(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월03일
(11) 등록번호 10-2762505
(24) 등록일자 2025년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) *A61K 35/35* (2015.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 35/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7027026
(22) 출원일자(국제) 2018년02월20일
심사청구일자 2021년02월15일
(85) 번역문제출일자 2019년09월16일
(65) 공개번호 10-2019-0116439
(43) 공개일자 2019년10월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/018684
(87) 국제공개번호 WO 2018/152488
국제공개일자 2018년08월23일
(30) 우선권주장
62/460,267 2017년02월17일 미국(US)
62/574,119 2017년10월18일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2014138486 A1*
Reinhold Forster 외, "Orchestrating the organizers: lymphotoxin-ß receptor conducts fibroblastic reticular cell maturation", Immunity, 제38권, 제851-853면 (2013. 5. 23.)*
Robert L. Ferris 외, "Lymphatics, lymph nodes and the immune system: barriers and gateways for cancer spread", Clin. Exp. Metastasis, 제29권, 제729-736면 (2012년)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
유니버시티 오브 피츠버그-오브 더 커먼웰쓰 시스템 오브 하이어 에듀케이션
미국 15260 펜실베니아 피츠버그 새커리 애비뉴 130 가드너 스틸 컨퍼런스 센터 1층
(72) 발명자
라가세 에릭
미국 15215 펜실베니아주 피츠버그 델라필드 로드 1000
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 최승희

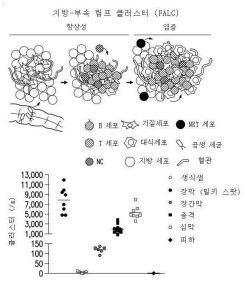
(54) 발명의 명칭 **이식, 조직 재생, 장기형성 및 다중 조직 기능을 위한 부위로서의 지방-부속 림프 클러스터**

(57) 요 약

본 발명은, 기능성 이소성 조직을 형성하기 위해 사용될 수 있는, 지방-부속 림프 클러스터 ("FALC" 또는 "밀키 스팟")에서의 세포의 생착 및 증식에 관한 것이다. 본 발명은, 림포톡신 베타 수용체 (LTβR) 및/또는 NF-κB-유도성 키나제 (NIK) 신호전달 경로를 활성화함으로써, FALC에서 세포를 이식 및 증식하기 위한 방법 및 조성물을

(뒷면에 계속)

대 표 도



또한 제공한다. 또한, 본 발명은, FALC (밀키 스팟)에서 이소성 간 조직을 확립하고, 치료학적 이점을 위해 상기한 이소성 간 조직을 이용하기 위한, 방법 및 조성물을 제공하며, 치료학적 이점을 위해 개체에서 사용될 수 있는 이소성 신장 조직을 FALC에서 형성하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

(52) CPC특허분류
A61K 35/33 (2013.01)
A61K 35/35 (2013.01)
A61K 35/407 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 세포 및 하나 이상의 물질을 포함하는,

개체의 지방-부속 림프 클러스터 (fat-associated lymphoid cluster) 또는 림프절에서 이소성 조직 (ectopic tissue)을 형성하기 위한 조성물로서,

상기 하나 이상의 세포가 상기 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 도입되고,

상기 하나 이상의 세포가: (a) 간 세포를 포함하고, 상기 이소성 조직이 이소성 간 조직을 포함하거나, 또는 (b) 신장 세포, 신장 조직 단편, 또는 이들의 조합을 포함하고, 상기 이소성 조직이 이소성 신장 조직을 포함하고,

상기 하나 이상의 물질이 개체에 투여시 이소성 조직의 형성을 촉진하고,

상기 하나 이상의 물질이 자이모산 (zymosan)을 포함하는 염증 촉진 물질을 포함하는, 조성물.

청구항 2

간세포 및 하나 이상의 물질을 포함하는,

간 기능 강화가 필요한 개체를 치료하기 위한 조성물로서,

상기 간세포가 지방-부속 림프 클러스터 (fat-associated lymphoid cluster) 또는 림프절에 도입되고,

상기 하나 이상의 물질이 개체에 투여시 상기 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서 이소성 간 조직의 형성을 촉진하고,

상기 하나 이상의 물질이 자이모산 (zymosan)을 포함하는 염증 촉진 물질을 포함하는, 조성물.

청구항 3

(a) 신장 세포, 신장 조직 단편, 또는 이들의 조합, 및 (b) 하나 이상의 물질을 포함하는,

신장 기능 강화가 필요한 개체를 치료하기 위한 조성물로서,

상기 신장 세포, 신장 조직 단편, 또는 이들의 조합이 지방-부속 림프 클러스터 (fat-associated lymphoid cluster) 또는 림프절에 도입되고,

상기 하나 이상의 물질이 개체에 투여시 상기 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서 이소성 신장 조직의 형성을 촉진하고,

상기 하나 이상의 물질이 자이모산 (zymosan)을 포함하는 염증 촉진 물질을 포함하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 하나 이상의 물질이 골수-유래 세포, 기질 세포, 섬유모세포, 또는 이들의 조합을 더욱 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 조성물이 기질 세포를 포함하고, 상기 기질 세포가 포도플라닌 (podoplanin), NIK, LTβR, 또는 이들의 조합을 발현하는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 하나 이상의 물질이 하나 이상의 세포의 증식, 이소성 조직의 혈관화 (vascularization), 또는 이들의 조합을 촉진하는, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 상기 하나 이상의 세포를 도입하기 전에 상기 염증 촉진 물질이 개체에게 투여되는 것인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 하나 이상의 세포가 개체의 지방-부속 림프 클러스터에 도입되는, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 지방-부속 림프 클러스터가 흉막강, 심낭강, 또는 복막강의 지방 세포에 위치하는 것인, 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 지방-부속 림프 클러스터가 장막 지방, 장간막 지방, 비장 지방, 문맥 지방, 생식샘 지방, 또는 이들의 조합에 위치하는 것인, 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 하나 이상의 세포가 지방-부속 림프 클러스터의 해부학적 영역으로 국소 투여되는 것인, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 하나 이상의 세포가 개체의 림프절에 도입되는 것인, 조성물.

청구항 13

제2항에 있어서,

상기 간세포가 개체의 지방-부속 림프 클러스터에 도입되는 것인, 조성물.

청구항 14

제3항에 있어서,

상기 신장 세포, 신장 조직 단편, 또는 이들의 조합이 개체의 지방-부속 림프 클러스터에 도입되는 것인, 조성물.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서,

상기 지방-부속 림프 클러스터가 흉막강, 심낭강, 또는 복막강의 지방 세포에 위치하는 것인, 조성물.

청구항 16

제13항 또는 제14항에 있어서,

상기 지방-부속 림프 클러스터가 장막 지방, 장간막 지방, 비장 지방, 문맥 지방, 생식샘 지방, 또는 이들의 조합에 위치하는 것인, 조성물.

청구항 17

삭제

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

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 우선권에 대한 정보

[0002] 본 출원은 2017년 2월 17일자 미국 가출원 번호 62/460,267 및 2017년 10월 18일자 미국 가출원 번호 62/574,119에 대한 우선권을 주장하며, 이들 미국 가출원의 내용들은 각각 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함되며, 각각에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] 지원 정보

[0004] 적용되지 않음

[0005] 1. 서론

[0006] 본 발명은 개체에서 장기 기능을 보완 또는 대체하기 위해 사용될 수 있는 이소성 조직 (ectopic tissue)을 생성하기 위한, 지방-부속 림프구 클러스터 ("FALC", "밀키 스팟"이라고도 함)에서의 장기 세포의 생착 및 증식에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 간 질환을 앓고 있는 환자에 효과적인 치료법은 부족한 편이다. 간 질환은 미국에서 매년 31,0000건의 사망을 초래한다. 간 동소 이식 (orthotopic liver transplantation, OLT)은 매우 일반적인 최후 수단으로, 최근에는 중증 질환에 대한 근치적 치료 (curative treatment)에 불과하다 (1, 2). 또한, 새로운 간이 필요한 환자는 약 100,000명으로 추정되지만, 매년 6,000명 정도만 간 이식을 받고 있다. 이용가능한 공여자 부족이 말기 간질환을 앓고 있는 환자가 직면하는 주된 문제 중 하나이다. 동반질병을 가진 고령 환자는 OLT의 후보자로 고려되지 않거나 또는 이식 후 생존율이 낮을 것으로 예상된다 (3-5). 아울러, 이식 시술은 재정적인 측면과 건강 관리 자원 측면에서 비용이 많이 든다. 이러한 이유로, 세포-기반 이식이 OLT에 대한 치료학적 대안으로서 또는 환자가 이용가능한 장기를 대기하기 위한 브릿지 (bridge)로서 제안되었다 (6).

[0008] 오늘날, 간세포 이식은 동물 모델에서 기능적인 유용성이 입증되었다. 형질전환 유로키나제 (7-9)부터 유도된 티로신혈증 마우스 (10-15)에 이르기까지, 간세포 이식에 대한 치료학적 잠재성이 성공적으로 확립되었으며, 간이 완전히 재생되었다. 이러한 고무적인 결과에도 불구하고, 동물 실험의 긍정적인 결과가 인간 질환에서의 치료학적 유용성으로 이행될 수 있기를 희망하면서, 인간 간세포 이식은 여전히 임상 연구의 실험 단계에 머물러 있다 (6, 16).

[0009] 그러나, 말기 간 질환을 앓고 있는 환자의 경우, 추가적인 문제들이 남아있다: 계획된 세포요법 대부분은 병든 간 자체에 세포를 생착시키는 것이다. 이식된 간 세포는 일반적으로 비장 (예, 인간 환자의 경우 비장 동맥 또는 설치류의 경우 비장 실질)을 통해 또는 문맥 정맥을 통해 주입된다. 간 세포는 이식된 간세포에 의한 간 재생이 이루어질 것으로 예상되는 병든 간으로 신속하게, 능동적으로 또는 수동적으로 이동한다. 이러한 방식은, 중증 간질환을 앓고 있는 환자 거의 대부분에 병든 간에서의 일반적인 병리학적 특징인 간경변 및 섬유증이 존

재하기 때문에, 세포요법의 효과가 제한적이며, 불가능할 수도 있다. 결과적으로, 이들 환자에서 - 치료가 가장 필요한 환자 - 자연적인 간 재생은 매우 어려운 과제이다.

[0010] 이에, 진행된 간 질환을 앓고 있는 환자들에 대한 새로운 치료법이 요구되고 있다. 조사된 한가지 옵션은 보조 간을 조작 (engineering)하는 것이다 (18-20). 일반적으로 이는 온전한 천연 간 일부 또는 전부를 그대로 남기면서 간 그래프트 (liver graft)를 이소적으로 또는 동소적으로 배치하여 이식하는 과정으로 이루어진다. 이 방식은 특정 범주의 환자들에서 OLT를 회피할 수 있을 뿐만 아니라 본래의 간의 자발적인 재생 가능성 및 면역억제 약물의 궁극적인 중단을 달성할 수 있다 (21-24). 초기 실험에서 문제점들이 발견되었지만 (18-20, 25-27), 최근 우호적인 성과들이 발표되었으며, 급성 간부전 (25), 대사 장애 (28-31) 및 심지어 간경변 간 (26, 27) 사례들에서는 고무적이다. 지금까지, 간세포 및 보조 간을 안정적이고 장기간 생존가능하게 유지하는데 필요한 세포 및 분자 기전에 대해서는 파악되지 않고 있다.

[0011] 많은 연구자들이 다양한 간외 부위에 간세포를 이식하였다 (37-40). 대부분의 간외 부위에서의 간세포 생착은 다양한 결과를 나타내었다. 마우스에서, 림프절에 이식된 간세포가 장기간 (6개월) 간 기능을 복구할 수 있는 기능성 보조 간(들)을 구축하는 것으로, 이미 입증된 바 있다 (예, 미국 특허 9,125,891 참조). 이런 결과는, 조직 또는 장기 대체물을 배양하기 위한 생체내 생물반응조로서 림프계 부위를 이용함으로써 조직을 재생하는 새로운 패러다임의 근간을 마련하였다 (32-36).

[0012] 간 질환 외에도, 신장 질환도 사람들에 만연되어 있으며, 미국에서는 매년 47,000명 이상이 사망하고 있다. 신장 질환을 치료하기 위한 공지된 치료 방법으로는 휴식, 식이 변화, 약물요법, 혈액투석 요법 및 신장 이식이 있으며, 이는 질환의 중증도에 따라 달라진다. 신부전에 이르면, 혈액투석 또는 복막투석과 같은 투석 요법 또는 신장 이식이 필연적이다. 혈액투석 요법이 체내 축적된 노폐물을 제거할 순 있지만, 손상된 신장의 기능은 회복시키진 못한다. 신부전의 경우, 환자가 신장 이식을 받지 않는 한, 환자는 일생동안 투석 요법을 계속 받아야 할 것이다. 그러나, 공여자 부족, 조직 적합성 문제 및 거부 반응 회피 등의 신장 이식과 관련된 많은 문제들이 존재한다. 그래서, 신장 기능이 저하된 환자에 대해 새로운 요법이 요구되고 있다.

[0013] 림프절 및 지방-부속 림프 클러스터 ("FALC", 본원에서 "밀키 스팟"이라고도 함)는 림프계의 제2 림프 기관으로, 혈관 구조가 잘 형성되어 있다. FALC는 장막 등의 여러 해부학적 위치들에서 발생한다 (도 1 참조). 이는 박테리아 또는 바이러스 감염과 같은 다양한 병태시 백혈구 세포를 대량 증폭시킬 수 있는, 중요한 역할을 면역계에서 담당하고 있다. 흥미롭게도, 림프절 및 밀키 스팟은, 초기 전이 이벤트, 즉, 종양 침습 및 초기 전이성 증식이 이루어지는 부위이기 때문에, 암에서 임상적으로 중요한 의미를 가진다. 림프절에서의 종양 전이는 암 병기 결정 및 예후 예측에 일반적으로 이용된다.

발명의 내용

[0014] 본 발명은, 숙주 개체에 이식하기 위한 기능성 이소성 조직을 구축하기 위해 사용될 수 있는, 지방-부속 림프 클러스터 ("FALC" 또는 "밀키 스팟")에서의 세포 생착 및 증식에 관한 것이다. 본 발명은, 적어도 부분적으로, 간 기능부전 마우스에 복막내 이식된 간세포가 장막의 FALC (밀키 스팟)뿐 아니라 장간막, 비장, 문맥 및/또는 생식샘 지방에 위치하고 증식하여, 마우스에서 간 기능을 유익하게 강화할 수 있는 이소성 간 조직을 생성한다는 발견 사실을, 기반으로 한다. 또한, 본 발명은, 부분적으로, 태아 신장 세포가 장막의 FALC에서 증식하여 이소성 신장 조직을 생성한다는 발견 사실을 기반으로 한다. 또한, 본 발명은, 부분적으로, 기질 세포 (stromal cell)에서의 LTβR 신호전달이 이식된 세포의 성공적인 혈관화/신생혈관을 촉진한다는 발견 사실을 기반으로 한다.

[0015] 특정 구현예에서, 본원은 장막의 FALC (밀키 스팟)뿐만 아니라 장간막, 비장, 문맥 및/또는 생식샘 지방에서 이소성 간 조직을 확립하고, 치료학적 효과를 위해 이러한 이소성 간 조직을 이용하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 본원은, 치료학적 효과를 위해 개체에 사용될 수 있는, 이소성 신장 조직을 FALC에서 생성하기 위한 방법 및 조성물을 추가로 제공한다.

[0016] 특정 구현예에서, 본원은 림포톡신 베타 수용체 (LTβR) 및/또는 NF-κB-유도성 키나제 (NIK) 신호전달 경로를 활성화함으로써, FALC 또는 림프절에서 세포, 예를 들어, 간세포 또는 신장 세포를 이식 및 증식시키기 위한 방법 및 조성물을 추가로 제공한다.

[0017] 본원은 개체에서 이소성 조직을 생성하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 이 방법은 개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 하나 이상의 세포를 도입하고, 하나 이상의 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진하는 하나 이상의 물질을 공급하여 이소성 조직을 형성하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 간세

포이고, 이소성 조직은 이소성 간 조직이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 신장 세포 및/또는 신장 조직 단편이고, 이소성 조직은 이소성 신장 조직이다. 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터는 흉막강 및/또는 심낭강 및/또는 복막강의 지방세포 조직에 위치한다. 복막강의 경우, FALC는 개체의 장막 및/또는 장간막 및/또는 비장 및/또는 문맥 및/또는 생식샘 지방에 위치할 수 있다.

[0018] 특정 구현예에서, 이소성 조직의 형성을 촉진하는 물질은 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포 중 하나 이상을 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 물질은 기질 세포, 예를 들어 섬유모세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 포도플라닌, NIK 및/또는 LTβR 중 하나 이상을 발현한다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자로 처리된다.

[0019] 특정 구현예에서, 이소성 조직의 형성을 촉진하는 물질은 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자, 예를 들어, LTβR 및/또는 NIK의 활성인자를 포함한다. 특정 구현예에서, 이소성 조직의 형성을 촉진하는 물질은 비-고전적인 (non-canonical) NF-κB 신호전달 경로의 활성인자를 포함한다. 특정 구현예에서, LTβR 및/또는 NIK의 활성화 및/또는 비-고전적 NF-κB 신호전달 경로의 활성화는 이소성 조직을 형성하도록 하나 이상의 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진한다.

[0020] 특정 구현예에서, 이소성 조직의 생성을 촉진하는 물질은 염증 촉진 물질을 포함한다. 특정 구현예에서, 염증은 개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 하나 이상의 세포를 도입하기 전에 유도된다.

[0021] 본 발명은 간 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 특정 구현예에서, 이 방법은 개체에게 간 세포를 치료학적 유효량으로 투여하고, 개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서 간세포의 증식을 촉진하여 이소성 간 조직을 형성시키는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터에서 이소성 간 조직의 형성은 지방-부속 림프 클러스터의 해부학적 영역으로 간세포를 국소 투여함으로써 촉진된다. 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터는 장막 및/또는 장간막 및/또는 비장 및/또는 문맥 및/또는 생식샘 지방에 위치한다.

[0022] 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서의 이소성 간 조직의 형성은 하나 이상의 골수-유래 세포 또는 기질 세포의 공동-투여에 의해 촉진된다. 예를 들어, 비-제한적으로, 기질 세포가 공동-투여된다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 섬유모세포이다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 포도플라닌, NIK 및/또는 LTβR 중 하나 이상을 발현한다.

[0023] 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서의 이소성 간 조직의 형성은 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자의 공동-투여에 의해 촉진된다. 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서의 이소성 간 조직의 형성은 비-고전적인 NF-κB 신호전달 경로의 활성인자의 공동-투여에 의해 촉진된다.

[0024] 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서의 이소성 간 조직의 형성은 개체에서 염증 유발에 의해 촉진된다. 특정 구현예에서, 염증은 개체에 염증 촉진 물질의 투여에 의해 유도된다. 특정 구현예에서, 염증은 개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 하나 이상의 세포를 도입하기 전에 유도된다.

[0025] 본 발명은, 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 하나 이상의 간세포를 도입하고, 이소성 간 조직의 형성을 촉진하는 하나 이상의 물질을 제공하는, 이소성 간을 형성하는 방법을 추가로 제공한다. 특정 구현예에서, 이 방법은 생체내 또는 시험관내에서 수행된다. 일부 구현예에서, 이소성 간 조직의 형성을 촉진하는 물질은 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 섬유모세포이다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 포도플라닌, NIK 및/또는 LTβR 중 하나 이상을 발현한다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자로 처리된다. 특정 구현예에서, 이소성 조직의 형성을 촉진하는 물질은 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자를 포함한다. 특정 구현예에서, 이소성 조직의 형성을 촉진하는 물질은 염증 촉진 물질을 포함한다.

[0026] 특정 구현예에서, 개체에서 이소성 간 조직을 형성하는 방법은, 하나 이상의 간세포 및 하나 이상의 기질 세포를 포함하는 세포들을 개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 도입하고, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자를 제공하는 것을 포함하며, 하나 이상의 기질 세포에서 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성화가 하나 이상의 간세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진하여 이소성 간 조직을 형성시킨다.

[0027] 특정 구현예에서, 개체에서 이소성 간 조직을 형성하는 방법은, 하나 이상의 간세포 및 하나 이상의 기질 세포를 포함하는 세포들을 개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 도입하고, LTβR 및/또는 NIK의 활성인자를 제공하는 것을 포함하며, 하나 이상의 기질 세포에서 LTβR 및/또는 NIK의 활성화가 하나 이상의 간세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진하여 이소성 간 조직을 형성시킨다. 특정 구현예에서, 신장 세포는 배아 신장으로부

터 단리된 세포, 후신 (metanephroi), 시험관내에서 형성된 신장 오가노이드 (organoid)로부터 단리된 세포 또는 이들의 임의 조합을 포함한다.

[0028] 본 발명은 신장 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 특정 구현예에서, 이 방법은 개체에 신장 세포 (또는 신장 조직 단편)를 치료학적 유효량으로 투여하고, 개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서 신장 세포의 증식을 촉진하여 이소성 신장 조직을 형성하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터에서 이소성 신장 조직의 형성은 지방-부속 림프 클러스터의 해부학적 영역에 간 세포를 국소 투여함으로써 촉진된다. 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터는 장막 및/또는 장간막 및/또는 비장 및/또는 문맥 및/또는 생식샘 지방에 위치한다.

[0029] 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서 이소성 신장 조직의 형성은 하나 이상의 골수-유래 세포 또는 기질 세포의 공동-투여에 의해 촉진된다. 예를 들어, 비-제한적으로, 기질 세포가 공동-투여된다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 섬유모세포이다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 포도플라닌, NIK 및/또는 LTβR 중 하나 이상을 발현한다.

[0030] 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서 이소성 신장 조직의 형성은 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자의 공동-투여에 의해 촉진된다. 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서 이소성 신장 조직의 형성은 비-고전적인 NF-κB 신호전달 경로의 활성인자의 공동-투여에 의해 촉진된다.

[0031] 특정 구현예에서, 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서 이소성 신장 조직의 형성은 개체에서 염증 유도에 의해 촉진된다. 특정 구현예에서, 염증은 개체에 염증 촉진 물질의 투여에 의해 유도된다. 특정 구현예에서, 염증은 하나 이상의 신장 세포를 개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 도입하기 전에 유도된다.

[0032] 본 발명은, 하나 이상의 신장 세포 (또는 하나 이상의 신장 조직 단편)를 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 도입하고, 이소성 신장 조직의 형성을 촉진하는 물질 하나 이상을 제공하는, 이소성 신장의 형성 방법을 추가로 제공한다. 특정 구현예에서, 이 방법은 생체내 또는 시험관내에서 수행된다. 특정 구현예에서, 이소성 신장 조직의 형성을 촉진하는 물질은 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 섬유모세포이다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 포도플라닌, NIK 및/또는 LTβR 중 하나 이상을 발현한다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자로 처리된다. 특정 구현예에서, 이소성 신장 조직의 형성을 촉진하는 물질은 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자를 포함한다. 특정 구현예에서, 이소성 신장 조직의 형성을 촉진하는 물질은 염증 촉진 물질을 포함한다.

[0033] 특정 구현예에서, 개체에서 이소성 신장 조직을 형성하는 방법은 하나 이상의 신장 세포 및 하나 이상의 기질 세포를 포함하는 세포들을 개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 도입하고, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자를 제공하는 것을 포함하며, 하나 이상의 기질 세포에서의 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성화는 하나 이상의 신장 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진하여 이소성 신장 조직을 형성시킨다.

[0034] 특정 구현예에서, 개체에서 이소성 신장 조직을 형성하는 방법은 하나 이상의 신장 세포 및 하나 이상의 기질 세포를 포함하는 세포들을 개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에 도입하고, LTβR 및/또는 NIK의 활성인자를 제공하는 것을 포함하며, 하나 이상의 기질 세포에서 LTβR 및/또는 NIK의 활성화는 하나 이상의 신장 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진하여 이소성 신장 조직을 형성시킨다.

[0035] 본 발명은 이소성 조직을 형성하기 위한 조성물을 추가로 제공한다. 특정 구현예에서, 조성물은 복수의 세포 및 이소성 조직의 형성을 촉진하는 하나 이상의 물질을 포함한다. 특정 구현예에서, 이소성 간 조직을 형성하기 위한 조성물은 복수의 간 세포 및 이소성 간의 형성을 촉진하는 하나 이상의 물질을 포함한다. 특정 구현예에서, 이소성 신장 조직을 형성하기 위한 조성물은 복수의 신장 세포 및 이소성 신장의 형성을 촉진하는 하나 이상의 물질을 포함한다.

[0036] 특정 구현예에서, 본 발명의 조성물에 포함되는 하나 이상의 물질은 복수의 골수-유래 세포 및/또는 복수의 기질 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 포도플라닌, NIK 및/또는 LTβR 중 하나 이상을 발현한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 물질은 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 물질은 염증 촉진 물질이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 물질은 (a) 복수의 골수-유래 세포 및/또는 복수의 기질 세포; (b) LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자; 및 (c) 염증 촉진 물질 중 2 이상을 포함한다. 특정 구현예에서, 조성물은 합성 배양 배지를 더 포함한다.

[0037] 특정 구현예에서, 간 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법은 개체에게 간 세포를 치료학적 유효량으로 투여하고, 개체의 림프절에서 이소성 간 조직의 형성을 촉진하는 하나 이상의 물질을 제공하는 것을 포함하며, 여

기서 하나 이상의 물질은 (a) 복수의 골수-유래 세포, 복수의 기질 세포 또는 이들의 조합; (b) LTβR 신호전달 경로의 활성인자, NIK 신호전달 경로의 활성인자 또는 이들의 조합; 또는 (c) 염증 촉진 물질 중 2 이상을 포함한다.

[0038] 특정 구현예에서, 본원은, 신장 세포, 신장 조직 단편 또는 이들의 조합을 치료학적 유효량으로 개체에 투여하고, 개체의 림프절에서 이소성 신장 조직의 형성을 촉진하는 하나 이상의 물질을 제공하는 것을 포함하며, 하나 이상의 물질이 (a) 복수의 골수-유래 세포, 복수의 기질 세포 또는 이들의 조합; (b) LTβR 신호전달 경로의 활성인자, NIK 신호전달 경로의 활성인자 또는 이들의 조합; 또는 (c) 염증 촉진 물질 중 2 이상을 포함하는, 신장 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다.

[0039] 본원은 본원에 기술된 하나 이상의 조성물을 포함하는 키트를 추가적으로 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1. 지방-부속 림프 클러스터; 개략도 (상단 패널) 및 분포 (하단 패널).

도 2A-D: 제2 림프 조직에서의 이소성 간 형성. (A) 간 세포 IP 이식 후 12주째 $Fah^{-/-}$ 마우스의 거시적인 이미지. 노란색 원은 림프 조직 (밀키 스팟 및 림프절 (LN))에서 형성된 많은 이소성 간 결절 (hepatic nodule)을 강조 표시한다. (B) 문맥대정맥문합술 (portacaval shunt), 부분 간절제술 및 간세포 이식 후 2개월 경과된 장간막 돼지 림프절. 좌측 패널, OCT 블럭 (OCT block), 및 LN에서, 간 세포의 경우 CK18 및 키큰 내피 세정맥 (High Endothelial Venule)의 경우 PNAd로 염색한 블럭의 냉동 조직 단편. LN 덩어리 중 51.5%는 CK18+ 간세포로서 동정되었다. 우측 패널, CK18 (간세포) 및 ER-TR7 (섬유모세포)으로 염색한 대조군 간 및 이소성 간의 냉동 조직 단편. H&E는 돼지 이소성 간에 존재하는 정상적인 미세혈관화를 보여준다. (C) 상단 패널, 위 (S)와 장 (I)을 덮고 있으며, 간 (L)에 인접하게 췌장 (도시 안함) 위에 위치한 더 큰 장막 (O)을 나타낸 마우스 복막 공간에 대한 거시적인 사진. 중간 패널, 풍부한 맥관구조를 보여주는 마우스 장막의 해부 현미경 사진. 하단 패널, 밀키 스팟을 지원하는 혈관 트리를 보여주는 장막의 밑그림도 (cartoon depiction). (D) GFP+ 간세포의 IP 이식. 간세포 생착 후 12주 경과시 Fah-/- 마우스 밀키 스팟에서 이소성 결절들이 형성되었다.

