



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0049000
 (43) 공개일자 2018년05월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12M 3/00* (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0671 (2013.01)
C12M 21/08 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7009401
- (22) 출원일자(국제) 2017년08월17일
 심사청구일자 2018년04월18일
- (85) 번역문제출일자 2018년04월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/070881
- (87) 국제공개번호 WO 2018/036910
 국제공개일자 2018년03월01일
- (30) 우선권주장
 16185725.5 2016년08월25일
 유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
 필립모리스 프로덕츠 에스.에이.
 스위스, 씨에이취-2000, 네우차텔, 쿠아이 얀레나
 우드 3
- (72) 발명자
 보바르드, 다비드
 스위스, 3235 에를라흐, 랭지 래벤 5
 뤼티히, 칼스타
 스위스, 2068 오뜨리브, 베르제 클로튜 5
- (74) 대리인
 김윤배, 이상복, 김호석

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양

(57) 요 약

분리된 3차원 간 구상체가 설명되며, 상기 구상체는: 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 동일하거나 증가된 활성; 및 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 알부민 분비를 가진다.

(52) CPC특허분류

C12M 23/16 (2013.01)

G01N 33/5044 (2013.01)

G01N 33/5067 (2013.01)

C12N 2502/27 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

분리된 3차원 간 구상체로서, 상기 구상체는:

구상체가 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량;

완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 동일한 또는 증가된 활성; 및

월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 일부민 분비를 가지는, 분리된 3차원 간 구상체.

청구항 2

공정에 의해 얻어지거나 얻어질 수 있는 3차원 다중-기관 배양 시스템에 사용하기 위한 분리된 3차원 간 구상체로서:

상기 공정은 3차원 간 구상체를 얻는 데 충분한 기간 동안 세포 배양 배지에서 3차원 간 구상체를 배양하는 단계를 포함하며, 상기 세포 배양 배지는: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되며, 상기 3차원 간 구상체에서:

ATP 함량은 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가되며;

시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성은 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 동일하거나 증가되며;

알부민 분비는 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가되는, 분리된 3차원 간 구상체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 구상체가 인간 간 전구 세포주이거나 이로부터 유래되며, 적합하게, 상기 구상체가 HepaRG 세포이거나 이로부터 유래되는, 분리된 3차원 간 구상체.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 구상체가 세포 배양 배지에서 배양되며, 상기 세포 배양 배지가: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는, 분리된 3차원 간 구상체.

청구항 5

제1 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 포함하는 공동 배양물로서, 바람직하게,

상기 공동 배양물이 세포 배양 배지에서 유지되며, 상기 세포 배양 배지가: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는, 공동 배양물.

청구항 6

3차원 기관 배양 시스템으로서, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 분리된 3차원 간 구상체; 또는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 분리된 3차원 간 구상체를 포함하는 3차원 다중-기관 배양 시스템을

포함하며, 적어도 하나의 다른 3차원 세포 유형 또는 제5항에 따른 공동 배양물을 더 포함하며, 바람직하게,

3차원 간 구상체가 배양 시스템에 함유된 배양 배지 내에 침지되며/침지되거나;

3차원 폐 상피 세포를 더 포함하며, 적합하게, 상기 3차원 폐 상피 세포가 3차원 다중-기관 배양 시스템의 공기 액체 계면에 있는, 3차원 기관 배양 시스템.

청구항 7

3차원 다중-기관 배양 시스템으로서:

(a) 배양 배지에서 제1 3차원 세포 유형을 침지시키도록 적응되는 제1 기관 공동을 포함하는 제1 기관 성장 구간;

(b) 공기 액체 계면에서 제2 3차원 세포 유형을 배양하도록 적응되는 제2 기관 공동을 포함하고, 이때 제2 3차원 세포 유형은 제1 3차원 세포 유형과 상이한 제2 기관 성장 구간; 및

(c) 제1 기관 공동과 제2 기관 공동을 연결하여 그 사이에서 배양 배지의 유동을 허용하는 배양 배지 저장소를 포함하며; 바람직하게,

제1 기관 공동 및 제2 기관 공동은 동일한 배양 배지를 함유하며/함유하거나;

제5항에 따른 공동 배양물을 더 포함하며/포함하거나;

상기 시스템은 소형화되며/소형화되거나;

상기 시스템은 미세유체공학 장치를 포함하거나 미세유체공학 장치이며, 바람직하게 상기 시스템은 인공 생체칩인, 3차원 다중-기관 배양 시스템.

청구항 8

세포 배양 배지로서: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지와 완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지와 완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물을 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되며; 바람직하게,

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 3차원 간 구상체 또는 제5항에 따른 공동 배양물을 더 포함하는, 세포 배양 배지.

청구항 9

배양 배지를 포함하는 3차원 다중-기관 배양 시스템으로서, 상기 배양 배지는: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지 중 어느 하나 또는 이의 두 개 이상의 조합을 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 배양 배지로 구성되는 그룹으로부터 선택되는, 3차원 다중-기관 배양 시스템.

청구항 10

3차원 기관 배양 시스템에 사용하기 위한 3차원 간 구상체를 준비하는 방법으로서:

(i) 3차원 간 구상체를 제공하는 단계;

(ii) (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 배양 배지와 3차원 간 구상체를 접촉시키는 단계;

(iii) 및 3차원 기관 배양 시스템에 사용하기 위한 3차원 간 구상체를 얻는 단계를 포함하는, 3차원 기관 배양 시스템에 사용하기 위한 3차원 간 구상체를 준비하는 방법.

청구항 11

3차원 다중-기관 배양 시스템에 사용하기 위한 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 포함하거나 이들로 구

성되거나 필수적으로 구성되는 공동 배양물을 준비하는 방법으로서:

- (i) 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 제공하는 단계;
- (ii) (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 배양 배지와 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 접촉시키는 단계; 및
- (iii) 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포의 공동 배양물을 얻는 단계를 포함하는, 공동 배양물을 준비하는 방법.

청구항 12

제제에 대한 3차원 간 구상체의 반응을 평가하기 위한 시험관내 방법으로서:

- (i) 적어도 하나의 제제와 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 3차원 간 구상체 또는 제5항에 따른 공동 배양물 또는 제6항에 따른 3차원 기관 배양 시스템, 또는 제7항 또는 제9항에 따른 3차원 다중-기관 배양 시스템을 접촉시키는 단계; 및
 - (ii) 적어도 하나의 제제와 접촉한 후 3차원 간 구상체 또는 공동 배양물 또는 3차원 기관 배양 시스템 또는 3차원 다중-기관 배양 시스템의 하나 이상의 반응을 측정하는 단계를 포함하며;
- 적어도 하나의 제제와의 접촉 전후의 적어도 하나의 반응의 차이는 제제가 세포의 반응을 조절하는 표시인, 제에 대한 3차원 간 구상체의 반응을 평가하기 위한 시험관내 방법.

청구항 13

제제에 대한 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포의 반응을 평가하는 시험관내 방법으로서:

- (i) 적어도 하나의 제제와 제5항에 따른 공동 배양물 또는 제6항에 따른 3차원 기관 배양 시스템 또는 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 3차원 다중-기관 배양 시스템을 접촉시키는 단계; 및
 - (ii) 적어도 하나의 제제와의 접촉 후 공동 배양물 또는 3차원 기관 배양 시스템 또는 3차원 다중-기관 배양 시스템의 하나 이상의 반응을 측정하는 단계를 포함하며;
- 적어도 하나의 제제와의 접촉 전후의 하나 이상의 반응의 차이는 제제가 세포의 반응을 조절하는 표시이며; 바람직하게,

상기 단계 (ii)는 3차원 폐 상피 세포 내로 적어도 하나의 제제 침투를 측정하는 것을 포함하며/포함하거나;

상기 방법은: (iii) 3차원 간 구상체에서 적어도 하나의 제제의 생체-활성화를 측정하는 단계를 더 포함하며; 상기 단계 (ii) 및 (iii)에서의 측정은 동시에 수행되거나 단계 (iii)에서의 측정은 단계 (ii)에서의 측정 후에 수행되며/수행되거나;

상기 제제는 에어로졸이며, 적합하게 상기 에어로졸은 연기, 적합하게 담배 연기이거나 그로부터 유래하는, 제에 대한 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포의 반응을 평가하는 시험관내 방법.

청구항 14

세포 배양 배지의 용도로서: 3차원 간 구상체 또는 3차원 폐 상피 세포를 배양하거나 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 공동 배양하기 위한, (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는, 세포 배양 배지의 용도.

청구항 15

독성 시험을 위한 또는 약물 발견을 위한, 또는 폐 세포 내로의 약물 침투를 결정하기 위한 및/또는 적합하게 제제가 에어로졸인, 간세포에서 제제의 생체-활성화를 결정하기 위한 제6항에 따른 3차원 기관 배양 시스템 또는 제7항 또는 제9항에 따른 3차원 다중-기관 배양 시스템의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 배양 분야, 특히 3차원 세포의 배양, 3차원 공동-배양과 방법 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 2차원 세포 배양 시스템을 사용한 독성학 연구는 세포 생존 및 효소 활성 등에 관한 약물의 영향을 조사하는 데 사용되었다. 플라스틱 표면의 편평한 층에서 세포를 성장시킬 수 있는 것이 간단하고 세포 생리학과 자극에 대한 반응의 여러 측면에 대한 연구를 허용하지만, 이들은 기관의 실제 구조와 아키텍처는 반영하지 않는다. 2차원 단층에서, 분화, 증식 및 세포 기능에 필수적인 세포외 기질, 세포-대-세포 및 세포-대-기질 상호작용이 손실된다.

[0003] 3차원 배양 시스템은 생체내 관찰된 것과 유사한 특징을 가진 기능 조직을 형성할 수 있다. 2차원 배양 시스템과 비교할 때, 3차원 세포 배양은 세포가 모든 3차원에서 그들의 주변 환경과 상호작용하게 하고, 보다 생리학적으로 관련된다. 이와 같은 세포는 생존 능력, 증식, 분화, 형태학, 자극에 대한 반응, 약물 대사, 유전자 발현 및 단백질 합성 등에서 개선을 나타낼 수 있다. 3차원 세포 배양은 특정 조직 유사 구조를 생성할 수 있고 전통적인 2차원 세포 단층보다 생리학적으로 관련되는 방식으로 실제 조직의 기능 및 반응을 모방할 수 있다.

[0004] 인간 기관을 모방하는 여러 3차원 조직이 상업적으로 이용 가능하다. 예를 들어, 폐 3차원 기관형 조직은 공기-액체 계면(ALI)에서 성장한 1차 인간 세포를 사용하여 준비될 수 있으며, 그 계면에서 이들 세포가 분화하여 기능 조직을 형성할 것이다. 이들 3차원 조직은 인간 기관지 조직과 형태 학적 유사성 및 대사 특성이 극히 밀접하다. 그들은 거짓중층(pseudostratified) 구조로 배열되는 기저 세포, 배상 세포 및 섬모 세포로 구성된다. 폐와 유사하게, 능동 박동 섬모가 존재하여, 그들의 기능과 활성에 대한 연구를 허용한다. 유사한 수준의 생체이물 효소-암호화 mRNA가 인간의 폐와 비교하여 이들 3차원 ALI 배양물에서 발견되었다. 또한, 이들 조직은 연장된 기간 동안 시험관내에서 유지될 수 있다. 폐 조직의 이와 같은 3차원 모델은 에어로졸과 약물 등의 영향을 탐구하고 또한 반복된 노출의 영향을 관찰하는 데 적절한 모델이다.

[0005] 3차원 간 구상체(spheroid) 모델을 포함하는 다른 3차원 모델이 또한 설명되어 있다. 간 구상체는 간 세포에 대한 약물 치료의 효과를 결정하기 위해 2차원 배양물에서 처음으로 사용되는 여러 세포 유형으로 구성될 수 있다. 그러나, 1차 인간 간세포는 인간 간 조직과 비교하여 유사한 1상 대사 유전자 발현을 가짐에도 불구하고, 대사 효소를 5일 초과 동안 발현하지 않는다. 다른 한계는 반복된 투약을 어렵게 하는 짧은 생존 능력이다. 이들 단점은 HepaRG 세포(ThermoFisher Scientific)와 같은 수명이 긴 대체 간 세포주(cell line)의 사용으로 극복될 수 있다. HepaRG 세포는 1차 인간 간세포의 많은 특성을 보유하고 있는 인간 간 전구 세포주이다. 그들은 1차 간세포와 비교하여 보다 큰 간 특이적 및 1상 대사 유전자 발현을 가진다. 또한, 그들의 수명이 크게 증가된다. 3차원 구상체에서 HepaRG 세포의 형성은 수명과 기초대사 능력을 증가시킨다.

[0006] 간-의존성 독성학 연구에 대한 관심은 생체이물 대사에 의해 여러 화합물을 대사 작용시키는 이와 같은 조직의 능력과 관련된다. 많은 화학적 화합물이 불활성화되고 용해되지만, 일부는 생체-활성화되고 따라서 독성을 가진다. 결과적으로, 간에서 일어나는 생체-활성화 공정을 고려하지 않고 기관 내 화합물의 독성을 연구하면 시험 물질의 과소평가된 독성 영향을 초래할 수 있다. 따라서, 에어로졸 노출의 분야에서, 폐에서의 물질 침투 및 간에서의 그 이상의 생체-활성화를 연구하기 위한 개선된 접근법에 대한 필요성이 존재한다. 본 발명은 당업계의 이와 같은 필요성을 해결하도록 시도하는 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 개시에서, 개별적인 폐 및 간 배양물은 형태학적으로 및 기능적으로 확립되고 특성화되었다. 두 세포 유형의 공동 배양을 촉진하기 위해, 세포 배양 조건 및 특히 세포 배지는 폐 및 간 배양 둘 모두가 생존 능력, 구조적 일체성 및 기능적 능력을 유지하도록 확인되었다. 유리하게, 이는 폐와 간 사이에서, 유의미하게 각각의 세포의 개별적인 특성의 손실없이 상호작용을 재현하는 다중 기관 시스템을 개발하는 것을 가능하게 한다. 폐상피 세포 배양 배지가 간 구상체를 성공적으로 성장시키고 유지하는 데 사용될 수 있고, 심지어 간 구상체의 특성을 상당히 개선시킬 수 있음을 본원에서 발견한 것은 완전히 예상하지 못했다. 이와 같은 다중 기관 시스템의 사용은 에어로졸과 같은 폐-흡수 화합물의 대사에 대한 간의 역할을 이해하는 데 크게 도움이 될 것이다. 본 개시는 임상학적 상황에 더 가깝고, 따라서 보다 예측적인 것으로 예상되는 3차원 세포 배양 시스템에서 화합물

의 영향을 연구하는 데 가치 있는 도구를 제공하며 독특하고 간단하고 저렴한 3차원 간 및 폐 세포 공동 배양 시스템을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 제1 양태에서, 분리된 3차원 간 구상체가 제공되며, 여기서 구상체는: 완전한 윌리엄스(William's) E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; 완전한 윌리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3 차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬(cytochrome) P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 동일하거나 증가된 활성; 및 윌리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 일부분 분비를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0009] **도 1.** 3차원 기관형 폐 조직(GEx : 유전자 발현)의 특성화를 위한 실험 설계 및 종점의 개략적 개요.

도 2. 간 구상체(GEx: 유전자 발현)의 특성화를 위한 실험 설계 및 종점의 개략적 개요.

도 3. 성숙 이후 1, 2, 3 및 4 주에 3차원 기관형 폐 배양물의 해마톡실린 & 에오신(Hematoxylin & eosin) 및 알시안 블루(Alcian blue) 염색. 상피의 대표적인 횡단면은 20x 배율로 도시된다.

도 4. 3차원 기관형 폐 배양물의 ATP 함량은 성숙 이후 1, 2, 3 및 4 주에 측정된다. 3 가지 독립적인 측정 결과가 도시된다. Rep: 복제; RLU: 상대적인 광 유닛

도 5. 3차원 기관형 폐 배양물의 선단 표면 액체로의 ATP 분비는 성숙 이후 1, 2, 3 및 4 주에 저장성 염류(hypotonic saline)에 의한 자극에 반응하여 측정된다. 6 가지 독립적인 측정 결과가 도시된다. Rep: 복제

도 6. 시토크롬 P450 1A1/B1 활성을 성숙 이후 1, 2, 3 및 4 주에 3차원 기관형 폐 배양물에서 측정된다. 결과는 기초 CYP 활성, TCDD 및 리팜피신으로 48 시간 처리 이후 유도된 활성, 및 α -나프토플라본에 의한 억제 이후의 유도된 활성을 도시한다. 결과는 3 가지 독립적인 실험의 평균 \pm SEM으로 제시된다. 점선은 시간 지점 당 평균값에 기초한 추세를 나타낸다.

