원 및 예방적 조치
- [0247] 동물은 1주 동안 매일 IV 항생제, 및 수술후 기간 동안 추가 약제를 수용하였다. 수술후 동물은 임상 및 실험실 파라미터에 따라 조정된 유지 IV 유체를 수용하였다.
- [0248] 또한, 수술후 기간 전반에 걸쳐, 위 운동성(장폐색 등)을 모니터링하였다.
- [0249] 중심선을 수술 절차의 마지막에 배치시켰다. 감염의 징후, 동물에 대한 고통 또는 개에게 가해진 외상이 없는 경우에, 본 연구 기간 동안 이러한 IV 접근을 제거하고 유지하였다.
- [0250] 면역억제(IS) 요법:
- [0251] 동물은 간세포 이식 전에 수술실에서 솔루메드롤(1 g IV)을 투여받았다. 수술 후 IS 요법은 하기와 같다:
- [0252] 본 연구의 기간 동안 Prograf(대략 0.3 mg/kg) Po q 12시간 모니터링하고, 이에 따라 독성을 예방하도록 조정하였다.
- [0253] 프레드니손 20 mg po qd x 1주
- [0254] 프레드니손 10 mg po qd x 1주
- [0255] 프레드니손 5 mg po qd, 이러한 연구 기간 동안.
- [0256] 본 개시의 바람직한 구현예가 본원에 나타나고 기술되었지만, 당업자에게, 이러한 구현예가 단지 일 예로서 제공된다는 것이 명백할 것이다. 수많은 변형, 변경, 및 치환은 본 개시를 벗어나지 않고 당업자에게 일어날 것이다. 본 개시의 구현예에 대한 다양한 대안이 본 개시를 실시하는 데 이용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 하기 청구범위가 본 개시의 범위를 규정하며, 이러한 청구범위 내의 방법 및 구조 및 이의 등가물이 이에 의해 포함되는 것으로 의도된다.
- [0257] 다양한 특허, 특허 출원, 간행물, 제품 설명, 프로토콜, 및 서열 수탁 번호는 본 출원 전반에 걸쳐 인용되며, 이의 발명은 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.