도 3. 간세포 IP 이식 후 3-4주 경과된 $Fah^{-/-}$ 마우스; 밀키 스팟에서 모세혈관 공간 확장 및 혈관의 발아 (sprouting).

도 4. 마우스에서의 망상 밀키 스팟.

도 5. 망상 밀키 스팟에서의 이식된 간세포의 생착. 간세포는 GFP로 표지되며, 그린 형광의 밝은 영역으로서 관찰된다. ER-TR7은 이 사진에서 청색 형광 (화살표로 표시)의, 림프 조직의 세포외 기질에서 발견되는 항원이다.

도 6. FRGN ($Fah^{-/-}$Rag2/$\gamma c^{-/-}$Nod) 마우스에는 망상 밀키 스팟이 없다. 표지된 야생형 (좌) 및 FRGN 망상 밀키 스팟 ("MS")의 면역형광 염색 결과.

도 7. FRGN 마우스의 장막에서의 간세포 생착.

도 8. 장막에서 생착된 간세포는 12주간 FRGN 마우스에서 증식하는 것으로 관찰되지 않는다.

도 9. 밀키 스팟이 FRGN 마우스의 장막에서 골수 이식에 의해 복구된다.

도 10. 밀키 스팟이 FRGN 마우스의 장막에서 골수 이식에 의해 복구된다. 우측 패널의 화살표는 밀키 스팟에서의 간세포 생착을 나타냄에 유념한다.

도 11. 골수 이식 후 FRGN 마우스에서 이소성 간 형성.

도 12. 골수 이식 후 FRGN 마우스에서 이소성 간 형성. 좌측 패널은 골수 이식하지 않은 경우의 결과를 보여준다 - 간세포가 응집되지만, 이소성 간의 형성은 관찰되지 않는다. 우측 패널은 골수 이식 결과로서, 이소성 간 형성이 관찰된다.

도 13. 기질 세포/림프 조직 유발인자 상호작용 (좌) 및 NIK 신호 경로 (우).

도 14. NIK-결핍 (aly/aly) 마우스 및 대조군 $Fah^{-/-}$ 마우스에서 복막내 (IP) 주입 대 비장 (SP) 주입에 따른 간 기능의 구제 (rescue)에 대한 NIK 기능 효과를 검사하기 위한 실험의 개략도. 비장 (SP) 주입 (좌) 또는 IP 주

입 (우)에 의해 간 세포 10^6개가 이식된 Fah-/- 마우스 및 aly/aly Fah-/- 마우스의 카플란 마이어 생존 곡선 (Kaplan Meier survival curve).

도 15. IP 주입에 의한 $Fah^{-/-}$ 마우스를 구제하는데 NIK 기능이 요구된다. 10^6 GFP+ 간세포를 IP 주입에 의해 $Fah^{-/-}$ 마우스 및 림프조직무형성 (alymphoplasia) $Fah^{-/-}$ 마우스 (aly/aly $Fah^{-/-}$)에 각각 접종하였다. 다양한 시간대에 망상 밀키 스팟의 홀-마운트 (whole-mount) 이미지. 공여체 간 세포 (녹색)의 형광을 명시야 (bright-field) 이미지와 겹쳐 나타낸다. 상단 패널, $Fah^{-/-}$ 마우스; 하단 패널, aly/aly $Fah^{-/-}$ 마우스.

도 16. IP 간 세포 이식 후 관찰된 성과를 개략적으로 나타냄.

도 17A-D. (A) 섬유모세포형 망상 세포 (fibroblastic reticular cell, "FRC"), 림프 내피 세포 (LEC) 및 뇌 내피 세포 (BEC)에서 포도플라닌 (PDPLN)과 CD31의 분포, 및 밀키 스팟 대비 림프절에서 이들 마커에 대한 유세포 측정 분석 결과. (B) 간 세포가 밀키 스팟에서 ER-TR7 기질 세포에 근접하게 자체적으로 확립된다. (C) IP 이식한 단리된 기질 세포는 망상 밀키 스팟으로 다시 이동할 것이다. (D) 이식된 간 세포가 존재하는 밀키 스팟.

도 18. 간 세포는 림포톡신 알파 및 베타 양성이고, 기질 세포는 NIK 및 림포톡신 베타 수용체에 양성임을 입증하는, 면역형광 실험.

도 19. 2주, 4주 및 6주 후 $Fah^{-/-}$ 또는 Fah/LTβ$R^{-/-}$ 마우스에 복막내 이식된 야생형 GFP+ (녹색 형광 단백질) 간세포. 사진은 이들 동물의 장막 생착을 보여준다.

도 20A-G. (A) 상단, 좌에서 우로, 인간 태아 신장, 신장 단편 이식 후 공장의 LN 및 이식 후 3주 경과시 LN을 나타낸 이미지. 중간 좌, 파라핀-포매된 공여체 인간 태아 신장의 H&E-염색 조직 단편. 중간 우, 신장 이식 후 3주 경과시 LN의 헤마톡실린-염색한 냉동 조직 단편. 오렌지색 점선으로 둘러싸인 영역은 비-생착된 LN 영역을 표시한다. 하단, 삽입도는 미-성숙 (좌) 또는 성숙 (우) 사구체를 나타낸다. (B) 3주된 이식 조직 단편에서의 NCAM, WT-1, PDPLN, α-SMA, Megalin, AQ1, LTL, NKCC2, BRN1/DBA, LTL/DBA, K8/AQ2 또는 EPO에 대한 대표적인 면역형광 염색결과. (C) 8주된 이식 조직 단편의 대표적인 3D 재구성. 좌, LN에 생착된 사구체 및 세관 사진. 우, 사구체와 세관만 나타낸 사진. (D) 11주 마우스 보유 이식물 내 10,000 kDa MW 텍사스 레드 덱스트란의 축적. (E) 1주, 3주 및 8주 이식물 조직 단편에 대한 대표적인 마우스 및 인간 CD31 면역형광 염색 결과. (F) 좌, 이식 전 마우스 NP 오가노이드에서의 대표적인 NCAM, SIX2, WT-1 또는 E-CADH 면역형광 염색 결과. 우, NP 오가노이드 이식 후 8주 경과시 LN 내 혈관화된 사구체-유사 구조를 보여주는, 대표적인 PDPLN/CD31, PDPLN/CD105 또는 PDPLN/Ly-76 면역형광 염색 결과. (G) 좌, iPSC-유래 신장 오가노이드에서 DBA/BRN1 및 E-CADH/LTL에 대한 대표적인 홀-마운트 면역형광 염색 결과. 하단, LN에 오가노이드 이식 후 6주 경과 시점에, LTL/Megalin 반응성 근위-유사 세관에 인접한, 각각 추정의 족세포 (PDPLN, SYNPO, PODXL), 사구체간질 세포 (CIV) 및 내피 세포 (CD31)를 포함하는 사구체-유사 구조로 각각 구성된, 2개의 구분되는 네프론-유사 구조를 보여주는 연속적인 조직 단편들. 핵은 Hoechst (청색)으로 대조염색하였다.

도 21. 고전적인 및 비-고전적인 NF-κB 신호전달 경로를 개략적으로 도시한 도.

도 22A-G. (A) 좌, 실험 계획 개략도. 마우스에 LTβR-Fc 또는 대조군 Ig 100 μg을 IP 주사한 다음 2일 후 LN에 배아 GFP+ 신장 단편을 이식하였다 (1일). 8일 및 15일에 다시 마우스에 처리하였다. 22일에 LN을 수집하였다. 우, 처리 또는 미-처리 마우스로부터 단리된 홀-마운트 신장을 가지고 있는 LN. (B) A에서와 같이 신장 이식물의 연속 단편들에서 대표적인 PDPLN, LTL, CD31, CD105, Ly-76 면역형광 염색 결과. (C) LN 또는 망상 기질 세포 집단 (CD45-)에서의 섬유모세포형 망상 세포 (FRC), 림프 내피 세포 (LEC) 및 혈관 내피 세포 (BEC)의 유세포 측정 프로파일. (D) 망상 기질 세포의 대표적인 PDPLN 및 LTβR 면역형광 염색 결과. (E) 이식 후 6주 경과 시점에, 배아 GFP+ 신장 이식 후 야생형 또는 LTβR-/- 마우스에서의 홀 마운트 신장을 가지고 있는 장막 (좌측: 형광/명시야 이미지 병합, 우측: 해부 스코프 이미지). 신생-신장을 성체 마우스 신장과 비교해 도시한다. (F) E에서와 같이 장막내 신장 이식물의 연속 조직 단편들에서 CD31, CD105 및 Ly-76에 대한 대표적인 면역형광 염색 결과. (G) 배아 GFP+ (좌측 및 중앙) 또는 야생형 (우측) 신장 LN 이식체의 조직 단편들에서 ERTR-7, LTα, LTβ, LTβR, NIK, NIK/CD34에 대한 대표적인 면역형광 염색 결과. 핵을 Hoechst (청색)로 대조염색하였다.

도 23. 복막 염증이 장막에서 현저한 변화를 유도한다. 상단 패널. 실험의 개괄도. 0일에 자이모산 (zymosan)을

복막내 (IP) 주입하였다. 3일 후, 간세포 백만개를 IP로 주입한다. 간세포 주입 7일 후, 샘플을 수집한다. 하단 좌측 패널. 자이모산 유도 동물 및 대조군 동물 유래의 장막에 대한 거시적인 사진. 하단 우측 패널. 자이모산 유도성 염증 유발 후, 대조군 대비 장막에서의 현저한 중량 증가.

도 24. FALC 및 간 증식. GFP+ 간세포 이식한지 1주 후 자이모산 또는 PBS 주입한 이후의 C57b1/6 마우스의 장막 및 장간막 지방. 자이모산 염증이 GFP+ 간세포 생착의 급격한 증가를 허용하는 FALC 수 및 크기를 유도하였다. 장막 및 장간막 지방을 비교하였으며, 형광 현미경 하에 GFP+ 간세포를 식별하였다.

도 25. 복막 염증이 간세포 이식 후 타이로신혈증성 마우스의 생존율을 증가시킨다. 기존에 유발된 염증을 가진 또는 염증이 없는 Fah$^{-/-}$ C57b1/6 마우스에 야생형 간 세포를 IP 이식한 다음 2회 선별하였다 (off NTBC). 염증이 없는 동물 (좌측 패널)은 2차 선별 후 계속적으로 체중이 감소하였으며, 동물 H146과 H148은 이식 후 약 8주에 사망하였다. 기존에 유발된 염증을 가진 동물 (우측 패널)은 2차 선별 중에 체중이 증가하였으며, 이는 간 질환의 구제 및 기능성 간 중량의 회복을 의미한다.

도 26. 복막 염증이 FALC 함유 지방에 존재하는 간 중량을 증가시킨다. 염증이 없는 (H146) 및 기존에 유발된 염증을 가진 (H150) Fah$^{-/-}$ C57b1/6 마우스에서 간 조직을 함유한 복막 조직에 대한 거시적 이미지. 염증은 FALC에서 이소성 간 증식을 뒷받침해준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 5. 본 발명에 대한 상세한 설명

[0042] 명확하게 하기 위해, 비-제한적인 방식으로, 본원의 내용에 대한 상세 설명은 다음과 같은 세부 항목으로 나뉜다:

[0043] (i) 정의;

[0044] (ii) 치료 방법;

[0045] a. 간 질환 및 장애의 치료;

[0046] b. 신장 질환 및 장애의 치료; 및

[0047] (iii) 조성물.

[0048] 5.1 정의

[0049] 달리 정의되지 않은 한, 본 출원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어들은 당해 기술 분야의 당업자들에게 공통적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 가진다.

[0050] 본원에서, 용어 "약" 또는 "대략"은, 그 값이 측정 또는 정해지는 방식에 의해, 즉, 측정 시스템의 한계에 의해 일부 결정되는, 당해 기술 분야의 당업자에 의해 정해지는 특정 값에 대해 허용가능한 오차 범위 내인 것을 의미한다. 예를 들어, "약"은 당해 기술 분야의 관행에 따라 표준오차 3 이내 또는 3보다 높은 범위를 의미할 수 있다. 다른 구현예에서, "약"은 소정의 값의 20% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 더 바람직하게 5% 이하, 보다 더 바람직하게 1% 이하의 범위를 의미할 수 있다. 다른 구현예에서, 구체적으로 생물 시스템 또는 공정과 관련하여, 이 용어는 값의 10의 1승 이내, 바람직하게는 5배 이내, 더 바람직하게는 2배 이내를 의미할 수 있다.

[0051] 본원에서, 지방-부속 림프 클러스터 ("FALC", 다른 예로 본원에서 "밀키 스팟"으로도 언급됨)는 림프절을 제외한 림프 시스템의 구조물들이다. FALC는, 비-제한적인 예로, 장간막, 종격, 심장막 및 피하 조직 등의 다수의 해부학적 위치들에 존재한다 (도 1 참조). FALC는 흉막, 심막 및 복막강의 비장세포 조직 내에 위치한다. 복막강에서, FALC는 개체의 장막 및 장간막, 비장, 문맥 및 생식샘 지방에 위치한다. 비-제한적인 특정 구현예에서, 이소성 조직의 증식, 예를 들어, 간 또는 신장 조직의 증식을 위해 사용되는 FALC는 장막에 위치한다. 비-제한적인 특정 구현예에서, FALC는 종격 또는 심장막에 위치한다.

[0052] 본원에서, "림프절" 또는 "LN"은 임의의 림프절, 비-제한적인 예로, 복부 림프절, 셀리악 림프절, 대동맥 주위 림프절, 비장 근처 림프절, 간문 림프절, 위 림프절 (좌측 및 우측), 위대망 (gastroomental, gastroepiploic) 림프절 (좌측 및 우측), 후복막 림프절, 유문 림프절 (유문상 림프절, 유문하 림프절, 후유문 림프절 (retropyloric)), 췌장 림프절 (췌장 위, 췌장 하, 비장 계통의 림프절 (lineal lymph node)), 간 림프절 (윈슬로의 낭성, 구멍-함유 공 (cystic, foraminal-including foramen of Winslow)), 췌장십이지장 림프절 (췌장

십이지장 위, 췌장십이지장 하), 장간막 상 림프절, 회결장 림프절, 막창자 림프절, 막창자 뒤 림프절, 충수 림프절, 결장간막 림프절 (결장 옆, 좌 결장, 중 결장, 우 결장, 장간막 림프절 (inferior mesenteric lymph node), S자 결장, 상직장), 총장골 (common iliac) 림프절 (내측 총장골 (medial common ilic), 중간 총장골 (intermediate common iliac), 외측 총장골 (lateral common iliac), 대동맥 하 총장골 (subaortic common iliac), 갑각융기 (promontory)의 총장골) 및 외장골 (external iliac) 림프절 (내측 외장골, 중간 외장골, 외측 외장골, 내측 열공성-대퇴 (medial lacunar-femoral), 중간 열공성-대퇴, 외측 열공성-대퇴, 장골간 외장골 (interiliac external iliac), 폐쇄기-외장골 폐쇄 (obturator-external iliac obturatory)), 공장, 슬와 및 액와 림프절을 지칭한다.

[0053] 장기의 세포는 한가지 또는 복수의 세포 타입들로 구성될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 기원 장기에서 발견되는 복수의 세포 타입들로 구성되지만, 장기에서 발견되는 모든 세포 타입을 반드시 포함하여야 하는 것은 아니다. 비-제한적인 예로서, 본 발명에 따른 생착을 위한 "간 세포 (liver cell)"는 간세포 (hepatocyte)를 포함하며, 간의 담관 세포, 내피 세포, 줄기 세포 및 선조 세포 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 다른 비-제한적인 예로서, 본 발명에 따른 생착을 위한 "신장 세포"는 신장 실질 세포를 포함하며, 신장의 사구체 세포, 내피 세포, 줄기 세포 및 선조 세포 (progenitor cell) 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 생착을 위한 도입 전에 분리 (dissociation)된다. 특정 구현예에서, 세포는 도입 전에 응집체 형태로 포함된다. 특정 구현예에서, 세포는 시험관내 증폭된 오가노이드 (organoids expanded *in vitro*)로 구성된다. 특정 구현예에서, 세포는 시험관내에서 증폭된 iPS 또는 기타 줄기 세포로 구성된다. 특정 구현예에서, 세포는 온전한 장기로부터 수득되는 조직 단편에 포함되지만, 이 단편은 장기의 약 5% 이하, 또는 약 10% 이하, 또는 약 25% 이상, 또는 약 50% 이하를 차지한다.

[0054] 본원에서, "활성인자"는 단백질 또는 경로의 활성, 기능, 발현 및/또는 형성을 활성화 (예, 증가, 촉진 또는 강화)하는 화합물 또는 분자 (예, 소분자, 펩타이드, 펩타이드 모방체, 천연 화합물 또는 항체)를 지칭한다. 활성인자는, LTβR 또는 NIK와 같이 명명된 단백질 (분자, 명명된 분자와 연관된 임의 분자 또는 명명된 연관 분자)의 임의 활성을 촉진하거나, 또는 명명된 단백질, 예를 들어 LTβR 또는 NIK와 신호전달 파트너 또는 결합 파트너의 상호작용을 촉진하는, 임의 화합물 또는 분자일 수 있다. 활성인자는, 또한, 예를 들어, 상류 신호전달 분자를 차단함으로써, 명명된 단백질, 예를 들어, LTβR 또는 NIK의 생물학적 활성을 간접적으로 조절하는 분자를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 활성인자는, 예를 들어, LTβR 또는 NIK를 형성 및/또는 생성하는 효소의 활성 및/또는 기능을 증가시킴으로써, LTβR 또는 NIK와 같은 명명된 단백질의 형성 및/또는 생성을 촉진, 증가 및/또는 강화하는 분자를 포함할 수 있다.

[0055] 본원에서, "치료" (및 "치료한다" 또는 "치료하는"과 같은 이의 문법상 변형어)는 치료 중인 개체의 자연적인 경과를 변형시키고자 하는 시도로서 임상적 개입을 지칭하며, 임상 병리 과정 중에 또는 예방을 위해 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과로는, 비-제한적으로, 질환의 발병 또는 재발 방지, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과 소거, 질환 진행률 감소, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 관해 또는 예후 개선 등이 있다. 특정 구현예에서, "치료"는 합병증, 증상 및/또는 악화 (deterioration)의 중증도 감소를 의미할 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 감소는, 예를 들어, 치료를 받지 않은 비교 대조군 개체를 기준으로, 합병증, 증상 및/또는 악화의 중증도 측면에서 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 감소일 수 있다. 특정 구현예에서, "치료"는 또한 치료를 제공받지 않은 경우에 예상되는 생존성과 비교해 긴 생존성을 의미할 수 있다.

[0056] 본원에서, "치료학적 유효량" 또는 "유효량"은 다음과 같은 사항들 중 하나 이상을 달성할 수 있다: 증상의 완화, 질환 진행률 감소, 생존 연장, 질환 상태의 개선 또는 경감 및/또는 예후 개선.

[0057] 본원에서 "개체" 또는 "개별"은 상호 호환적으로 사용되며, 인간 또는 인간을 제외한 개체를 지칭할 수 있다. 인간을 제외한 개체에 대한 비-제한적인 예로는인간을 제외한 영장류, 개, 고양이, 말, 마우스, 랫, 햄스터, 토끼, 돼지 등이 있다.

[0058] 용어 또는 표현 "이식", "세포 대체" 또는 "그래프팅 (grafting)"은 본원에서 상호 호환적으로 사용되며, 타겟 조직, 예를 들어 FALC 또는 FALC를 포함하는 조직에 세포를 도입하는 것을 의미한다.

[0059] 본원에서, "와 조합하여"는 이식할 하나 이상의 세포 또는 이의 조성물, 및 물질, 예를 들어 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자가, 치료 용법 또는 계획의 일부로서, 개체에 투여되는 것을 의미할 수 있다. 특정 구현예에서, 조합하여 사용된다는 것은, 하나 이상의 세포 및 하나 이상의 물질이 이들이 동일한 시간 범위 내에 투여되거나 또는 투여하기 전에 물리적으로 조합되어야 하는 것은 아니다. 예를 들어, 비-제한적으로, 이식할

하나 이상의 세포 및 하나 이상의 물질은 치료 중인 개체에 동시에 투여될 수 있거나, 또는 동일 시점에 투여될 수 있거나, 또는 임의 순서로 순차적으로 투여될 수 있거나, 또는 서로 다른 시점에 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 이식할 하나 이상의 세포, 예를 들어, 간세포 또는 신장 세포를 투여하기 전에 하나 이상의 물질을 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0060] 5.2 치료 방법

[0061] 특정 구현예에서, 본원은 지방-부속 림프 클러스터 ("FALC" 또는 "밀키 스팟")에서 세포를 생착 및 증식시켜 이소성 조직을 발생시키는 것에 관한 것이다.

[0062] 본원은 FALC 내 또는 주위에서 이소성 조직을 형성하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 이소성 조직의 형성 방법은 세포, 예를 들어, 간세포 또는 신장 세포를 개체의 FALC에 도입하여 이소성 조직, 예를 들어, 이소성 간 조직 또는 이소성 신장 조직을 형성하는 것을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 이소성 조직을 형성하는 방법은 개체의 림프절에 세포를 도입하는 것을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원의 방법은 이소성 조직의 형성이 유익할 수 있는 의학적인 병태 또는 장애 (예, 병태, 질환, 증후군)를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 개체는 비-제한적인 예로 간 질환 및/또는 간 부전 또는 신장 질환 및/또는 신장 부전과 같은 질환 또는 장애를 앓을 수 있다.

[0063] 특정 구현예에서, 개체는 인간 또는 인간 이외의 개체일 수 있다. 인간 이외의 개체에 대한 비-제한적인 예로는 인간을 제외한 영장류, 개, 고양이, 말, 마우스, 랫, 햄스터, 토끼, 돼지 등이 있다. 특정 구현예에서, 개체는 인간이다.

[0064] 특정 구현예에서, 개체의 FALC에 이식할 세포는 인간 세포, 비-인간 세포 또는 둘다일 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 인간 세포이다. 특정 구현예에서, 인간 세포는, 비-인간 개체, 예를 들어, 마우스의, FALC에 또는 FALC를 함유한 영역에 이식될 수 있다.

[0065] 이식용 세포는 이식 진행 중인 개체로부터 수득할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 이식 중인 개체 이외의 다른 소스로부터 수득할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 신선한 또는 냉동된 세포 집단으로부터 수득할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 조직으로부터 단리하여, 이식 전 다양한 배양 조건 하에 시험관내에서 배양할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 배아, 태아, 소아 또는 성체 조직으로부터 수득할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 선조 세포 또는 전구 세포일 수 있다. 특정 구현예에서, 선조 세포 또는 전구 세포는 이식할 세포의 타입으로 분화할 수 있다.

[0066] 본 발명에 따라 사용하기 위한 세포는 당해 기술 분야에 공지된 임의 수단에 의해 준비할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포 용액, 예를 들어, 본원에 기술된 조성물이 주입에 사용된다. 본 방법에 사용하기 위한 조성물에 대한 비-제한적인 예들은 하기 섹션 5.3에 기술된다. 특정 구현예에서, 세포는 Li et al. J Tissue Culture Methods 14:139-146 (1992)의 방법에 따라 준비할 수 있다. 간략하게는, 단리는 절단면이 단 하나인 제한된 크기 (<50 g)의 샘플의 콜라게나제 관류 (collagenase perfusion)를 포함한다. 특정 구현예에서, 특이적으로 농화된 세포 집단은 미국 특허 7,211,404에 기술된 바와 같이 사용할 수 있다.

[0067] 세포는 당해 기술 분야에 공지된 임의 방법에 의해 개체에 투여할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는, 비-제한적인 예로, 복막내, 정맥내 또는 동맥내 주사에 의해 또는 국소 주입 (local instillation)에 의해 주입될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는, 예를 들어, 통례적인 또는 내시경 외과 기법에 의해 외과적으로 생착시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 국소 투여될 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 세포는, 비-제한적인 예로, 생식샘, 장막, 장간막, 종격, 심장막 및 피하 조직 등의, FALC를 함유한 해부학적 위치 근처로 도입할 수 있다. 특정 구현예에서, 해부학적 영역은 장막이다. 특정 구현예에서, 예를 들어, 간세포 또는 신장 세포 (또는 신장 조직의 단편)는, 예를 들어, 타겟화된 복막내 주사 또는 통례적인 또는 내시경 외과 기법에 의해 장막 (및 이에 잔류하는 FALC)의 근처로 도입할 수 있다. 특정 구현예에서, 생착시킬 세포를 먼저 배양으로 증폭시킨 다음 FALC 또는 림프절에 생체내 도입할 수 있다.

[0068] 특정 구현예에서, 세포는 임의의 적절한 주사용 완충제 중에 현탁할 수 있다. 이러한 완충제에 대한 비-제한적인 예로는 특히 식염수 (saline), 포스페이트 완충화된 염수, 행크의 염 (Hank's salt) 및 링거액 등이 있다.

[0069] 특정 구현예에서, FALC 또는 림프절 내 또는 주변에서 이소성 조직을 형성하는 방법은 이소성 조직의 형성을 촉진하는 물질을 제공하는 것을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 그 방법은 이식할 하나 이상의 세포를 이소성 조직의 형성을 촉진하는 하나 이상의 물질과 조합하여 투여하는 것을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 물질은 이식할 하나 이상의 세포를 포함하는 조성물에 포함될 수 있다. 다른 예로 및/또는

부가적으로, 하나 이상의 물질은 하나 이상의 세포를 이식하기 전, 이식한 후, 이식과 동시에 투여할 수 있다. 특정 구현예에서, 이 물질은 이소성 조직을 형성하기 위해 하나 이상의 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진한다. 비슷한 방법들을 사용해 림프절에 이소성 조직을 형성시킬 수 있다.

[0070] 특정 구현예에서, 이소성 조직의 형성을 촉진하는 물질은 이소성 조직을 형성하는 세포, 예를 들어 신장 세포 또는 간세포와는 다른 세포 타입일 수 있다. 특정 구현예에서, 물질은 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 물질은 기질 세포, 예를 들어 섬유모세포, 섬유모세포형 망상 세포(FRC), 여포 수지상 세포 (FDC), 림프 내피 세포 (LEC), 혈관 내피 세포 (BEC), α-7 인테그린 혈관 주위 세포 (AIP) 및 이중 음성 세포 (DNC)를 포함한다. 특정 구현예에서, 섬유모세포는 인간 포피 섬유모세포, 인간 배아 섬유모세포, 마우스 배아 섬유모세포, 피부 섬유모세포, 혈관 섬유모세포, 근섬유모세포, 평활근 세포, 간엽 줄기 세포 (MSC)-유래 섬유모세포 또는 이들의 조합일 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 이소성 조직을 형성하는 방법은, (a) 하나 이상의 세포, 예를 들어, 간세포 또는 신장 세포를 개체의 FALC (또는 FALC를 함유한 해부학적 영역) 또는 림프절 (또는 림프절을 함유한 해부학적 영역)에 도입하여, 이소성 조직, 예를 들어, 이소성 간 조직 또는 이소성 신장 조직을 도입하는 단계, 및 (b) 예를 들어, 이소성 조직을 형성하기 위해 하나 이상의 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진함으로써, 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포를 도입하여 이소성 조직의 형성을 촉진하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 이식할 하나 이상의 세포 및 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포는 동일한 조성물에 포함될 수 있다.

[0071] 비-제한적인 일부 구현예에서, 이소성 조직의 형성을 촉진하는 기질 세포, 예를 들어, 기질 내피 세포 또는 섬유모세포는, 포도플라닌, 림포톡신 베타 수용체 ("LTβR"), NIK 또는 이들의 조합 중 하나 이상을 검출가능한 수준으로 발현할 수 있다. 다른 예로 및/또는 부가적으로, 기질 세포는 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자, 예를 들어, LTβR 또는 NIK의 활성인자, 또는 이의 하류 타겟으로, 개체에 투여 전, 투여 중 또는 투여 후에 처리될 수 있다. 특정 구현예에서, 기질 세포, 예를 들어, 기질 내피 세포 또는 섬유모세포는 NIK의 활성인자로 처리될 수 있다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 LTβR 및/또는 NIK를 외인성으로 발현하거나 및/또는 LTβR 및/또는 NIK를 과발현하도록 유전자 변형될 수 있다.