도 7. 3차원 기관형 폐 배양물에서 1상 약물 대사 효소-암호화 유전자의 발현에 대한 폴드 조절이 1, 2, 3 및 4 주에서 평가된다. 유전자 발현은 48 시간 동안 TCDD와 리팜피신(rifampicin)으로 처리된 폐 배양물(n=3)과 미처리된 배양물(n=3) 사이에서 비교되며, 폴드 변경이 $\Delta \Delta CT$ 방법을 사용하여 계산된다. 히트맵은 폴드 변화와 함께 20 개의 가장 위쪽(적색, 원쪽) 및 가장 아래쪽으로 조절된 유전자(청색, 오른쪽)를 나열한다. 유전자 기호는 히트맵의 좌측에 표시된다.

도 8. 간 구상체는 성숙 이후 1, 2, 3 및 4 주에서 시토케라틴 19 발현 동안 염색된다. 10x 배율로 의사 컬러(pseudocolor)(적색의 CK19, 청색의 핵)의 대표 이미지가 도시된다.

도 9. 간 구상체 및 그들의 조건부 배지의 총 ATP 함량은 성숙 이후 1, 2, 3 및 4 주에 측정된다. 3 가지 독립적인 측정 결과가 도시된다. Rep: 복제

도 10. 간 구상체로부터 일부분 분비는 성숙 이후 1, 2, 3 및 4 주에 정량화된다 8 가지 독립적인 측정 결과가 도시된다. 점선은 시간 지점 당 평균값에 기초한 추세를 나타낸다. Rep: 복제; 간 구상체에 의한 알파-GST 제조는 성숙 이후 1, 2, 3 및 4 주에 평가된다. 8 가지 독립적인 측정 결과가 도시된다. Rep: 복제; 시토크롬 P450 1A1/B1 활성을 성숙 이후 1, 2, 3 및 4 주에 간 구상체에서 측정된다. 결과는 기초 CYP 활성, TCDD 및 리팜피신으로 48 시간 처리 이후 유도된 활성, 및 α -나프토플라본에 의한 억제 이후의 유도된 활성을 도시한다. 결과는 3 가지 독립적인 실험의 평균 \pm SEM으로 제시되며; 시토크롬 P450 1A2 활성을 성숙 이후 1, 2, 3 및 4 주에 간 구상체에서 측정된다. 결과는 기초 CYP 활성, TCDD 및 리팜피신으로 48 시간 유도 이후 유도된 활성, 및 폴루복사민 말레이트에 의한 억제 이후 유도된 활성을 도시한다. 결과는 3 가지 독립적인 실험의 평균 \pm SEM으로 제시된다.

도 11. 간 구상체 및 그들의 조건부 배지의 총 ATP 함량은 윌리엄스 E와 완전한 B-ALI 배지 또는 완전한 PneumaCult-ALI 배지(StemCell Technologies, 그린노블, 프랑스)의 혼합물에서 배양 이후에 측정된다. 결과는 5 가지 독립적인 측정에 대한 평균 \pm SEM으로서 제시되며; 세포 독성은 윌리엄스 E와 완전한 B-ALI 배지 또는 완전한 PneumaCult-ALI 배지의 혼합물에서 배양 이후 간 구상체에서 측정된다. 결과는 5 가지 독립적인 측정에 대한 평균 \pm SEM으로서 제시된다. RFU: 상대 형광 유닛

도 12. 세포사멸은 윌리엄스 E와 완전한 B-ALI 배지 또는 완전한 PneumaCult-ALI 배지 배지의 혼합물에서 배양

이후 간 구상체에서 측정된다. 결과는 5 가지 독립적인 측정에 대한 평균 ± SEM으로서 제시되며; CYP1A1/B1 활성은 월리엄스 E 및 완전한 B-ALI 배지 또는 완전한 PneumaCult-ALI 배지의 혼합물에서 배양 이후 간 구상체에서 측정된다. 결과는 3 가지 독립적인 측정에 대한 평균 ± SEM으로서 제시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 용어 "완전한 월리엄스 E 배지 단독"은 단지 완전한 월리엄스 E 배지만으로 구성되는 배양 배지, 즉 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지로 구성된 배양 배지를 의미한다.
- [0011] 다른 양태에서, 세포 배양 배지에서 3차원 간 구상체를 배양하는 단계를 포함하는 공정에 의해 얻어지거나 얻어질 수 있는 3차원 다중-기관 배양 시스템에 사용하기 위한 분리된 3차원 간 구상체가 제공되며, 여기서 세포 배양 배지: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되며, 상기 3차원 간 구상체에서: ATP 함량은 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가되며; 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성은 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 동일하거나 증가되며; 일부만 분비는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된다.
- [0012] 적합하게, 구상체는 인간 간 전구 세포주이거나 그로부터 유래되며, 적합하게, 상기 구상체는 HepaRG 세포이거나 그로부터 유래된다.
- [0013] 적합하게, 구상체는 세포 배양 배지에서 배양되며, 세포 배양 배지는: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는, 분리된 3차원 간 구상체.
- [0014] 다른 양태에서, 이전의 항들 중 어느 한 항에 따른 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 포함하는 공동 배양물이 제공된다.
- [0015] 적합하게, 공동 배양물은 세포 배양 배지에서 유지되며, 세포 배양 배지는: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는, 공동 배양물.
- [0016] 다른 양태에서, 본원에서 설명되는 분리된 3차원 간 구상체를 포함하는 3차원 기관 배양 시스템이 제공된다.
- [0017] 다른 양태에서, 본원에서 설명되는 바와 같은 분리된 3차원 간 구상체를 포함하고 본 발명에서 설명되는 적어도 하나의 다른 3차원 세포 유형을 포함하거나 공동 배양물을 더 포함하는 3차원 다중 기관 배양 시스템이 제공된다.
- [0018] 적합하게, 3차원 간 구상체는 배양 시스템에 함유된 배양 배지에 침지된다.
- [0019] 적합하게, 3차원 다중 기관 배양 시스템은 3차원 폐 상피 세포를 더 포함하며, 적합하게, 상기 3차원 폐 상피 세포는 3차원 다중 기관 배양 시스템의 공기 액체 계면에 있다.
- [0020] 다른 양태에서, 3차원 다중 기관 배양 시스템이 제공되며, 상기 시스템은: (a) 배양 배지에서 제1 3차원 세포 유형을 침지시키도록 적응되는 제1 기관 공동을 포함하는 제1 기관 성장 구간; (b) 공기 액체 계면에서 제2 3차원 세포 유형을 배양하도록 적응되는 제2 기관 공동을 포함하고, 이때 제2 3차원 세포 유형은 제1 3차원 세포 유형과 상이한 제2 기관 성장 구간; 및 (c) 제1 기관 공동과 제2 기관 공동을 연결하여 그 사이에서 배양 배지의 유동을 허용하는 배양 배지 저장소를 포함한다.
- [0021] 적합하게, 제1 기관 공동 및 제2 기관 공동은 동일한 배양 배지를 함유한다.
- [0022] 적합하게, 3차원 다중-기관 배양 시스템은 본원에서 설명되는 공동 배양물을 포함한다.
- [0023] 적합하게, 3차원 기관 배양 시스템 또는 3차원 다중-기관 배양 시스템은 소형화된다.
- [0024] 적합하게, 3차원 기관 배양 시스템 또는 3차원 다중-기관 배양 시스템은, 적합하게, 상기 시스템이 인공 생체칩 (organ-on-a-chip)인 미세유체공학 장치를 포함하거나 미세유체공학 장치이다.

- [0025] 다른 양태에서, 세포 배양 배지가 제공되며, 상기 세포 배양 배지는: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지와 완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지와 완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물을 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다.
- [0026] 적합하게, 세포 배양 배지는 본원에서 설명되는 3차원 간 구상체 또는 공동 배양물을 더 포함한다.
- [0027] 다른 양태에서, 배양 배지를 포함하는 3차원 다중 기관 배양 시스템이 제공되며, 상기 배양 배지는: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지 중 어느 하나 또는 이의 두 개 이상의 조합을 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 배양 배지로 구성되는 그룹으로부터 선택되는, 3차원 다중 기관 배양 시스템.
- [0028] 다른 양태에서, 3차원 기관 배양 시스템에 사용하기 위한 3차원 간 구상체를 준비하는 방법이 제공되며, 상기 방법은: (i) 3차원 간 구상체를 제공하는 단계; (ii) (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 배양 배지와 3차원 간 구상체를 접촉시키는 단계; 및 (iii) 3차원 기관 배양 시스템에 사용하기 위한 3차원 간 구상체를 얻는 단계를 포함한다.
- [0029] 다른 양태에서, 3차원 다중 기관 배양 시스템에 사용하기 위한 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 공동 배양물의 준비 방법이 제공되며, 상기 방법은: (i) 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 제공하는 단계; (ii) (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 배양 배지와 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 접촉시키는 단계; 및 (iii) 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 얻는 단계를 포함한다.
- [0030] 추가의 양태에서, 제제(agent)에 대한 3차원 간 구상체의 반응을 평가하기 위한 시험관내 방법이 제공되며, 상기 방법은: (i) 적어도 하나의 제제와 본원에 설명되는 바와 같은 3차원 간 구상체 또는 공동 배양물 또는 3차원 기관 배양 시스템, 또는 3차원 다중-기관 배양 시스템을 접촉시키는 단계; 및 (ii) 적어도 하나의 제제와 접촉한 후 3차원 간 구상체 또는 공동 배양물 또는 3차원 기관 배양 시스템 또는 3차원 다중-기관 배양 시스템의 하나 이상의 반응을 측정하는 단계를 포함하며; 여기서 적어도 하나의 제제와의 접촉 전후의 하나 이상의 반응의 차이는 제제가 세포의 반응을 조절하는 표시이다.
- [0031] 다른 양태에서, 제제에 대한 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포의 반응을 평가하는 시험관내 방법이 제공되며, 상기 방법은: (i) 공동 배양물 또는 3차원 기관 배양 시스템 또는 3차원 다중-기관 배양 시스템을 적어도 하나의 제제와 접촉시키는 단계; 및 (ii) 적어도 하나의 제제와의 접촉 후 공동 배양물 또는 3차원 기관 배양 시스템 또는 3차원 다중-기관 배양 시스템의 하나 이상의 반응을 측정하는 단계를 포함하며; 여기서 적어도 하나의 제제와의 접촉 전후의 하나 이상의 반응의 차이는 제제가 세포의 반응을 조절하는 표시이다.
- [0032] 적합하게, 단계 (ii)는 3차원 폐 상피 세포 내로 적어도 하나의 제제의 침투를 측정하는 것을 포함한다.
- [0033] 적합하게, 상기시험관내 방법은: (iii) 3차원 간 구상체에서 적어도 하나의 제제의 생체-활성화를 측정하는 단계를 더 포함하며; 여기서, 단계 (ii) 및 단계 (iii)에서의 측정은 동시에 수행되거나 상기 단계 (iii)에서의 측정은 단계 (ii)에서의 측정 후에 수행된다.
- [0034] 적합하게, 제제는 에어로졸이며, 보다 적합하게, 에어로졸은 연기, 적합하게 담배 연기이거나 그로부터 유래된다.
- [0035] 다른 양태에서, 세포 배양 배지의 용도가 제공되며, 상기 용도는: 3차원 간 구상체 또는 3차원 폐 상피 세포를 배양하거나 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 공동 배양하기 위한, (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는, 용도.
- [0036] 다른 양태에서, 독성 시험을 위한 또는 약물 발견을 위한 또는 폐 세포 내로 제제의 침투를 결정하기 위한 및/ 또는 적합하게 제제가 에어로졸인, 간세포에서 제제의 생체-활성화를 결정하기 위한 본원에서 설명되는 바와 같은 3차원 기관 배양 시스템 또는 3차원 다중-기관 배양 시스템의 용도가 제공된다.
- [0037] 다른 양태는 실질적으로 본원에서 설명되고 첨부된 설명 및 도면을 참조하는 바와 같은 간 구상체, 공동 배양,

3차원 기관 배양 시스템, 3차원 다중-기관 배양 시스템, 세포 배양 배지, 방법 또는 용도에 관한 것이다.

[0038] 추가의 구체적이고 바람직한 양태는 첨부된 독립항 및 종속항에 기재된다. 종속항의 특징은 적절하게 독립항의 특징과 조합되고, 청구범위에서 명시적으로 기재된 것 이외의 조합으로 조합될 수 있다. 따라서, 상기 기재된 구현예의 하나 이상의 조합이 또한 개시된다.

[0039] 본 개시의 실시는 달리 나타내지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학 및 생화학의 종래 기술을 사용한다. 이와 같은 기술은 다음 문헌, 예컨대 분자 클로닝: 문헌[A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press]; 문헌[Oligonucleotide Synthesis (MJ. Gait, ed., 1984)]; 문헌[Methods in Molecular Biology, Humana Press]; 세포 생물학: 문헌[A Laboratory Notebook (J. E. CeIMs, ed., 1998) Academic Press]; 문헌[Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987)]; 문헌[Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press]; 세포 및 조직 배양: 문헌[Laboratory Procedures (A. Doyle, IB. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons]; 문헌[Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)]; 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987)]; PCR: 문헌[The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)]에 충분히 설명되어 있다. 상업적으로 이용 가능한 키트 및 시약을 사용하는 절차는 달리 나타내지 않는 한, 통상적으로 제조업체-정의 프로토콜에 따라 사용될 것이다.

[0040] 본원에서 사용되는 기술 용어 및 표현은 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학 및 생화학의 관련 분야에서 이들에 통상적으로 적용되는 의미가 일반적으로 제공되어야 한다. 모든 이하의 용어 정의는 본 출원의 완전한 내용에 적용된다.

[0041] 용어 "포함하는"은 다른 요소 또는 단계를 배제하지 않는다.

[0042] 용어 "필수적으로 구성되는"은 주어진 구현예에 요구되는 이들 요소를 지칭한다. 이 용어는 해당 구현예의 기본 및 신규 또는 기능적 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 요소의 존재를 허용한다. 이 용어는 조성물의 필수적인 특성이 그들의 존재에 의해 실질적으로 영향을 받지 않는다면, 나열된 구성 요소 또는 성분 이외에 다른 구성 요소 또는 성분의 존재를 허용한다. 세포 배양 배지의 맥락에서, 이 용어는 세포 배양 배지의 기본 및 신규 또는 기능적 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 요소 또는 성분의 존재를 허용한다. 이 용어는 세포 배양 배지의 필수적인 특성이 그들의 존재에 의해 실질적으로 영향을 받지 않는다면, 나열된 요소 또는 성분 이외에 다른 요소 또는 성분의 존재를 허용한다. 예를 들어, 이 용어는 세포 배양 배지에서 배양된 세포의 필수적인 특성이 다른 요소 또는 성분을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포와 비교하여 그들의 존재에 의해 실질적으로 영향을 받지 않는다면, 나열된 요소 또는 성분 이외에 다른 요소 또는 성분의 존재를 허용한다.

[0043] 부정 관사 "a" 또는 "an"은 복수를 배제하지 않는다.

[0044] 세포 배양

[0045] 세포 배양은 일반적으로 인공 환경에서 성장하기 이전에 조직으로부터 세포를 제거하는 것을 지칭한다. 배양될 세포는 배양될 세포를 함유하는 조직으로부터 직접 제거될 수 있고 배양 이전에 효소적 또는 기계적 수단에 의해 선택적으로 처리될 수 있다. 일 대안예로서, 배양될 세포는 이전에 확립된 균주 또는 세포주로부터 유래될 수 있다. 세포 배양은 생리학을 포함하는 세포의 다양한 측면을 연구하기 위한 시스템; 생화학; 에어로졸을 포함하는 약물이나 화합물의 영향; 약물 또는 화합물의 스크리닝 및 개발 또는 최적화; 약물 또는 화합물 효능의 연구; 약물 또는 화합물 흡수의 연구; 독성 스크리닝; 독성학; 표적 발견; 약동학; 약력학; 재생 의학을 제공할 수 있다.

[0046] 세포는 성장 인자, 호르몬, 가스 및 필수 영양소(예컨대, 비타민, 아미노산, 탄수화물, 미네랄 등)를 공급하는 세포 배양 배지를 함유하는 인공 환경에서 성장하며, 인공 환경은, 예를 들어 온도, pH 및 압력에 관하여 조절된다. 일부 세포는 고체 또는 반고체 기재에 고정 장치를 요구하는 반면에, 다른 세포는 배양 배지에 떠있는 동안 성장할 수 있다.

[0047] 본 개시는 기질 또는 스캐폴드의 사용 여부에 관계없이 세포의 3차원 배양을 제공하는 임의의 방법을 포함하는 "3차원 세포 배양"의 용도를 포함한다. 구상체 배양 및 기관형 배양을 포함하는 다수의 상이한 3차원 세포 배양 방법이 개발되었다. 구상체 시스템, 특히 간 구상체 시스템은 본 개시에서 특히 관심이 있다.