도면

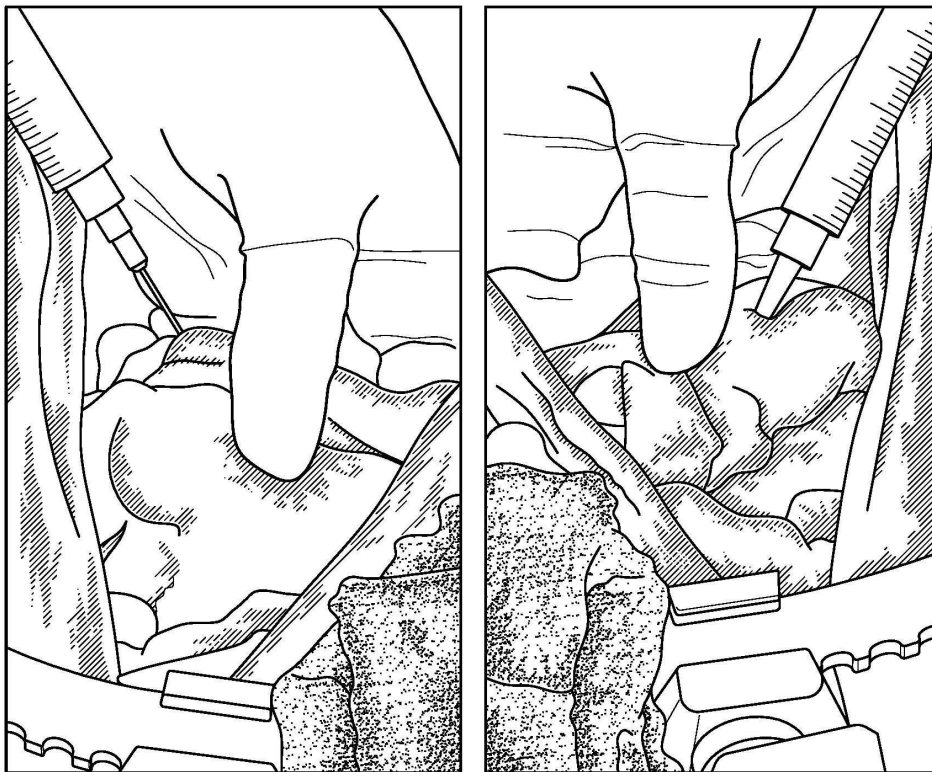
도면1a



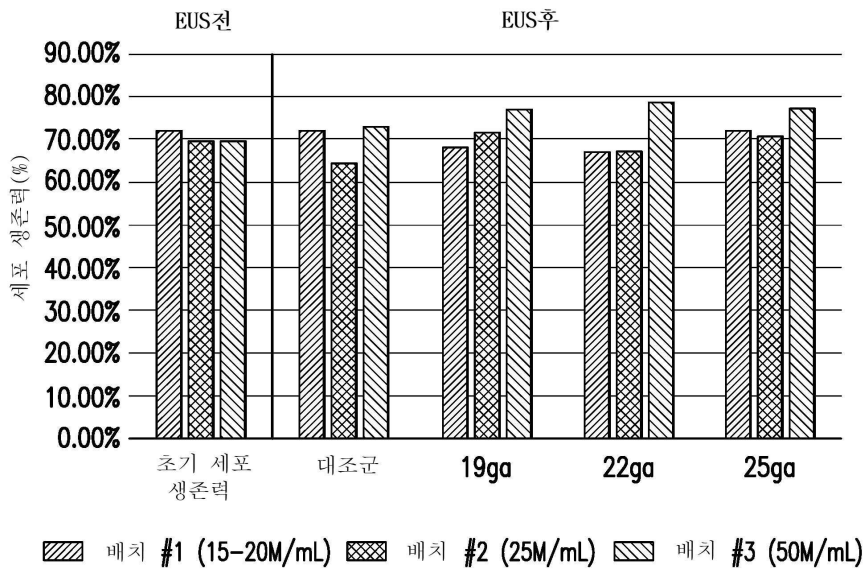
도면1b



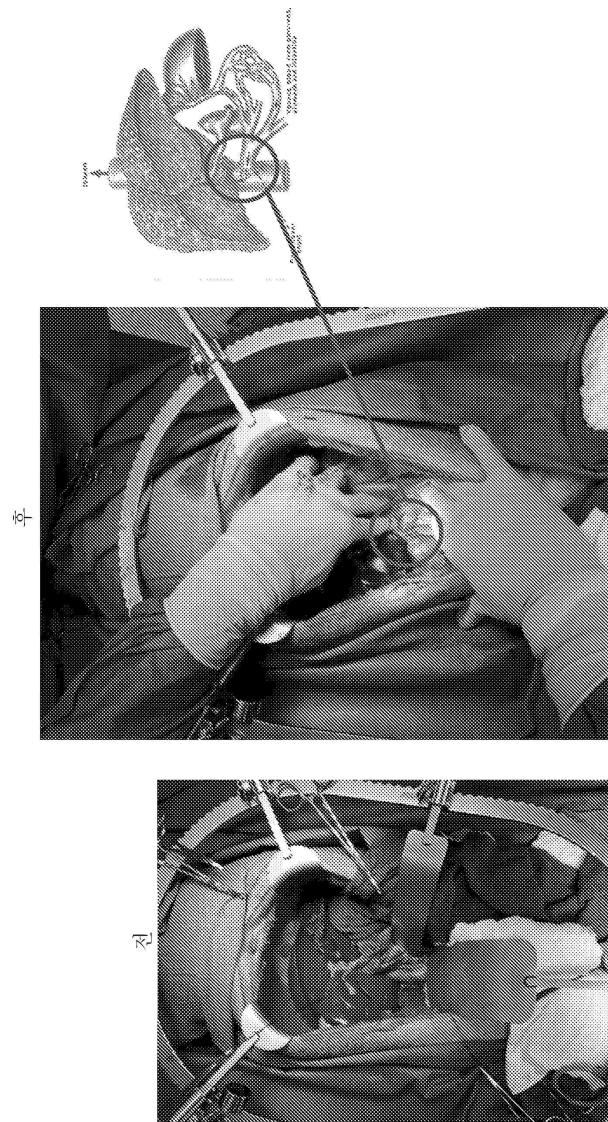