[0072] 특정 구현예에서, 예를 들어, 하나 이상의 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진하여 이소성 조직을 형성함으로써, 이소성 조직의 형성을 촉진하는 물질은, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자일 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, FALC 또는 림프절 내 또는 주위에서 이소성 조직을 형성하는 방법은 세포, 예를 들어 간세포 또는 신장 세포를 개체의 FALC (또는 FALC를 포함하는 해부학적 영역) 또는 림프절에 도입하는 단계 및 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 하나 이상의 활성인자를 제공하는 단계를 포함할 수 있으며, LTβR 및/또는 NIK의 활성화 또는 이의 하류 타겟의 활성화는 이소성 조직, 예를 들어 이소성 간 조직 또는 이소성 신장 조직의 형성을 촉진한다. 특정 구현예에서, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자는 LTβR 및/또는 NIK의 활성인자 또는 비-고전적인 NF-κB 신호전달 경로의 활성인자이다. 특정 구현예에서, 이식할 하나 이상의 세포 및 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자는 동일한 조성물에 포함될 수 있다. 다른 예로, 활성인자는 개체에 이식할 하나 이상의 세포를 도입하기 전, 도입하는 중 또는 도입한 후 투여할 수 있다.

[0073] 특정 구현예에서, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자는 이식 진행 중인 개체에 존재하는, 세포, 예를 들어, 기질 세포 또는 기질 내피 세포에서, LTβR 또는 NIK의 발현을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자는 개체의 FALC에 존재하는 기질 세포에서 신호전달 경로를 활성화한다.

[0074] 다른 예로 및/또는 부가적으로, 이식할 세포는, 기질 세포 또는 기질 내피 세포를 포함하는, 이종의 세포 집단, 예를 들어, 이종의 세포 집단을 포함하는 조성물일 수 있으며, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자는 이식할 조성물에 존재하는 기질 세포 또는 기질 내피 세포에서 LTβR 또는 NIK의 발현을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 이소성 조직을 형성하는 방법은, (a) 하나 이상의 세포, 예를 들어, 간세포 또는 신장 세포를 개체의 FALC 또는 림프절에 도입하여, 이소성 조직, 예를 들어, 이소성 간 조직 또는 이소성 신장 조직을 형성하는 단계, (b) 하나 이상의 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진하기 위해 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포를 도입하여, 이소성 조직을 형성하는 단계, 및 (c) LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자는 이식할 하나 이상의 세포를 포함하는 조성물에 존재하며, 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포 또는 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자는 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포를 포함하는 조성물에 존재한다.

[0075] 특정 구현예에서, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자는 LTβR의 활성인자 또는 LTβR의 하류 타겟일 수 있다. 특정 구현예에서, 활성인자는 NIK의 활성인자 또는 NIK의 하류 타겟, 예를 들어, 비-고전적인 NF-κB 신호전달 경로의 활성인자일 수 있다. 특정 구현예에서, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자는 LTβR 또는 NIK에 특이적으로 결합하는 작용제 항체 (또는 이의 항체 단편) 또는 단쇄 항체일 수 있다. 항-LTβR 작용제 항체에 대한 비-제한적인 예로는 Adipogen Life Sciences 사에서 제조한 단일클론 항체, 카탈로그 번호 AG-20B-0008, 항-LTβR 작용제 항체 CBE11 (예, Lukashev et al., Cancer Res. 66(19):9617-9624 (2006)), 항-LTβR 작용제 항체 BS-1 (예, Hu et al., Carcinogenesis 34(5):1105-1114 (2013)) 및 항-LTβR 작용제 항체 4H8 (예, Scarzello et al., Gut 65:1765-1775 (2016)) 등이 있다. 항-LTβR 작용제 항체에 대한 비-제한적인 부가적인 예들은 미국 특허 공개번호 2002/0090366에 기술되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 특정 구현예에서, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자는 LTβR 또는 NIK의 기능 및/또는 활성을 높이는 소형 분자 또는 이의 하류 타겟일 수 있다.

[0076] 특정 구현예에서, 본원은, 하나 이상의 세포를 개체의 FALC 또는 림프절에 도입하는 단계 및 LTβR 및/또는 NIK의 활성인자를 제공하는 단계를 포함하며, LTβR 및/또는 NIK의 활성화가 이소성 조직을 형성하기 위해 하나 이상의 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진하는, 개체에서 이소성 조직을 형성하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 간세포를 포함하며, 이소성 조직은 이소성 간 조직을 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 신장 세포를 포함하고, 이소성 조직은 이소성 신장 조직을 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포는 하나 이상의 기질 세포를 더 포함하고, LTβR 및/또는 NIK의 활성인자는 기질 세포에서 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성화를 달성한다.

[0077] 특정 구현예에서, 이소성 조직의 형성을 촉진하는 물질은 개체에서의 염증 촉진 물질일 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, FALC 또는 림프절 내 또는 주위에서 이소성 조직을 형성하는 방법은, 예를 들어, 개체에 염증 촉진 물질을 투여함으로써, 개체에서 염증을 유발하는 것을 더 포함할 수 있다. 이들 물질에 대한 비-제한적인 예로는 사이토카인, 혈관확장제, 히스타민, 세로토닌, 브래디키닌 및 자이모산 등이 있다. 사이토카인에 대한 비-제한적인 예로는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-24, IL-27, IFN-α, IFN-α2, IFN-β, 또는 IFN-γ, TNF-α 및 TNF-β, TGF-α 및 TGF-β, 림포톡신-α 및 림포톡신-β 등이 있다. 케모카인에 대한 비-제한적인 예로는 CCL18, CCL19, CCL21, CXCL8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 CCL7, CXCL12 및 CXCL13 등이 있다. 특정 구현예에서, 물질은 보체 시스템을 활성화하는 화합물 및/또는 분자를 포함한다. 특정 구현예에서, 물질은 자이모산을 포함한다. 특정 구현예에서, 물질은 세포가 이식되거나 또는 이식될 FALC 내 및/또는 근처로 투여된다. 특정 구현예에서, 염증은, 예를 들어 세포가 이식되었거나 또는 이식될 FALC 또는 림프절을 포함하는 해부학적 영역 내 또는 근처에서 국소적으로 유도된다. 다른 예로 및/또는 부가적으로, 염증은 전신적으로 유도된다.

[0078] 특정 구현예에서, 염증은 일시적이다. 예를 들어, 비-제한적으로, 염증은 약 10주 이하, 약 9주 이하, 약 8주 이하, 약 7주 이하, 약 6주 이하, 약 5주 이하, 약 4주 이하, 약 3주 이하, 약 2주 이하, 약 1주 이하, 약 6일 이하, 약 5일 이하, 약 4일 이하 또는 약 3일 이하의 기간 동안 지속된다.

[0079] 특정 구현예에서, 염증은 이식할 하나 이상의 세포를 도입하기 전에 유도된다. 예를 들어, 비-제한적으로, 염증은, 이식할 하나 이상의 세포를 도입하기 적어도 2시간 전에, 적어도 4시간 전에, 적어도 6시간 전에, 적어도 8시간 전에, 적어도 10시간 전에, 적어도 12시간 전에, 적어도 14시간 전에, 적어도 16시간 전에, 적어도 18시간 전에, 적어도 20시간 전에, 적어도 22시간 전에, 1일 전에, 적어도 2일 전에, 적어도 3일 전에, 적어도 4일 전에, 적어도 5일 전에, 적어도 6일 전에, 적어도 7일 전에, 적어도 8일 전에, 적어도 9일 전에 또는 적어도 10일 전에 유도된다.

[0080] 다른 예로 및/또는 부가적으로, 염증은 이식할 하나 이상의 세포를 도입한 후 유도된다. 예를 들어, 비-제한적으로, 염증은, 이식할 하나 이상의 세포를 도입한지 적어도 10분 후, 적어도 30분 후, 적어도 1시간 후, 적어도 2시간 후, 적어도 4시간 후, 적어도 6시간 후, 적어도 8시간 후, 적어도 10시간 후, 적어도 12시간 후, 적어도 14시간 후, 적어도 16시간 후, 적어도 18시간 후, 적어도 20시간 후, 적어도 22시간 후, 1일 후, 적어도 2일 후, 적어도 3일 후, 적어도 4일 후, 적어도 5일 후, 적어도 6일 후, 적어도 7일 후, 적어도 8일 후, 적어도 9일 후 또는 적어도 10일 후에 유도된다.

[0081] 비-제한적인 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어, 간세포 또는 신장 세포 이식 수여체에는, 이식된 세포, 예를 들어 간세포 또는 신장 세포에 대한 면역 거부 반응을 최소화하기 위해, 면역억제제가 부가적으로 투여될 수 있다. 면역억제제는, 비-제한적인 예로, T 세포 및/또는 B 세포 활성을 비롯하여, 임의의 선천적인 면역시스템의

활성을 저해 또는 억제함으로써, 외래 또는 이식된 조직에 대한 유해한 면역 반응을 수여체 포유류에서 줄이거나 또는 방지할 수 있다. 면역억제제의 투여로는 방사선요법 실시 및/또는 면역억제 약물의 투여 등이 있지만, 이로 제한되는 것은 아니다. 적합한 면역억제 약물의 예로는, 비-제한적으로, 스테로이드 (예, 코르티코스테로이드, 덱사메타손 및 프레드니손 (prednisone)), Cox-1 및 Cox-2 저해제, 마크롤라이드 (macrolide) 항생제 (예, 라파마이신 및 타크롤리무스 (tacrolimus)), 및 B 세포, T 세포 및/또는 그외 선천적인 면역 활성을 제한, 감소 또는 억제하는 기타 물질 등이 있다. 특정 구현예에서, 본원에서 사용하기 특히 적합한 면역억제제로는 간 및/또는 신장 이식과 함께 사용하는 것으로 공지된 면역억제제 등이 있으며, 비-제한적인 예로, 스테로이드, 사이클로스포린, 라파마이신, 아자티오프린 (azathioprine), 프레드니손 및 OKT3가 있다. 특정 구현예에서, 간세포 이식물 수여체에는, IL-2 생산 및 하류 B 림프구 활성화를 저해할 수 있는 칼시뉴린 저해제인, FK506으로 지칭되는, 면역억제제 타크롤리무스가 투여된다.

[0082] 비-제한적인 특정 구현예에서, 개체에 면역억제제, 예를 들어, 본 단락에서 전술한 물질이 투여되지 않는다 (예, 비-제한적으로, 자가 간세포 또는 신장 세포가 투여되는 경우).

[0083] 5.2.1 간 질환 및 장애의 치료

[0084] 본원은 간 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 본원은 이소성 간 조직을 생성하기 위한 목적으로 FALC 또는 림프절에서 간세포를 증식시키는 방법을 제공하며, 이는 예를 들어 간 기능이 저하된 개체에서 치료학적 이점을 위해 개체에 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, FALC는 장막에 위치한다.

[0085] 간 기능 강화가 필요한 개체는, 비-제한적인 예로, 섬유증 간 (fibrotic liver) 및/또는 경화성 간 (cirrhotic liver), 또는 질환, 외상 또는 독성 작용에 의한 간 손상을 가진 개체 등의, 건강한 상태를 유지할만큼 충분한 기능성 간이 부족한 개체이다. 예를 들어, 건강한 상태는 개체의 정상 범위에 속하는 하나 이상의 간 기능 파라미터에 의해 확인된다. 간 기능 파라미터에 대한 비-제한적인 예로는 알부민 수치, 알라닌 트랜스아미나제 ("ALT") 수치, 아스파르테이트 트랜스아미나제 ("AST") 수치, 크레아티닌 수치, 총 빌리루빈 수치, 직접형 빌리루빈 수치 (direct bilirubin level), 페닐알라닌 수치, 알라닌 수치, 글리신 수치, 발린 수치, 글루타메이트 수치, 프로트롬빈 시간 (prothrombin time), 락테이트 데하이드로게나제 및 알칼라인 포스파타제 등이 있으며; 이들 수치에 대한 정상 범위는 인간 개체를 포함하여 다양한 개체들에 대해서 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 비-제한적인 특정 구현예에서, 상기 파라미터들 중 하나 이상, 또는 2 이상 또는 3 이상이 정상 수치에 대해 적어도 약 25% 또는 적어도 약 50%까지 높은 것은, 간 기능 강화가 필요하다는 것을 의미한다. 개체에서 간 기능 강화 달성은 하나 이상의 간 기능 파라미터가 정상 범위로 변동하는 것을, 예를 들어, 비-제한적으로 약 10% 이상 또는 약 20% 이상 또는 약 30% 이상 또는 약 40% 이상 또는 약 50% 이상 개선되는 것을 의미한다.

[0086] 비-제한적인 특정 구현예에서, 강화된 간 기능은 개체의 생존성을 예를 들어 약 20% 이상 또는 약 30% 이상 연장하는 것으로 나타난다.

[0087] 특정 구현예에서, 간 기능 강화가 필요한 개체는 간 질환, 간 장애, 간 부전 및/또는 간 기능 저하를 앓고 있을 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 간 질환 및/또는 간 장애에 대한 비-제한적인 예로는 대사 장애, 1형 크리글러-나자르 증후군, 급성 간 부전, 간경변, 혈색소증, 고옥살산뇨증, 옥살산증, 윌슨 질환, α-1 항트립신 결핍증, 간암, 간염 (알코올성 및 자가면역성), 지방 간 질환 및 비-알코올성 지방 간 질환 등이 있다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 담도계 (및 간접적으로 간)와 관련된 질환 및/또는 장애에 대한 비-제한적인 예로는 원발성 담증성 간경변 및 원발성 경화성 담관염 등이 있다.

[0088] 비-제한적인 특정 구현예에서, 본원은, 간세포를 치료학적 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하며, 투여된 간세포 하나 이상이 FALC 또는 림프절 내 또는 주위에서 증식하여 이소성 간 조직을 형성하며, 이로써 개체의 간 기능이 강화되는, 간 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0089] 특정 구현예에서, 개체에 이식되는 간세포는 인간 간세포, 비-인간 간세포 또는 둘다일 수 있다. 간세포는 의도한 수여체와 동계 또는 동종이계일 수 있다. 비-제한적인 구현예에서, 간세포는 의도한 수여체의 자가이다 (예, 이식하기 전에 수확하여 배양 증폭시키거나, 또는 의도한 수여체의 전구 세포 또는 줄기 세포로부터 생성함). 비-제한적인 특정 구현예에서, 한 종의 간세포를 다른 종으로, 예를 들어, 비-제한적으로, 인간 간세포를 비-인간 (예, 마우스) 숙주에 이식할 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 비-인간 간세포를 인간 수여체의 FALC에 이식할 수 있다.

[0090] 이식할 간세포의 유효량 또는 치료학적 유효량은, 간세포 약 10^4 내지 10^{11}개, 또는 간세포 약 10^5 내지 10^{10}개, 또는 FALC 또는 림프절 내 이소성 간 조직 부위 하나 이상을 형성하는데 효과적인 것으로 확인된 양을 포함할

수 있다. 특정 구현예에서, 유효량의 간세포는 하나 이상의 간세포를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 간세포 약 10^5 내지 약 10^{11}, 약 10^5 내지 약 10^9, 약 10^5 내지 약 10^8, 약 10^5 내지 약 10^7, 약 10^5 내지 약 10^6, 약 10^6 내지 약 10^{11}, 약 10^6 내지 약 10^{10}, 약 10^6 내지 약 10^9, 약 10^6 내지 약 10^8, 약 10^6 내지 약 10^7, 약 10^7 내지 약 10^{11}, 약 10^7 내지 약 10^{10}, 약 10^7 내지 약 10^9 또는 약 10^7 내지 약 10^8개가 개체에 투여될 수 있다.

[0091] 특정 구현예에서, 간세포는 바람직한 이소성 간 조직을 형성하기 위해 2회 이상으로 개체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 간세포는 개체에게 2회 이상, 3회 이상 또는 4회 이상 투여될 수 있다. 다른 예로 또는 부가적으로, 간세포는 FALC 또는 림프절을 포함하는 2곳 이상의 서로 다른 해부학적 영역으로 이식되어, 2 이상의 이소성 간 조직을 형성할 수 있다.

[0092] 비-제한적인 특정 구현예에서, 본원은, 간세포를 치료학적 유효량으로 개체에 투여하는 단계 및 개체의 FALC에서 하나 이상의 간세포의 증식을 촉진하는 단계를 포함하는, 간 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 이러한 증식은, 예를 들어, 비-제한적으로, 전술한 바와 같이, 이소성 간 조직 형성의 타겟이 되는 FALC를 포함하는 해부학적 영역에 간세포를 국소 투여함으로써, 및/또는 이소성 간 조직의 형성을 촉진하는 하나 이상의 물질을 제공함으로써, 촉진될 수 있다. 특정 구현예에서, 물질은 비-제한적인 예로 복수의 골수-유래 세포 및/또는 복수의 기질 세포일 수 있다. 특정 구현예에서, 물질은, 전술한 바와 같이, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자, 예를 들어, LTβR 또는 NIK의 활성인자 또는 이의 하류 타겟일 수 있다. 특정 구현예에서, 물질은 골수-유래 세포, 기질 세포, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자 또는 이들의 조합일 수 있다. 유사한 방법을 이용해, 림프절에서 이소성 조직을 형성하여 간 기능을 강화할 수 있다.

[0093] 비-제한적인 특정 구현예에서, 본원은, 간세포를 FALC에 도입하는 단계 및 예를 들어 전술한 바와 같이 이소성 간 조직의 형성을 촉진하는 하나 이상의 물질을 제공하는 단계를 포함하는, 이소성 간 조직을 형성하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 비-제한적으로, 간 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법은, (a) 간세포를 치료학적 유효량으로 개체에, 개체의 FALC에 투여하여 이소성 간 조직을 형성하는 단계, 및 (b) 예를 들어, 이소성 간 조직을 형성하기 위해 하나 이상의 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진함으로써, 개체에게 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포를 투여하여 이소성 간의 형성을 촉진하는 단계를 포함한다. 유사한 방법을 이용해 림프절에 이소성 조직을 형성시킬 수 있다.

[0094] 비-제한적인 특정 구현예에서, 간 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법은, (a) 간세포를 치료학적 유효량으로 개체에, 개체의 FALC에 투여하여 이소성 간 조직을 형성하는 단계, (b) 개체에게 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자를 투여하여 이소성 간의 형성을 촉진하는 단계를 포함할 수 있다. 유사한 방법을 이용해 림프절에 이소성 조직을 형성시켜 간 기능을 강화할 수 있다.

[0095] 비-제한적인 특정 구현예에서, 간 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법은, (a) 간세포를 치료학적 유효량으로 개체에, 개체의 FALC에 투여하여 이소성 간 조직을 형성하는 단계, (b) 예를 들어, 이소성 간 조직을 형성하기 위해 하나 이상의 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진함으로써, 개체에게 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포를 투여하여 이소성 간의 형성을 촉진하는 단계, 및 (c) LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 유사한 방법을 이용해 림프절에 이소성 조직을 형성시켜 간 기능을 강화할 수 있다.

[0096] 특정 구현예에서, 간 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법은 개체에서 염증을 유도하는 것을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 염증은 전술한 바와 같이 염증 촉진 물질을 개체에 투여함으로써 유도될 수 있다. 특정 구현예에서, 염증은 전술한 바와 같이 이식할 간세포 하나 이상을 도입하기 전에 유도된다.

[0097] 특정 구현예에서, 본원의 방법은 전술한 바와 같이 생체내에서 수행된다. 특정 구현예에서, 시험관내/생체외에서, 예를 들어, 배양된 조직 이식편으로서 수행된다. 비-제한적인 특정 구현예에서, 본 발명은, 예를 들어, 간 기능 강화가 필요한 개체에 향후 이식하기 위한, 상기한 시험관내/생체외 방법으로 생성되는 간 조직을 제공한다.

[0098] 5.2.2 신장 질환 및 장애의 치료

[0099] 본원은 신장 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 본원은, 예를 들어, 신장 기능이 저하된 개체에서, 치료학적 이점을 위해 개체에 사용될 수 있는 이소성 신장 조직을 생성하기 위한 목적으로, FALC 또는 림프절에서 신장 세포 또는 신장 조직의 단편을 증식시키는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, FALC는 장막에 위치한다.

[0100] 신장 기능 강화가 필요한 개체는, 비-제한적인 예로, 신장 부전, 또는 질환, 외상 또는 독성 작용에 의한 신장 손상을 가진 개체를 비롯하여, 건강한 상태를 유지할만큼 충분한 기능성 신장이 부족한 개체이다. 예를 들어, 비-제한적으로, 건강한 상태는 개체의 정상 범위에 속하는 하나 이상의 신장 기능 파라미터에 의해 확인된다. 신장 기능 파라미터에 대한 비-제한적인 예로는 크레아티닌 수치, 단백질 수치 및 알부민 수치 등이 있으며; 이들 수치에 대한 정상 범위는 인간 개체를 포함하여 다양한 개체들에 대해 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 비-제한적인 특정 구현예에서, 상기 파라미터들 중 하나 이상, 또는 2 이상 또는 3 이상이 정상 수치에 대해 적어도 약 25% 또는 적어도 약 50%까지 높은 것은, 신장 기능 강화가 필요하다는 것을 의미한다. 개체에서 신장 기능 강화 달성은 하나 이상의 신장 기능 파라미터가 정상 범위 쪽으로 이동하는 것을, 예를 들어, 비-제한적으로 약 10% 이상 또는 약 20% 이상 또는 약 30% 이상 또는 약 40% 이상 또는 약 50% 이상 개선되는 것을 의미한다. 특정 구현예에서, 개체의 사구체 여과율 (GFR) 감소는 신장 기능 저하를 의미한다. 예를 들어, 비-제한적으로, 개체의 GFR 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40% 또는 약 50% 감소는 신장 기능 저하를 의미한다. 특정 구현예에서, 생착된 세포가 농축뇨 (concentrated urine)를 생산할 수 있다.

[0101] 비-제한적인 특정 구현예에서, 신장 기능 강화는 개체의 생존성을, 예를 들어 약 20% 이상 또는 약 30% 이상 연장하는 것으로 나타난다.

[0102] 특정 구현예에서, 신장 기능 강화가 필요한 개체는 신장 질환, 신장 장애, 신장 부전 및/또는 신장 기능 저하를 앓고 있을 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 신장 질환 및/또는 장애에 대한 비-제한적인 예로는 급성 신장 부전, 만성 신장 질환, 사구체신염, 루푸스, 다낭성 신장 질환, 신장병증, 신장증, 신장 기형 및 신장 암 등이 있다. 신장 질환과 관련된 다른 비-제한적인 예는 적혈구 생성 감소, 활성화된 비타민 D 결핍 및 비정형 비갑상선 질환 (atypical nonthyroidal illnesses)이다.

[0103] 비-제한적인 특정 구현예에서, 본원은, 신장 세포를 치료학적 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하며, 투여된 하나 이상의 신장 세포가 FALC 또는 림프절 내 또는 주변에서 증식하여 이소성 신장 조직을 형성하고, 이로써 개체의 신장 기능이 강화되는, 신장 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0104] 특정 구현예에서, 신장 세포 또는 신장 조직의 단편은 이소성 신장 조직을 형성하기 위해 FALC 또는 림프절 내 또는 주변으로 이식된다. 특정 구현예에서, 개체에 이식되는 신장 세포 또는 신장 조직의 단편은 인간 세포 또는 비-인간 세포일 수 있다. 비-인간 신장 세포에 대한 비-제한적인 예로는 인간을 제외한 영장류의 신장 세포 및 개, 고양이, 말, 마우스, 랫, 햄스터, 토끼, 돼지 등과 같은 다양한 비-인간 동물 유래의 신장 세포 등이 있다. 특정 구현예에서, 신장 세포 또는 신장 조직의 단편은 의도한 수여체에 대해 동계 또는 동종이계일 수 있다. 비-제한적인 구현예에서, 신장 세포 및/또는 신장 조직 단편은 의도한 수여체에 대해 자가의 것이다 (예, 이식하기 전에 수확하여 배양 증폭시키거나, 또는 의도한 수여체의 전구 세포 또는 줄기 세포로부터 생성함). 특정 구현예에서, 신장 세포는 태아 신장 세포 또는 조직, 예를 들어, 후신이다. 특정 구현예에서, 신장 세포는 후신, 예를 들어 온전한 후신이 아니다. 특정 구현예에서, 신장 세포는 신장 선조 세포 (renal progenitor cell)일 수 있다. 비-제한적인 특정 구현예에서, 한 종의 신장 세포 및/또는 신장 조직 단편이 다른 종에게 이식될 수 있으며, 예를 들어, 비-제한적으로, 인간 신장 세포가 마우스 숙주에 이식될 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 비-인간 신장 세포 및/또는 신장 조직 단편이 인간 수여체의 FALC에 이식될 수 있다.

[0105] 특정 구현예에서, 신장 세포의 유효량은 신장 세포 약 10^4 내지 10^{11}개, 또는 약 10^5 내지 10^{10}개, 또는 FALC에서 이소성 신장 조직 부위를 하나 이상 형성하는데 효과적으로 확인된 양을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 신장 세포의 유효량은 하나 이상의 신장 세포를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 신장 세포 약 10^5 내지 약 10^{11}, 약 10^5 내지 약 10^9, 약 10^5 내지 약 10^8, 약 10^5 내지 약 10^7, 약 10^5 내지 약 10^6, 약 10^6 내지 약 10^{11}, 약 10^6 내지 약 10^{10}, 약 10^6 내지 약 10^9, 약 10^6 내지 약 10^8, 약 10^6 내지 약 10^7, 약 10^7 내지 약 10^{11}, 약 10^7 내지 약 10^{10}, 약 10^7 내지 약 10^9 또는 약 10^7 내지 약 10^8개의 함량이 개체에 투여될 수 있다.

[0106] 특정 구현예에서, 신장 세포 및/또는 신장 조직 단편은 바람직한 이소성 신장 조직을 형성하기 위해 2회 이상으로 개체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 신장 세포 및/또는 신장 조직 단편은 개체에게 2회 이상, 3회 이상 또는 4회 이상 투여될 수 있다. 다른 예로 또는 부가적으로, 신장 세포 및/또는 신장 조직 단편은 FALC 또는 림프절을 포함하는 2곳 이상의 서로 다른 해부학적 영역으로 이식되어, 2 이상의 이소성 신장 조직을 수득할 수 있다.

[0107] 특정 구현예에서, 본원은, 신장 세포를 치료학적 유효량으로 개체에 투여하는 단계 (또는 신장 조직의 단편) 및

개체의 지방-부속 림프 클러스터 또는 림프절에서 신장 세포의 증식을 촉진하는 단계를 포함하는, 신장 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법을 더 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 증식은, 예를 들어, 비-제한적으로, 이소성 신장 조직 형성의 타겟이 되는 FALC 또는 림프절을 포함하는 해부학적 영역에 신장 세포를 국소 투여함으로써, 및/또는 이소성 신장 조직의 형성을 촉진하는 하나 이상의 물질을 제공함으로써, 촉진될 수 있다.

[0108] 특정 구현예에서, 물질은, 비-제한적인 예로, 복수의 골수-유래 세포 및/또는 복수의 기질 세포 또는 기질 내피 세포일 수 있다. 다른 예로 및/또는 부가적으로, 물질은 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자, 예를 들어, LTβR 또는 NIK의 활성인자 또는 이의 하류 타겟일 수 있다. 특정 구현예에서, 물질은 비-고전적인 NF-κB 신호전달 경로의 활성인자일 수 있다. 특정 구현예에서, 물질은 골수-유래 세포, 기질 세포, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자, 비-고전적인 NF-κB 신호전달 경로의 활성인자 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0109] 비-제한적인 특정 구현예에서, 본원은, 신장 세포를 포함하는 조성물을 FALC에 도입하는 단계 및 예를 들어 전술한 바와 같이 이소성 신장 조직의 형성을 촉진하는 하나 이상의 물질을 공급하는 단계를 포함하는, 이소성 신장 조직을 형성하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 비-제한적으로, 신장 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법은, (a) 신장 세포 또는 신장 조직 단편을 치료학적 유효량으로 개체에, 개체의 FALC에 투여하여, 이소성 신장 조직을 형성하는 단계, 및 (b) 예를 들어, 이소성 신장 조직을 형성하기 위해 하나 이상의 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진함으로써, 개체에게 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포를 투여하여 이소성 신장의 형성을 촉진하는 단계를 포함한다. 유사한 방법을 이용해 림프절에 이소성 조직을 형성시킬 수 있다.