[0048] 구상체

- [0049] 용어 "구상체"는 구상체 내에서 3차원 세포 성장을 지지하기 위한 기질 또는 스캐폴드의 사용 여부와 관계없이, 3차원의 세포의 덩어리로 분할하는 단일 세포이거나 3차원의 다중 세포의 집합체인 당업계에서 통상적으로 이해되는 의미로 한다. 3차원 구상체는 접착성 구상체 또는 혼탁 상태에서 성장된 구상체일 수 있다.
- [0050] 예를 들어, 나노 배양 플레이트에서, 혼탁 배양에서, 젤에서, 폴리-HEMA로 코팅된 플라스틱에서, 세포 캡슐화를 통해 집합체로서 또는 매달린 액적 시스템을 통한 집합체로서 성장된 구상체를 포함하는, 구상체를 배양하기 위한 여러 상이한 시스템이 이용 가능하다. 다른 방법은 스피너 플라스크(spinner flask), 회전 시스템, 오목 플레이트 방법 및 액체-오버레이(liquid-overlay)의 사용을 포함한다. 생물 반응기는 또한 3차원 구상체 세포 배양에 사용하도록 적응될 수 있다. 일 구현예에서, 사용된 방법은 매달린 액적 시스템(예컨대, GravityPLUS Hanging Drop System(InSphero))이다. 이와 같은 방법은 구상체의 제조를 위해 설계된 비-접착 코팅된 마이크로 타이터(microtiter) 플레이트인 GravityTRAP ULA Plate의 사용을 수반한다. 구상체 성숙은 통상적으로 세포 유형 및 배양 조건에 따라 2 내지 5 일의 시딩(seeding) 내에서 발생한다. 적합하게, 구상체는 100 μl 이상, 또는 200 μl 이상, 또는 300 μl 이상의 용적으로 배양된다. 적합하게, 구상체는 Corning[®] 구상체 마이크로플레이트에서 배양된다.
- [0051] 3차원 세포 배양 기질 또는 스캐폴드는 구상체 배양에 사용될 수 있다. 이들은 종종 3차원 세포 성장 및 분화를 지지할 수 있는 다공성 기재이다. 물리적 외관, 다공성, 투과성, 기계적 특성 및 나노-규모의 표면 형태의 차이를 갖는 3차원 스캐폴드를 제조하기 위해 다양한 물질이 개발되었다. 이와 같은 물질의 예로는 콜라겐 젤, 스펀지 또는 바이오 젤; 피브린; 피브로넥틴; 라미닌; 알지네이트, 하이드로 젤; 가교된 글리코사미노글리카; 폴리머-기반 스캐폴드, 합성 스캐폴드; 웨이퍼드 스캐폴드; 및 키토산 복합 스캐폴드를 포함한다.
- [0052] 3차원 구상체는 그들의 세포 통신 및 세포의 기질의 발달에 관하여 생체내 조직과 보다 밀접하게 유사하다. 이들 기질은 세포가, 살아있는 조직에서 움직이는 방식과 유사하게 구상체 내에서 세포의 움직임을 돋는다. 따라서 구상체는 분화, 생존, 세포 이동, 세포 분극화, 유전자 발현 및 성장을 위한 더욱 개선된 모델이다.
- [0053] 구상체는 플레이트 판독기로 측정된 비색, 형광 및 발광 검정을 포함하는 당업계에 잘 알려진 다양한 방법을 사용하여 수확 및 연구될 수 있거나 이들은 현미경에 의해 용이하게 관찰될 수 있다. 추가 기술은 웨스턴, 노던 또는 서던 블로트 기술, 조직학적 기술(예를 들어, 면역 조직 화학, 원위치 혼성화, 면역 형광법) 등을 포함한다. 역광 시야 현미경, 형광 현미경, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT), 양전자 방출 단층촬영(PET), 자기 공명 영상(MRI) 및 체렌코프(Cerenkov) 발광 영상(CLI) 기술과 같은 광영상 방법의 사용 또한 고려된다.
- [0054] 3차원 구상체의 사용 용례는 생체내, 화합물의 스크리닝, 독성학 검정, 세포 치료, 세포 전달, 약물 전달, 생화학적 대체, 생물학적 활성 분자의 제조, 조직 공학, 생체 적합 물질 및 임상 시험에서 발견되는 것과 보다 밀접하게 근접한 환경에서 생체외 세포 및 조직의 증식에 대한 연구를 포함한다.
- [0055] 3차원 세포 배양에서 구상체의 사용은 문헌[*Expert Opin. Drug Discov.* (2015) 10, 519-540]에서 일반적으로 검토된다.
- [0056] 일 구현예에서, 구상체는 간 세포로부터 유래되어 3차원 간 구상체를 형성한다. 이와 같은 간 구상체는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[*ALTEX* (2014) 31, 441-477 및 *Toxicol. Sci. OFF. J. Soc. Toxicol.* (2013) 133, 67-78]에서 설명되는 것과 같은 당업계에 공지된 다양한 방법을 사용하여 준비될 수 있다.
- [0057] 일 양태는 분리된 3차원 간 구상체에 관한 것이며, 여기서 구상체는: 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 ATP 함량이 증가되고; 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성이 동일하거나 증가되고; 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 알부민 분비가 증가되었다.
- [0058] 다른 양태는: 세포 배양 배지에서 3차원 간 구상체를 배양하는 것을 포함하는 공정에 의해 얻어지거나 얻어질 수 있는 3차원 다중-기관 배양 시스템에 사용하기 위한 분리된 3차원 간 구상체에 관한 것이며, 여기서 세포 배양 배지는: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되며, 상기 3차원 간 구상체에서: ATP 함량은 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가되며; 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성은 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 동일하거나 증가되며; 알부민 분비는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된다.

- [0059] 적합하게, 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스 E 배지와 같은 간세포 배양을 위해 이전에 최적화된 세포 배양 배지에서 성장한 분리된 3차원 간 구상체와 비교하여 개선된 특성을 나타낼 수 있다.
- [0060] 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 동일하거나 증가된 활성 및 증가된 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0061] 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체보다 적어도 1.5 배 높은 ATP 함량, 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 1.0 배 높은 시토크롬 P450 1A1과 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양한 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 1.9 배 높은 증가된 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0062] 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체보다 적어도 2.1 배 높은 ATP 함량, 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 1.9 배 높은 시토크롬 P450 1A1과 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 1.8 배 높은 증가된 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0063] 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체보다 적어도 2.1 배 높은 ATP 함량, 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 2.1 배 높은 시토크롬 P450 1A1과 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 2.0 배 높은 증가된 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0064] 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체보다 적어도 2.4 배 높은 ATP 함량, 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 2.4 배 높은 시토크롬 P450 1A1과 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양한 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 2.1 배 높은 증가된 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0065] 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체보다 적어도 2.9 배 높은 ATP 함량, 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 2.3 배 높은 시토크롬 P450 1A1과 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 2.6 배 높은 증가된 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0066] 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체보다 적어도 2.6 배 높은 ATP 함량, 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 2.9 배 높은 시토크롬 P450 1A1과 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 2.5 배 높은 증가된 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0067] 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체보다 적어도 2.7 배 높은 ATP 함량, 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 2.1 배 높은 시토크롬 P450 1A1과 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 3.3 배 높은 증가된 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0068] 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체보다 적어도 2.7 배 높은 ATP 함량, 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 2.6 배 높은 시토크롬 P450 1A1과 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 적어도 3.1 배 높은 증가된 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0069] ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성 및 알부민 분비를 측정하는 방법이 본원에서 설명된다.
- [0070] 적합하게, 배양에서 성장될 때 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 동일한 수 또는 증가된 괴사성 세포 수를 가진다.
- [0071] 적합하게, 배양에서 성장될 때 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 수의 사멸 세포를 가진다.
- [0072] 적합하게, 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 조절된(예를 들어, 증가 또는 감소된) 수준의 글루타티온(GSH)을 가진다.

- [0073] 적합하게, 분리된 3차원 간 구상체는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 수준의 산화 글루타티온(GSSG)을 가진다.
- [0074] 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.
- [0075] 공동 배양의 사용이 또한 고려된다. 일 양태에서, 적어도 하나의 다른 세포 유형, 적합하게 3차원 폐 상피 세포와 함께 본원에서 설명되는 바와 같은 3차원 간 구상체를 포함하는 공동 배양물이 제공된다. 적합하게, 공동 배양물은 본 발명에서 설명되는 바와 같은 세포 배양 배지에서 유지된다.
- [0076] 일 구현예에서, 구상체는 폐 세포이거나 폐 세포로부터 유래되어 3차원 폐 구상체를 형성한다. 이와 같은 폐 구상체는 문헌[ALTEX (2014) 31, 441-477 및 *Toxicol. Sci. OFF. J. Soc. Toxicol.* (2013) 133, 67-78]에서 설명되는 것과 같은 당업계에 공지된 다양한 방법을 사용하여 준비될 수 있다.
- [0077] 세포 원천
- [0078] 본 개시는 폐 세포 및 간 세포를 포함하는 다양한 세포 유형을 활용한다. 본 개시에서 사용하기 위한 세포 및 세포주는 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 조직 또는 유체로부터 분리될 수 있다. 본 개시에서 사용하기 위한 세포 및 세포주는 배아 줄기 세포 또는 유도 다능성 줄기 세포와 같은 줄기 세포로부터 분화되거나 체세포로부터 직접 분화될 수 있다. 세포 및 세포주는 임의의 다수 포유류 종, 적합하게 인간을 포함하지만 랙트, 마우스, 돼지, 토끼 및 영장류 등을 포함하지 않는, 인간 또는 동물 대상체로부터 또는 인간 또는 동물의 세포일 수 있거나 그로부터 유래될 수 있다. 세포 및 세포주는 상업적 공급원으로부터 얻어질 수 있다.
- [0079] 폐 상피 세포를 포함하는 폐 세포는 관심 있는 하나의 세포 유형이다. 기관지 및/또는 기도 상피 세포는 본 개시에서 특별히 사용된다. 인간 기관지 상피 세포는 기관지 내시경 검사 절차 중에 공여자의 폐를 브러싱하여 수집될 수 있다. 일 구현예에서, 폐 세포는 정상 인간 기관지 상피(NHBE) 세포이다. 폐 상피 세포는 미분화 세포의 단층으로서 배양되거나 공기-액체 계면에서 기관형 폐 상피-유사 조직으로 추가로 개발될 수 있다. 세포는 다음의 방법론을 사용하여 공기-액체 계면에 확립될 수 있다. 간단히 말해, 상피 세포는 플라스크에서 배양되어 세포의 수를 증가시킬 수 있다. 인큐베이션 기간 후, 세포는 플라스크로부터 분리되고, 계수되고, 인서트 상을 시딩(seeding)된다. 이를 인서트에서, 세포는 정점 및 기저 측의 배지로 인큐베이션된다. 이 단계는 세포가 분열하여 상피를 형성하기 위해 인서트를 완전히 덮을 것이다. 그 후, 정점 배지가 제거되며, 기본 배지가 보유되고 더 완전한 배지로 대체된다. 배양물은 추가 기간 동안 이와 같이 인큐베이션된다. 그러는 동안, 세포는 3 가지 세포 유형: 기저 세포, 배상 세포 및 섬모 세포로 분화할 것이다. 성숙 말기에, 배양물은 사용할 준비가 된다. 인간 코점막 상피 세포를 배양하기 위한 공기 액체 계면의 사용은 문헌[J Vis Exp. 2013; (80): 50646]에서 설명된다.
- [0080] 폐 상피 세포는 흡연자 또는 비-흡연자로 분류되는 대상체를 포함하는, 상이한 병리학을 가진 인간 또는 동물 대상체로부터 얻어질 수 있다.
- [0081] 간 세포는 관심 있는 다른 세포 유형이다. 일 구현예에서, 사용되는 세포는 간세포이다. 간세포는 간의 세포이며, 이는 간의 세포질 질량의 70 내지 85%를 차지한다. 간세포의 기능성은 3차원 배양에서만 확립되는 극성 표현형을 형성하는 그들의 능력에 크게 의존한다. 간 세포의 하나의 원천 간 생리학 및 병리학의 수많은 양태를 조사하는 데 널리 사용되는 시험관내 모델인 1차 간세포이다. 인간 간세포를 분리하는 데 사용되는 기술은 공여된 간에 대한 2-단계 콜라겐酶 관류(collagenase perfusion)를 기초로 할 수 있다. 그러나, 이를 세포는 대사 효소를 5 일 초과 동안 발현하지 않는다. 다른 한계는 그들의 짧은 생존 능력이다. 이를 단점은 인간이나 동물의 간 전구 세포주와 같은 대안으로서 수명이 긴 간 세포주의 사용으로 극복될 수 있다. 인간 간 전구 세포주의 이와 같은 일 실시예는 HepaRG 세포주(ThermoFisher Scientific)이다. HepaRG 세포는 1차 인간 간세포의 많은 특성을 보유한다. 그들은 1차 간세포와 비교하여 더 큰간 특이적 및 대사성 유전자 발현과 더 긴 수명을 갖는다. 3차원 구상체에서 HepaRG 세포의 재조직은 수명과 대사 능력 둘 모두를 더욱 증가시켜, 구상체가 독성 시험을 위한 시험관내 모델에서 더 양호한 대안을 제공할 수 있음을 제안한다. 간 구상체는 또한 1차 간세포와 간성상세포, 또는 1차 간세포와 지방 조직-유래 줄기 세포의 혼합물로 생성될 수 있다.
- [0082] 일 구현예에서, 폐 세포는 기관지 및/또는 기도 상피 세포와 같은 폐 상피 세포이다.
- [0083] 일 구현예에서, 간 세포는 HepaRG 세포, 적합하게 구상체 HepaRG 세포이다.
- [0084] 간 및 폐 세포의 조합을 포함하는 세포의 조합이 또한 고려된다. 기관지 및/또는 기도 상피 세포와 같은 폐 상피 세포와 HepaRG 세포, 적합하게 구상체 HepaRG 세포의 조합이 고려된다.

- [0085] 본 개시의 일 양태는 3차원 다중-기관 배양 시스템에 관한 것이다. 이와 같은 배양 시스템은 본원에서 설명되는 바와 같은 간세포 및 폐 세포와 같은 다양한 세포의 사용을 포함할 수 있다. 내피 세포, (폐)섬유아 세포 및 면역 세포, 예컨대 단핵구/대식세포, 수지상 세포, 호중구 및 비만 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 세포 유형의 사용이 또한 고려된다.
- [0086] 일 구현예에서, 본 개시의 방법은 대상체로부터 세포 샘플을 분리하거나 얻는 단계를 배제한다.
- [0087] 세포 배양 배지
- [0088] 본 개시의 일 양태는 3차원 세포를 배양하는 데 사용될 수 있는 세포 배양 배지에 관한 것이다. 일 구현예에서, 세포 배양 배지는 각각의 세포의 개별적인 특성의 손실없이 간 및 폐 세포를 배양하는 데 사용될 수 있다. 본원에서 설명되는 배지에서 배양된 간 세포는 간 세포 배양을 위해 이전에 최적화 된 세포 배양 배지(예컨대, 월리엄스 E 배지)에서 성장한 간 세포와 비교하여 개선된 특성을 나타낼 수 있다. 적합하게, 폐 세포는 본원에서 설명되는 바와 같은 그들의 특성을 보유한다. 본원에서 설명되는 배지는 간 세포의 배양 또는 폐 세포 배양 또는 간 세포와 폐 세포의 공동 배양에 사용될 수 있다.
- [0089] 적합하게, 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체와 비교하여, 증가된 ATP 함량, 동일하거나 증가된 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성, 및 증가된 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0090] 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된, 분리된 3차원 간 구상체보다 적어도 1.5 배 높은 ATP 함량, 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여 적어도 1.0 배 높은 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 그보다 적어도 1.9 배 높은 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0091] 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여, 적어도 2.1 배 높은 ATP 함량, 적어도 1.9 배 높은 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 적어도 1.8 배 높은 증가된 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0092] 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여, 적어도 2.1 배 높은 ATP 함량, 적어도 2.1 배 높은 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 적어도 2.0 배 높은 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0093] 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여, 적어도 2.4 배 높은 ATP 함량, 적어도 2.4 배 높은 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 적어도 2.1 배 높은 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0094] 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여, 적어도 2.9 배 높은 ATP 함량, 적어도 2.3 배 높은 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 적어도 2.6 배 높은 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0095] 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여, 적어도 2.6 배 높은 ATP 함량, 적어도 2.9 배 높은 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 적어도 2.5 배 높은 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0096] 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여, 적어도 2.7 배 높은 ATP 함량, 적어도 2.1 배 높은 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 적어도 3.3 배 높은 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0097] 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여, 적어도 2.7 배 높은 ATP 함량, 적어도 2.6 배 높은 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 적어도 3.1 배 높은 알부민 분비를 가질 수 있다.
- [0098] ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성 및 알부민 분비를 측정하는 방법이 본원에서 설명된다.
- [0099] 적합하게, 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여 동일한 수 또는 증가된 수의 괴사성 세포를 가진다.