도면2



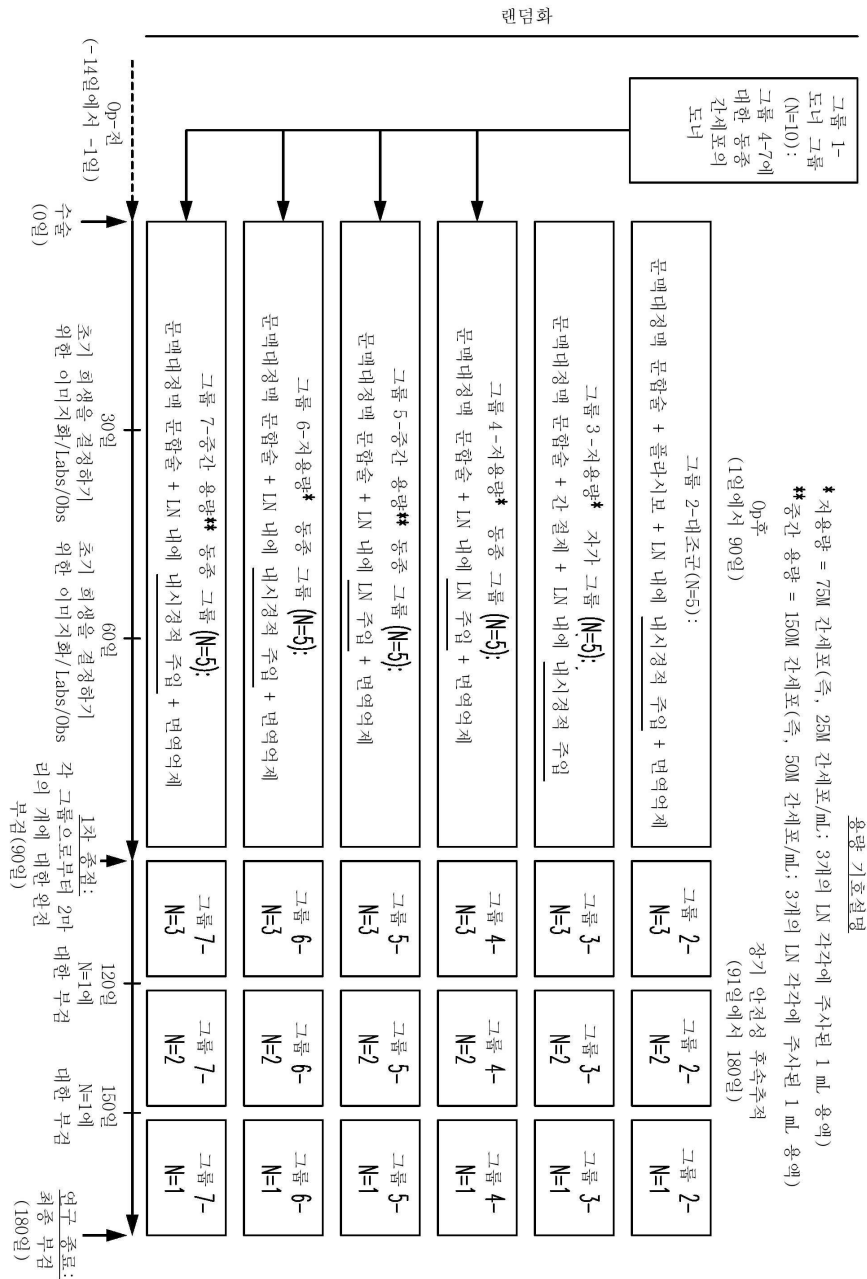
도면3



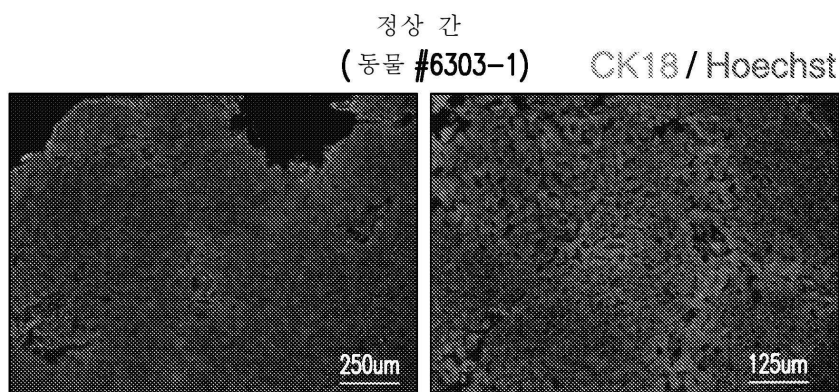
도면4



도면5