[0110] 비-제한적인 특정 구현예에서, 신장 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법은, (a) 신장 세포 또는 신장 조직 단편을 치료학적 유효량으로 개체에, 개체의 FALC 또는 림프절에 투여하여, 이소성 신장 조직을 형성하는 단계, 및 (b) 예를 들어, 이소성 신장 조직을 형성하기 위해 하나 이상의 세포의 증식 및/또는 혈관화를 촉진함으로써, 개체에게 하나 이상의 골수-유래 세포 및/또는 기질 세포를 투여하여 이소성 신장의 형성을 촉진하는 단계를 포함한다. 유사한 방법을 이용해 림프절에 이소성 조직을 형성시켜 신장 기능을 강화할 수 있다.

[0111] 비-제한적인 특정 구현예에서, 신장 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법은, (a) 신장 세포 또는 신장 조직 단편을 치료학적 유효량으로 개체에, 개체의 FALC 또는 림프절에 투여하여, 이소성 신장 조직을 형성하는 단계, (b) 개체에게 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자를 투여하여 이소성 신장 조직의 형성을 촉진하는 단계를 포함할 수 있다. 유사한 방법을 이용해 림프절에 이소성 조직을 형성시켜 신장 기능을 강화할 수 있다.

[0112] 특정 구현예에서, 신장 기능 강화가 필요한 개체를 치료하는 방법은 개체에서 염증을 유도하는 것을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 염증은 전술한 바와 같이 염증 촉진 물질을 개체에 투여함으로써 유도될 수 있다. 특정 구현예에서, 염증은 전술한 바와 같이 이식할 간세포 하나 이상을 도입하기 전에 유도된다.

[0113] 특정 구현예에서, 본원의 방법은 전술한 바와 같이 생체내에서 수행된다. 특정 구현예에서, 시험관내/생체외에서, 예를 들어, 배양된 조직 이식편으로서 수행된다. 비-제한적인 특정 구현예에서, 본 발명은, 예를 들어, 신장 기능 강화가 필요한 개체에 향후 이식하기 위한, 상기한 시험관내/생체외 방법으로 생성된 신장 조직을 제공한다.

[0114] ### 5.3 조성물 및 키트

[0115] 본 발명은 이소성 조직을 형성하기 위한 조성물을 제공한다. 본 발명은 하나 이상의 세포 및 하나 이상의 세포로부터 이소성 조직의 형성을 촉진하기 위해 사용될 수 있는 하나 이상의 물질을 포함하는, 이소성 조직을 형성하기 위한 조성물을 제공한다.

[0116] 특정 구현예에서, 조성물에 존재하는 하나 이상의 세포는 간세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 조성물에 존재하는 하나 이상의 세포는 신장 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 간세포 또는 신장 세포는 이식을 위해 준비될 수 있거나 및/또는 이식 시술을 미국 특허 9,125,891에 기술된 방법을 이용해 수행할 수 있으며, 상기 미국 특허는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0117] 본원에서 사용하기 적합한 세포는 임의의 적합한 소스로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 세포는 자가 소스로부터 유래될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 세포를 이식받을 개체로부터 유래될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 이종의 소스로부터 유래될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 세포를 이식받을 개체와는 다른 개체로부터 유래될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어, 간세포 또는 신장 세포는 또한 이후 관련 세포 타입으로 분화되는 다양한 소스로부터 유래된 줄기 세포로부터 형성될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는,

본원의 조성물 및/또는 방법에 사용하기 전, 특정 표현형을 유도하기 위해 다양한 조건 하에 소정의 시간 동안 배양할 수 있다.

[0118] 특정 구현예에서, 본원의 조성물에 포함되는 세포의 수는 다양할 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 적어도 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 50, 약 100, 약 150, 약 200, 약 300, 약 400, 약 500, 약 1000, 약 10,000, 약 100,000 또는 약 1,000,000개의 세포, 예를 들어, 간세포 또는 신장 세포를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 약 10^4 내지 약 10^{11}개의 세포, 예를 들어, 간세포 또는 신장 세포를 포함할 수 있다.

[0119] 특정 구현예에서, 본원은 이소성 간을 형성하거나 또는 간 기능 강화가 필요한 개체를 치료하기 위한 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 조성물은 복수의 간세포와, 이소성 간 형성을 촉진하는 하기 물질들 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 물질은 간세포가 아닌 하나 이상의 세포일 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 하나 이상의 물질은 복수의 골수-유래 세포 및/또는 복수의 기질 세포를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 골수-유래 세포는 조혈 줄기 세포일 수 있다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 섬유모세포 또는 섬유모세포-유사 세포, 예를 들어 섬유모세포형 망상 세포 (FRC), 여포 수지상 세포 (FDC), 림프 내피 세포 (LEC), 혈관 내피 세포 (BEC), α-7 인테그린 혈관 주위 세포 (AIP) 및 이중 음성 세포 (DNC)일 수 있다.

[0120] 특정 구현예에서, 본원은 이소성 신장을 형성하거나 또는 신장 기능 강화가 필요한 개체를 치료하기 위한 조성물을 제공한다. 비-제한적인 특정 구현예에서, 본원은 복수의 신장 세포 (또는 신장 조직의 단편)와, 이소성 신장 형성을 촉진하는 물질들 중 하나 이상을 포함하는, 이소성 신장을 형성하기 위한 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 물질은 신장 세포가 아닌 하나 이상의 세포일 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 하나 이상의 물질은 복수의 골수-유래 세포 및 복수의 기질 세포를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 골수-유래 세포는 조혈 줄기 세포일 수 있다. 특정 구현예에서, 기질 세포는 섬유모세포 또는 섬유모세포-유사 세포, 예를 들어 섬유모세포형 망상 세포 (FRC), 여포 수지상 세포 (FDC), 림프 내피 세포 (LEC), 혈관 내피 세포 (BEC), α-7 인테그린 혈관 주위 세포 (AIP) 및 이중 음성 세포 (DNC)일 수 있다.

[0121] 특정 구현예에서, 조성물은 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자를 더 포함할 수 있다. LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자에 대한 비-제한적인 예들은 상기에 언급되어 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 비-고전적인 NF-κB 신호전달 경로의 활성인자를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 비-제한적으로, 본 발명의 조성물은 복수의 세포, 예를 들어 신장 세포 (또는 신장 조직의 단편) 또는 간세포, 및 치료학적 유효량의, LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자를 포함할 수 있다.

[0122] 특정 구현예에서, 본원은, (a) 복수의 세포, 예를 들어, 신장 세포 (또는 신장 조직의 단편) 또는 간세포, (b) 복수의 골수-유래 세포 및 복수의 기질 세포, 및 (c) 치료학적 유효량의 LTβR 및/또는 NIK 신호전달 경로의 활성인자를 포함할 수 있는, 조성물을 제공한다.

[0123] 특정 구현예에서, 조성물은 선택적으로 합성 배양 배지 및/또는 스캐폴드를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 배지 및/또는 스캐폴드는, 비-제한적인 예로, 펩타이드, 단백질, 탄수화물, 마트리겔 (matrigel), 히알루론산, 콜라겐, 피브린, 피브리노겐, 파이브로넥틴, 폴리오르토에스테르, 폴리비닐 알코올, 폴리아미드, 폴리카보네이트, 아가로스, 알기네이트, 폴리(에틸렌) 글리콜, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리카프로락톤, 폴리비닐 피롤리돈, 해양 접착제 (marine adhesive) 단백질, 시아노아크릴레이트, 폴리머성 하이드로겔, 유사체 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0124] 특정 구현예에서, 조성물은 선택적으로 항생제를 포함할 수 있다. 항생제에 대한 비-제한적인 예로는, 비-제한적으로, 페니실린, 예를 들어 페니실린 및 아목시실린 (amoxicillin); 세팔로스포린 (cephalosporin), 예를 들어 세팔렉신 (cephalexin); 설폰아미드, 예를 들어, co-트리목사졸 (co-trimoxazole) 및 트리메토프림 (trimethoprim); 마크롤라이드 (macrolide), 예를 들어 에리트로마이신 (erythromycin), 클라리트로마이신 (clarithromycin) 및 아지트로마이신 (azithromycin); 플루오로퀴놀론, 예를 들어 시프로플록사신 (ciprofloxacin), 레보플록사신 (levofloxacin) 및 오플록사신 (ofloxacin); 테트라사이클린, 예를 들어 테트라사이클린 및 독시사이클린; 및 아미노글리코시드, 예를 들어 겐타마이신 및 토브라마이신 (tobramycin) 등이 있다.

[0125] 본 발명은 전술한 방법에 의해 생성된 이소성 조직을 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 예를 들어, 비-제한적으로, 본 발명의 조성물은 전술한 바와 같이 비-인간 숙주에서 생성된 인간 간 조직을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 합성 배양 배지 및/또는 스캐폴드를 선택적으로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 조성

물은 항생제를 선택적으로 포함할 수 있다.

[0126] 본 발명은 본원의 조성물 하나 이상을 포함하는 키트를 추가로 제공한다. 특정 구현예에서, 키트가 하나 이상의 조성물을 포함하는 경우, 각 조성물은 키트 내 자체 용기 안에 제공될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 키트는 키트 사용 설명서, 예를 들어 키트에 존재하는 조성물을 투여하기 위한 설명서를 추가로 제공한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 키트는 사용 설명서, 디바이스 및 부가적인 시약과 같은 하나 이상의 구성 성분, 및 전술한 방법을 수행하기 위한 튜브, 용기 및 시린지와 같은 구성 요소를 더 포함할 수 있다.

[0127] 아래 실시예는 본원을 보다 충분히 예시하기 위해 제공되지만, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0128] 6. 실시예 1: 제2 림프 조직에서의 간 생체공학

[0129] 6.1. 림프절 (LN) 및 밀키 스팟 (FALC)에서 보조 간 형성

[0130] 온전한 장기 이식의 대안으로서 간 세포를 이식하기 위한 새로운 부위를 동정하기 위한 탐구로서, 음용수에서 2-(2-니트로-4-트리플루오로메틸벤조일)-1,3-사이클로헥산다이온 ("NTBC")을 제거한 후 (32), 간 부전 유도 모델인 $Fah^{-/-}$ 마우스 (티로신 이화효소 푸마릴아세토아세테이트 하이드롤라제 (Fah) 결핍 마우스)에 복막내 주사 (IP)하여 이소성 결절을 데 노보로 형성시킬 수 있다는, 이례적인 관찰이 이루어졌다. 먼저, 정상 간세포가 림프계로 이동하여 $Fah^{-/-}$ 마우스의 림프절에서 증식하고 (도 2A), 천연 간 무게의 70% 이상으로 이소적으로 생성되는 것으로 관찰되었다. 이는, 특히, 림프절이 다수 암들이 처음에 전이하는 공통된 부위라는 것을 고려하였을 때, 놀라운 결과였다. 도 3은 간 세포 IP 이식 후 3-4주 경과시 $Fah^{-/-}$ 마우스; 밀키 스팟에서 모세혈관 공간 확장 및 혈관의 발아를 보여준다.

[0131] 이는, 림프절이 조직 및 장기 기능을 복구하기 위해 복수의 세포 타입들을 이소적으로 이식하기 위한 부위로서 직접 타겟팅될 수 있다는 가설을 도출하였다. 간세포를 단일한 $Fah^{-/-}$ 마우스 림프절 (액와, 슬와 또는 장간막)에 직접 주사하면, 치명적인 대사 질환을 앓고 있는 돌연변이 마우스의 생존을 구제할만큼 충분한 기능성의 이소성 간 덩어리가 형성되는 것으로, 확립되어 있다 (33).

[0132] 보다 최근 들어, 이소성 간을 형성시킨다는 이러한 개념이 간 질환 유도 후 거대 동물에서 구현될 수 있는 것으로 입증되었다 (도 2B). 본원에서, 간 질환 돼지 모델을 구축하였으며, 문맥대정맥문합술을 수행한 다음 장간막 림프절에 간세포를 이식함으로써 림프절에 이소성 간 조직을 증식시켰다. 돼지 6마리에 이식하였으며, 부분 간절제술을 이용해 추가적으로 간을 손상시켰다. 실험 결과, 림프절에서 간세포 생착 및 이식받은 동물 전체에서 간 조직의 생성이 입증되었으며 (도 2B), 이소성 간 덩어리가 커졌다. 문맥대정맥문합술은 중증 간 질환을 앓고 있는 환자에 대한 주요 외과 시술이지만, 현재 일반적으로 거의 사용되진 않는다. 이 방법은 쇠약성 문맥 고혈압 (debilitating portal hypertension)을 완화하기 위해 혈관들 간에 새로운 연결 (문맥 정맥에서 대정맥)을 형성함으로써, 혈류의 75%를 감소시킨다. 또한, 간으로 흐르는 혈류의 급격한 감소가 간영양성 인자 (hepatotrophic factor) 및 간세포 증식을 유도하는 것으로 알려져 있다 (41).

[0133] 오늘날, 비슷하지만, 선호되는 최소-침습성 시술은, 중증의 문맥 고혈압을 가진 간경변 환자에서 문맥 정맥에서 간 정맥으로의 새로운 연결을 개시하기 위한, TIPS (Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunting)이다. 돼지 모델에서의 이러한 기대되는 결과와 TIPS 이후의 환자에서의 잠재적인 중개 성과 (translational outcome)로 인해, 림프 미세환경이 이식된 세포에 어떻게 그리고 왜 훌륭한 숙주인지를 확인하고자 하였다.

[0134] 간세포는 또한 밀키 스팟에 생착한다. IP 주사 후 $Fah^{-/-}$ 마우스의 간 세포 생착 부위를 조심스럽게 분석한 바, 림프절과 더불어, 간세포가 장막 밀키 스팟으로 이동하여, 간 결절을 형성하는 것으로 확인되었다 (도 2C-D, 도 3-5). 특히, 도 3에 나타낸 바와 같이, 밀키 스팟에서 모세혈관 공간 확장 및 혈관 발아 (예, 하단 우측 패널)가 확인되었다. 밀키 스팟은 더 큰 장막에서 주로 발견되는 림프 조직으로 된 작은 "우유빛"을 띠는 영역 (지방-부속 림프 클러스터 또는 "FALC")이다 (도 2C). 조혈 세포 (림프 세포 및 대식세포)와 기질 세포로 된 이러한 응집체는 림프절과 비슷한 제2 림프 기관으로서 알려져 있다 (42, 43). 당연히, 밀키 스팟은 또한 복막 암종증 (peritoneal carcinomatosis), 특히 전이성 난소암으로서 식별되었다.

[0135] 이소성 간 형성에 림프 조직 환경이 필요한지를 검증하기 위해, 리콤비나제 활성화 유전자-2 (RAG2) 및 공통 사이토카인 수용체 감마 체인 (감마 c) ("FRGN" 마우스)에 추가적인 돌연변이를 가지고 있는 $Fah^{-/-}$ NOD 마우스에

서 IP 이식을 수행하였으며; 이들 마우스에는 림프가 전혀 없다 (alymphoid) (44). 도 6에 나타낸 바와 같이, FRGN 마우스에는 장막 밀키 스팟과 FALC가 없다. 간세포를 IP 이식한 결과, 야생형 대조군과 비교해 FRGN 마우스 장막에서의 생착이 불량하였으며 (도 7), 생착된 세포의 증식은 관찰되지 않았다 (도 8). 흥미롭게도, 밀키 스팟 및 FALC를 형성할 수 있는 능력은 골수 이식에 의해 FRGN에서 회복되었으며 (도 9 및 10), 이러한 밀키 스팟 및 FALC는 이소성 간 형성을 뒷받침할 수 있었다 (도 11 및 12).

[0136] 6.2. 이소성 간 발생의 분자 기전

[0137] 림프절이 간세포 생착 및 $Fah^{-/-}$ 생존에 필요한 것인지에 대해 의문을 제기하였다. 간세포는 밀키 스팟 및 림프절에서 증식 중인 것으로 추론되었으며, 기능성 림프절이 결핍된 $Fah^{-/-}$ 마우스가 생존하기 위해 밀키 스팟에서 충분한 이소성 간 덩어리를 형성할 수 있는지를 확인하고자 하였다. 이러한 가설을 검증하기 위해, 림프모구성 마우스 (aly/aly)를 유도성 간 부전을 앓고 있는 마우스 ($Fah^{-/-}$)와 교배하였다. Aly/aly 마우스에는 림프절, 페이어판 (Peyer's patch)이 결핍되어 있으며, 세포에서 비-고전적인 NF-κB 신호전달을 파괴하는 NF-κB 유도성 키나제 (NIK)의 점 돌연변이로 인해 해체형 비장 (disorganized spleen)을 가지고 있다 (도 13). 이들 마우스에 림프관, 특히 밀키 스팟이 존재하고 기능함에도 불구하고 (43), 비-고전적인 NF-κB 신호전달 없이는, 발생 단계 동안에 림프절 장기 형성은 적절하게 이루어지지 않는다 (림프절 없음).

[0138] IP 이식된 간세포가 aly/aly-$Fah^{-/-}$ 마우스에서 생착하는지를 먼저 조사하였다 (도 14). 간세포 대부분이 장막 내 밀키 스팟으로 이동한 것으로 확인되었으며, 간세포가 $Fah^{-/-}$ 마우스에서와 마찬가지로 aly/aly-$Fah^{-/-}$ 마우스의 장막에 생착하였지만 (도 15), 6주간 거대 결절을 형성할 수 없으며, 장막에서 처음에 생착되었음에도 불구하고 (도 14, 카플란 마이어 생존 곡선의 가장 오른쪽), 12주 후 (대조군 Fah-/- 마우스를 구제하는데 소요되는 시간) 이식받은 마우스들 (n=28) 모두 구제되지 않았다. 부검에서, $Fah^{-/-}$ 마우스에서 형성된 이소성 결절과 비교해 제한적인 혈관화가 관찰되었다. 또한, 간세포를 aly/aly-$Fah^{-/-}$ 마우스의 간으로 (비장 주사를 통해) 이식하였으며, 마우스는 간 부전으로부터 회복되는 것으로 확인되었다 (도 14, 카플란 마이어 생존 곡선의 가장 왼쪽). 이러한 결과는, aly/aly-$Fah^{-/-}$ 마우스에서 간세포의 복막 증식 결핍이 이 부위에서 고유하고, aly (NIK) 돌연변이로 인한 NIK 경로의 파괴 결과임을 의미하므로 (도 16), 중요하다. 간 (비장 주사)에 주사된 간세포는 아마 NIK 경로 없이도 정상적인 간 아키텍처 내 사멸 간세포를 대체한다.

[0139] 다음으로, 이소성 간 형성을 위한 숙주로 작용할 수 있는 림프 환경을 특정화하기 위한 실험들을 수행하였다. 도 17A는 밀키 스팟과 비교하여 림프절에서의 림프 마커 포도플라닌 및 내피 마커 CD31의 분포를 보여준다. 도 17B에 나타낸 바와 같이, 이식된 간세포는 ER-TR7을 보유한 기질 세포와 밀접한 조합 (close association)을 형성한다. 흥미롭게도, 간세포가 아닌 장막 기질 세포를 복막내 주사를 통해 이식하였을 경우, 이는 장막의 밀키 스팟으로 다시 되돌아간다 (도 17C). 도 18에 나타낸 바와 같이, 기질 세포는 NIK와 림포톡신 베타 수용체를 둘 다 발현하는 것으로 확인되었으며; 간세포는, 이후, 림포톡신 알파 (종양 괴사 인자 베타라고도 함) 및 베타 (종양 괴사 인자 C라고도 함) 양성이었다.

[0140] 간세포는 림프톡신 베타 ("LTb")를 발현하고, 기질 세포는 림포톡신 베타 수용체 ("LTbR")를 발현한다는 결과를 감안하면, 간세포는 LTbR이 결핍된 $Fah^{-/-}$ 마우스의 밀키 스팟에서 생착 및 증식할 것이지를 확인하는 것은 흥미로운 일이었다. 그 결과는 도 19에 나타내며, Fah/$LTbR^{-/-}$ 마우스에서의 간세포 증식은 $Fah^{-/-}$, $LTbR^{+}$ 마우스에서보다 낮게 관찰되었다.

[0141] 결론적으로, IP 주입된 간세포는 $Fah^{-/-}$ 마우스에서 이소성 간 덩어리를 뒷받침하기 위한 신-혈관화 (neo-vascularization)를 갖춘 장기 형성을 이행하게 되며, NIK 경로는 이러한 과정을 완료하기 위해 필요한 고유 경로이다.

[0142] 스티븐 파제트 박사 (1889)에 의한 암의 고전적인 종자와 토양 가설에서, 종자 (전이암)는 재생하기 위해 토양 (비옥한 환경)을 필요로 한다. 본원에 기술된 결과는, 종자 (간세포)가 이소성 부위에서 간 조직을 생착 및 형성시키기 위해 토양 (제2 림프 기관)을 필요로 한다는 것을 보여준다. 어떠한 특정 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 본 데이터는 간세포가 기질 세포와 함께 림프톡신/NIK 경로를 활성화하여 밀키 스팟에서 보조적인 간을 형성한다는 기전을 뒷받침해준다. 또한, 본 데이터는, 간 (비장 경로) 또는 밀키 스팟 (IP 경로)에 간세포 이식에 의한 간 조직 재생이 기전 측면에서 서로 다르다는 것을, 보여준다. NF-κB 유도성 키나제 (NIK)의

aly/aly 점 돌연변이는 이소성 간 발생을 파괴하지만, 자연적인 간 재생은 파괴하지 않는다. NIK는 제2 림프 기관 발생시 비-고전적인 NF-κB 신호전달에 핵심적인 기능을 담당한다. NIK는 미토겐-활성화 단백질 3 (MAP3) 키나제의 일원으로, 수용체 라이게이션 후, 검출가능한 수준으로 축적된다. 이는 NIK를 인산화시키고, κB 키나제 α (IKKα)의 저해제를 활성화하며, 이로써 IKKα-매개 p100의 인산화가 개시된다 (도 13).

[0143] 6.3. 참조문헌

[0144] 1. Starzl, T.E. et al. Orthotopic homotransplantation of the human liver. Ann Surg 168, 392-415 (1968).

[0145] 2. Reuben, A. Alcohol and the liver. Curr Opin Gastroenterol 23, 283-291 (2007).

[0146] 3. Perkins, J.D. et al. Should liver transplantation in patients with model for end-stage liver disease scores <or= 14 be avoided? A decision analysis approach. Liver Transpl 15, 242-254 (2009).

[0147] 4. Volk, M.L., Hernandez, J.C., Lok, A.S. & Marrero, J.A. Modified Charlson comorbidity index for predicting survival after liver transplantation. Liver Transpl 13, 1515-1520 (2007).

[0148] 5. Lipshutz, G.S. & Busuttil, R.W. Liver transplantation in those of advancing age: the case for transplantation. Liver Transpl 13, 1355-1357 (2007).

[0149] 6. Strom, S.C., Chowdhury, J.R. & Fox, I.J. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. Semin Liver Dis 19, 39-48 (1999).

[0150] 7. Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Degen, J.L., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. Science (New York, N.Y.) 263, 1149-1152 (1994).

[0151] 8. Weglarz, T.C., Degen, J.L. & Sandgren, E.P. Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver. Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes. Am J Pathol 157, 1963-1974 (2000).

[0152] 9. Braun, K.M. & Sandgren, E.P. Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury. Am J Pathol 157, 561-569 (2000).

[0153] 10. Grompe, M. et al. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. Nat Genet 10, 453-460 (1995).

[0154] 11. Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M. & Grompe, M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. The American journal of pathology 151, 1273-1280 (1997).

[0155] 12. Lagasse, E. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nat Med 6, 1229-1234 (2000).

[0156] 13. Grompe, M. Principles of therapeutic liver repopulation. J Inherit Metab Dis 29, 421-425 (2006).

[0157] 14. Grompe, M., Overturf, K., al-Dhalimy, M. & Finegold, M. Therapeutic trials in the murine model of hereditary tyrosinaemia type I: a progress report. J Inherit Metab Dis 21, 518-531 (1998).

[0158] 15. Overturf, K. et al. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. Nat Genet 12, 266-273 (1996).

[0159] 16. Fox, I.J. et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. N Engl J Med 338, 1422-1426 (1998).

[0160] 17. Nishikawa, T. et al. Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. The Journal of clinical investigation 125, 1533-1544 (2015).

[0161] 18. Tretbar, L.L., Beven, E.G. & Hermann, R.E. Homotransplantation of an auxiliary dog liver into the pelvis; effect of protacaval shunt in the prevention of liver atrophy. Surgical forum 16, 219-221 (1965).

[0162] 19. Marchioro, T.L., Porter, K.A., Dickinson, T.C., Faris, T.D. & Starzi, T.E. Physiologic Requirements For Auxiliary Liver Homotransplantation. Surgery, gynecology & obstetrics 121, 17-31 (1965).

[0163] 20. Van Thiel, D.H., Makowka, L. & Starzl, T.E. Liver transplantation: where it's been and where it's going. Gastroenterology clinics of North America 17, 1-18 (1988).

[0164] 21. Moritz, M.J. et al. Heterotopic liver transplantation for fulminant hepatic failure--a bridge to recovery. Transplantation 50, 524-526 (1990).

[0165] 22. Boudjema, K. et al. Temporary auxiliary liver transplantation for subacute liver failure in a child. Lancet (London, England) 342, 778-779 (1993).

[0166] 23. Terpstra, O.T., Reuvers, C.B. & Schalm, S.W. Auxiliary heterotopic liver transplantation. Transplantation 45, 1003-1007 (1988).

[0167] 24. Metselaar, H.J. et al. Recovery of failing liver after auxiliary heterotopic transplantation. Lancet (London, England) 335, 1156-1157 (1990).

[0168] 25. Faraj, W. et al. Auxiliary liver transplantation for acute liver failure in children. Annals of surgery 251, 351-356 (2010).

[0169] 26. Dokmak, S., Elkrief, L. & Belghiti, J. Auxiliary liver transplantation with a small deceased liver graft for cirrhotic liver complicated by hepatocellular carcinoma. Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation 26, e102-104 (2013).

[0170] 27. Ren, W., Zhang, A. & Dong, J. Integrating repopulation and regeneration of the auxiliarily transplanted small liver graft: the solution for organ shortage and immunosuppression. Medical hypotheses 79, 241-245 (2012).

[0171] 28. McKiernan, P. Liver transplantation and cell therapies for inborn errors of metabolism. Journal of inherited metabolic disease 36, 675-680 (2013).

[0172] 29. Shanmugam, N.P. et al. Auxiliary liver transplantation: a form of gene therapy in selective metabolic disorders. Journal of clinical and experimental hepatology 1, 118-120 (2011).

[0173] 30. Rela, M. et al. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I. Annals of surgery 229, 565-569 (1999).

[0174] 31. Burdelski, M. & Rogiers, X. Liver transplantation in metabolic disorders. Acta gastro-enterologica Belgica 62, 300-305 (1999).

[0175] 32. Hoppo, T., Komori, J., Manohar, R., Stolz, D.B. & Lagasse, E. Rescue of lethal hepatic failure by hepatized lymph nodes in mice. Gastroenterology 140, 656-666 e652 (2011).

[0176] 33. Komori, J., Boone, L., DeWard, A., Hoppo, T. & Lagasse, E. The mouse lymph node as an ectopic transplantation site for multiple tissues. Nat Biotechnol 30, 976-983 (2012).

[0177] 34. DeWard, A.D., Komori, J. & Lagasse, E. Ectopic transplantation sites for cell-based therapy. Current opinion in organ transplantation 19, 169-174 (2014).