- [0100] 적합하게, 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 윌리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여 증가된 수의 사멸 세포를 가진다.
- [0101] 적합하게, 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 윌리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여 조절된(예를 들어, 증가 또는 감소된) 수준의 글루타티온(GSH)을 가진다.
- [0102] 적합하게, 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 간 세포는 윌리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 세포와 비교하여 증가된 수준의 산화 글루타티온(GSSG)을 가진다.
- [0103] 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.
- [0104] ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성, 및 알부민 분비를 측정하는 방법은 실시예에서 상세히 설명된다. ATP 함량은 CellTiterGlo® assay(Promega, 뒤벤도르프, 스위스)를 사용하여 결정될 수 있다. CYP1A1/B1, CYP1A2 및 CYP2B6의 활성은 P450-Glo Assays(Promega, 뒤벤도르프, 스위스)를 사용하여 결정될 수 있다. 알부민 분비는 Human Albumin ELISA 키트(Abcam)를 사용하여 결정될 수 있다.
- [0105] 적합하게, 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 폐 세포는 생존 능력, 구조적 일체성 및 기능적 능력을 유지한다. 적합하게, 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 폐 세포는 완전한 PneumaCult-ALI 배지 또는 완전한 B-ALI 배지에서 배양된 폐 세포와 비교하여 동일한 생존 능력, 구조적 일체성 및 기능적 능력을 유지한다. 적합하게, 세포 배양 배지/배지들에서 성장한 폐 세포는 완전한 PneumaCult-ALI 배지 또는 완전한 B-ALI 배지에서 배양된 폐 세포와 동일하다.
- [0106] 배양 배지는 임의의 첨가 또는 희석 없이 100%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI 배지를 함유하는 완전한 PneumaCult-ALI 배지일 수 있다.
- [0107] 배양 배지는 임의의 첨가 또는 희석 없이 100%(v/v) 완전한 B-ALI 배지를 함유하는 완전한 B-ALI 배지일 수 있다.
- [0108] 배양 배지는 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 윌리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 혼합물일 수 있다. 완전한 PneumaCult-ALI 배지는 완전한 윌리엄스 E 배지로 희석된다. 일 구현예에서, 혼합물은 30% 내지 99.9%(v/v), 40% 내지 99.9%(v/v), 50% 내지 99.9%(v/v), 60% 내지 99.9%(v/v), 70% 내지 99.9%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지를 포함하거나 이들로 구성되며, 나머지 용적은 최대 100%(v/v)의 완전한 윌리엄스 E 배지가 차지한다.
- [0109] 배양 배지는 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 윌리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되는 혼합물을 포함하거나 필수적으로 구성되는 혼합물일 수 있다. 완전한 B-ALI 배지는 완전한 윌리엄스 E 배지로 희석된다. 일 구현예에서, 혼합물은 30% 내지 99.9%(v/v), 40% 내지 99.9%(v/v), 50% 내지 99.9%(v/v), 60% 내지 99.9%(v/v), 70% 내지 99.9%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지를 포함하거나 이들로 구성되며, 나머지 용적은 최대 100%(v/v)의 완전한 윌리엄스 E 배지를 차지한다.
- [0110] (i) 완전한 B-ALI 배지
- [0111] 일 구현예에서, 세포 배양 배지는 완전한 B-ALI 배지로 구성된다. 다시 말하면, 세포 배양 배지는 첨가된 배양 배지 구성 성분 없이 100%(v/v) 완전한 B-ALI 배지를 함유한다. 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 완전한 B-ALI 배지로 필수적으로 구성된다.
- [0112] 완전한 B-ALI 배지는 폐 상피 세포의 분화를 촉진한다.
- [0113] 완전한 B-ALI 배지는 B-ALI 성장 기본 배지, B-ALI 분화 기본 배지 및 BALI SingleQuots 키트를 함유하는 B-ALI BulletKit(Lonza, 카탈로그 번호 193514)의 내용물과 함께 조합함으로써 준비된다. B-ALI BulletKit은 성장 및 분화 배지 SingleQuots 키트, 성장 기본 배지 및 분화 기본 배지로 구성된다. 이는 폐 상피 세포의 완전한 분화를 촉진한다.
- [0114] 본 개시의 이와 같은 구현예에 따라서, 9 일 동안 완전한 B-ALI 배지에서 단독으로(즉, 100%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지) 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 윌리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 윌리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 윌리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 윌리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 동일한 또는 증가된 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성; 및 (C) 완전한 윌리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 윌리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된

알부민 분비를 가진다. 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0115] 적합하게, 완전한 B-ALI 배지(즉, 100%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지)에서 단독으로 9 일 동안 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 1.9 배 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 동일한 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성; 및 (C) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 1.9 배 증가된 알부민 분비(표 1 참조). 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0116] 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 완전한 B-AL1 배지를 포함하지만, 9 일 후에 완전한 B-AL1 배지를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체가 다음을 갖는다는 단서를 가진다: (A) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 동일한 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성; 및 (C) 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 알부민 분비. 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0117] 바람직하게, 세포 배양 배지는 완전한 B-AL1 배지를 포함하지만, 9 일 후에 완전한 B-AL1 배지를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체가 다음을 갖는다는 단서를 가진다: (A) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 1.9 배 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 동일한 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성; 및 (C) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 1.9 배 증가된 알부민 분비(표 1 참조).

[0118] 적합하게, 배양에서 성장할 때 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스의 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 수의 사멸 세포를 가진다.

[0119] 적합하게, 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 조절된 (예를 들어, 증가 또는 감소된) 수준의 글루타티온(GSH)을 가진다.

[0120] 적합하게, 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 수준의 산화 글루타티온(GSSG)을 가진다.

[0121] 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0122] (ii) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지.

[0123] 일 구현예에서, 세포 배양 배지는 완전 B-AL1 배지와 완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물을 포함하거나 그들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 완전한 완전한 월리엄스 E 배지는 성체 랫트 간 상피 세포의 분리와 장기간 보수를 위해 개발되었다.

[0124] 완전한 B-ALI 배지는 B-ALI 성장 기본 배지, B-ALI 분화 기본 배지 및 BALI SingleQuots 키트를 함유하는 B-ALI BulletKit(Lonza, 카탈로그 번호 193514)의 내용물과 함께 조합함으로써 준비된다. B-ALI BulletKit은 성장 및 분화 배지 SingleQuots 키트, 성장 기본 배지 및 분화 기본 배지로 구성된다. 이는 기도 상피의 완전한 분화를 촉진한다.

[0125] 완전한 월리엄스의 E 배지는 HepaRG Maintenance & Metabolism Supplement(ThermoFisher Scientific, 카탈로그 번호 HPRG720) 및 GlutaMAX™ 솔루션(ThermoFisher Scientific, 카탈로그 번호 35050061)으로 월리엄스 E 배지(ThermoFisher Scientific, 카탈로그 번호 12551032)를 보충함으로써 준비된다. 월리엄스 E 배지는 문헌[*Exp. Cell Res.* (1974) 89:139]에 설명되고 표 2에 나타낸다.

[0126] 완전한 B-ALI 배지는 완전한 월리엄스 E 배지와 혼합된다. 함께 조합된 각각의 배지의 백분율은 변경될 수 있다. 일 구현예에서, 혼합률은 적어도 70%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되며, 나머지 용적은 최대 100%(v/v)의 완전한 월리엄스 E 배지가 차지한다. 일 구현예에서, 혼합률은 70%/30%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 다른 구현예에서, 혼합률은 75%/25%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 다른 구현예에서, 혼합률은 80%/20%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스

E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 다른 구현예에서, 혼합물은 85%/15%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 다른 구현예에서, 혼합물은 90%/10%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 다른 구현예에서, 혼합물은 95/5%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다.

[0127] 적합하게, 혼합물이 90%/10%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 증가된 활성; 및 (C) 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 일부분 분비를 가진다. 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0128] 적합하게, 혼합물이 90%/10%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v))에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.1 배 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v))에서 동일한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성; 및 (C) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v))에서 일정한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 1.8 배 증가된 일부분 분비를 가진다(표 1 참조). 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0129] 적합하게, 혼합물이 80%/20%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 증가된 활성; 및 (C) 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 일부분 분비를 가진다. 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0130] 적합하게, 혼합물이 80%/20%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.4 배 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 동일한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.4 배 증가된 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성; 및 (C) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 일정한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.1 배 증가된 일부분 분비를 가진다(표 1 참조). 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0131] 적합하게, 혼합물이 70%/30%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 증가된 활성; 및 (C) 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 일부분 분비를 가진다. 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0132] 적합하게, 혼합물이 70%/30%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.1 배 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 동일한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.1 배 증가된 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성; 및 (C) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 일정한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.0 배 증가된 일부분 분비를 가진다(표 1 참조). 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0133] 표 1에 요약된 결과로부터 알 수 있듯이, 80%/20%(v/v) 완전한 B-AL1 배지/완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물은 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 조합해서 6.9 배의 ATP 함량, 시토크

롭 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성 및 일부분 분비의 증가를 초래하였다. 따라서, 완전한 월리엄스 E 배지에 완전한 B-ALI 배지의 추가 희석은 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성에서 조합적인 증가를 초래할 것이다. 60%/40%(v/v) 완전한 B-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지, 50%/50%(v/v) 완전한 B-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지, 40%/60%(v/v) 완전한 B-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지, 및 30%/70%(v/v) 완전한 B-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지가 개시된다.

- [0134] 적합하게, 배양에서 성장할 때 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스의 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 수의 사멸 세포를 가진다.

[0135] 적합하게, 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 조절된(예를 들어, 증가 또는 감소된) 수준의 글루타티온(GSH)을 가진다.

[0136] 적합하게, 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 수준의 산화 글루타티온(GSSG)을 가진다.

[0137] 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0138] (iii) 완전한 PneumaCult-ALI 배지.

[0139] 일 구현예에서, 세포 배양 배지는 완전한 PneumaCult-ALI 배지로 구성된다. 다시 말하면, 세포 배양 배지는 추가의 배양 배지 구성 성분 없이 100%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI 배지를 함유한다. 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 완전한 PneumaCult-ALI 배지로 필수적으로 구성된다.

[0140] PneumaCult-ALI 배지는 폐 상피 세포의 분화를 촉진한다.

[0141] 완전한 PneumaCult- ALI 배지는 PneumaCult-ALI 기본 배지(StemCell Technologies, ref. 05002)와 PneumaCult-ALI 10X 보충물(StemCell Technologies, ref. 05003), PneumaCult-ALI 유지 보충물(StemCell Technologies, ref. 05006), Hydrocortisone Stock Solution(StemCell Technologies, ref. 07925) 및 PBS(StemCell Technologies, ref. 37250)의 0.2 % 헤파린 나트륨 염을 혼합함으로써 준비된다.

[0142] 본 개시의 이와 같은 구현예에 따라서, 완전한 PneumaCult-ALI 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI 배지)에서 단독으로 9 일 동안 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 증가된 활성; 및 (C) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 알부민 분비를 가진다. 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0143] 적합하게, 완전한 PneumaCult-ALI 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI 배지)에서 단독으로 9 일 동안 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.7 배 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 2.1 배 증가된 활성; 및 (C) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 3.3 배 증가된 알부민 분비(표 1 참조). 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0144] 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 완전한 PneumaCult-ALI 배지를 포함하지만, 9 일 후에 완전한 PneumaCult-ALI 배지를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체가 다음을 갖는다는 단서를 가진다: (A) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 증가된 활성; 및 (C) 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 알부민 분비를 가진다. 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0145] 적합하게, 세포 배양 배지는 완전한 PneumaCult-ALI 배지를 포함하지만, 9 일 후에 완전한 PneumaCult-ALI 배지를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체가 다음을 갖는다는 단서를 가진다: (A) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.7 배 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로

독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 2.1 배 증가된 활성; 및 (C) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100%(v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 3.3 배 증가된 일부분 분비(표 1 참조). 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

- [0146] 적합하게, 배양에서 성장할 때 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스의 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 수의 사멸 세포를 가진다.
- [0147] 적합하게, 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 조절된 (예를 들어, 증가 또는 감소된) 수준의 글루타티온(GSH)을 가진다.
- [0148] 적합하게, 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 수준의 산화 글루타티온(GSSG)을 가진다.
- [0149] 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.
- [0150] (iv) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지
- [0151] 일 구현예에서, 세포 배양 배지는 완전한 PneumaCult-ALI 배지와 완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물을 포함하거나 그들로 구성된다.
- [0152] 완전한 PneumaCult-ALI 배지는 PneumaCult-ALI 기본 배지(StemCell Technologies, 카탈로그 번호 05002)에 PneumaCult-ALI 10X 보충물(StemCell Technologies, 카탈로그 번호 05003), PneumaCult-ALI 유지 보충물(StemCell Technologies, 카탈로그 번호 05006), 하이드로코르티손 저장 용액(StemCell Technologies, 카탈로그 번호 07925) 및 PBS의 0.2% 해파린 나트륨 염(StemCell Technologies, 카탈로그 번호 37250)을 혼합함으로써 준비된다.
- [0153] 완전한 월리엄스 E 배지는 월리엄스 E 배지(ThermoFisher Scientific, 카탈로그 번호 12551032)에 HepaRG 유지 & 대사 보충물(ThermoFisher Scientific, 카탈로그 번호 HPRG720)과 GlutaMAX 용액(ThermoFisher Scientific, 카탈로그 번호 35050061)을 보충함으로써 준비된다.
- [0154] 완전한 PneumaCult-ALI 배지는 완전한 월리엄스 E 배지와 혼합된다. 함께 조합된 각각의 배지의 백분율은 변경될 수 있다. 일 구현예에서, 혼합률은 적어도 70%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되며, 나머지 용적은 최대 100%(v/v)의 완전한 월리엄스 E 배지가 차지한다.
- [0155] 일 구현예에서, 혼합률은 70%/30%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 다른 구현예에서, 혼합률은 75%/25%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 다른 구현예에서, 혼합률은 80%/20%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 다른 구현예에서, 혼합률은 85%/15%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 다른 구현예에서, 혼합률은 90%/10%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 다른 구현예에서, 혼합률은 95%/5%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다.
- [0156] 적합하게, 혼합률이 90%/10%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 증가된 활성; 및 (C) 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 일부분 분비를 가진다. 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.
- [0157] 적합하게, 혼합률이 90%/10%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.9 배 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 동일한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.3 배 증가된 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성; 및 (C) 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v))에서 일정한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체

와 비교하여 2.6 배 증가된 알부민 분비를 가진다(표 1 참조). 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0158] 적합하게, 혼합물이 80%/20%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 증가된 활성; 및 (C) 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 알부민 분비를 가진다. 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0159] 적합하게, 혼합물이 80%/20%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.7 배 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 동일한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.5 배 증가된 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성; 및 (C) 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 일정한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 3.1 배 증가된 알부민 분비를 가진다(표 1 참조). 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0160] 적합하게, 혼합물이 70%/30%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 증가된 활성; 및 (C) 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 알부민 분비를 가진다. 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0161] 적합하게, 혼합물이 70%/30%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성될 때, 9 일 후에 세포 배양 배지에서 배양된 3차원 간 구상체는: (A) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 단독으로 동일한 기간 동안 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.6 배 증가된 ATP 함량; (B) 완전한 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 동일한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.9배 증가된 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성; 및 (C) 월리엄스 E 배지(즉, 100% (v/v) 완전한 월리엄스 E 배지)에서 일정한 기간 동안 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 2.5 배 증가된 알부민 분비를 가진다(표 1 참조). 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0162] 적합하게, 배양에서 성장할 때 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스의 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 수의 사멸 세포를 가진다.

[0163] 적합하게, 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 조절된 (예를 들어, 증가 또는 감소된) 수준의 글루타티온(GSH)을 가진다.

[0164] 적합하게, 분리된 3차원 간 구상체는 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 수준의 산화 글루타티온(GSSG)을 가진다.

[0165] 적합하게, 본원에서 설명되는 변화는 배양 9 일 후에 관찰된다.

[0166] 표 1에 요약된 결과로부터 알 수 있듯이, 70%/30%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물은 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 조합해서 8배의 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성 및 알부민 분비의 증가를 초래하였다. 따라서, 완전한 월리엄스 E 배지에 완전한 PneumaCult-ALI 배지를 추가로 희석하면 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1 활성에서 조합된 증가를 초래할 것이다. 60%/40%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지, 50%/50%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지, 40%/60%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지, 30%/70%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지가 개시된다.

[0167] 3차원 간 구상체의 배양에 대해 본 개시에서 시험된 다양한 배지 중, 80%/20%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI/완전한 월리엄스 E 배지로 구성된 혼합물은 3차원 간 구상체의 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1

의 활성, 및 일부민 분비가 전체적으로 가장 큰 배수로의 증가를 초래하였다. 80%/20%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 세포 배양 배지 혼합물은 본 개시의 특정 구현예에 대해 바람직하다.

[0168] 3차원 간 구상체의 배양에 대해 본 개시에서 시험된 다양한 배지 중, 100%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI 배지로 구성되거나 필수적으로 구성되는 혼합물은 3차원 간 구상체의 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성, 및 일부민 분비가 전체적으로 두 번째로 가장 큰 배수로의 증가를 초래하였다. 100%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI로 구성되거나 필수적으로 구성되는 세포 배양 배지는 본 개시의 특정 구현예에 대해 바람직하다.