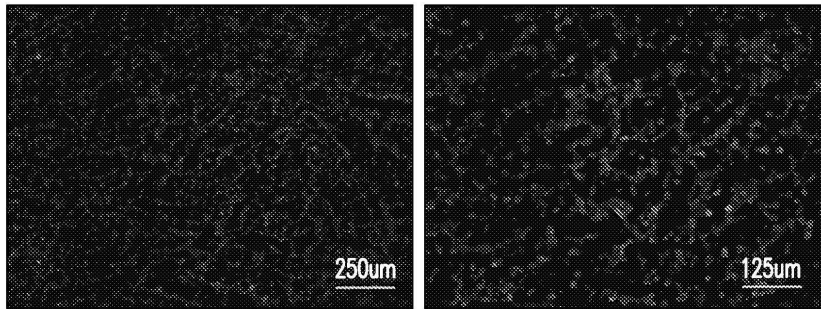


도면6a



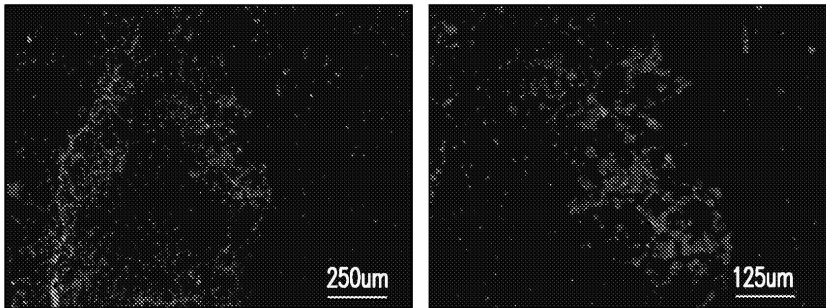
도면6b

EUS 주사를 통한 LN에서의 HT
(동물 #6303-3)