[0178] 35. Francipane, M.G. & Lagasse, E. Maturation of embryonic tissues in a lymph node: a new approach for bioengineering complex organs. Organogenesis, 1-9 (2014).

[0179] 36. Francipane, M.G. & Lagasse, E. in Stem Cells Translational Medicine In press (2015).

[0180] 37. Gupta, S. et al. Hepatocytes exhibit superior transgene expression after transplantation into liver and spleen compared with peritoneal cavity or dorsal fat pad: implications for hepatic gene therapy. Hum Gene Ther 5, 959-967 (1994).

[0181] 38. Jirtle, R.L. & Michalopoulos, G. Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes.

Cancer Res 42, 3000-3004 (1982).

[0182] 39. Ohashi, K. et al. Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. Nat Med 6, 327-331 (2000).

[0183] 40. Ohashi, K. et al. Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. Hepatology (Baltimore, Md.) 41, 132-140 (2005).

[0184] 41. Nordlinger, B. et al. Can hepatocytes proliferate when transplanted into the spleen? Demonstration by autohistoradiography in the rat. European surgical research. Europaische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes 19, 381-387 (1987).

[0185] 42. Shah, S. et al. Cellular basis of tissue regeneration by omentum. PloS one 7, e38368 (2012).

[0186] 43. Rangel-Moreno, J. et al. Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. Immunity 30, 731-743 (2009).

[0187] 44. Mazurier F1, Fontanellas A, Salesse S, Taine L, Landriau S, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Peault B, Di Santo JP, de Verneuil H., A novel immunodeficient mouse model--RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants--requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. J Interferon Cytokine Res. 1999 May;19(5):533-41.

[0188] 45. Fabregat I, Moreno-Caceres J, Sánchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G, Ten Dijke P; IT-LIVER Consortium., TGF-β signalling and liver disease. FEBS J. 2016 Jun;283(12):2219-32.

[0189] 46. Rogers S., Lowell J., Hammerman N., and Hammerman M., Transplantation of developing metanephroi into adult rats. Kidney International 1998; 54:27-37.

[0190] 7. 실시예 2: 제2 림프 조직에서의 신장 생체공학

[0191] 마우스 림프절 (LN), 제2 림프 기관 (SLO)은 마우스 후신이 사구체 및 세관 기능을 갖춘 네프론으로 성숙하는 과정을 뒷받침할 수 있으며, LN은 또한 이식된 인간 태아 신장의 성숙화 뿐만 아니라 마우스 네프론 선조 (NP) 또는 인간 유도성 만능 줄기 세포 (hiPSC)로부터 생성된 신장 오가노이드 배양물의 성숙화를 조성할 수 있다 (도 20). LN 발생에서 중요한 신호전달 매개인자인 LTβR 신호전달이 이소성 기관 형성을 뒷받침하는지를 조사하기 위해, LN 신장 이식물을 보유한 마우스에 LTβR-Fc 융합 단백질을 처리하였다. LTβR-Fc 융합 단백질은, LTβR 리간드 (LTα 및 LTβ)와 결합함으로써 LTβR-매개 효과를 길항한다 (도 21 참조). 도 22A-B에 나타낸 바와 같이, LTβR-Fc 처리는 이식물의 크기 및 이의 혈관화를 현저하게 감소시켰다.

[0192] LTβR-Fc는, LTβR 리간드와의 결합 외에도, LTβR과 상호작용할 뿐만 아니라 또한 HVEM 및 Dcr3 수용체와 상호작용할 수 있는, non-TNF 패밀리 멤버 LIGHT와도 결합한다 (도 21). 이식물 혈관화/혈관신생 장애가 LTβR에 의해 매개되는 것 이외의 다른 신호전달 경로를 이용한 LTβR-Fc 간섭이 원인일 가능성을 배제하기 위해, LTβR-/- 마우스에서 제공되는 바와 같은 LTβR 결함 환경에서 신장 이식 결과를 조사하였다 (도 22 참조). 이러한 방식은, 관찰된 효과가, 기질 세포 및 조혈 세포를 비롯하여, 이식 시점에 공여 조직에 존재하는 공여 신장 세포 또는 다른 세포 타입에서의 LTβR/HVEM/Dcr3 저해로 인한 것일 가능성을 배제할 수 있었다.

[0193] LTβR-/- 마우스는 LN을 가지고 있지 않기 때문에, 이식을 위한 대안적 SLO로서 더 큰 장막을 사용하였다. 장막은 밀키 스팟으로 지칭되는 림프 응집체를 함유하며, 이는 복막 항원에 대한 면역을 촉진한다 (도 1 참조). LN에서와 같이, 섬유모세포형 망상 세포 (FRC)의 망 네트워크는 밀키 스팟 내 백혈구를 지원한다. LN과 비교해 장막의 정상 상태 기질 조성물을 조사하였을 경우, 비슷한 기질 세포 유세포 측정 프로파일이 확인되었다 (도 22C). 또한, PDPLN+/LTβR+ 및 PDPLN-/LTβR+ 세포 서브세트들이 장막 세포 현탁물에서 동정되었는데, 이는 장막에 LT-반응성 FRC 및 뇌 내피 세포 (BEC)로 된 드문 집단이 존재한다는 것을 의미한다 (도 22D). 배아 신장 단편의 증식은 LTβR-/- 장막에서 영향이 현저하였으며; 이식물은 더 작게 성장하였을 뿐만 아니라 혈관화 역시 낮은 수준이었으며, 이의 대조군 카운터파트와 비교해 비정상적인 형태를 나타내었는데, 이는 이소성 신장 이식물의 성공적인 혈관화/혈관신생을 위해서는 숙주 기질 세포에서의 LTβR 신호전달이 중요함을 지적해준다 (도 22E-F). 비-처리된 LN 신장 이식물의 경우, LTβR 하류 타겟이자 비-고전적인 NF-κB 경로의 중심 구성 성분인 NIK는 사구체 내피 세포로 제한되었다 (도 22G). 반대로, LTβR-Fc 처리는 이들 세포에서 NIK 발현을 무효화하였다. 마찬가지로, NIK 발현은 LTβR-/- 장막에서 증식된 이식물에서는 검출할 수 없었다. 임의의 특정 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, LTβR은 NIK를 사용해 비-고전적인 NF-κB 신호전달을 증폭시키고, 이식

된 조직의 혈관화/혈관신생을 촉진할지도 모른다. 나아가, 임의의 특정 이론으로 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 제2 림프 기관 내에 상주하는 기질 세포가 LTβR-신호전달을 기관 형성을 촉진하도록 사용하고, 기질 내피 세포-제한된 NIK 활성화가 그래프 신생혈관 (graph angiogenesis)을 촉진할 수 있는 것으로 보인다.

[0194] 8. 실시예 3: 염증은 이식된 간세포의 증식을 강화한다

[0195] 복막 염증은 지방-부속 림프 클러스터 (FALC)의 수 및 크기 증가를 유도한다 (Benezech, C. et al. Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. *Nature immunology* 16, 819-828 (2015)). 이러한 효과는 골수 세포에 의한 TNF 발현 및 기질 세포 상에서의 TNFR 신호전달에 의존적이다 (Benezech et al. (2015)). 염증이 간세포의 생착 증가를 또한 유도하는지를 확인하기 위해, 자이모산 (Toll-유사 수용체 2의 효모-유래 리간드)에 의해 유발되는 무균 복막 염증 (sterile peritoneal inflammation)을 야생형 C57bl/6 및 대조군 동물 (PBS 주사한 야생형 C57bl/6)에서 유도하였다 (도 23 참조). 3일 후 양쪽 동물 그룹에 GFP+ 간세포를 이식하였으며, 1주일 후 희생시켰다.

[0196] 도 24에 나타낸 바와 같이, 자이모산-유도된 염증은 조직에서 가시화된 바와 같이, 장막 및 장간막 지방에서의 GFP+ 간세포의 정량화에 의해 확인된 바와 같이, GFP+ 세포의 존재를 급격하게 증가시켰다. 중요한 점은, IP 주사 후 FALC에서의 간세포 생착이 야생형 마우스에서 관찰되었다는 것이며, 이는 FALC에서의 생착이 간 손상에 의존적이지 않다는 것을 의미한다. FALC 형성이 염증의 개시 또는 해소와 어떻게 시기를 맞추고, 간세포 생착이 해소 단계에서 지속될지는 여전히 조사가 필요하다.

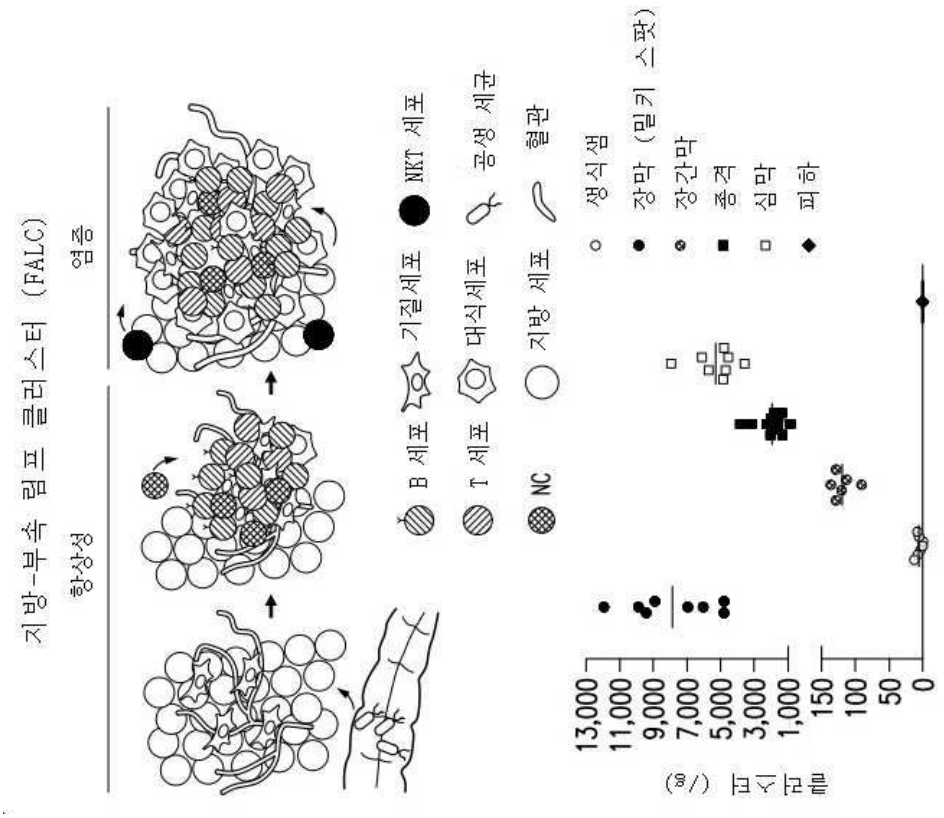
[0197] 다음으로, 간 질환 유도 후 (off NTBC) 티로신혈증 마우스의 생존에 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 이러한 프리컨디셔닝 레지먼트 (preconditioning regiment)를 $Fah^{-/-}$ C57bl/6 마우스에서 조사하였다. 도 23에 기술된 방식과 동일한 방식을 이용해, 염증이 유도된 또는 유도되지 않은 $Fah^{-/-}$ C57bl/6 마우스에 야생형 간세포를 이식한 후, 간 질환을 유도하였다 (off NTBC). 도 25에 나타낸 바와 같이, 염증이 없는 좌측 패널의 동물은 2번 선별 후 구제되지 않았지만 (체중 감소 = 간 질환), 염증이 유도된 동물은 8주 후 구제되었다.

[0198] 염증 유도하지 않은 동물을 부검한 결과, 장막, 비장, 문맥, 생식샘 및 장간막 지방에 존재하는 FALC에서 낮은/제한적인 간 생착 및 간 덩어리가 확인되었다 (도 26). 이와는 대조적으로, 염증 유도된 동물에서는 이들 위치들에서 큰 덩어리의 간 조직이 관찰되었다.

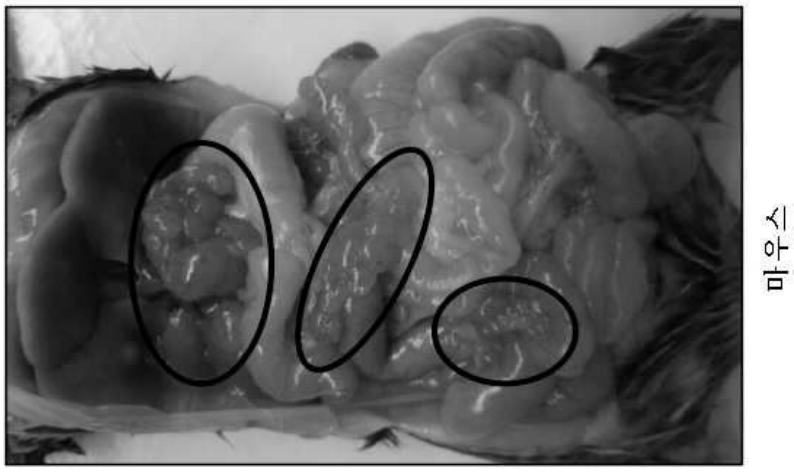
[0199] 다양한 참조문헌, 특허 및 특허 출원들이 본원에 인용되며, 이들 내용은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

도면

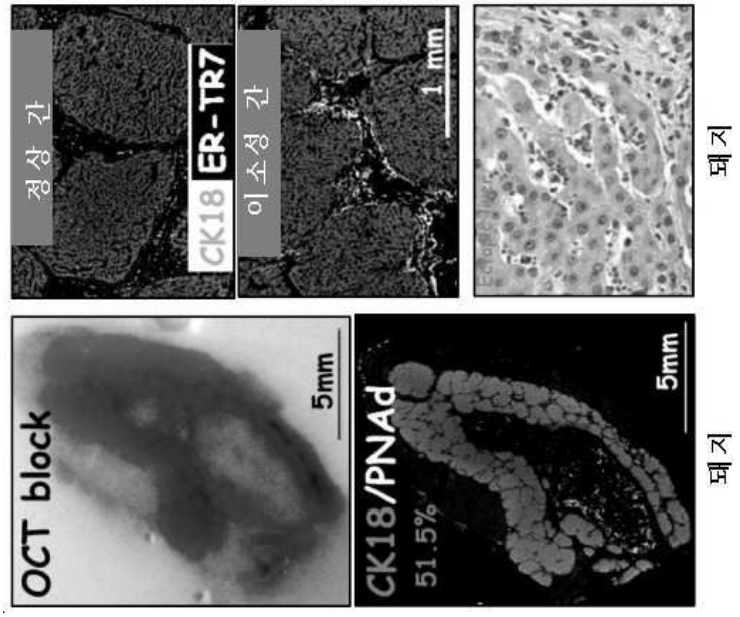
도면1


지방-부속 림프 클러스터 (FALC)
항상성
염증
B 세포
기질세포
NKT 세포
T 세포
대식세포
공생 세균
NC
지방 세포
혈관
생식 샘
장막 (밀키 스팟)
장간막
종격
심막
피하
클러스터 (/g)
13,000
11,000
9,000
7,000
5,000
3,000
1,000
150
100
50
0

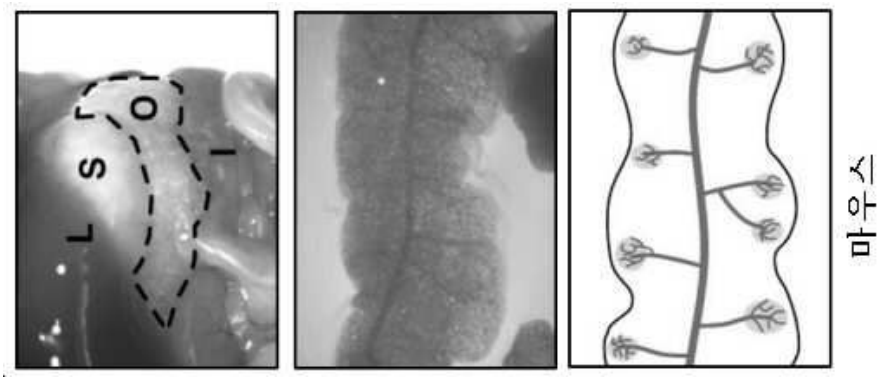
도면2a


마우스

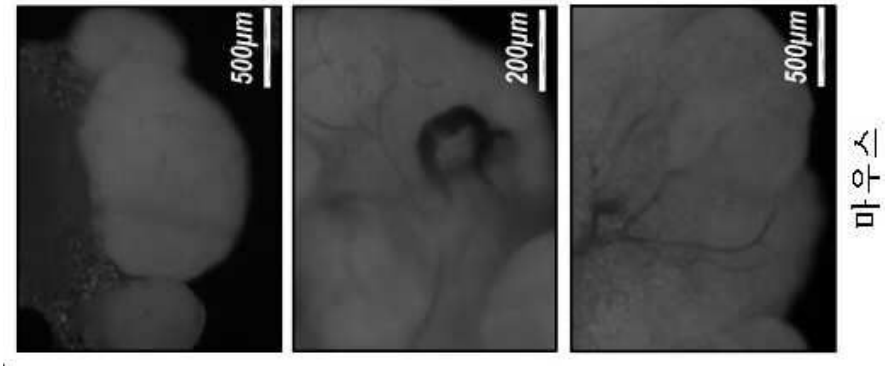
도면2b



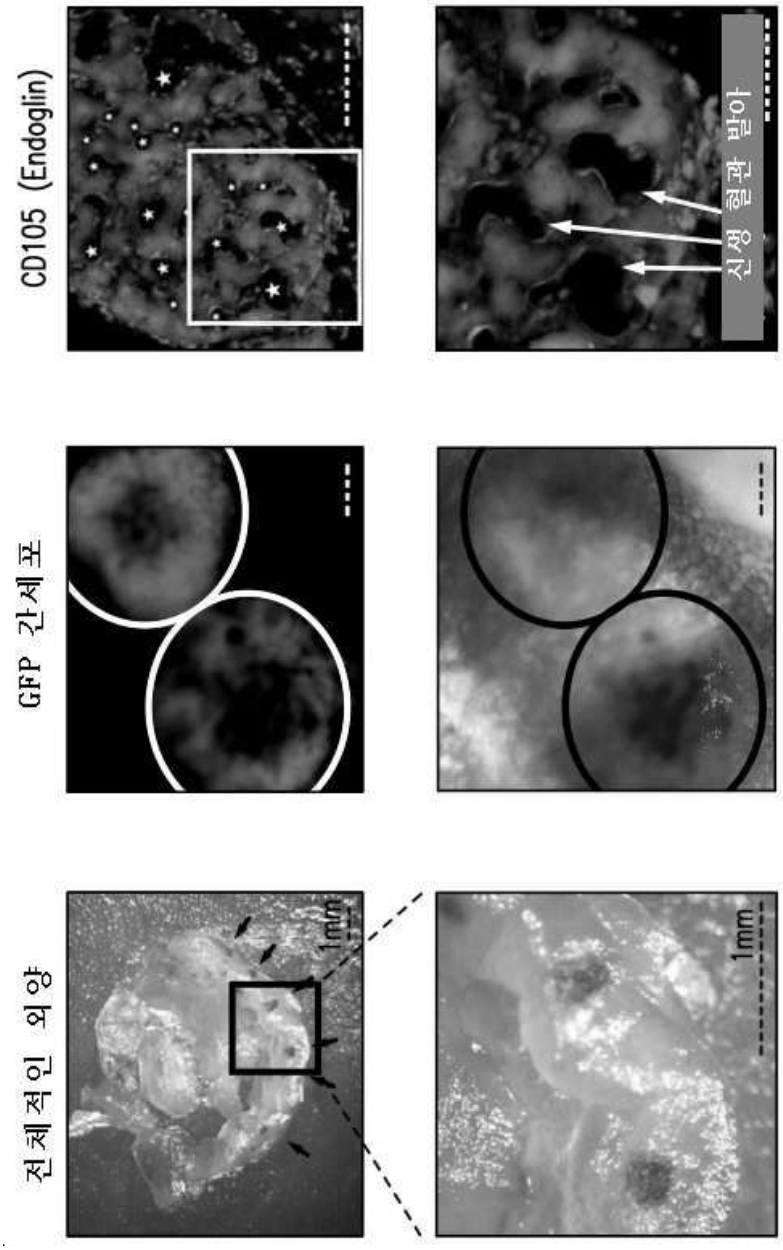
도면2c



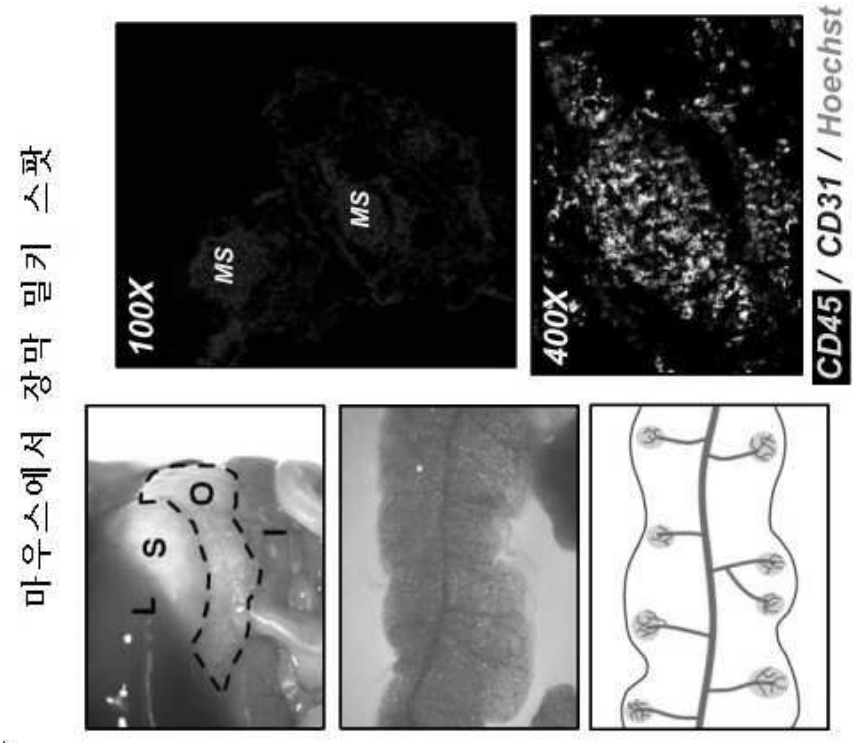
도면2d



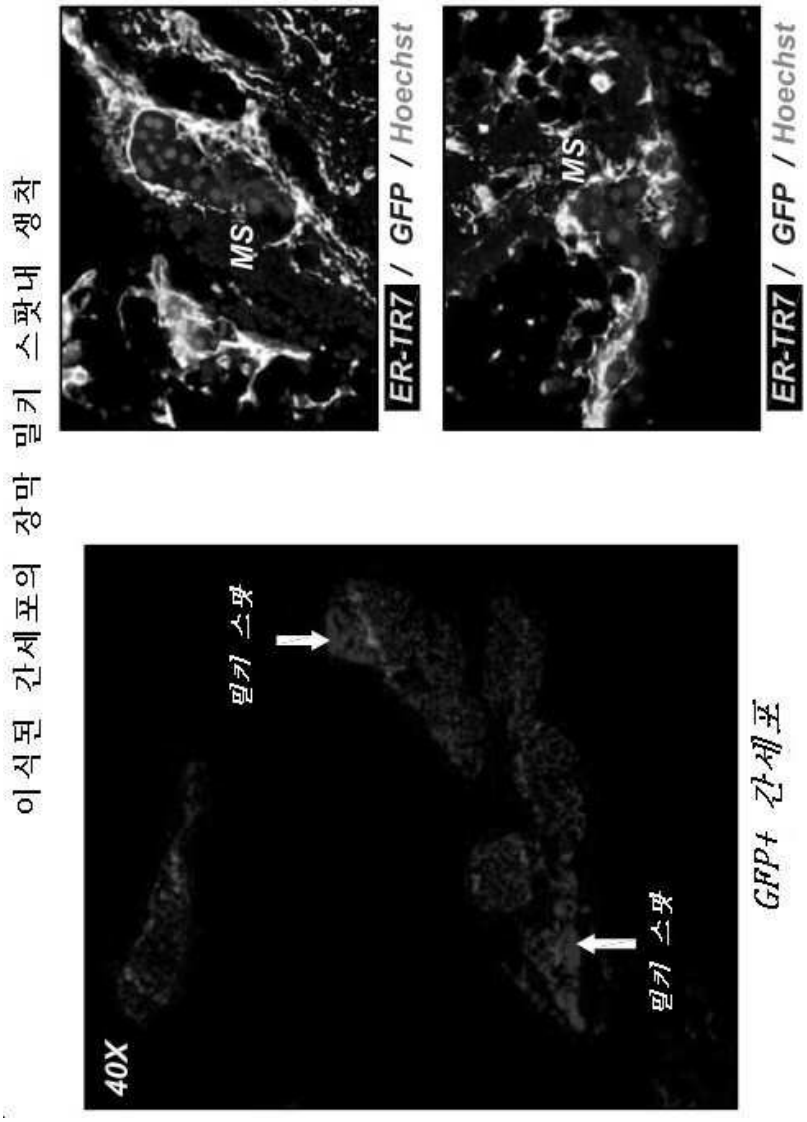
도면3



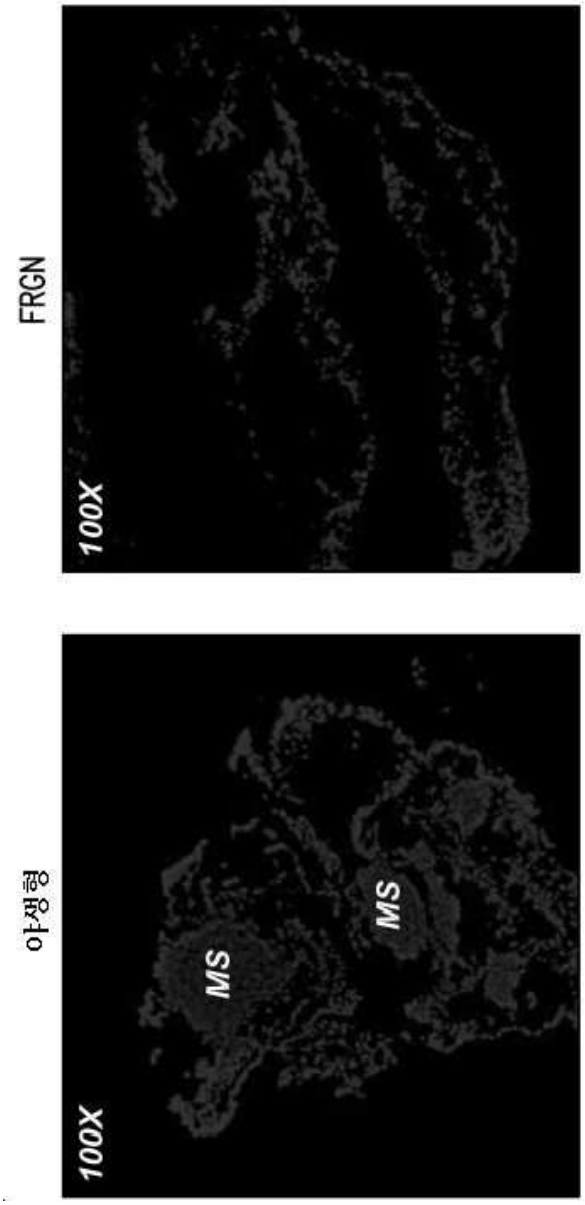
도면4



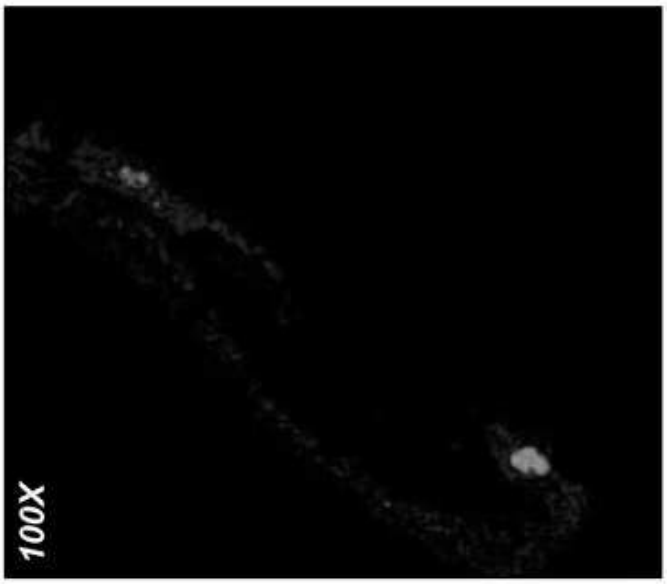
도면5

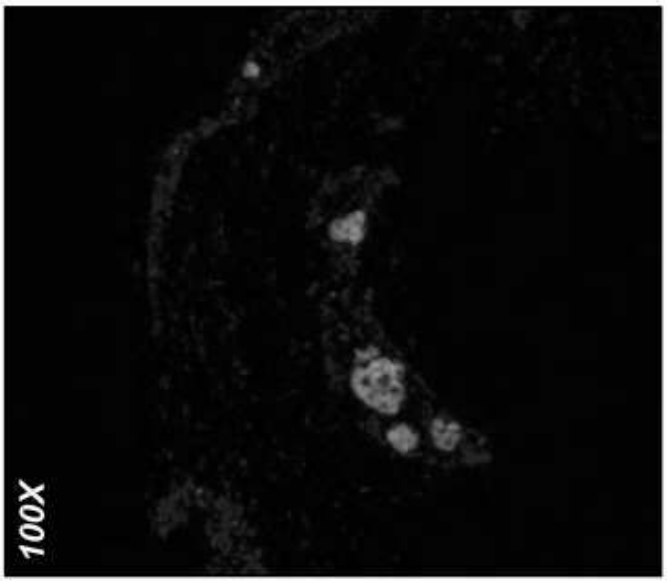

이식된 간세포의 장막 밀키 스팟내 생착
MS
ER-TR7 / GFP / Hoechst
MS
ER-TR7 / GFP / Hoechst
40X
밀키 스팟
밀키 스팟
GFP+ 간세포