[0169] 3차원 간 구상체의 배양에 대해 본 개시에서 시험된 다양한 배지 중, 70%/30%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 구성되거나 필수적으로 구성되는 혼합물은 3차원 간 구상체의 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성, 및 일부민 분비가 전체적으로 세 번째로 가장 큰 배수로의 증가를 초래하였다. 70%/30%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 세포 배양 배지 혼합물은 본 개시의 특정 구현예에 대해 바람직하다.

[0170] 3차원 간 구상체의 배양에 대해 본 개시에서 시험된 다양한 배지 중, 90%/10%(v/v) 완전한 PneumaCult-ALI/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 구성되거나 필수적으로 구성되는 혼합물은 3차원 간 구상체의 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성, 및 일부민 분비가 전체적으로 네 번째로 가장 큰 배수로의 증가를 초래하였다. 90%/10%(v/v)의 완전한 PneumaCult-ALI/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 세포 배양 배지 혼합물은 본 개시의 특정 실시예에 대해 바람직하다.

[0171] 3차원 간 구상체의 배양에 대해 본 개시에서 시험된 다양한 배지 중, 80%/20%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 구성되거나 필수적으로 구성되는 혼합물은 3차원 간 구상체의 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성, 및 일부민 분비가 전체적으로 다섯 번째로 가장 큰 배수로의 증가를 초래하였다. 80%/20%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 세포 배양 배지 혼합물은 본 개시의 특정 구현예에 대해 바람직하다.

[0172] 3차원 간 구상체의 배양에 대해 본 개시에서 시험된 다양한 배지 중, 70%/30%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 구성되거나 필수적으로 구성되는 혼합물은 3차원 간 구상체의 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성, 및 일부민 분비가 전체적으로 여섯 번째로 가장 큰 배수로의 증가를 초래하였다. 70%/30%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 세포 배양 배지 혼합물은 본 개시의 특정 구현예에 대해 바람직하다.

[0173] 3차원 간 구상체의 배양에 대해 본 개시에서 시험된 다양한 배지 중, 90%/10%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 구성되거나 필수적으로 구성되는 혼합물은 3차원 간 구상체의 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성, 및 일부민 분비가 전체적으로 일곱 번째로 가장 큰 배수로의 증가를 초래하였다. 90%/10%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 세포 배양 배지 혼합물은 본 개시의 특정 구현예에 대해 바람직하다.

[0174] 3차원 간 구상체의 배양에 대해 본 개시에서 시험된 다양한 배지 중, 100%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지를 포함하거나, 그로 구성되거나 필수적으로 구성되는 혼합물은 3차원 간 구상체의 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성, 및 일부민 분비가 전체적으로 여덟 번째로 가장 큰 배수로의 증가를 초래하였다. 100%(v/v)의 완전한 B-ALI 배지를 포함하거나, 그로 구성되거나 필수적으로 구성되는 세포 배양 배지는 본 개시의 특정 구현예에 대해 바람직하다.

[0175] 추가의 양태는 본원에서 설명되는 폐 세포 및 간 세포의 공동 배양에 사용될 수 있는 공동 배양 배지를 확인하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 또는 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하는 배양 배지를 제공하는 단계; (b) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 또는 완전한 월리엄스 E 배지를 배양 배지와 혼합하는 단계로서, 이는 세포 배양 배지 혼합물을 제공하기 위해 간세포 배양에 최적화되거나 특이적인, 단계; (c) 세포 배양 배지 혼합물에 폐 세포 및 간 세포의 공동 배양물을 첨가하는 단계; 및 (d) 간 세포가: 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 간 세포와 비교하여 증가된 ATP 함량; 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 간세포와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 동일하거나 증가된 활성; 및 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 간 세포와 비교하여 증가된 일부민 분비를 가지고 폐 세포가 그의 특성을 유지하는 세포 배양 배지 혼합물을 확인하는 단계를 포함한다. 간 세포의 다른 속성이 본원에서 설명된다.

- [0176] 추가의 양태는 이와 같은 공정에 의해 얻어지거나 얻어질 수 있는 폐 세포와 간 세포의 공동 배양에 사용될 수 있는 공동 배양 배지에 관한 것이며, 여기서 공동 배양 배지에서 배양된 간세포는: 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 간세포와 비교하여 증가된 ATP 함량; 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 간세포와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 동일하거나 증가된 활성; 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 간 세포와 비교하여 증가된 일부분 분비를 가지며 폐 세포는 그의 특성을 보유한다. 간 세포의 다른 속성이 본원에서 설명된다.
- [0177] 3차원 기관 배양 시스템
- [0178] 3차원 기관 배양 시스템, 특히 소형화된 형태의 배양 시스템은 기관이 어떻게 기능하는지를 연구하게 하기 때문에 본 개시에 사용된다. 특정 자극에 대한 반응, 하나 이상의 화학적 화합물 또는 조성물에 대한 반응 및 이와 같은 화합물 또는 조성물의 약동학 행동은, 예를 들어 본원에서 설명되는 바와 같은 스크리닝 분석에서 연구될 수 있다. 또한 인공 생체칩으로서 알려진 소형화된 3차원 기관 배양 시스템은, 이들이 기관 그룹의 조합된 연구, 즉 적어도 3차원 폐 조직과 간 조직의 연구를 가능하게 하기 때문에 특히 관심이 있다. 이는 폐 조직과 간 조직 사이의 상호작용의 복잡성이 재현되게 한다. 따라서, 폐 기관 및 간 기관을 고려하고 이를 다중 기관의 동적 배양을 가능하게 하는 본 개시의 3차원 배양 시스템은 매우 유리하다. 대부분의 3차원 기관 배양 시스템은 기관형이며, 이는 이들이 기관 또는 기관 시스템의 주요 기능을 재현하고자 하는 것을 의미한다. 폐 조직과 간 조직을 상호연결하는 소형화된 유체 시스템이 또한 설명된다.
- [0179] 적합하게, 인공 생체칩은 적어도 하나의 조직 유형, 예컨대 폐 또는 간의 적어도 하나의 생리적 기능을 가지거나, 보다 적합하게는 적어도 2 가지 상이한 조직 유형, 예컨대 폐 및 간의 적어도 하나의 생리적 기능을 가지는 미세유체공학 장치이다. 인공 생체칩은 포유류, 비-포유류 및 동물을 포함하는, 임의의 간 조직 또는 임의의 기관으로부터의 것일 수 있다.
- [0180] 인공 생체칩은 일반적으로 그 안에 배치되는 적어도 하나의 미세유체 채널을 포함할 것이다. 이를 채널의 정확한 치수는 칩의 기능 및/또는 치수에 기초하여 상이할 것이다. 적어도 하나의 미세유체 채널은 일반적으로 칩 상의 생물학적 물질에 영양분을 제공하고 보충하는 기능을 할 것이다.
- [0181] 일 양태에서, 3차원 다중-기관 배양 시스템은: (a) 간과 같은 제1 3차원 세포 유형을 배양 배지에서 배양하거나 침지시키도록 적응되는 제1 기관 성장 구간; (b) 공기 액체 계면에서 폐와 같은 제2 3차원 세포 유형을 배양하도록 적응되는 제2 기관 성장 구간으로서, 제2 3차원 세포 유형이 제1 3차원 세포 유형과 상이한 세포 유형인, 제2 기관 성장 구간; 및 (c) 제1 기관 공동과 제2 기관 공동을 연결하여 그 사이에 배양 배지의 유동을 허용하는 배양 배지 저장소를 포함한다.
- [0182] 제1 기관 성장 구간은 제1 기관 공동 또는 리셉터를 또는 용기 또는 컨테이너 또는 수용 수단을 포함할 수 있다.
- [0183] 제2 기관 성장 구간은 제2 기관 공동 또는 리셉터를 또는 용기 또는 컨테이너 또는 수용 수단을 포함할 수 있다.
- [0184] 저장소는 미세유체 채널에 의해 제공될 수 있다. 적합하게, 제1 기관 공동과 같은 제1 기관 성장 구간 및 제2 기관 공동과 같은 제2 기관 성장 구간은 다음을 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 배양 배지와 같은 동일한 배양 배지를 함유한다: 본원에서 설명되는 것과 같은 (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지 또는 이의 변형.
- [0185] 본원에서 설명되는 세포 유형 이외에, 칩은 다중-기관 칩을 생성하기 위한 추가의 세포 유형을 포함할 수 있다.
- [0186] 당업자는 특정 용례를 달성하는 데 요구되는 채널의 최적의 수 및/또는 치수를 갖는 칩을 설계할 수 있다.
- [0187] 칩은 칩 내의 미세순환을 제어하기 위한 펌프 또는 밸브 미세채널과 같은 유체 유동을 조절하는 유체 제어 요소를 포함할 수 있다.
- [0188] 칩 상의 세포 및 조직은, 예를 들어 가스 교환 막을 사용하여 산소를 공급받을 수 있다.
- [0189] 칩은 셀의 주변 조건에 대한 변수 및/또는 반응을 모니터링하기 위한 하나 이상의 센서를 더 포함할 수 있다.
- [0190] 칩은 당업자에게 익숙할 수 있는 임의의 적합한 물질로 제조될 수 있다. 이와 같은 물질, 적합하게 생체적합성 물질의 예는 실리콘, 폴리우레탄, 유리, 플라스틱, 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 폴리카보네이트, 폴리테트라

플루오로에틸렌(TEFLON. TM), 폴리비닐클로라이드(PVC), 폴리디메틸실록산(PDMS) 및 고무이다.

[0191] 칩은 또한, 산소 공급기, 펌프, 밸브, 가스-교환기 및 베블 트랩과 같은 추가 구성 요소를 요구에 따라 포함할 수 있다.

[0192] 다양한 종류의 인공 생체칩이 당업계에 설명되어 있다 - 예를 들어, 문헌[*Lab Chip* (2015) 15, 2688-2699 및 *Lab. Chip* (2013) 13, 3538] 참조.

[0193] 칩 상의 조직 또는 기관의 기능은 다양한 방법을 사용하여 평가될 수 있으며, 그 중 일부는 본원에서 설명된다. 예를 들어, 조직 또는 기관은 영상 기술을 사용하여 형태학적으로 모니터링될 수 있다. 폐 칩의 기능성은, 예를 들어 투과성 장벽 기능, 계면 활성제 제조 및 시토카인(cytokine)에 대한 반응을 측정함으로써 모니터링될 수 있다. 간 칩의 기능성은 다양한 분석을 사용하여 모니터링될 수 있으며, 그 중 일부는 본원에서 설명된다. 이와 같은 분석은 운반체 기능, 시토크롬 P450 발현 및 일부분 분비를 포함할 수 있다.

[0194] 간 기반 3차원 배양

[0195] 간은 무독화, 탄수화물, 지질 및 단백질의 대사뿐만 아니라 내인성 및 외인성 물질의 생체내 변환에 중심적인 역할을 한다. 간 기능성은 고도로 전문화된 세포의 어셈블리에 밀접하게 연결되어 있으며, 그의 대부분은, 소위 소엽으로 구성된 복잡한 3차원 구조에 내장된 간세포이다. 화합물의 생체내 변환은 통상적으로 비-독성 및 보다 가용성인 대사산물을 초래하지만, 때때로 보다 독성인 대사산물이 형성되어 간독성을 유발할 수 있다.

[0196] 콜라겐 샌드위치 배양물, 막 생물 반응기, 교반기 생물 반응기, 매달린 액적, 폴리스티렌 스캐폴드 배양의 사용을 포함하는, 당업계에 잘 기록된 다양한 방법을 사용하고 미세유체공학 장치를 사용하여 3차원 간 세포를 배양하는 것이 가능하다.

[0197] 간세포는 샌드위치 배양물, 폴리스티렌 스캐폴드와 같은 고체 스캐폴드 물질, 콜라겐 I형과 같은 하이드로겔의 사용을 포함하는 다양한 방법, 또는 구상체로 간세포의 자가-조립을 통해서 3차원으로 변화될 수 있다.

[0198] 제한된 새롭게 분리된 1차 인간 간세포의 사용이 본 개시의 바람직한 폐 세포 유형일 수 있지만, 이들의 이용 가능성은 제한적이다. 인간 간 세포주의 다른 선택은 HepG2와 Hep2/C3A를 포함한다. 특히 적합한 세포 원천은 HepaRG 세포주이다. 인간 간세포의 다른 원천은 인간 배아 줄기 세포(hESC) 유래 간세포 및 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)에서 유래된 간세포이다.

[0199] 3차원 간 구상체는 본 개시에서 특별히 사용된다. 그들은 집합체로 간세포의 자가-조립에 의해 다중 웨 플레이트의 스캐폴드 프리 시스템(scaffold free system)에서 또는 교반 생물 반응기에서 제조될 수 있다. 간 구상체는 내부에 간 유사 구조를 형성하고 장기간 동안 생존 가능하여 이를 고치리 용례 및 칩에서의 사용에 매우 적합한 양호한 기능성을 나타낸다.

[0200] 폐 기반 3차원 배양

[0201] 호흡 기관의 형태가 상부 기도로부터 하부 기도로 변화함에 따라, 많은 상이한 세포 배양 모델이 1차 세포 또는 세포주를 사용하여 확립되고 본 개시에서 사용하기 위해 고려된다. 정확히 어떤 세포 또는 세포주를 사용할지에 대한 선택은 주어진 연구에 대한 호흡 기관의 관심 영역에 의존할 것이다.

[0202] 칩 위의 폐(lung-on-a-chip) 모델은 살아있는 폐의 구조와 기능을 재현할 수 있다. 이와 같은 모델의 일 실시에서, 막에 의해 분리된 2 개의 밀접하게 나란히 놓여진 미세채널을 함유하는 미세유체 시스템이 제조될 수 있다. 막은 세포의 기질로 코팅될 수 있으며, 인간 폐포 상피 세포 및 인간 폐의 미세혈관 내피 세포는 막의 대향 측 부에서 배양될 수 있다. 일단 세포가 융합되도록 성장되면, 공기가 상피 구획으로 유입되어 폐포 공기 공간의 내벽을 모방하기 위해 공기-액체 계면을 생성한다.

[0203] 폐 표면이 공기에 노출되기 때문에, 세포 모델은 폐를 보다 사실적으로 모방하기 위해 공기-액체 계면에서 배양된다.

[0204] 스크리닝

[0205] 3차원 세포, 조직 또는 기관에 대한 하나 이상의 제제의 효과는 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 일 양태에서, 3차원 세포, 조직 또는 기관의 제제에 대한 반응을 평가하기 위한 시험관내 방법이 설명되며, 이 방법은: (i) 3차원 세포 또는 공동 배양물 또는 3차원 기관 배양 시스템 또는 3차원 다중-기관 배양 시스템을 적어도 하나의 제제와 접촉시키는 단계; 및 (ii) 적어도 하나의 제제와 접촉시킨 후에 하나 이상의 반응

을 측정하는 단계를 포함하며; 여기서 적어도 하나의 제제와 접촉시키기 전후의 하나 이상의 반응에서의 차이는 제제가 세포, 조직 또는 기관의 반응을 조절한다는 표시이다.

[0206] 또한, 3차원 간 세포, 조직 또는 기관 및 3차원 폐 세포, 조직 또는 기관의 제제에 대한 반응을 평가하기 위한 시험관내 방법이 설명되며, 이 방법은: (i) 공동 배양물, 또는 3차원 기관 배양 시스템, 또는 3차원 다중-기관 배양 시스템을 적어도 하나의 제제와 접촉시키는 단계; (ii) 적어도 하나의 제제와 접촉시킨 후에 하나 이상의 반응을 측정하는 단계를 포함하며; 여기서 적어도 하나의 제제와 접촉시키기 전후의 하나 이상의 반응에서의 차이는 제제가 세포, 조직 또는 기관의 반응을 조절한다는 표시이다.

[0207] 적합하게, 3차원 폐 세포, 조직 또는 기관 내로 적어도 하나의 제제의 침투가 측정되거나 결정된다. 적절하게, 3차원 간 세포, 조직 또는 기관에서의 적어도 하나의 제제의 생체-활성화가 측정되거나 결정된다. 이를 단계는 서로 동시에 또는 후속적으로 수행될 수 있다.

[0208] 3차원 폐 세포, 조직 또는 기관에 대한 하나 이상의 제제의 효과는 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 3차원 간 세포, 조직 또는 기관에 대한 하나 이상의 제제의 효과는 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 3차원 폐 세포, 조직 또는 기관 및 3차원 간 세포, 조직 또는 기관에 대한 하나 이상의 제제의 효과는 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 3차원 폐 세포, 조직 또는 기관으로의 에어로졸과 같은 제제의 침투 및 간 세포, 조직 또는 기관에서의 그의 추가의 생체-활성화에 대한 하나 이상의 제제의 효과는 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 제제는 약물, 독소, 병원균, 항원, 항체 및 에어로졸 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 제제는 본원에서 설명되는 3차원 배양 시스템에 첨가될 수 있으며, 3차원 배양된 세포, 조직 또는 기관에 대한 그의 효과가 모니터링되거나 결정될 수 있다. 측정될 수 있는 효과의 예는 산소 소모, 이산화탄소의 생성, 세포 생존 능력, 단백질의 발현, 효소의 활성, 침투, 투과성 장벽 기능, 계면 활성제 생성, 시토카인에 대한 반응, 운반체 기능, 시토크롬 P450 발현, 알부민 분비 등을 포함한다.