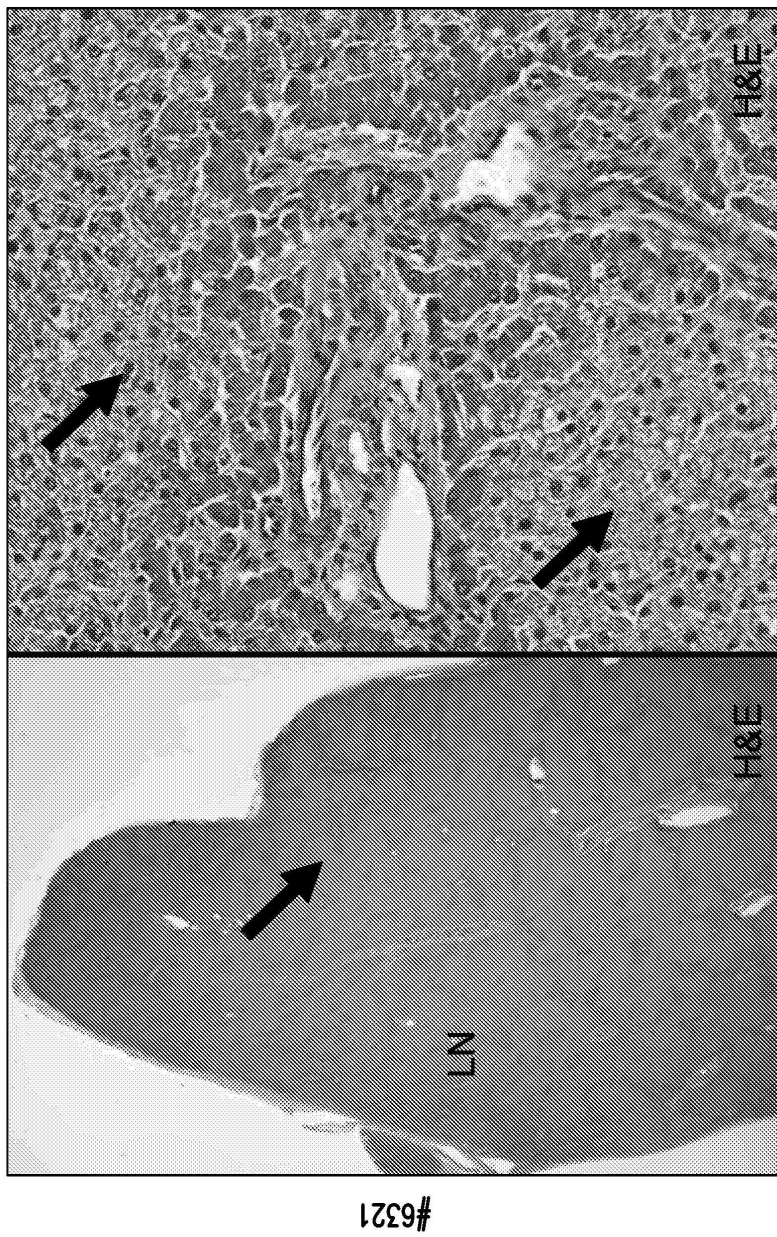


도면6c

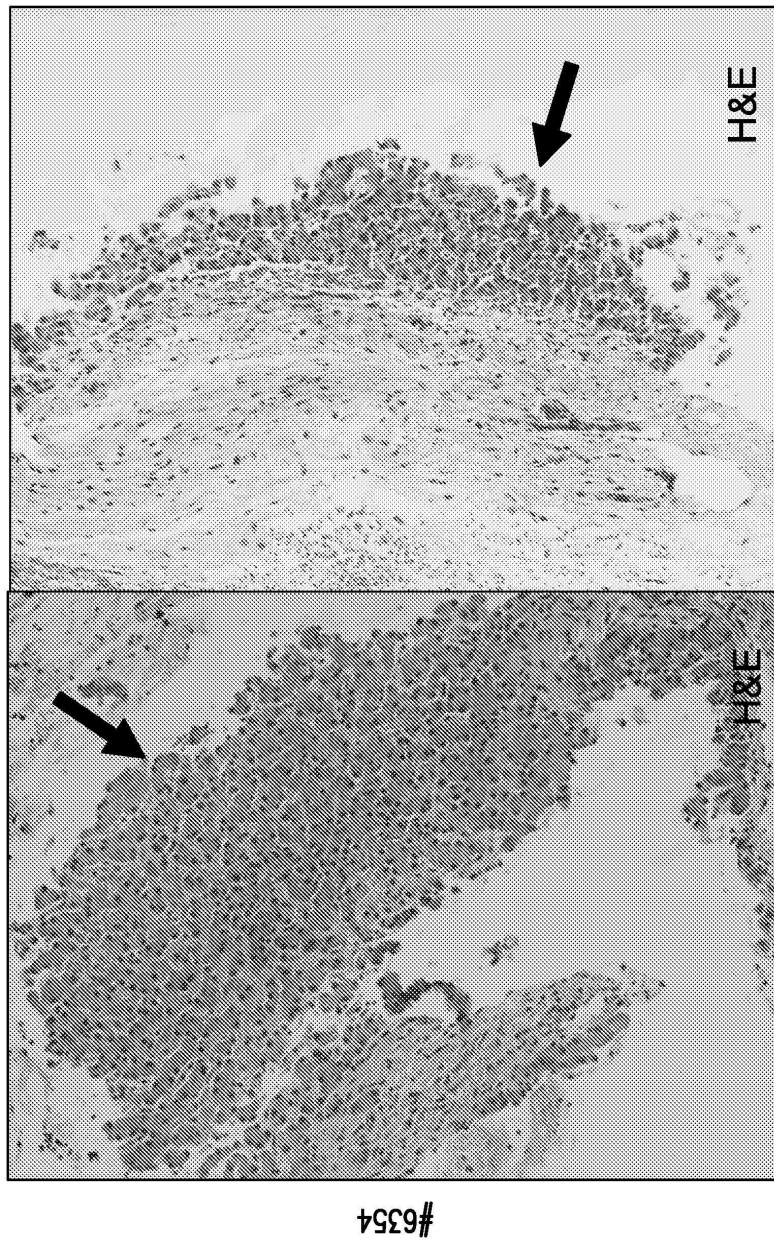
직접 주사를 통한 LN에서의 HT
(동물 #6303-3)