도면6

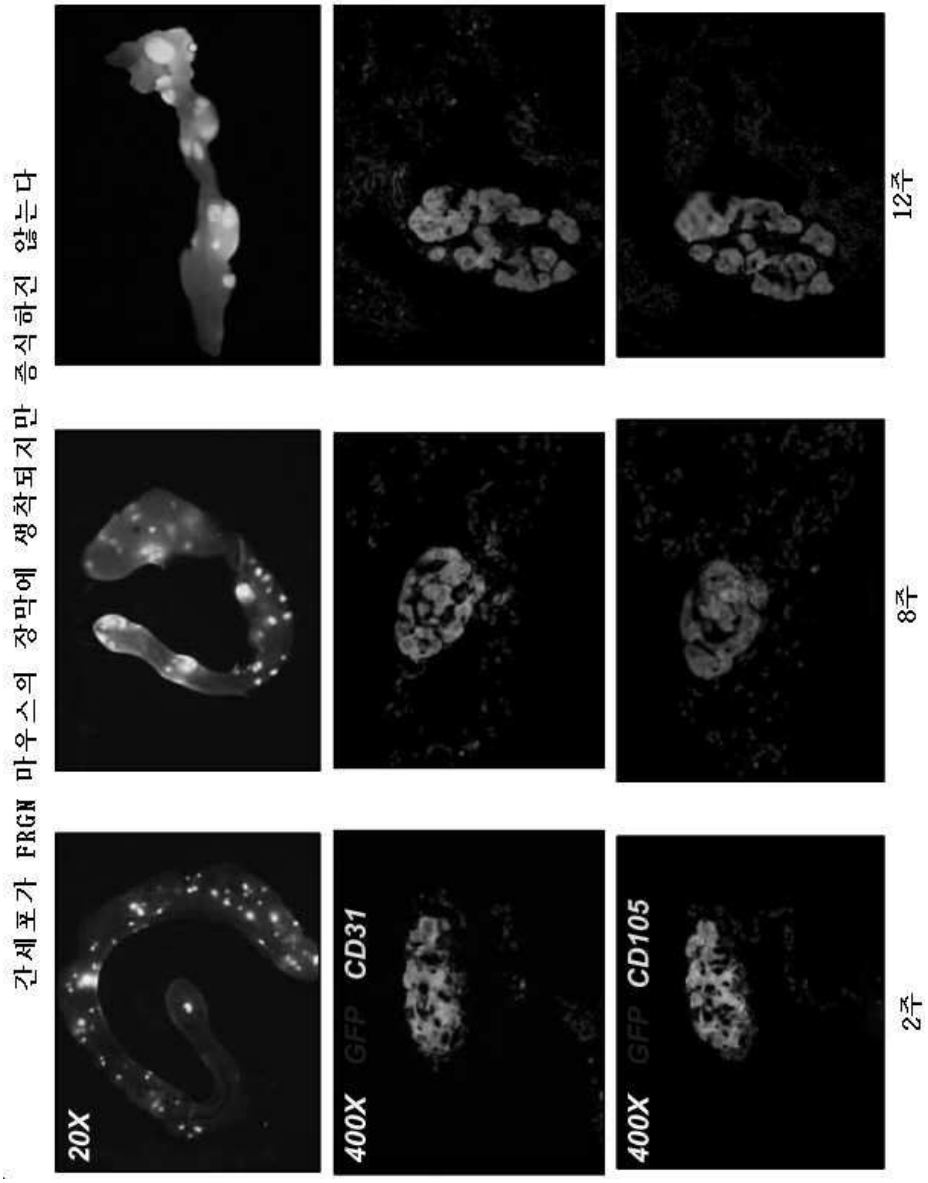


도면7

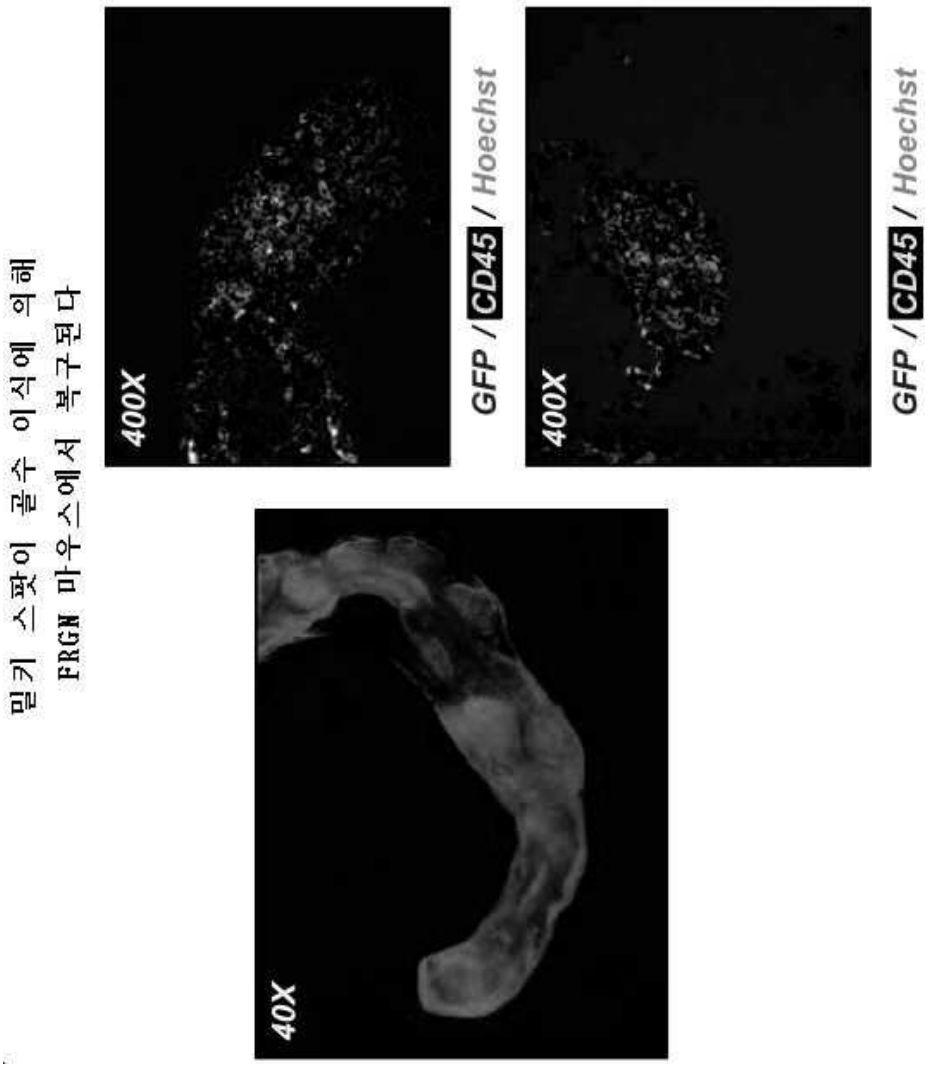




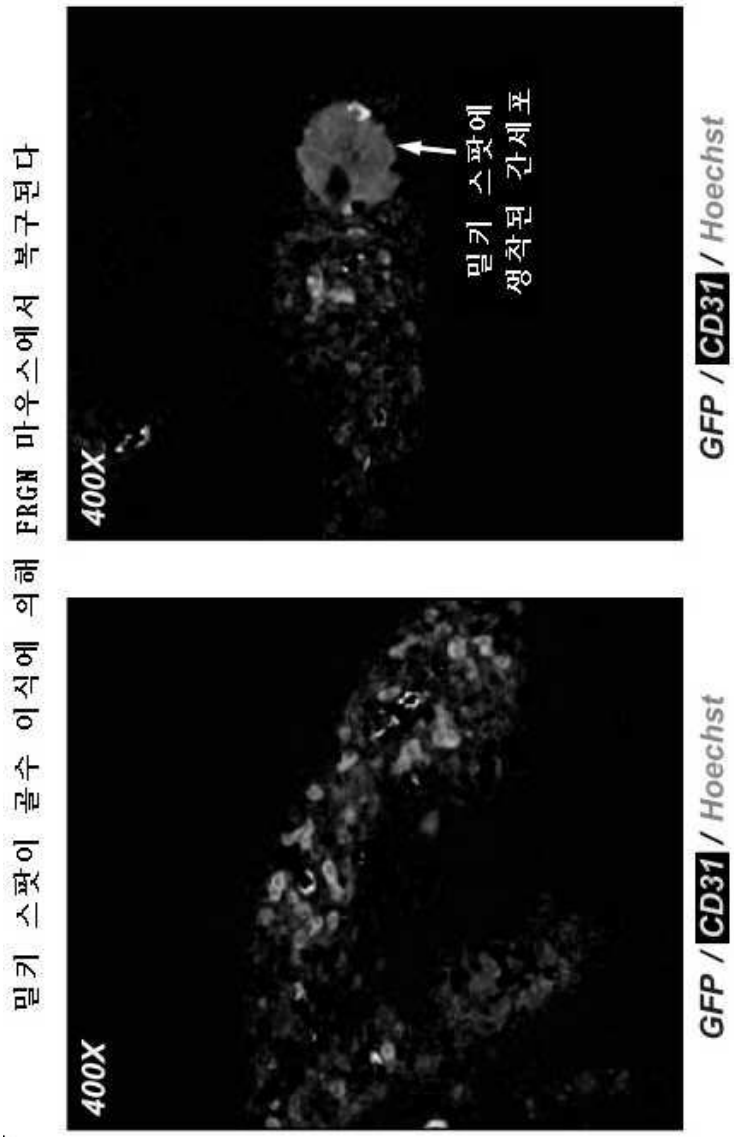
도면8


간세포가 FRGN 마우스의 장막에 생착되지만 증식하진 않는다
20X
400X GFP CD31
400X GFP CD105
2주
8주
12주

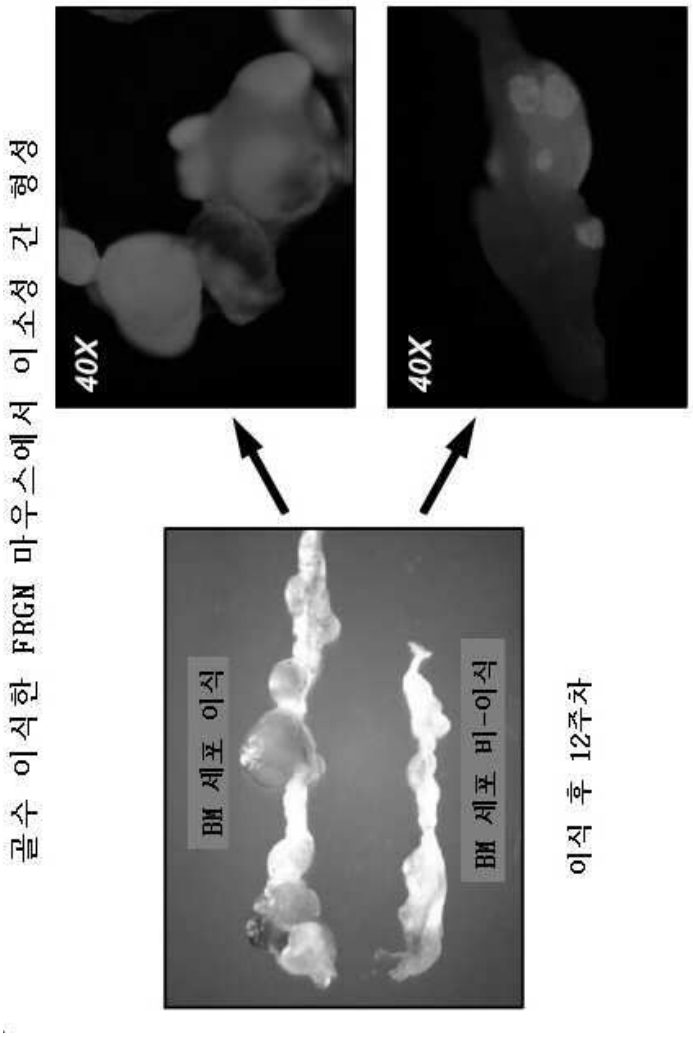
도면9


밀키 스팟이 골수 이식에 의해
FRGN 마우스에서 복구된다
400X
GFP / CD45 / Hoechst
400X
GFP / CD45 / Hoechst
40X

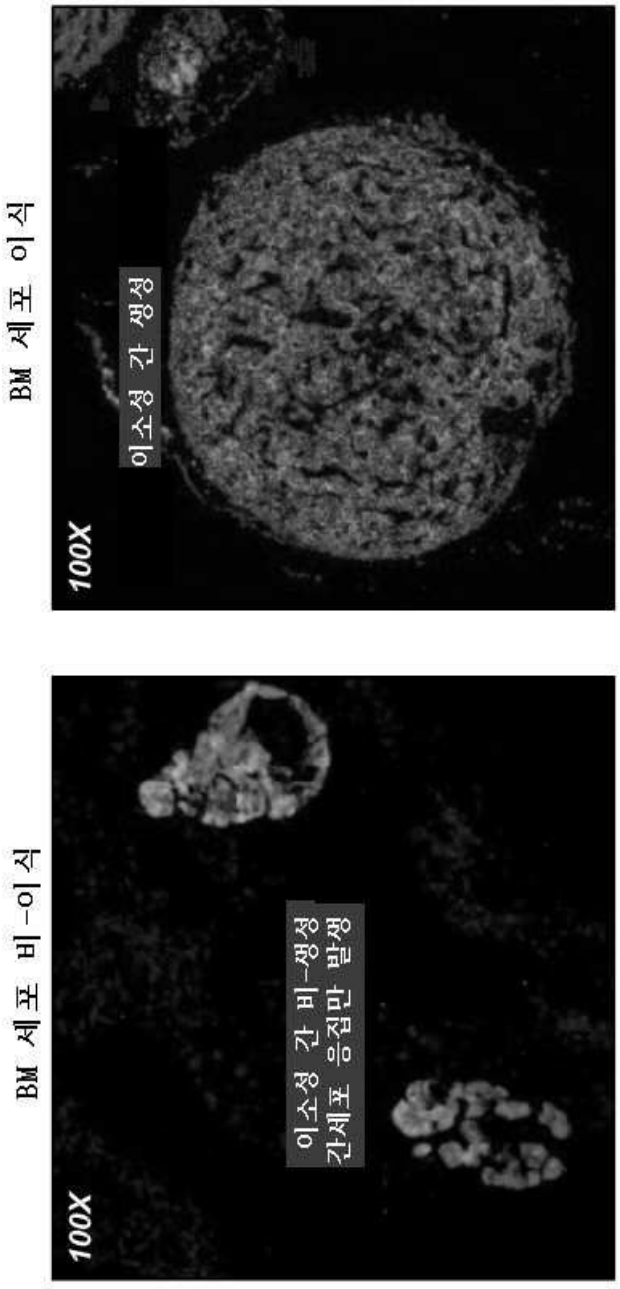
도면10


밀키 스팟이 골수 이식에 의해 FRGM 마우스에서 복구된다
400X
GFP / CD31 / Hoechst
400X
밀키 스팟에
생착된 간세포
GFP / CD31 / Hoechst

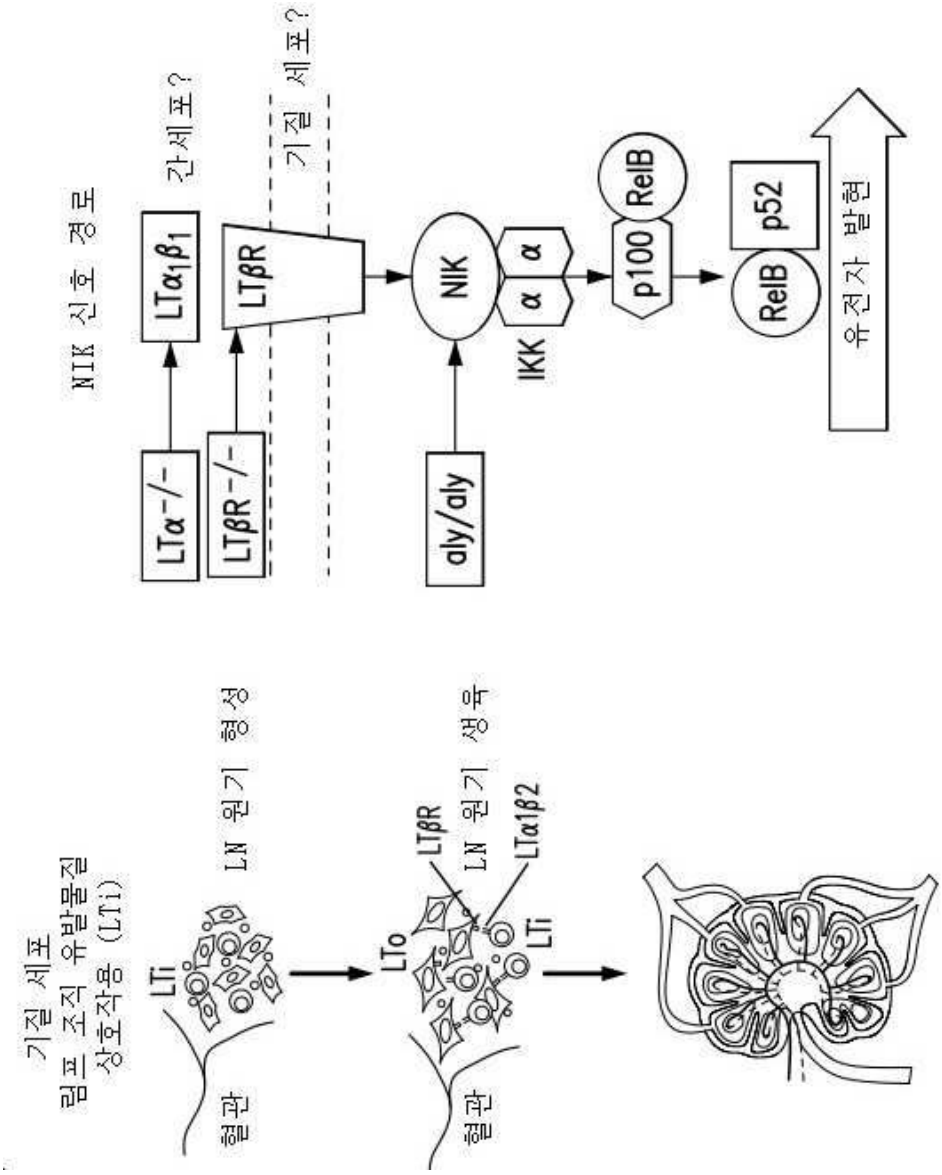
도면11



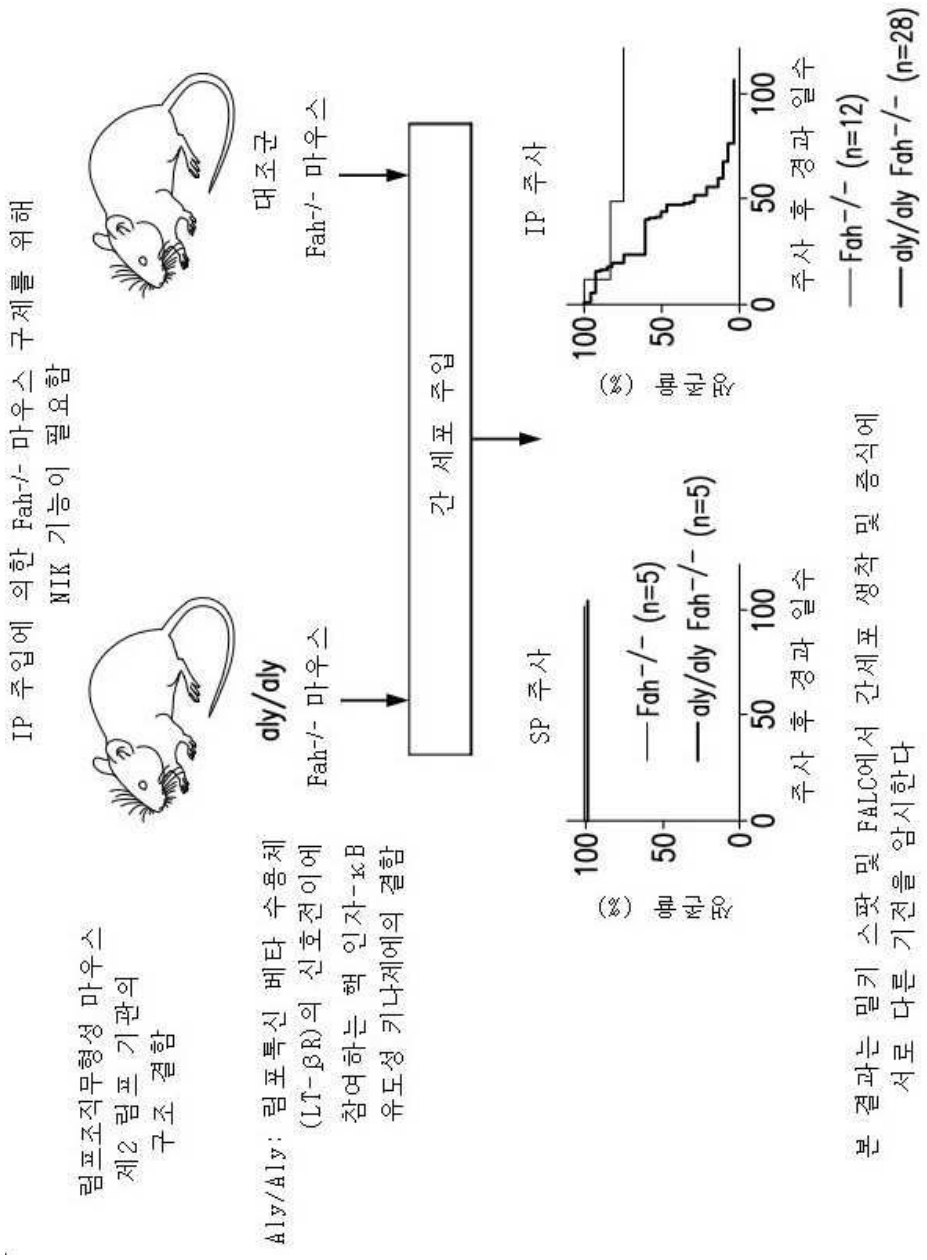
도면12



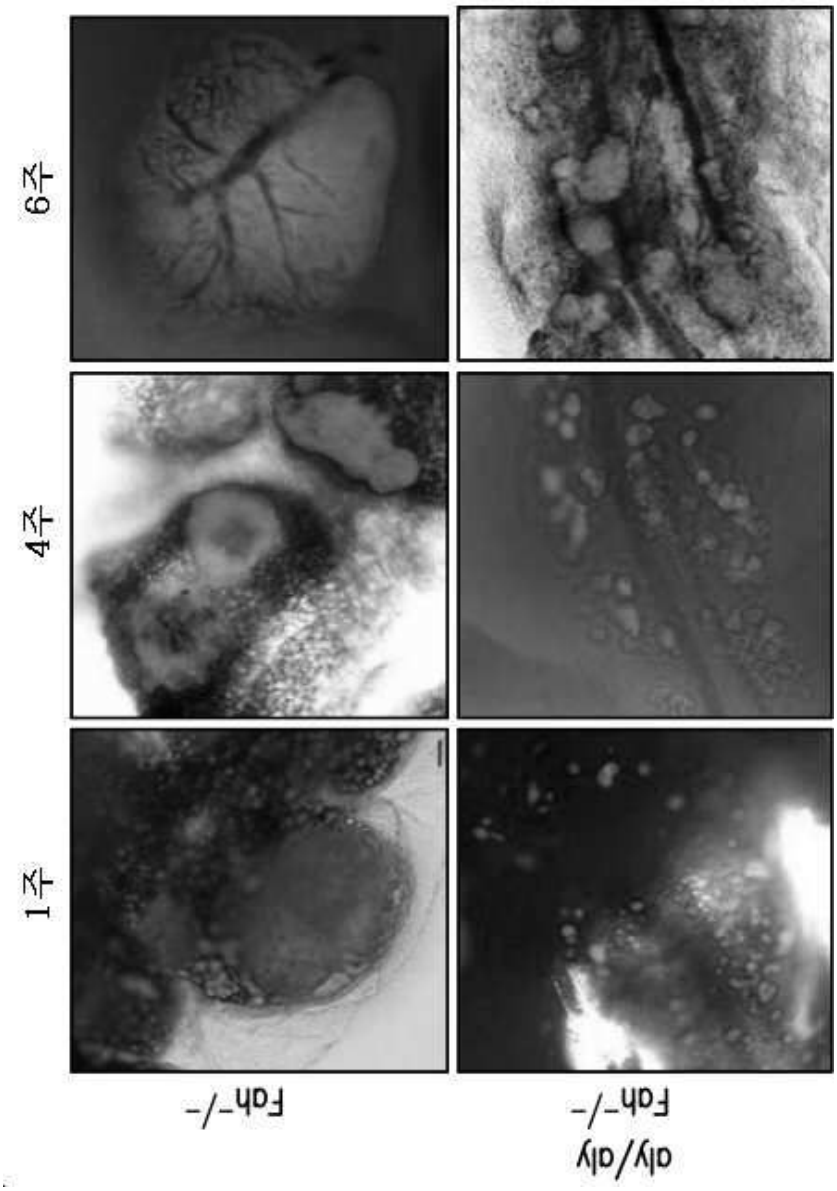
도면13


NIK 신호 경로
LTα-/-
LTβR-/-
aly/aly
LTα1β1
LTβR
NIK
IKK
α
α
p100
RelB
RelB
p52
유전자 발현
간세포?
기질 세포?
기질 세포
림프 조직 유발물질
상호작용 (LTi)
LTi
LN 원기 형성
혈관
LTo
LTβR
LN 원기
LTα1β2
LTi
생육
혈관