[0209] 복수의 분석은 다양한 농도에 대한 상이한 반응을 얻기 위해 상이한 농도의 제제와 병행하여 수행될 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 제제의 유효 농도를 결정하는 공정은 통상적으로 1:10으로부터 초래되는 농도의 범위 또는 다른 로그 척도의 희석을 사용한다. 농도는 필요하다면, 일련의 제2 희석으로 더욱 정제될 수 있다. 통상적으로, 이를 농도 중 하나는 음성 대조군으로서의 역할을 한다.

[0210] 제제(예를 들어, 시험 화합물)는 임의의 관심있는 화합물일 수 있고 작은 유기 화합물, 폴리펩티드, 웨티드, 고분자량 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지방산 및 지질, 에어로졸 또는 에어로졸의 하나 이상의 구성 요소 등일 수 있다. 시험 화합물은 개별적으로 또는 화합물의 세트 또는 조합 라이브러리(combinatorial library)로 스크리닝될 수 있다. 시험 화합물은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리를 포함하는 다양한 원천에서 얻어질 수 있다. 박테리아, 곰팡이, 식물 및 동물 추출물의 형태인 천연 화합물의 라이브러리가 사용될 수 있다. 종래의 화학적, 물리적 및 생화학적 수단을 통해 변형된 천연 또는 합성으로 제조된 라이브러리 및 화합물이 조합 라이브러리를 제조하는 데 사용될 수 있다. 공지된 약리학적 제제는 아실화, 알킬화, 에스테르화, 산성화와 같은 지시되거나 무작위적인 화학적 변형에 의해 스크리닝을 위한 구조적 유사체를 제조하도록 처리될 수 있다. 조합 라이브러리를 사용하여 스크리닝할 때, 화학적으로 유사하거나 다양한 분자의 대형 라이브러리가 스크리닝될 수 있다. 조합 스크리닝에서, 발견된 히트의 수는 시험된 분자의 수에 비례한다. 실험실 자동화 및 로봇 공학이 적용될 수 있는, 하루에 시험되는 수천 개의 화합물에 도달할 수 있는 상당수의 화합물이 스크리닝될 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법의 많은 예가 당업계에서 발견될 수 있다. 작은 유기 화합물은 약 5000 미만, 통상적으로 약 2500 미만, 일반적으로, 약 2000 미만, 보다 일반적으로 약 1500 미만, 적합하게 약 100 내지 약 1000의 문자량의 화합물을 포함한다. 작은 유기 화합물은 생물학적 또는 합성 유기 화합물일 수 있다. 작은 유기 화합물에 존재하는 원자는 일반적으로 탄소, 수소, 산소 및 질소를 포함하는 군에 속하며 약학적으로 허용 가능한 형태인 경우 할로겐, 봉소, 인, 셀레늄 및 황을 포함할 수 있다. 일반적으로, 산소, 질소, 황 또는 인이 존재한다면, 탄소 또는 하나 이상의 서로에 또는 수소에 결합되어, 예를 들어 카르복실 산, 알코올, 티올, 카르복사미드, 카르바메이트, 카르복실 산 에스테르, 아미드, 에테르, 티오에테르, 티오에스테르, 포스페이트, 포스포네이트, 올레핀, 케톤, 아민, 알데히드 등과 같은 다양한 작용기를 형성한다. 본원에서 사용되는 용어와 같은 작은 유기 화합물은 약 5000 미만의 문자량을 갖는 작은 웨티드, 작은 올리고뉴클레오티드, 작은 다당류, 지방산, 지질 등을 또한 포함한다.

[0211] 제약 제제의 예는 문헌[The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman, McGraw-Hill, New York, New York, (1996), 제9 판]에서 설명된다. 제제는 독소일 수 있다.

- [0212] 적합한 용매에 용해될 수 있는 용액 및 고체 샘플에서의 시험 화합물이 분석될 수 있다. 기체 형태의 시험 화합물은 또한 일정 기간 동안 샘플을 가스에 노출시킴으로써 분석될 수 있다. 관심있는 샘플은 환경 샘플, 생물학적 샘플, 제조 샘플, 화합물의 라이브러리 및 합성 및 천연 발생 화합물을 포함한다.
- [0213] 적어도 약 5,000, 보다 통상적으로 적어도 약 10,000의 문자량을 갖는 폴리펩티드가 스크리닝될 수 있다. 시험 폴리펩티드는 일반적으로 약 5,000 내지 약 5,000,000 또는 그 초과의 문자량, 보다 통상적으로 약 20,000 내지 약 1,000,000 문자량일 것이다. 유사한 구조적 특징을 갖는 폴리펩티드, 특정 생물학적 기능을 갖는 폴리펩티드, 특이적 미생물, 특히 질병 유발 미생물 관련된 폴리펩티드의 군과 같은 다양한 폴리펩티드가 고려될 수 있다. 이와 같은 폴리펩티드는 시토카인 또는 인터류킨, 효소, 프로타민, 히스톤, 알부민, 면역글로불린, 스클레로폴리펩티드(scleropolypeptide), 포스포폴리펩티드, 뮤코폴리펩티드, 크로모폴리펩타이드, 리포폴리펩타이드, 뉴클레오플리펩티드, 글리코펩티드, T-세포 수용체, 프로테오글리칸, 소마토트로핀, 프로락틴, 인슐린, 웨신, 인간 혈장에서 발견되는 폴리펩티드, 혈액 응고 인자, 혈액형 인자, 폴리펩티드 호르몬, 암 항원, 조직 특이 항원, 웨티드 호르몬, 영양 마커, 조직 특이 항원 및 당화되거나 되지 않을 수 있는 합성 웨티드를 포함한다.
- [0214] 폴리뉴클레오티드는 스크리닝될 수 있다. 시험 폴리뉴클레오티드는 천연 화합물 또는 합성 화합물일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 리보뉴클레오티드 및 데옥시리보뉴클레오티드 및 이들의 유도체와 같은 천연 뉴클레오티드로 구성되지만, 2'-변형 뉴클레오사이드, 웨티드 핵산 및 올리고머뉴클레오사이드 포스포네이트와 같은 비천연 뉴클레오티드 모방체가 또한 고려된다. 고분자량 폴리뉴클레오티드는 약 20 내지 약 5,000,000 개 이상의 뉴클레오티드를 가질 수 있다.
- [0215] 측정될 수 있는 하나 이상의 변수는 세포, 세포 이하의 물질, 세포 이하의 구성 요소, 또는 세포 생성물의 정량화 가능한 요소, 특히 고처리 분석 시스템에서 정확히 측정될 수 있는 요소를 포함한다. 산출물은 생존 능력, 호흡, 신진대사, 세포 표면 결정인자, 수용체, 단백질 또는 이의 입체 구조적 변형 또는 후변역 변형, 지질, 탄수화물, 유기 또는 무기 분자, DNA, RNA 등을 포함하는 임의의 세포, 세포 구성 요소 또는 세포 생성물 또는 이와 같은 세포 구성 요소로부터 유래된 일부의 특징, 조건, 상태 또는 기능일 수 있다. 변수(들)가 정량적 판독 값을 제공할 수 있지만, 몇몇 경우에 반-정량적 또는 정성적 결과가 얻어질 수 있다. 판독 변수는, 예를 들어 단일 값 또는 평균 값, 또는 중간 값 또는 그 분산을 포함할 수 있다.
- [0216] 다양한 방법을 사용하여 세포, 조직 또는 체제/시험 화합물에 대한 기관의 반응을 결정하기 위해 변수를 측정하는 데 사용될 수 있다. 존재하는 문자의 양을 측정하기 위한 하나의 방법은 형광, 발광, 방사성, 효소적 활성 등일 수 있는 검출 가능한 모이어티로 문자를 분류하는 것이다. 형광 및 발광 모이어티는 생체 문자, 구조 또는 세포 유형을 분류하는 데 이용될 수 있다. 면역형광 모이어티는 특정 단백질뿐만 아니라 특정 형태, 분해 생성물 또는 인산화와 같은 부위 변형에도 결합하도록 지시될 수 있다. 개별 웨티드와 단백질은 자동-형광으로 조작될 수 있다. 면역 조직 화학(immunohistochemistry), 방사 면역 검정(RIA) 또는 효소 결합 면역 흡착 측정(ELISA) 및 관련 비-효소적 기술과 같은 면역 분석 기술이 사용될 수 있다. 이를 기술은 리포터 문자로서 특이적 항체를 활용하는 데, 이는 단일 문자 표적에 부착하기 위한 그들의 고도의 특이성 때문에 특히 유용하다. 세포 기반 ELISA 또는 관련 비-효소적 또는 형광-기반 방법은 세포 표면 매개변수의 측정을 가능하게 한다.
- [0217] 스크리닝 분석의 결과는 기준 화합물, 농도 곡선, 대조군 등으로부터 얻은 결과와 비교될 수 있다. 체제는 연기 또는 연기로부터 유래되는 에어로졸과 같은 에어로졸일 수 있다.
- [0218] 에어로졸
- [0219] 일 구현에는 본원에서 설명되는 3차원 폐 세포, 조직 또는 기관 내로의 에어로졸과 같은 체제의 침투를 연구하는 것에 관한 것이다. 다른 구현에는 에어로졸과 같은 체제가 3차원 폐 세포, 조직 또는 기관으로 침투하고 간 세포, 조직 또는 기관에서 그의 추가의 생체-활성화를 연구하는 것에 관한 것이다. 특히, 이는 본원에서 설명되는 3차원 기관 배양 시스템에서 수행될 수 있다.
- [0220] 에어로졸은 에어로졸 형성 장치에 의해 유도되거나 생성될 수 있다. 흡연 물품 및 흡연 가능한 물품은 에어로졸 형성 장치들의 유형이다. 흡연 물품 또는 흡연 가능한 물품의 예는 궐련(cigarette), 엽궐련(cigarillos), 및 시가(cigar)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 에어로졸 형성 장치에서는, 연소 대신에, 담배 조성물 또는 다른 에어로졸 형성 물질이 하나 이상의 전기 가열 요소에 의해 가열되어 에어로졸을 생성한다. 다른 유형의 가열 에어로졸 형성 장치에서는, 가연성 연료 요소 또는 열원으로부터 물리적으로 분리되어 열원의 내부, 주위 또는 하류에 위치되는 에어로졸 형성 물질로 열이 전달되어 에어로졸이 생성된다. 통상적으로 가열식 흡연

물품에서, 에어로졸은 열원으로부터, 열원의 내부, 그 주위 또는 그 하류에 위치될 수 있는, 물리적으로 분리된 에어로졸 형성 기재 또는 물질로의 열 전달에 의해 발생된다. 흡연 동안, 휘발성 화합물이 열원으로부터의 열 전달에 의해서 에어로졸 형성 물질로부터 방출되고 흡연 물품을 통해 흡인된 공기에 비말동반된다. 방출된 화합물은 냉각되면서 응축되어 사용자에 의해 흡입되는 에어로졸을 형성한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 ‘에어로졸 형성 물질’은 휘발성 화합물을 가열할 때에 방출될 수 있는, 에어로졸을 형성할 수 있는 물질을 설명하는 데 사용된다. 에어로졸 형성 물질은 식물 기반일 수 있다. 에어로졸 형성 물질의 예는 담배 조성물, 담배, 담배 추출물, 대담배(cut tobacco), 각초(cut filler), 말린 담배, 팽화 담배(expanded tobacco), 균질화된 담배, 재생 담배, 및 파이프 담배들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 에어로졸 형성 물질은 대안으로, 비-식물 기반 함유 물질을 포함할 수 있다.

[0221] 에어로졸은 연기 형태일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 '연기'는 흡연 물품, 예컨대 궤련에 의해서, 또는 에어로졸 형성 물질을 연소하여 생성되는 에어로졸의 유형을 설명하는 데 사용된다. 연기는, 필요한 경우 연구를 위해 개별 화합물로 제공될 수 있는 다양한 제제를 포함한다. 이와 같은 제제의 예는 니코틴이 없는 전조 미립자 물질, 일산화탄소, 포름알데히드, 아세트알데히드, 아세톤, 아크릴레인, 프로피온알데히드, 크로톤알데히드, 메틸-에틸 케톤, 부틸알데히드, 벤조[[a]페렌, 폐놀, m-크레졸, o-크레졸, p-크레졸, 카테콜, 레조르시놀, 히드로퀴논, 1,3-부타디엔, 이소프렌, 아크릴로니트릴, 벤젠, 톨루엔, 피리딘, 퀴놀린, 스티렌, N'-니트로소노니코틴(NNN), N'-니트로소아나타빈(NAT), N'-니트로소시아나바신(NAB), 4-(메틸니트로 사미노) -1-(3-피리딜)-1-부탄온(NNK), 1-아미노나프탈렌, 2-아미노나프탈렌, 3-아미노비페닐, 4-아미노비페닐, 일산화질소(NO), 아산화질소(Nox), 시안화수소산, 암모니아, 비소, 카드뮴, 크롬, 납, 니켈, 셀레늄 및 수은을 포함한다.

[0222] 본 발명에서 설명되는 3차원 기관 배양 시스템은 다양한 양의 시간 동안 연기에 노출될 수 있다. 연기는 문헌 [Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol 304: L489-L503 (2013)]에서 설명된 바와 같은 Vitrocell 흡연 로봇을 사용하여 전달될 수 있다. 담배당 정의된 퍼프의 수 및 노출의 분당 정의된 퍼프의 수가 사용될 수 있으며 담배의 수는 노출 시간에 따라 조절되도록 변경될 수 있다. 기준 담배 3R4F와 같은 기준 담배는 흡연 체제 국제 표준화기구(ISO 2000)에 따라 흡연원으로서 사용되고 흡연 로봇에서 흡연될 수 있다. 노출 후, 3차원 기관 배양 시스템은 분석 전에 새로운 배양 배지와 선택적으로 인큐베이션될 수 있다.

[0223] 키트

[0224] 키트가 또한 고려된다. 본원에서 설명되는 배양 배지 또는 배양 배지들은 하나 이상의 적합한 용기에 충진될 수 있다. 적합한 용기는 멸균 가능한 플라스크 또는 멸균 가능한 병 또는, 밀봉 가능한 또는 재 밀봉 가능한 상단과 같은 상단을 포함하는 멸균 가능한 비이커일 수 있다. 따라서, 본 개시는 또한 본원에서 설명되는 배양 배지를 포함하는 용기에 관한 것이다. 본 개시는 또한 본원에서 설명되는 배양 배지를 포함하는 다중 용기에 관한 것이다. 또한, 본 개시는 선택적으로 배양 배지를 준비하기 위한 설명서와 함께 배양 배지를 포함하는 단일 또는 다중 플라스크 또는 병을 포함하는 패키지 또는 키트에 관한 것이다. 선택적으로, 본원에서 설명되는 하나 이상의 세포 유형이 패키지 또는 키트에 포함될 수 있다. 선택적으로, 하나 이상의 기준 담배가 패키지 또는 키트에 포함될 수 있다. 사용 설명서가 또한 포함될 수 있다.

[0225] 추가 양태

[0226] 본 개시의 추가 양태가 하기 번호의 단락에 제시된다:

[0227] 1. 분리된 3차원 간 구상체로서, 상기 구상체는: 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 ATP 함량; 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 동일한 또는 증가된 활성; 및 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된 알부민 분비를 갖는다.

[0228] 2. 공정에 의해 얻어지거나 얻어질 수 있는 3차원 다중-기관 배양 시스템에 사용하기 위한 분리된 3차원 간 구상체로서: 상기 공정은 3차원 간 구상체를 얻는 데 충분한 기간 동안 세포 배양 배지에서 3차원 간 구상체를 배양하는 단계를 포함하며, 상기 세포 배양 배지는: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되며, 상기 3차원 간 구상체에서: ATP 함량은 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가되며; 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 1B1의 활성은 완전한 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가되며; 알부민 분비는 월리엄스 E 배지에서 단독으로 배양된 3차원 간 구상체와 비교하여 증가된다.