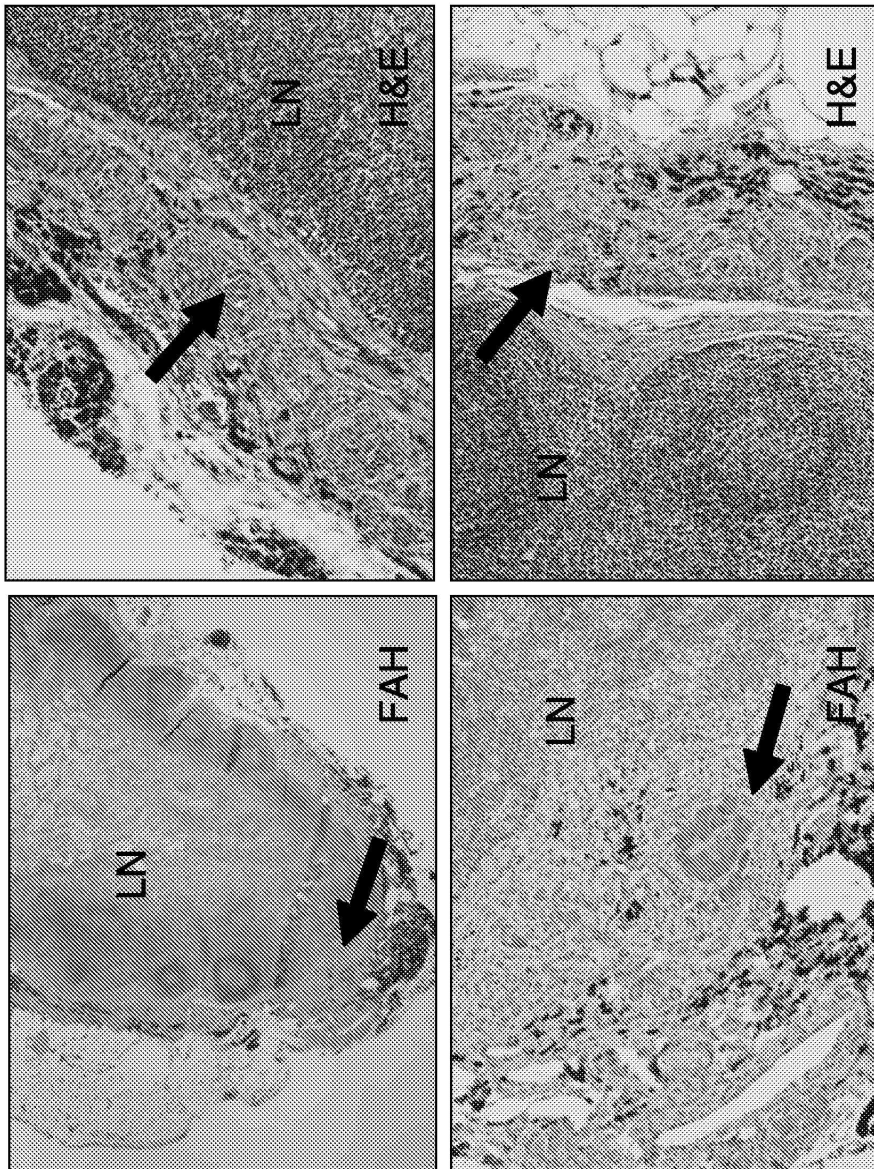
도면7a



도면7b