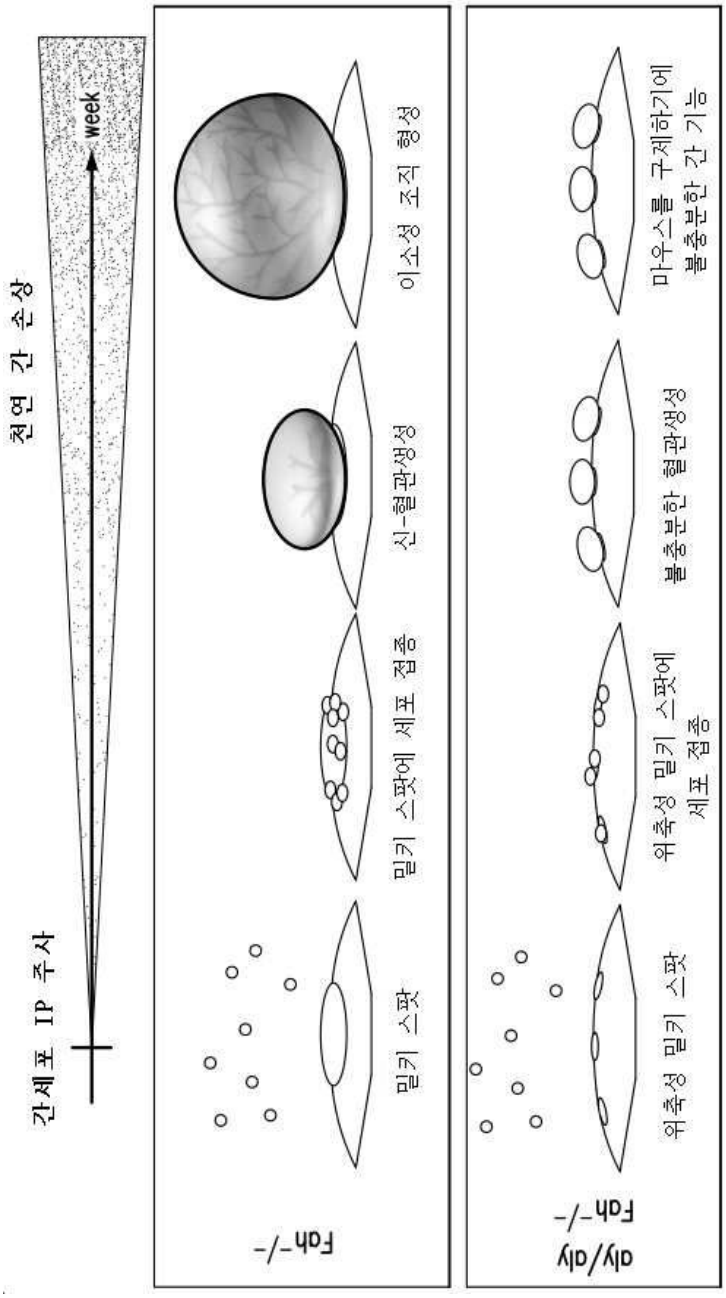
도면14


IP 주입에 의한 Fah-/- 마우스 구제를 위해
NIK 기능이 필요함
림프조직무형성 마우스
제2 림프 기관의
구조 결함
Aly/Aly: 림포톡신 베타 수용체
(LT-βR)의 신호전이에
참여하는 핵 인자-κB
유도성 키나제에의 결함
aly/aly
Fah-/- 마우스
대조군
Fah-/- 마우스
간 세포 주입
SP 주사
IP 주사
생존율 (%)
Fah-/- (n=5)
aly/aly Fah-/- (n=5)
주사 후 경과 일수
Fah-/- (n=12)
aly/aly Fah-/- (n=28)
주사 후 경과 일수
본 결과는 밀키 스팟 및 FALC에서 간세포 생착 및 증식에
서로 다른 기전을 암시한다

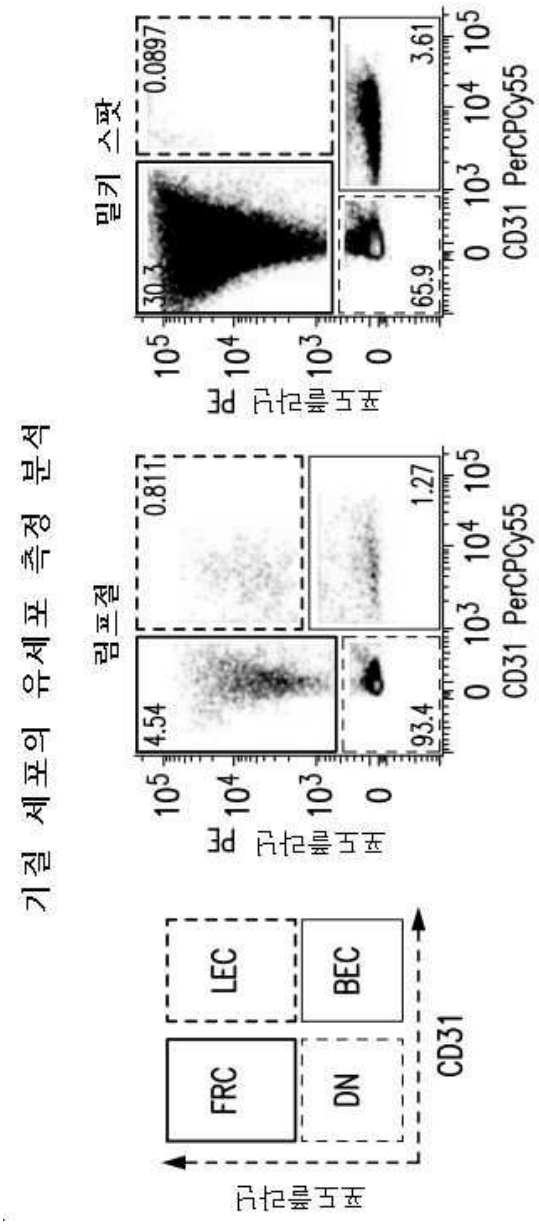
도면15



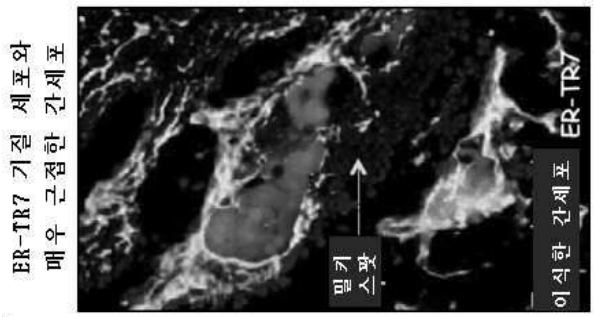
도면16


간세포 IP 주사
week
천연 간 손상
Fah-/-
밀키 스팟
밀키 스팟에 세포 접종
신-혈관생성
이소성 조직 형성
Fah-/-
Aly/Aly
위축성 밀키 스팟
위축성 밀키 스팟에
세포 접종
불충분한 혈관생성
마우스를 구제하기에
불충분한 간 기능

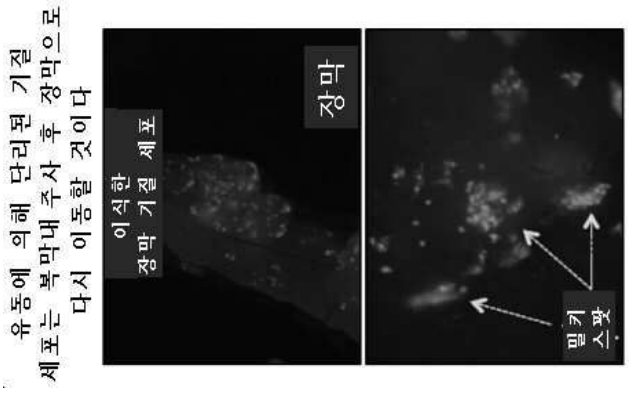
도면17a


기질 세포의 유세포 측정 분석
림프절
밀키 스팟
FRC
DN
LEC
BEC
CD31
podoplanin
CD31 PerCPCy55
4.54
0.811
93.4
1.27
30.3
0.0897
65.9
3.61

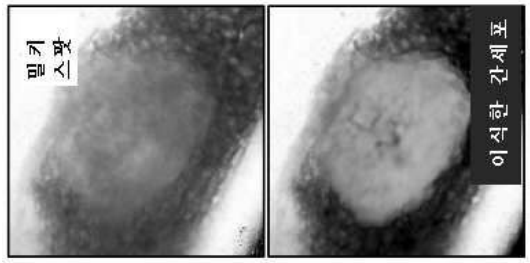
도면17b


ER-TR7 기질 세포와
매우 근접한 간세포
밀키
스팟
이식한 간세포
ER-TR7

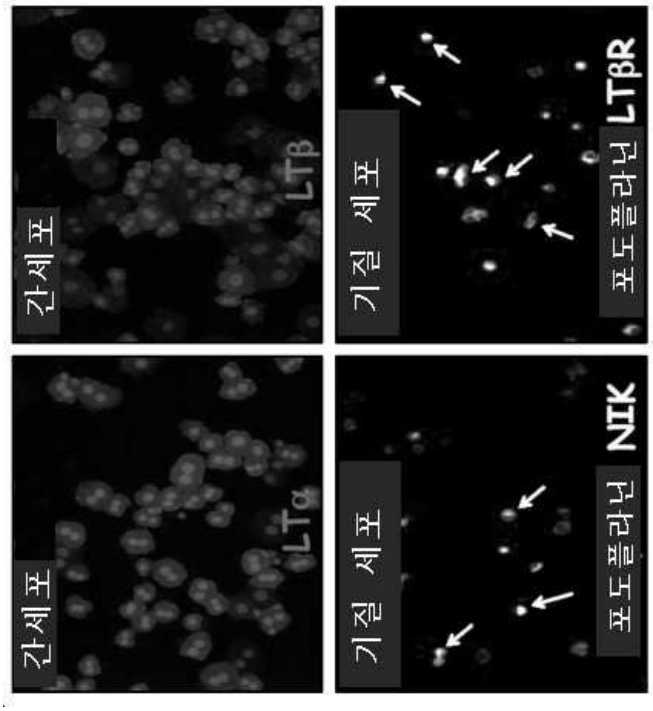
도면17c



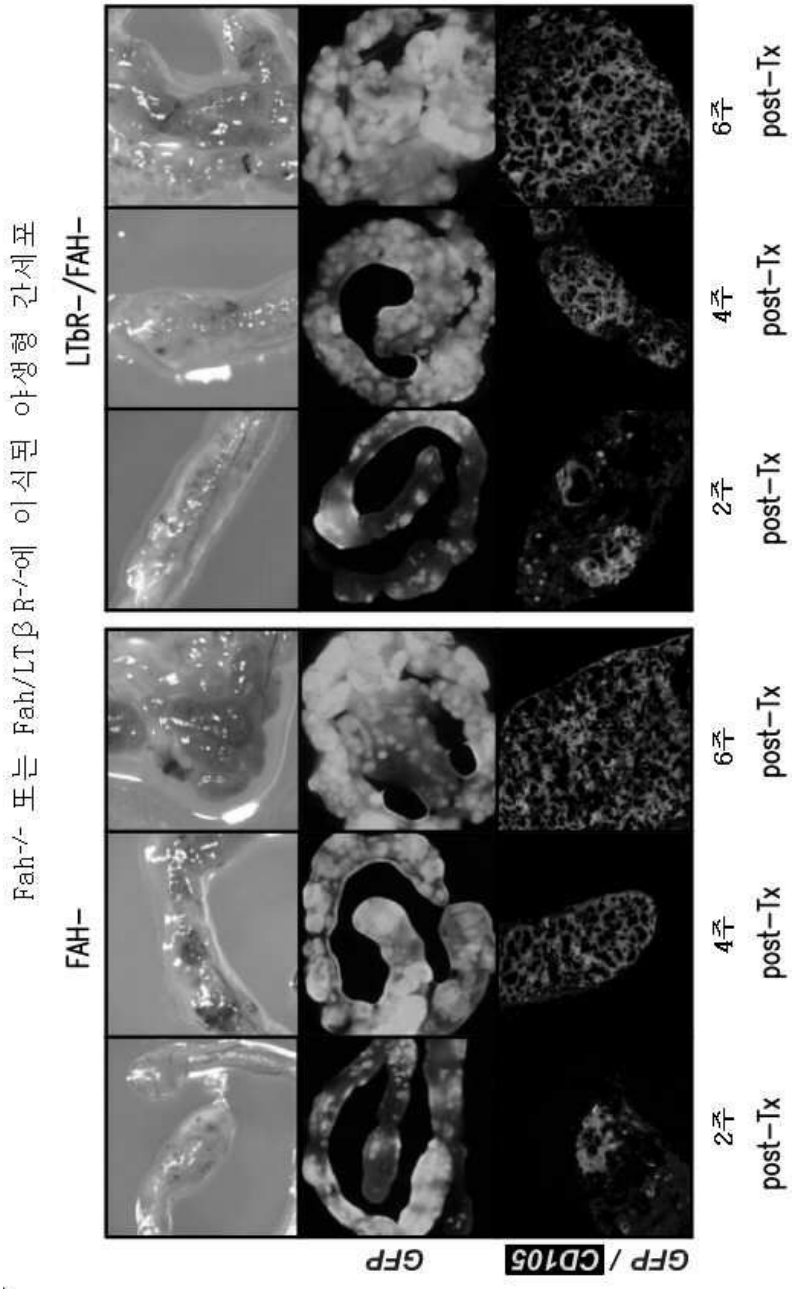
도면17d



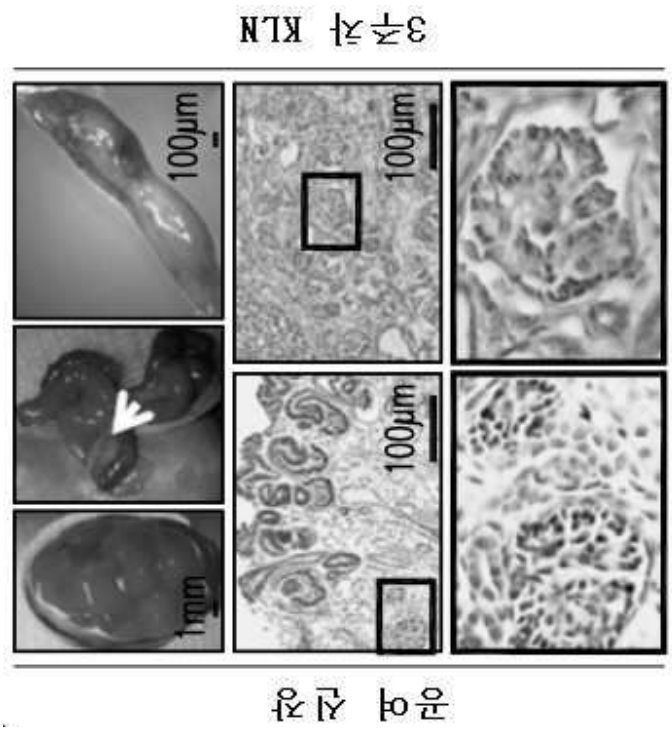
도면18



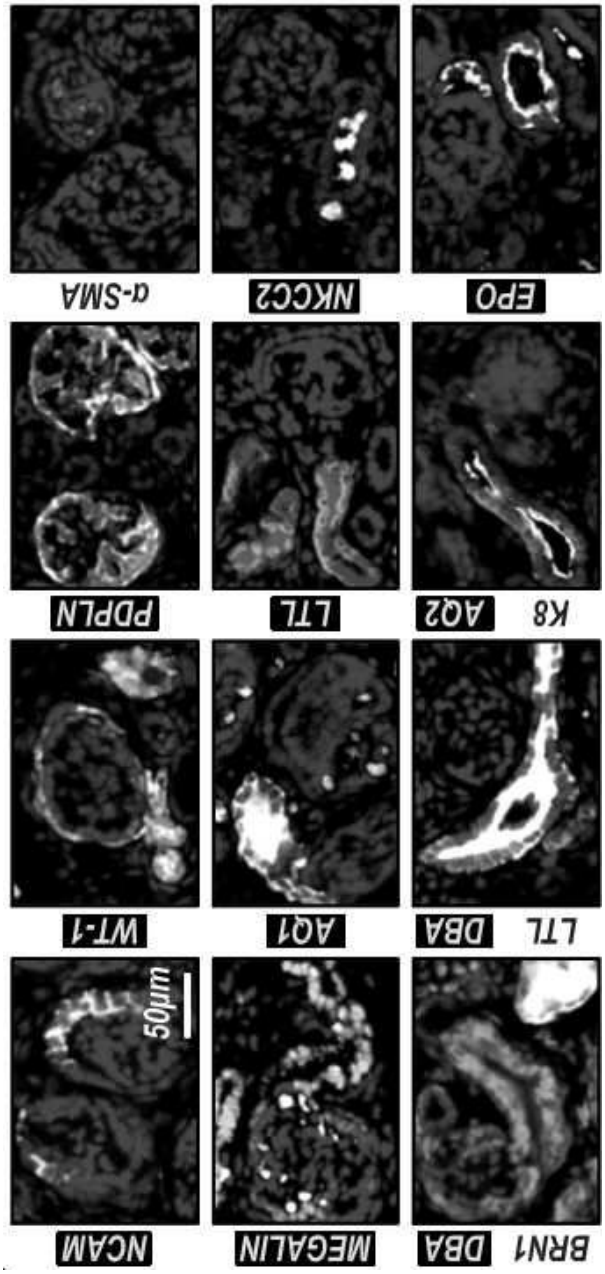
도면19


Fah-/- 또는 Fah/LTβR-/-에 이식된 야생형 간세포
FAH−
LTbR−/FAH−
GFP / CD105
GFP
2주 post-Tx
4주 post-Tx
6주 post-Tx
2주 post-Tx
4주 post-Tx
6주 post-Tx