- [0229] 3. 단락 1 또는 단락 2에 따른 분리된 3차원 간 구상체에 있어서, 상기 구상체는 인간 간 전구 세포주이거나 그로부터 유래하며, 적합하게, 상기 구상체가 HepaRG 세포이거나 이로부터 유래한다.
- [0230] 4. 단락 1 또는 단락 3에 따른 분리된 3차원 간 구상체에 있어서, 상기 구상체가 세포 배양 배지에서 배양되며, 상기 세포 배양 배지가: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다.
- [0231] 5. 이전의 단락들 중 어느 한 단락에 따른 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 포함하는, 공동 배양물.
- [0232] 6. 단락 5에 따른 공동 배양물에 있어서, 상기 공동 배양물이 세포 배양 배지에서 유지되며, 상기 세포 배양 배지가: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다.
- [0233] 7. 단락 1 내지 단락 4 중 어느 한 단락에 따른 분리된 3차원 간 구상체를 포함하는, 3차원 기관 배양 시스템.
- [0234] 8. 단락 1 내지 단락 4 중 어느 한 단락에 따른 분리된 3차원 간 구상체를 포함하고 적어도 하나의 다른 3차원 세포 유형을 더 포함하거나 단락 5 또는 단락 6에 따른 공동 배양물을 포함하는, 3차원 다중-기관 배양 시스템.
- [0235] 9. 단락 7에 따른 3차원 기관 배양 시스템 또는 단락 8에 따른 3차원 다중-기관 배양 시스템에 있어서, 3차원 간 구상체는 배양 시스템에 함유된 배양 배지에 침지된다.
- [0236] 10. 단락 8 또는 단락 9에 따른 3차원 다중-기관 배양 시스템에 있어서, 3차원 폐 상피 세포를 더 포함하며, 적합하게, 여기서 3차원 폐 상피 세포는 3차원 다중-기관 배양 시스템의 공기 액체 계면에 있다.
- [0237] 11. 3차원 다중-기관 배양 시스템으로서: (a) 배양 배지에서 제1 3차원 세포 유형을 침지시키도록 적응되는 제1 기관 공동을 포함하는 제1 기관 성장 구간; (b) 공기 액체 계면에서 제2 3차원 세포 유형을 배양하도록 적응되는 제2 기관 공동을 포함하고, 이때 제2 3차원 세포 유형은 제1 3차원 세포 유형과 상이한 제2 기관 성장 구간; 및 (c) 제1 기관 공동과 제2 기관 공동을 연결하여 그 사이에서 배양 배지의 유동을 허용하는 배양 배지 저장소를 포함한다.
- [0238] 12. 단락 11에 따른 3차원 다중-기관 배양 시스템에 있어서, 제1 기관 공동 및 제2 기관 공동은 동일한 배양 배지를 함유한다.
- [0239] 13. 단락 5 또는 단락 6에 따른 공동 배양물을 포함하는, 단락 11 또는 단락 12에 따른 3차원 다중-기관 배양 시스템.
- [0240] 14. 단락 7에 따른 3차원 기관 배양 시스템 또는 단락 8 내지 단락 13 중 어느 한 단락에 따른 3차원 다중-기관 배양 시스템에 있어서, 상기 시스템은 소형화되었다.
- [0241] 15. 단락 7 또는 단락 14에 따른 3차원 기관 배양 시스템, 또는 단락 8 내지 단락 14 중 어느 한 단락에 따른 3차원 다중-기관 배양 시스템에 있어서, 상기 시스템은 미세유체공학 장치를 포함하거나 미세유체공학 장치이며, 적합하게, 상기 시스템은 인공 생체칩이다.
- [0242] 16. 세포 배양 배지로서: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지와 완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지와 완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물을 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성된다.
- [0243] 17. 단락 1 내지 단락 4 중 어느 한 단락에 따른 3차원 간 구상체 또는 단락 5 또는 단락 6에 따른 공동 배양물을 더 포함하는, 단락 16에 따른 세포 배양 배지.
- [0244] 18. 배양 배지를 포함하는 3차원 다중-기관 배양 시스템으로서, 상기 배양 배지는: (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지 중 어느 하나 또는 이의 두 개 이상의 조합을 포함하거나, 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 배양 배지로 구성되는 그룹으로부터 선택된다.
- [0245] 19. 3차원 기관 배양 시스템에 사용하기 위한 3차원 간 구상체를 준비하는 방법으로서: 이 방법은 (i) 3차원 간 구상체를 제공하는 단계; (ii) (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 배양 배지와 3차원 간 구상체를 접촉시키는 단계; 및 (iii)

3차원 기관 배양 시스템에 사용하기 위한 3차원 간 구상체를 얻는 단계를 포함한다.

[0246] 20. 3차원 다중-기관 배양 시스템에 사용하기 위한 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 공동 배양물을 준비하는 방법으로서: 이 방법은 (i) 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 제공하는 단계; (ii) (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; 또는 (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는 배양 배지와 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 접촉시키는 단계; 및 (iii) 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 얻는 단계를 포함한다.

[0247] 21. 제제에 대한 3차원 간 구상체의 반응을 평가하기 위한 시험관내 방법으로서: 이 방법은 (i) 적어도 하나의 제제와 단락 1 내지 단락 4 중 어느 한 단락에 따른 3차원 간 구상체 또는 단락 5 또는 단락 6에 따른 공동 배양물 또는 단락 7, 단락 14 또는 단락 15에 따른 3차원 기관 배양 시스템, 또는 단락 8 내지 단락 15 중 어느 한 단락에 따른 3차원 다중 기관 배양 시스템을 접촉시키는 단계; 및 (ii) 적어도 하나의 제제와 접촉 한 후 3차원 간 구상체 또는 공동 배양물 또는 3차원 기관 배양 시스템 또는 3차원 다중 기관 배양 시스템의 하나 이상의 반응을 측정하는 단계를 포함하며; 여기서 적어도 하나의 제제와의 접촉 전후의 적어도 하나의 반응의 차이는 제제가 세포의 반응을 조절하는 표시이다.

[0248] 22. 제제에 대한 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포의 반응을 평가하는 시험관내 방법으로서: 이 방법은 (i) 적어도 하나의 제제와 단락 5 또는 단락 6에 따른 공동 배양물 또는 단락 7, 단락 14 또는 단락 15에 따른 3차원 기관 배양 시스템, 또는 단락 8 내지 단락 15 중 어느 한 단락에 따른 3차원 다중 기관 배양 시스템을 접촉시키는 단계; 및 (ii) 적어도 하나의 제제와 접촉한 후 공동 배양물 또는 3차원 기관 배양 시스템 또는 3차원 다중 기관 배양 시스템의 하나 이상의 반응을 측정하는 단계를 포함하며; 여기서 적어도 하나의 제제와의 접촉 전후의 하나 이상의 반응의 차이는 제제가 세포의 반응을 조절하는 표시이다.

[0249] 23. 단락 22에 따른 시험관내 방법에 있어서, 여기서, 단계 (ii)는 3차원 폐 상피 세포 내로 적어도 하나의 제제의 침투를 측정하는 것을 포함한다.

[0250] 24. 단락 23에 따른 시험관내 방법에 있어서: (iii) 3차원 간 구상체에서 적어도 하나의 제제의 생체-활성화를 측정하는 단계를 더 포함하며; 여기서, 단계 (ii) 및 단계 (iii)에서의 측정은 동시에 수행되거나 상기 단계 (iii)에서의 측정은 단계 (ii)에서의 측정 후에 수행된다.

[0251] 25. 단락 22 내지 단락 24 중 적어도 한 단락에 따른 시험관내 방법에 있어서, 여기서, 제제는 에어로졸이며, 적합하게, 여기서, 에어로졸은 연기, 적합하게 담배 연기이거나 이로부터 유래한다.

[0252] 26. 세포 배양 배지의 용도로서: 3차원 간 구상체 또는 3차원 폐 상피 세포를 배양하거나 3차원 간 구상체 및 3차원 폐 상피 세포를 공동 배양하기 위한, (a) 완전한 PneumaCult-ALI 배지; 또는 (b) 완전한 B-ALI 배지; (c) 완전한 PneumaCult-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지, 또는 (d) 완전한 B-ALI 배지 및 완전한 월리엄스 E 배지를 포함하거나 이들로 구성되거나 필수적으로 구성되는, 세포 배양 배지의 용도.

[0253] 27. 독성 시험을 위한 또는 약물 발견을 위한 또는 폐 세포 내로의 제제 침투를 결정하기 위한 및/또는 적합하게, 여기서 제제가 에어로졸인, 간세포에서 제제의 생체-활성화를 결정하기 위한 단락 7, 단락 14 또는 단락 15에 따른 3차원 기관 배양 시스템 또는 단락 8 내지 단락 15 중 어느 한 단락에 따른 3차원 다중-기관 배양 시스템의 용도.

[0254] 본 발명의 예시적인 구현예가 첨부 도면을 참조하여 본 발명에서 상세히 개시되었지만, 본 발명은 정확한 구현 예에 한정되지 않으며 첨부된 청구범위 및 그의 균등물에 의해 정해지는 바와 같은 본 발명의 범주를 벗어남이 없이 다양한 변경 및 수정이 당업자에 의해 본 발명에서 실시될 수 있음이 이해될 것이다.

[0255] 본 발명은 발명을 더 상세히 설명하기 위하여 제공되는 하기 실시예에서 추가적으로 설명된다. 본 발명을 수행하기 위하여 현재 고려되는 바람직한 형태를 제공하는 이를 실시예는 본 발명을 제한하는 것이 아닌 예시하도록 의도된 것이다.

실시예

실시예 1

기관지 기관형 배양물의 준비

이들은 Clonetech™ B-ALI™ 공기-액체 계면 배지란 명칭의 Lonza (스위스, 바젤)로부터의 프로토콜에 따라 준

비된다. 간단히 말하면, 정상 인간 기관지 상피 세포(NHBEC)는 약 80%의 융합 시까지 37°C의 5% CO₂(90% 상대 습도)에서 완전한 B-ALI 배지로 확장된다. 세포가 트립신화되고, 세척되고, 재현탁된다. 35,000 개의 세포가 콜라겐-I-코팅된 Transwell® 인서트(Corning®, 로트 랭엔볼트, 스위스)에 시딩되고 인서트가 완전한 B-ALI 배지(Lonza)로 사전 충진된 다중 웰 플레이트에 넣고 3 일간 인큐베이션된다. 그 후 정점 배지가 제거되고, 기본 배지가 완전한 B-ALI 배지로 대체된다. 에어-리프팅된 인서트는 인큐베이터로 복귀되며, 배지는 2 내지 3 일마다 교체된다. 또한, 정점 세척(apical wash)은 성숙 단계 동안 일주일에 한 번 수행된다. 배양은 통상적으로 에어-리프트 이후 4 주에 한 번 성숙으로 사용된다. 형태학적 평가, ATP 함량의 측정, 정점 ATP 분비 및 CYP1A1/B1 활성은 성숙 후 최대 4 주 동안 매주 수행된다(도 1 참조). 조직학적 평가 및 ATP 함유량 측정 전용 인서트를 제외하면, 모든 인서트는 시간 경과에 따라 재사용된다.

[0260] 실시예 2

[0261] 간 구상체의 준비

간 구상체는 InSphero의 GravityTRAP™ ULA Plate 매뉴얼에 설명된 대로 준비된다. 간단히 말하면, HepaRG 세포가 먼저 37°C에서 2 분간 해동된 다음, Thaw, Plate & General Purpose 보충물(ThermoFisher Scientific, ref. HPRG770) 및 GlutaMAX 용액(ThermoFisher Scientific, ref. 35050061)으로 보충된 9 ml의 예열된 월리엄스 E 배지(ThermoFisher Scientific, ref. 12551032)에 혼합된다. 그 후 세포는 배지를 상기 설명된 바와 같이 동일한 보충물을 갖는 신선한 월리엄스 E 배지로 교체하기 이전에 400 x g에서 2 분간 원심 분리된다. Corning® 구상체 마이크로플레이트(ref. 4520)의 웰당 약 5000 개의 세포가 분배된다. 5 일 후, 배지는 HepaRG Maintenance & Metabolism 보충물(ThermoFisher Scientific, ref. HPRG720) 및 GlutaMAX 용액(ThermoFisher Scientific, ref. 35050061)으로 보충된 새로운 월리엄스 E 배지(ThermoFisher Scientific, ref. 12551032)로 대체된다. 1 주일 후, 구상체는 성숙되고 실험에 사용될 준비가 된다.

[0263] 실시예 3

[0264] 기관지 기관형 배양물과 간 구상체의 형태를 결정

기관지 기관형 배양물의 형태학은 이전에 문헌[Toxicol Sci. 2015 Sep; 147 (1) : 207-21]에서 설명된 바와 같이 해마톡실린과 에오신(H&E) 및 알시안 블루(Alcian blue)로 고정 및 파라핀 포매, 구획 및 염색 후 평가된다.

간 구상체 형태는 면역 염색법 후에 평가된다. 간단히 말해서, 간 구상체는 밤새 4 %의 신선한 파라포름알데히드에 고정된다. 1% 트리톤 X-100/0.2% 어피 젤라틴(FSG)에서 블로킹한 후, 구상체를 0.1% FSG로 PBS에서 24 시간 회석한 마우스 항-시토케라틴(cytokeratin) 19(1/500, Abcam, Cambridge, UK)로 염색한다. 1차 항체는 FITC-분류된 염소 항-마우스 항체(1/500, Abcam)를 사용하여 가시화된다. 그 후 구상체는 DAPI(Thermo Fisher)가 있는 ProLong Diamond antifade를 사용하여 장착되고 Cellinsight™ CX7 플랫폼(Thermo Fisher)에서 고화질 영상에 의해 평가된다.

[0267] 실시예 4

[0268] 기관지 기관형 배양물과 간 구상체의 ATP 함량 결정

이는 제조업체의 권고에 따라 CellTiterGlo® 3D 세포 생존 능력 분석(Promega, 뒤벤도르프, Switzerland)을 사용하여 결정된다.

기관지 배양물에서의 측정을 위해, 회석되지 않은 CellTiterGlo® 시약을 배양물에 직접 첨가하여 세포내 ATP 함량을 산출한다.

간 구상체의 분석을 위해, CellTiterGlo® 시약이 먼저 월리엄스 E 배지(1:1(V/V))에 회석되고, 그 후에 구상체 플레이트의 웰에 첨가된다. 따라서, 간 구상체에서의 ATP 측정은 세포내 및 세포외 ATP 함량(즉, 총 ATP)을 설명한다. 발광은 CellTiterGlo® 시약을 첨가한 후 30 분에 FLUOstar Omega 플레이트 판독기(BMG Labtech, 오른텐베르크, 독일)를 사용하여 기록된다.

[0272] 실시예 5

[0273] 기관지 기관형 배양물과 간 구상체의 ATP 분비를 결정

기관지 기관형 배양물의 기도 표면 액체(ALS)로의 ATP 분비는 저장(5.2 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM 글루코스, 10 mM TES, pH 7.4) 식염액을 첨가한 후에 측정된다. 간단히 말해서, 배양물을 먼저 PBS로 세

척한 다음, 등장성 식염수로 5 분간 처리한다. 그 후, 정점 용액을 신중히 수집한다. 60 분 후, 배양물을 5 분간 저장성 용액으로 정점 처리 한 후에 정점 용액을 조심스럽게 수집한다. 수집된 ASL 샘플의 ATP 함량은 ENLITEN® ATP 분석 시스템(Promega)을 사용하여 측정된다. 발광은 FLUOstar Omega 플레이트 판독기(BMG Labtech)를 사용하여 기록된다. ATP 농도는 표준 곡선으로부터 추정된다.

[0275] 실시예 6

[0276] 유전자 발현 분석

[0277] RNA는 miRNeasy Mini 키트(QIAGEN, 헬렌, 독일)를 사용하여 폐 및 간 조직으로부터 준비된다. cDNA는 RT2 제1 스트랜드 키트를 사용하여 준비되고 Phase I Enzymes RT2 Profiler PCR Array(QIAGEN)에 혼합하도록 플레이팅하기 전에 RT² qPCR Mastermix에 혼합된다. qPCR은 ViiA™ 7 Real-Time PCR System(Thermo Fisher)을 사용하여 수행되며, 데이터는 QIAGEN에서 제공된 설명서에 따라 분석된다. 조정되지 않은 p-값 <0.05 (t-test)으로의 폴드 변화는 통계적으로 유의미하다고 간주된다.

[0278] 실시예 7

[0279] CYP1A1/B1, CYP1A2 및 CYP2B6 효소의 유도성 및 활성 측정

[0280] 두 배양 시스템의 대사 능력은 제조사의 설명서에 따라 P450-Glo Assays(Promega)를 사용하여 CYP1A1/B1, CYP1A2 및 CYP2B6 효소의 유도성 및 활성을 조사함으로써 추가로 확인된다. CYP 활성은 10 nM 2,3,7,8-테크랄로로디벤조다이옥신(TCDD)과 25 μM 리팜피신(Sigma-Aldrich, 부크스, 스위스)의 조합에 대한 측정 48 시간 전에 유도된다. 각각 CYP1A1/B1 및 CYP2B6 활성을 억제하기 위해 20 μM α-나프토플라본과 10 μm 플루복사민 말레이트(fluvoxamine maleate)(Sigma)가 사용된다. 측정이 완료되면, 조직을 PBS로 두 번 세척하고 인큐베이터로 복귀된다.