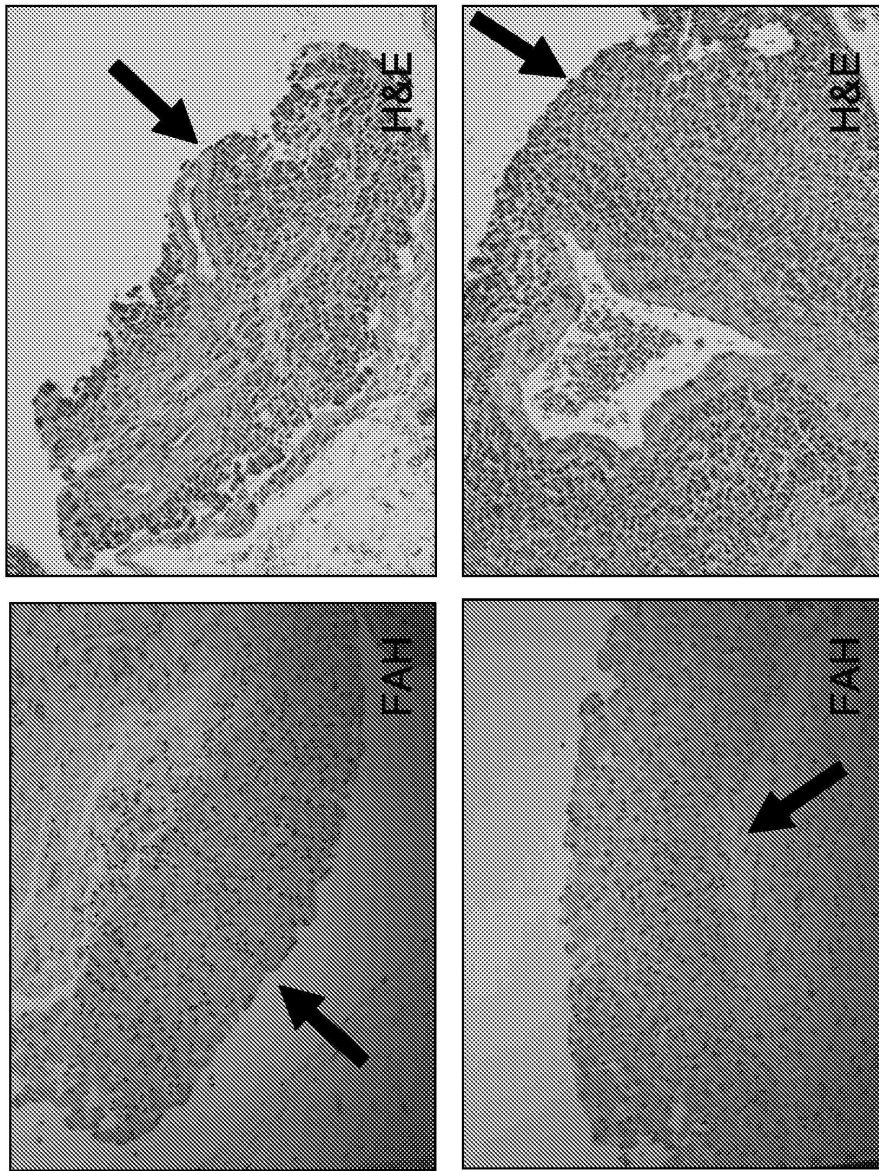


도면7c



#636090

도면7d



#6347