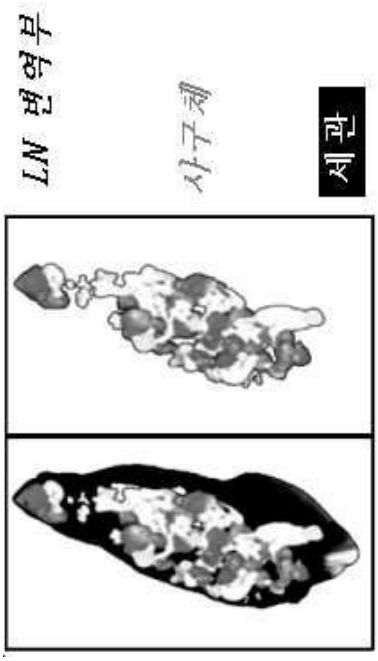
도면20a



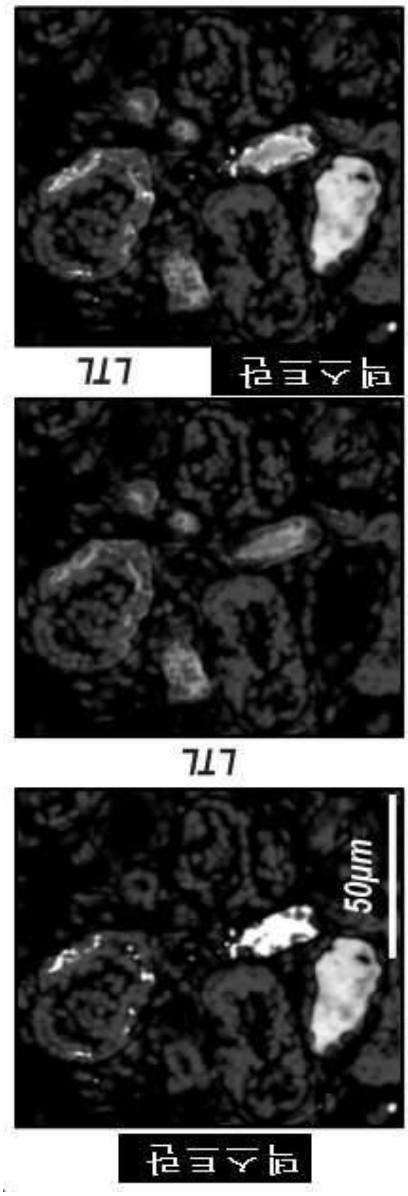
도면20b


α-SMA
NKCC2
EPO
PDPLN
LTL
AQ2
K8
WT-1
AQ1
DBA
LTL
50μm
NCAM
MEGALIN
DBA
BRN1

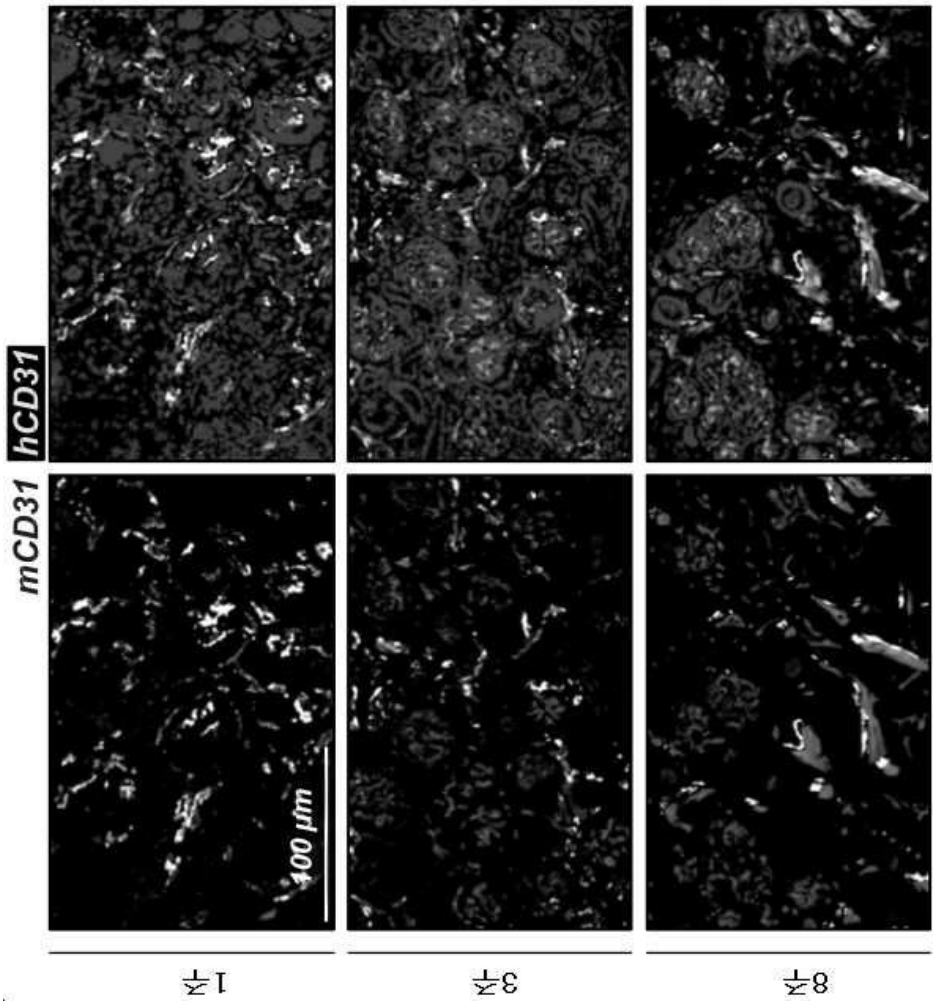
도면20c



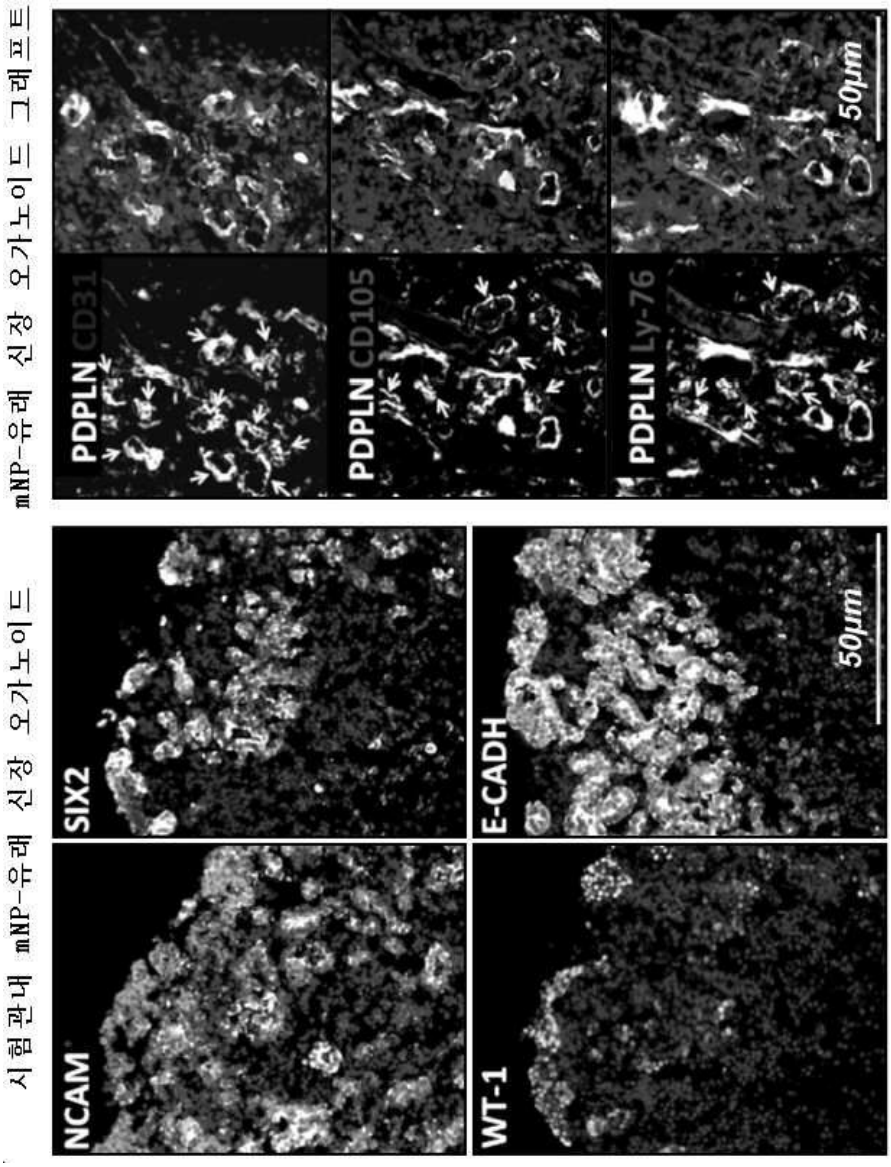
도면20d



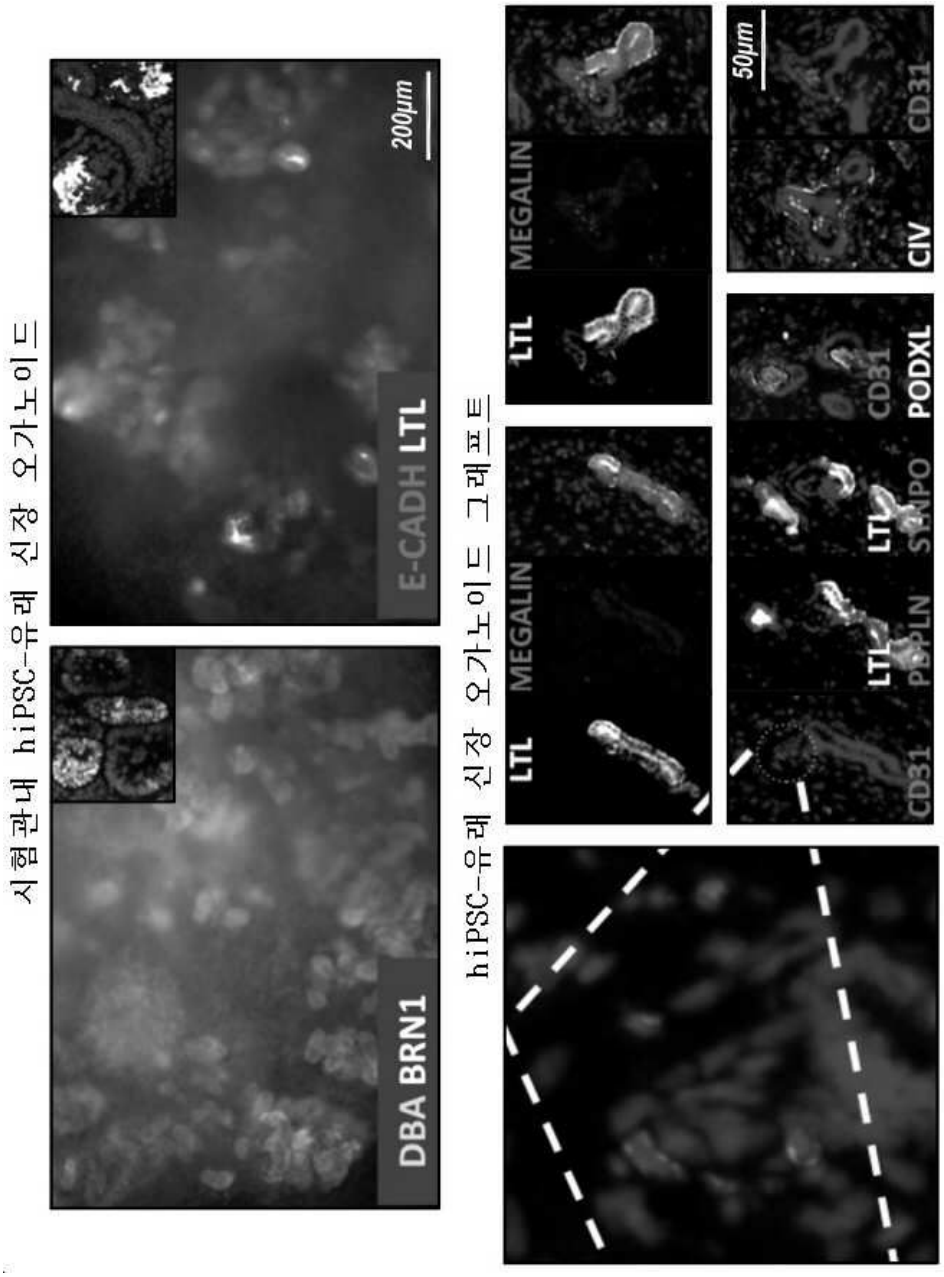
도면20e



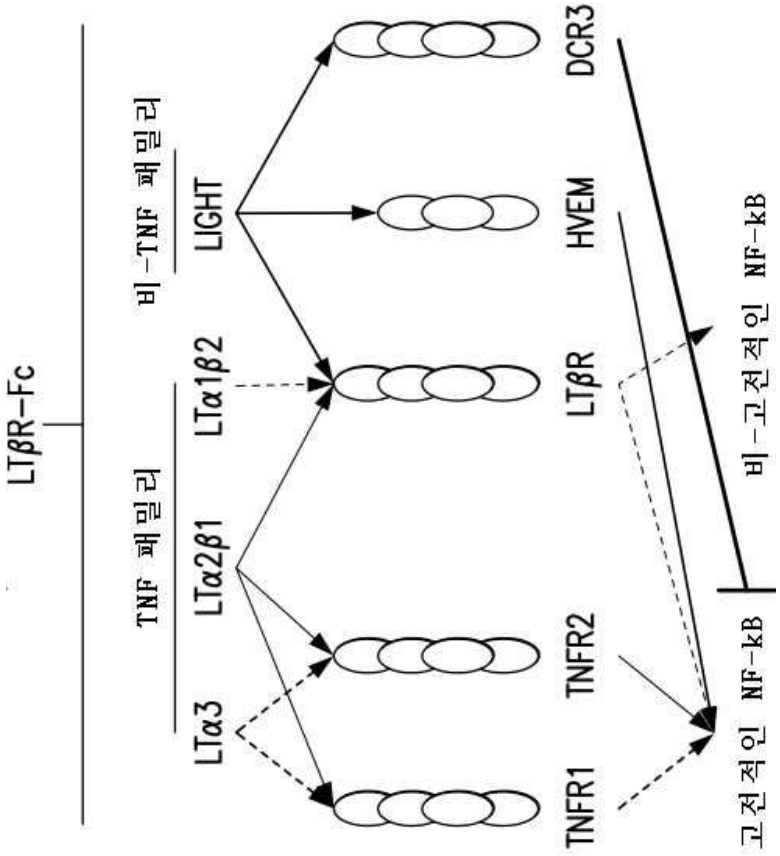
도면20f


시험관내 mNP-유래 신장 오가노이드
mNP-유래 신장 오가노이드 그래프트
NCAM
SIX2
WT-1
E-CADH
PDPLN CD31
PDPLN CD105
PDPLN Ly-76
50μm
50μm

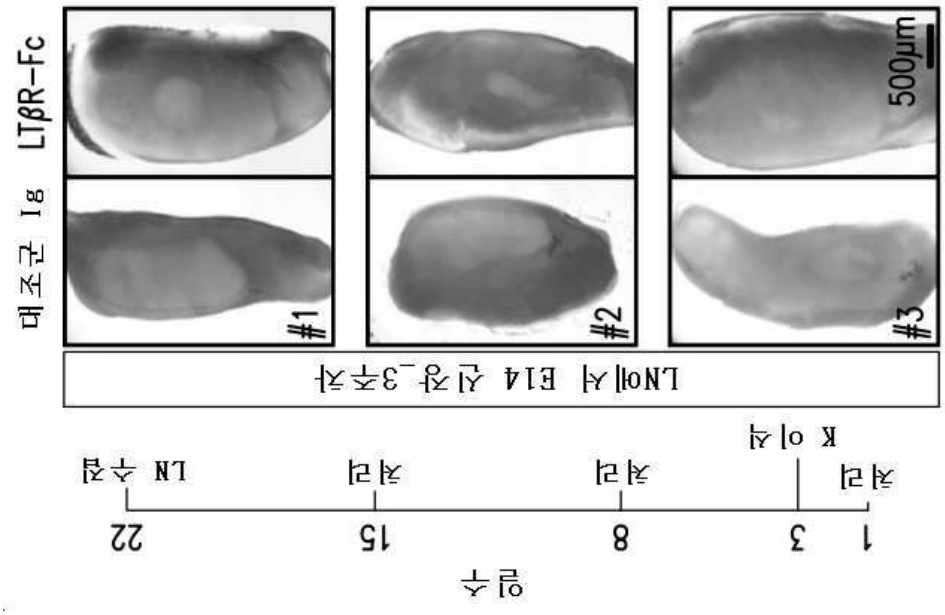
도면20g


시험관내 hiPSC-유래 신장 오가노이드
DBA BRN1
E-CADH LTL
200μm
hiPSC-유래 신장 오가노이드 그래프트
LTL
MEGALIN
CD31
PODXL
SYNPO
CIV
50μm

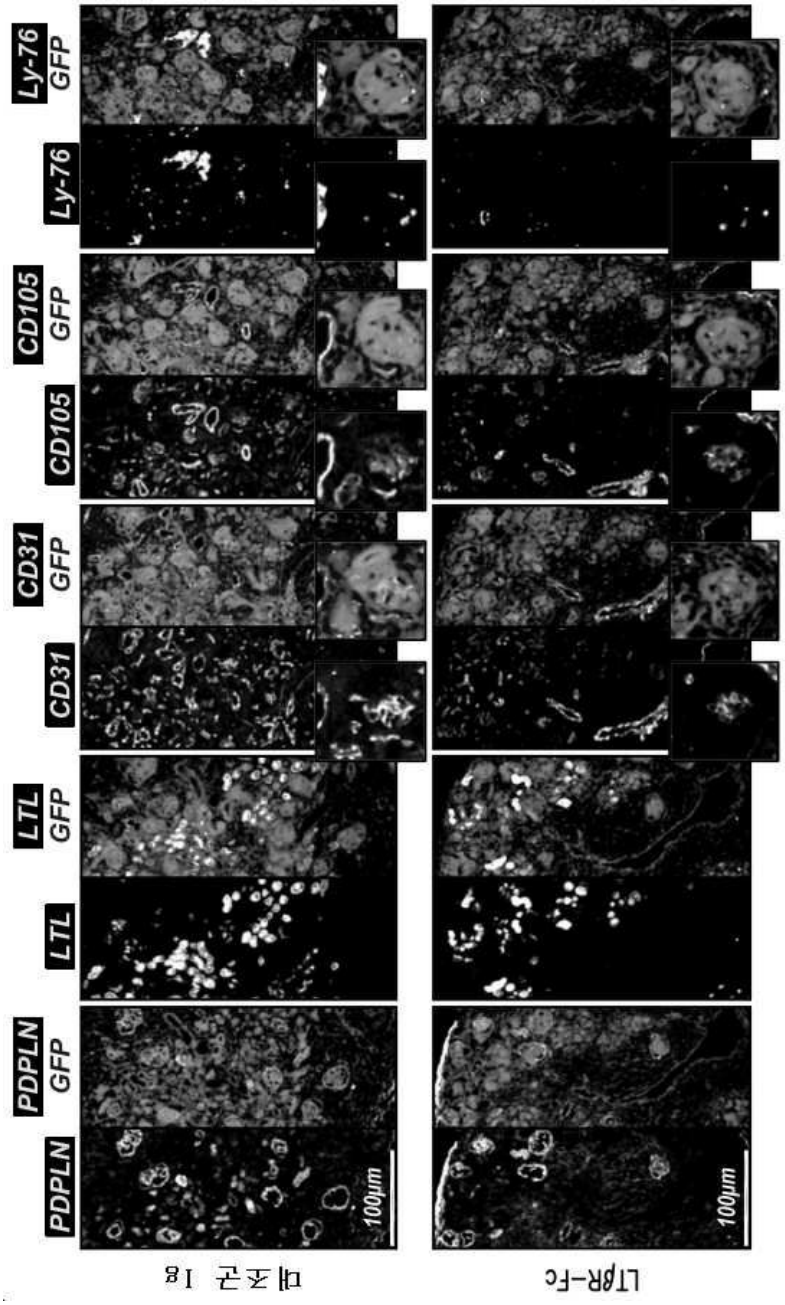
도면21


LTβR-Fc
TNF 패밀리
LTα3
LTα2β1
LTα1β2
비-TNF 패밀리
LIGHT
TNFR1
TNFR2
LTβR
HVEM
DCR3
고전적인 NF-kB
비-고전적인 NF-kB

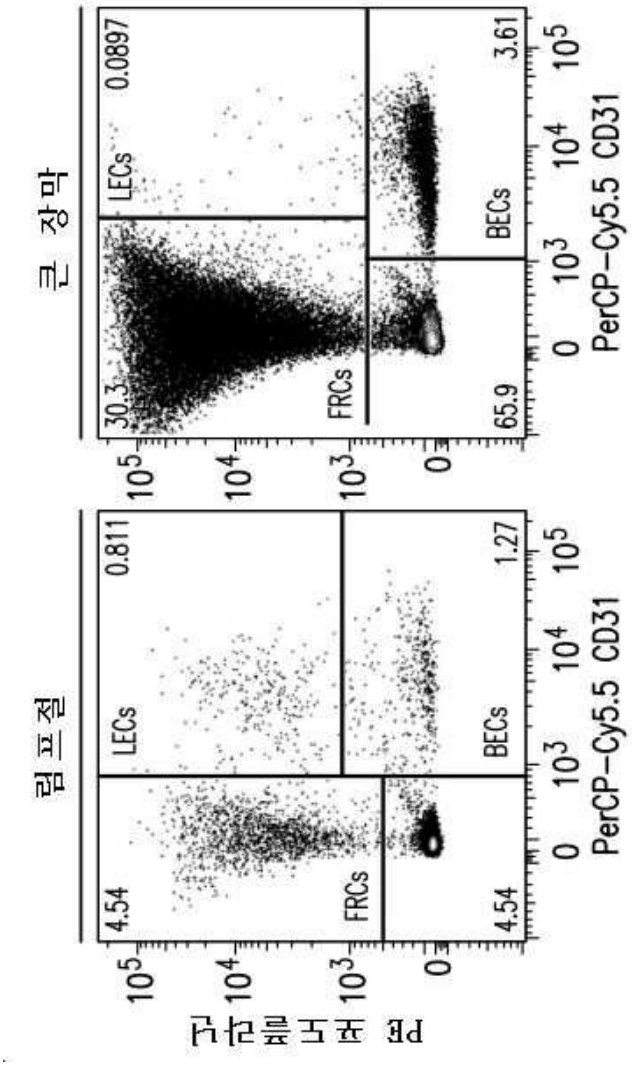
도면22a


대조군 Ig
LTβR-Fc
#1
#2
#3
500μm
LN에서 E14 신장_3주차
일수
1
3
8
15
22
처리
처리
처리
LN 수집
K 이식

도면22b

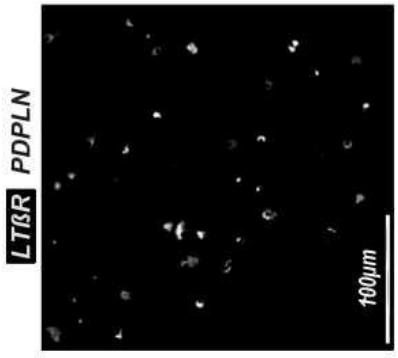

PDPLN
PDPLN GFP
LTL
LTL GFP
CD31
CD31 GFP
CD105
CD105 GFP
Ly-76
Ly-76 GFP
100μm
대조군 1g
LTβR-Fc

도면22c



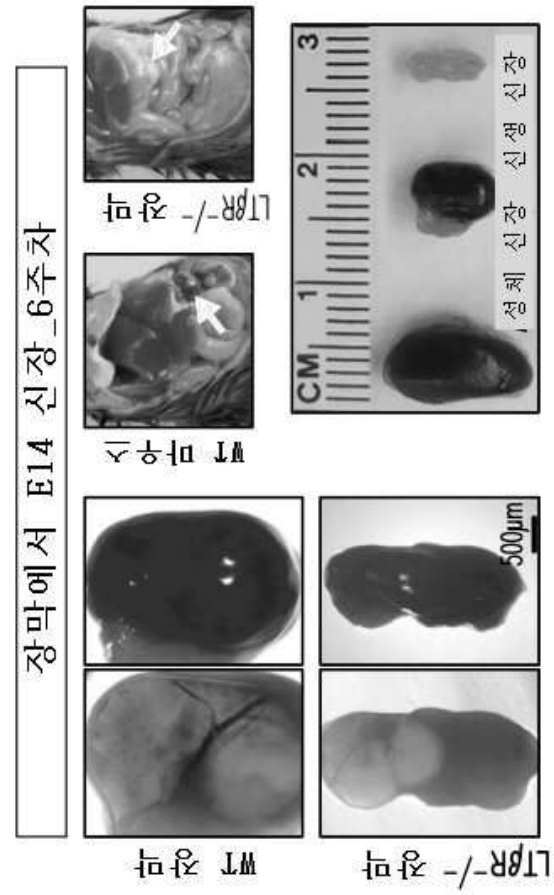
림프절
큰 장막
PE 포도플라닌
PerCP-Cy5.5 CD31
FRCs
LECs
BECs
4.54
0.811
1.27
30.3
0.0897
65.9
3.61

도면22d

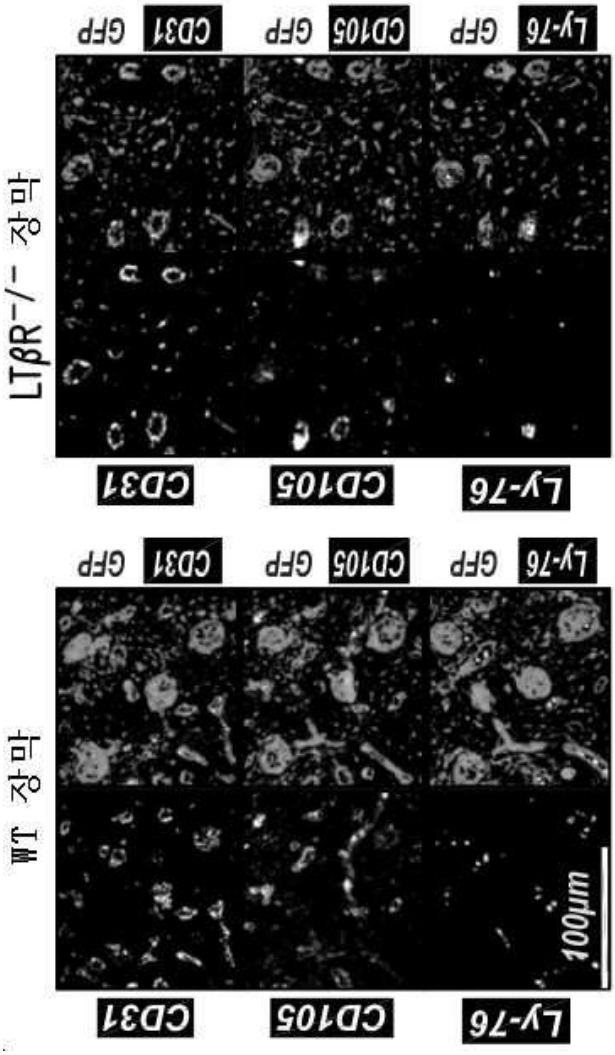


LTßR PDPLN
100μm

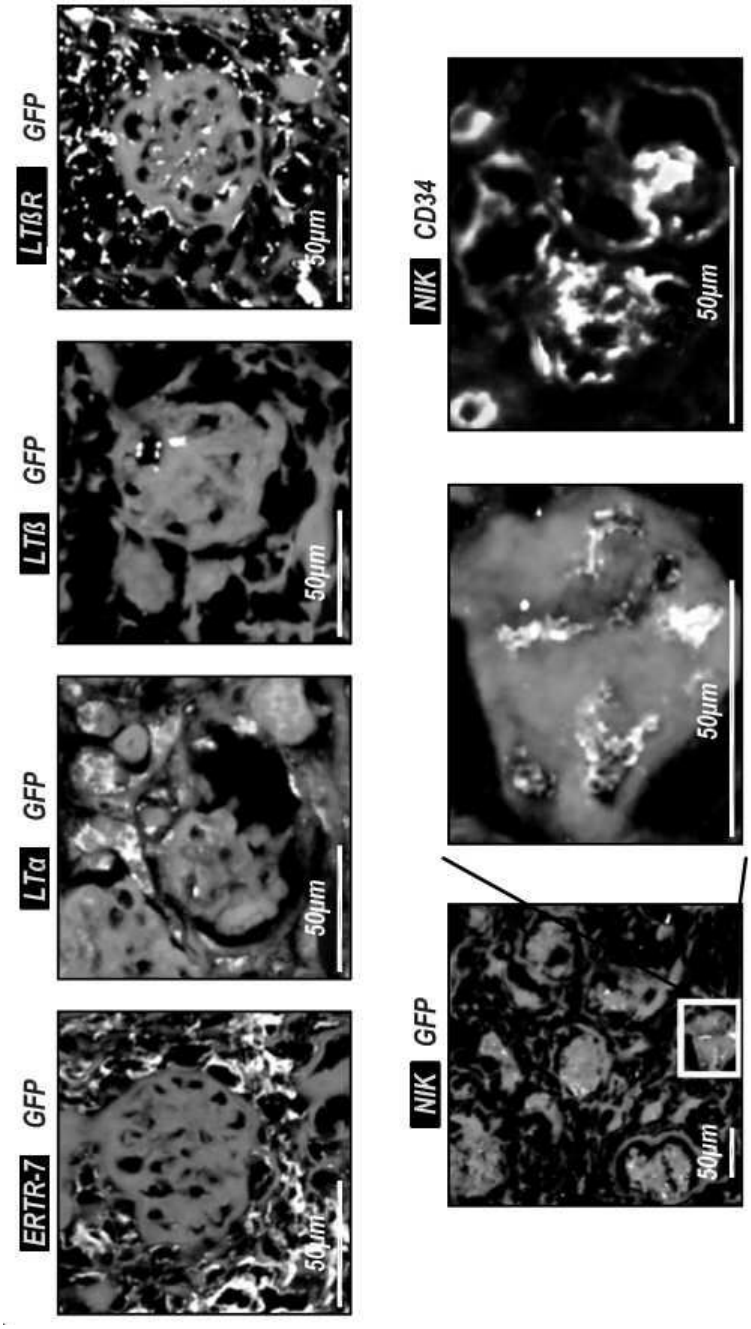
도면22e


장막에서 E14 신장_6주차
WT 장막
LTβR-/- 장막
WT 마우스
LTβR-/- 장막
CM
1
2
3
성체 신장
신생 신장
500μm

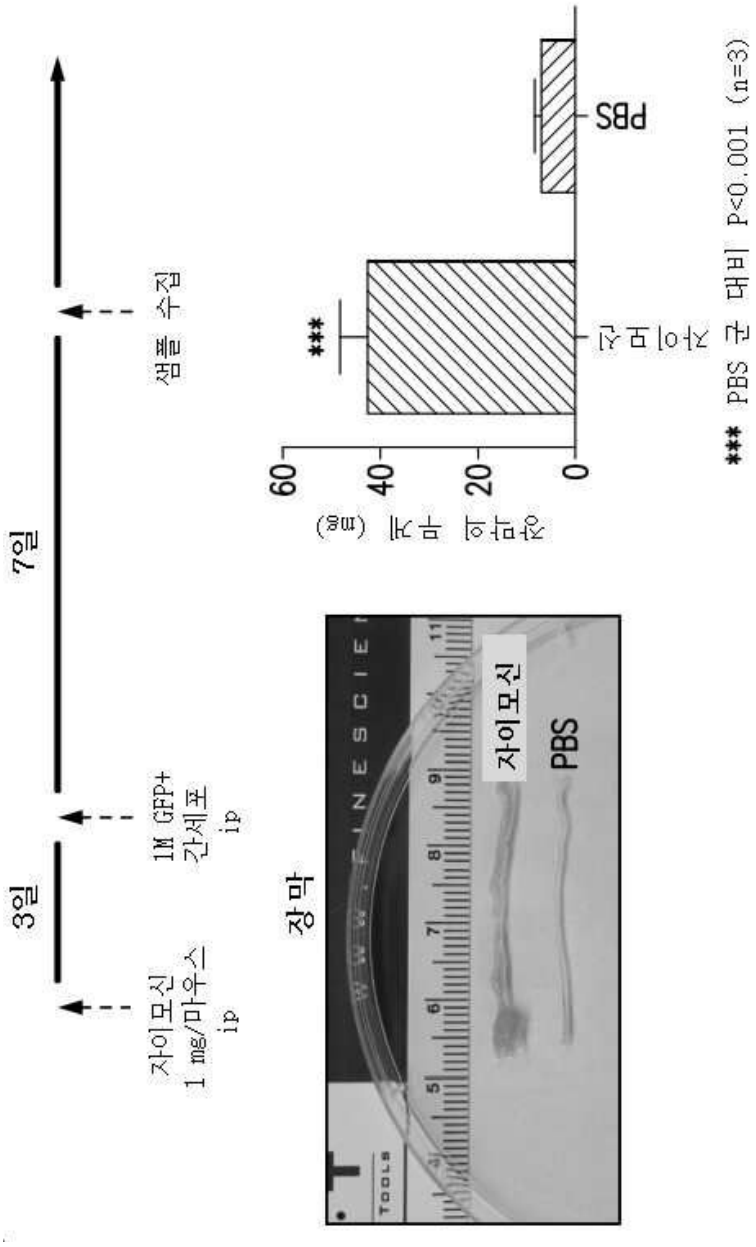
도면22f



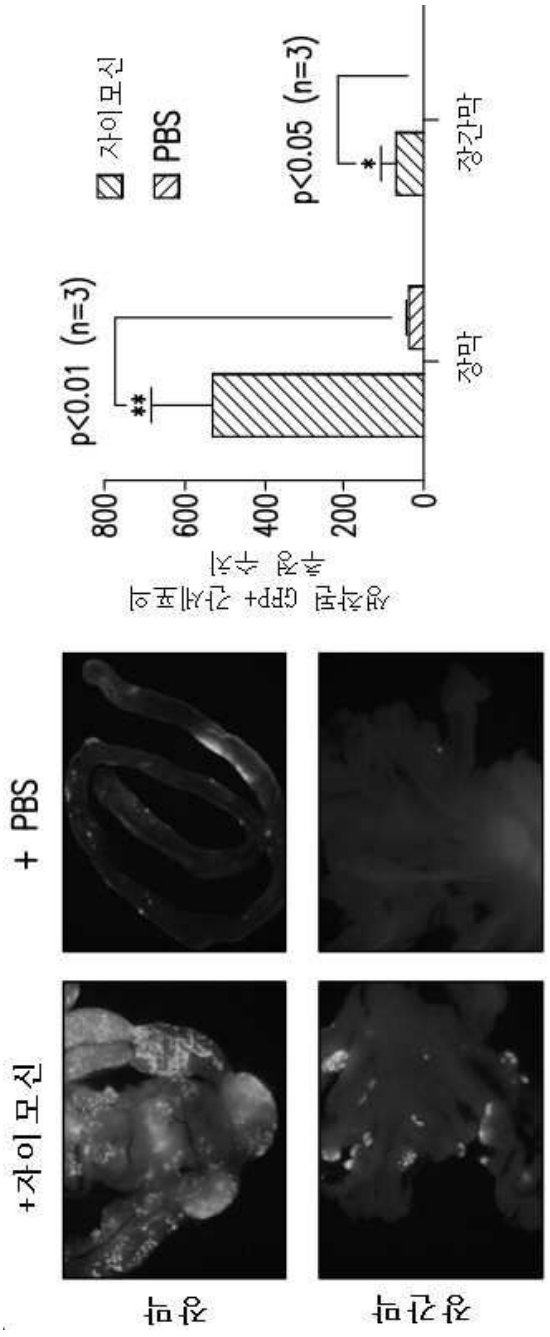
도면22g



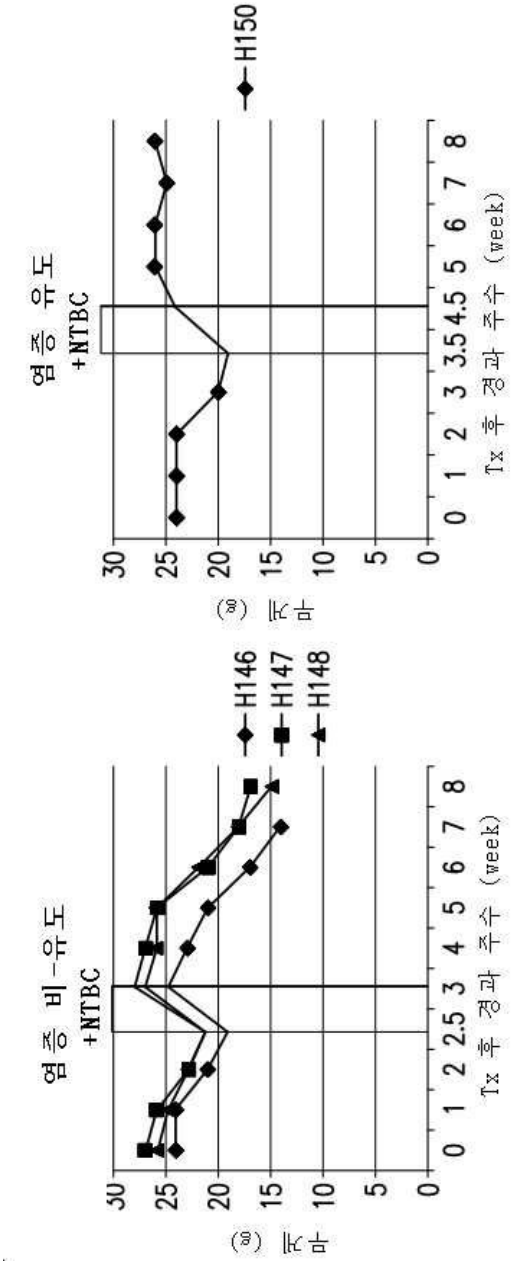
도면23


3일
7일
자이모신
1 mg/마우스
ip
1M GFP+
간세포
ip
샘플 수집
장막
자이모신
PBS
장막의 무게 (mg)
60
40
20
0
***
자이모신
PBS
*** PBS 군 대비 P<0.001 (n=3)

도면24



도면25


염증 유도
+NTBC
H150
부피 (㎣)
Tx 후 경과 주수 (week)
염증 비-유도
+NTBC
H146
H147
H148
부피 (㎣)
Tx 후 경과 주수 (week)

도면26