[0281] 실시예 8

[0282] 알부민 분비 측정

[0283] 간 구상체에 의한 알부민 분비가 Human albumin ELISA 키트(Abcam)를 사용하여 마지막 배지 변경 48 시간 후에 정량화된다. 동일한 세포 배양 보충물이 Human α-GST ELISA 키트(LuBioScience, 루체른, 스위스에 의해 배포된 Wuhan EIAab)를 사용하여 α-GST의 방출에 대해 분석된다.

[0284] 실시예 9

[0285] 세포독성과 세포사멸 측정

[0286] ApoTox-Glo™ triplex assay(Promega, 뒤벤도르프, 스위스)는 손상된/파괴 및 사멸 세포의 수를 결정하는 데 사용된다. 세포는 먼저, 손상된 세포의 수를 정량화하기 위해 비스-알라닐-알라닐-페닐알라닐-로다민 110(bis-AAF-R110)으로 30 분간 인큐베이션된다. 그 후, 동일한 구상체가 사멸 세포의 수를 측정하기 위해 특정 카스파제 3/7 시약으로 인큐베이션된다.

[0287] 실시예 10

[0288] PneumaCult-ALI 배지와 월리엄스 E 배지의 혼합물의 준비.

[0289] 완전한 PneumaCult-ALI 배지는 PneumaCult-ALI 기본 배지(StemCell Technologies, ref. 05002)와 PneumaCult-ALI 10X 보충물(StemCell Technologies, ref. 05003), PneumaCult-ALI 유지 보충물(StemCell Technologies, ref. 05006), Hydrocortisone Stock Solution(StemCell Technologies, ref. 07925) 및 PBS(StemCell Technologies, ref. 37250)의 0.2 % 혼합물을 혼합함으로써 준비된다.

[0290] 월리엄스 E 배지(ThermoFisher Scientific, ref 12551032)는 완전한 월리엄스 E 배지를 제공하기 위해 HepaRG Maintenance & Metabolism Supplement(ThermoFisher Scientific, ref. HPRG720) 및 GlutaMAX 용액(ThermoFisher Scientific, ref. 35050061)으로 보충된다.

[0291] 완전한 PneumaCult-ALI 배지는 완전한 월리엄스 E 배지와 다양한 백분율로 혼합되어 70/30 내지 100/0% v/v) 범위의 완전한 PneumaCult-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물을 제공한다.

[0292] 실시예 11

[0293] 완전한 B-ALI 배지와 월리엄스 E 배지의 혼합물.

- [0294] 완전한 월리엄스 E 배지는 실시예 1에서 설명된 대로 준비된다.
- [0295] 완전한 B-ALI 배지는 B-ALI BulletKit™(Lonza, ref. 193514)의 성분을 조합하여 준비된다. 완전한 B-ALI 배지는 70 내지 100%의 다양한 백분율의 B-ALI 배지에서 완전한 월리엄스 E 배지와 혼합된다. 완전한 B-ALI 배지를 완전한 월리엄스 E 배지와 다양한 백분율로 혼합하여 70/30 내지 100/0%(v/v)의 완전한 PB-ALI 배지/완전한 월리엄스 E 배지를 제공한다.
- [0296] 실시예 12
- [0297] 다른 배양 배지의 영향 결정
- [0298] 다른 배지 및 그들의 희석 효과가 37°C에서 5% CO₂ 및 90%의 상대 습도로 세포를 배양함으로써 9 일 기간 동안 평가된다.
- [0299] 상이한 배지 및 그들의 희석 효과가 9 일 기간 동안 평가된다. HepaRG 세포는 먼저, Thaw, Plate, & General Purpose Supplement(Thermo Fisher Scientific, ref. HPRG770) 및 GlutaMAX 용액으로 보충된 월리엄스 E 배지를 사용하여 Corning® Spheroid Microplates에 시팅된다. 1 주 성숙 후, PneumaCult-ALI 배지 또는 B-ALI 분화 배지와 Maintenance & Metabolism Supplement로 보완된 월리엄스 E 배지의 혼합물로 교환된다. 완전한 월리엄스 E 배지에서 희석된 완전한 PneumaCult-ALI 또는 B-ALI의 백분율은 70%, 80%, 90% 및 100%였다. 9 일 후, 구상체가 실험에 사용된다. 배지 혼합물로 얻은 모든 결과는 완전한 월리엄스 E 배지에서만 유지되는 구상체와 비교된다.
- [0300] 실시예 13
- [0301] 총 글루타티온 수준 측정
- [0302] GSH/GSSG-Glo 분석(Promega, 뒤벤도르프, 스위스)은 항산화제 용량의 마커로서 총 글루타티온 수준을 결정하는데 사용된다. 이와 같은 분석에서, 구상체는 총 글루타티온 완충제(GSH + GSSG) 또는 산화된 글루타티온 완충제(GSH)와 함께 30 분 동안 인큐베이션된다. 루시페린 검출 시약을 첨가한 후, 발광이 FLUOstar Omega 플레이트 판독기로 측정된다. 분석으로 총 GSH + GSSG와 GSSG의 측정 값을 허용하므로, 샘플의 GSH 양을 추정할 수 있다.
- [0303] 실시예 14
- [0304] 수행된 몇몇 실험 결과가 표 1에 요약된다.
- [0305] 실시예 15
- [0306] 간 구상체의 ATP 함량
- [0307] 완전한 Pneumacult-ALI 배지 또는 완전한 B-ALI 배지를 사용할 때 모든 조건에서 유의미한($P<0.05$) ATP 증가가 발견된다. 최고 ATP 함량은 70%, 80% 및 90% 완전한 Pneumacult-ALI 배지를 사용할 때 유사한 ATP 함량으로 100% 완전한 Pneumacult-ALI 배지에서 구상체를 유지할 때 나타난다. 완전한 B-ALI 배지에서 유지되는 구상체의 ATP 함량은 완전한 Pneumacult-ALI 배지에서 배양된 구상체의 경우와 비교하여 항상 낮으며, 완전한 B-ALI 배지의 100 %에서 유지되는 구상체의 경우 최저치가 얻어진다.
- [0308] 실시예 16
- [0309] 간 구상체의 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 B1 활성
- [0310] 시토크롬 P450 1A1과 시토크롬 P450 B1의 활성은 완전한 월리엄스 E 배지와 완전한 B-ALI 배지의 혼합물 또는 완전한 월리엄스 E 배지와 완전한 Pneumacult 배지의 혼합물에서 배양된 유도된 구상체에서 상당히($P<0.05$) 증가하였다. 100% 완전한 B-ALI™ 배지에서 유지되는 유도된 구상체에서, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 B1 활성은 완전한 월리엄스 E 배지에서 배양된 구상체의 활성과 유사하다. 기본 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 B1 활성은 또한 완전한 Pneumacult-ALI 또는 완전한 B-ALI™ 배지의 70%와 80%로 유지되는 샘플에서 상당히($P<0.05$) 더 높았다.
- [0311] 실시예 17
- [0312] 손상된/괴사성 간 구상체 수의 평가
- [0313] 70% 완전한 Pneumacult-ALI 조건을 제외하면, 완전한 월리엄스 E 배지 및 완전한 Pneumacult-ALI 배지/완전한

B-ALI 배지 혼합물과의 9 일 인큐베이션은 손상/괴사성 세포의 수를 상당히($P<0.005$) 증가시킨다. 또한, 완전한 Pneumacult-ALI 배지/완전한 B-ALI 배지의 증가량은 괴사성 세포 수의 증가를 초래한다. 손상/괴사성 세포의 수는 완전한 Pneumocult-ALI 혼합물과 비교하여(유사한 %의 혼합물과 비교할 때) 완전한 B-ALI 혼합물을 사용할 때 상당히($P<0.05$) 더 높다. 표준 조건을 제외하고, 70% 완전한 Pneumacult-ALI를 함유하는 배지 혼합물에 의해 최저 수의 괴사성 세포가 얻어졌다.

[0314] 모든 배지 혼합물은 사멸 세포의 수를 상당히 증가시키고($P<0.05$), 완전한 월리엄스 E-배지 및 완전한 Pneumacult-ALI 배지에서 배양된 구상체에서 최고 수가 나타났다. 완전한 월리엄스 E 및 완전한 B-ALI 배지에서 유지되는 구상체에서의 사멸 세포의 수는 완전한 월리엄스 배지 및 완전한 Pneumacult-ALI 배지 혼합물에 비해(유사한 %의 혼합물에 비교할 때) 70%, 80 % 및 100% 혼합물에 대해 상당히($P<0.05$) 더 작다. 사멸 세포의 최저 수를 허용하는 조건이 100% B-ALI 배지에 의해 얻어졌다.

실시예 18

간 구상체의 글루타티온(GSH) 및 산화 글루타티온(GSSG) 수준

[0317] 완전한 월리엄스 E 배지와 완전한 Pneumacult-ALI 배지/완전한 B-ALI 배지의 다양한 혼합물에서 9 일 동안 간 구상체를 배양하면, GSH의 수준은 완전한 월리엄스 E 배지와 비교하여 70% 및 80% 완전한 Pneumacult -ALI 배지의 배양에서 상당히($P<0.05$) 더 높았다. 완전한 Pneumacult-ALI 배지의 양이 많을수록 GSH 함량은 더 증가하지 않고 이들을 감소시킨다. 유사하게, GSH 수준은 완전한 월리엄스 E 배지 단독에 비해 70% 완전한 B-ALI 배지를 갖는 혼합물에서 유지된 구상체에서 상당히($P<0.05$) 더 높다. 완전한 Pneumacult-ALI 배지에서와 같이, GSH 함량은 완전한 B-ALI 배지의 양이 증가함에 따라 감소하고, 결국 (100% 완전한 B-ALI 배지에서) 월리엄스 E 배지에서 배양된 구상체에서 볼 수 있는 미만의 값에 도달한다.

[0318] 동일한 분석으로, GSSG 함량이 또한 측정된다. GSSG는 사용된 완전한 Pneumacult-ALI 배지/완전한 B-ALI 배지의 유형 또는 그의 농도와 무관하게, 100% 완전한 월리엄스 E 배지에 비교된 완전한 Pneumacult-ALI 배지/완전한 B-ALI 배지와 완전한 월리엄스 E 배지의 혼합물에 유지되는 간 구상체에서 상당히 더 높다. GSSG 함량이 완전한 월리엄스 E 배지에서만 유지된 구상체의 함량보다 완전한 월리엄스 E 배지 및 완전한 B-ALI 배지 혼합물에서 배양된 구상체에서 단지 약간 상승되지만, GSSG 함량은 완전한 월리엄스 E 배지와 완전한 Pneumacult-ALI 배지 혼합물에서 유지되는 구상체에서 강하게 증가된다.

실시예 19

간 구상체의 알부민 분비

[0321] 완전한 월리엄스 E 배지에서 유지되는 구상체의 알부민 분비가 예상 결과(예상치: 15 내지 30 pg/일/세포; 얻어진 수치: 4 pg/일/세포(Gunness et al., 2013))보다 낮지만, 시험된 모든 배지 혼합물에 대해 알부민 방출의 상당한 증가($P<0.05$)가 측정되었다. 70%, 80% 및 90% 완전한 월리엄스 E 및 완전한 Pneumacult-ALI 배지/완전한 B-ALI 배지에서 유지되는 구상체의 분비된 알부민은 (동일한 %에서 비교할 때) 완전한 B-ALI™ 배지에서 유지된 것보다 완전한 Pneumacult-ALI 배지에서 유지된 구상체가 상당히($P<0.05$) 더 높다.

실시예 20

유전자 발현

[0324] 3차원 기관형 폐 배양물에서 1상 약물 대사 효소-암호화 유전자의 발현에 대한 폴드 조절이 1, 2, 3 및 4 주에서 평가된다. 유전자 발현은 TCDD와 리팜피신으로 48 시간 동안 처리된 폐 배양물($n=3$)와 미처리된 배양물($n=3$) 사이에서 비교되며, 폴드 변화가 계산된다. 도 7에 도시된 모든 유전자는 TCDD 및 리팜피신의 존재 하에서 3 주 차에 상향 조절된다. 도 7에 도시된 모든 유전자는 TCDD 및 리팜피신 존재 하에서 4 주차에 하향 조절된다.

실시예 21

폐 구상체을 생성하는 데 사용되는 플레이트

[0327] 구상체를 형성하는 데 사용되는 플레이트는 Corning® spheroids microplate(Corning®, ref. 4520)로 명명된다. 구상체(HepaRG)를 준비하는 데 사용되는 세포는 해동되고, 즉시 이를 플레이트에 시팅된다. 웰이 초기 접착 표면으로 코팅되기 때문에, 세포는 부착되지 않고 대신 응집된다. 일주일 후, 세포는 실험을 위해 추가로 사용될 수 있는 구상체를 형성한다. CYP 유도(대사 마커), 알부민 분비(대사 및 건강 마커) 및 ATP 함량(건강 마커)이 모두 증가되며, 이는 구상체가 InSphero의 웰과 비교할 때 이를 웰에서 보다 건강하다는 것을 의미한다. 임의의

이론에 구속되지 않지만, 이는 Corning[®] 구상체 마이크로플레이트에 함유될 수 있는 배양 배지의 증가된 용적으로 인한 것일 수 있다. 알파 GST의 분비는 InSphero에 비해 Corning[®] 플레이트를 사용하여 크게 감소된다.

[0328] CYP 유도성은 2 주 초과 동안 유지된다(InSphero CYP 유도성은 단지 2 주 동안 유지되는 반면에 이는 Corning[®]에서 4 주 동안 유지된다). ATP 함량은 처음 3 주 동안 30% 증가하고 4 주차에 40% 증가한 것으로 발견된다. 일부민 분비는 또한, 2 주(10% 더 높음)와 3 주(20%)에서 더 높았지만, 그 후 InSphero 플레이트와 유사한 값에 도달한다. 알파 GST 방출에 대해서, 4 주(50% 감소)와 5 주(63% 감소)에서 큰 차이가 나타난다.

[0329] 실시예 22

[0330] 결과 요약

[0331] 본 연구에서, 4 주간의 건강, 형태 및 대사 활동에 대한 폐 및 간의 3차원 기관형 배양물이 연구되었다. 그 결과로써: 공기-액체 계면에서 유지되는 3차원 기관지 배양물은 3 주까지 안정된 ATP 함량을 가지며 시험 기간에 걸쳐 형태학적 변화를 나타내지 않았다. 이들은 4 주 기간 동안 자극에 반응하여 ATP를 생성하는 능력을 보유한다. 또한, 3차원 기관지 배양물은 2 및 3 주에서 더 높은 CYP1A1/B1 활성을 나타내는 반면에, 여러(전부는 아님) 대사 효소-암호화 유전자의 발현이 시험 기간전체에 걸친 유도 이후에 증가된다(도 7 참조). HepaRG 구상체는 시험 기간에 걸쳐 ATP 함량 및 CYP1A1과 1A2 유도성이 감소하고 α-GST 방출이 최소한으로 증가하지만, 안정된 형태를 가진다. 예상외로, 일부민 분비는 배양 첫 주 후에 급격히 감소한다.

[0332] 완전한 월리엄스 E 배지 및 완전한 Pneumacult-ALI 배지 혼합물에서 9 일 동안 구상체를 유지하면, ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 B1 유도성 및 분비된 일부민이 완전한 월리엄스 E 배지 조건에 비해 모두 개선된다. 동시에, 괴사성 또는 사멸 세포의 수 및 GSH/GSSG 비율은 산화 스트레스의 결과일 수 있는 혼합물에 의해 부정적인 영향을 받는다. 완전한 월리엄스 E 배지 및 완전한 B-ALI 배지 혼합물로 수행된 시험은 또한 완전한 월리엄스 E 배지와 비교하여 ATP 함량, 시토크롬 P450 1A1 및 시토크롬 P450 B1 유도성 및 분비된 일부민의 증가를 보여준다. 공동 배양을 위한 완전한 Pneumacult-ALI 배지의 사용은 본 개시의 특정 구현예에 적합하다. 본 개시의 일 양태가 상호 연결된 폐 조직과 간 조직을 갖는 칩 시스템의 2 개의 기관에 관한 것이므로, 100% 완전한 Pneumacult-ALI 배지를 사용하면 임의의 추가적인 최적화없이 폐 배양물을 사용할 수 있다. 간 구상체가 100% 완전한 Pneumacult-ALI 배지에서 유지되는 것으로 나타나기 때문에, 이는 다중-인공 생체칩 시스템에서의 공동 배양에 적합한 조건이다.

[0333] 본원에 인용된 또는 설명된 간행물은 본 출원의 출원일에 앞서 개시된 관련 정보를 제공한다. 본원에서 언급된 것은, 발명자가 이와 같은 개시보다 선행하하도록 명명하지 않는 것을 인정하는 것으로 해석되지 않는다. 상기 명세서에서 언급된 모든 간행물은 본원에 참조로 인용된다. 본 발명의 다양한 수정 및 변형은 본 발명의 범위 및 사상에서 벗어나지 않고서 당업자에게 명백하게 될 것이다. 본 발명이 특정 바람직한 구현예와 관련하여 설명되었지만, 청구범위에 기재된 발명은 이와 같은 특정 구현예에 부당하게 한정되지 않아야 하는 것이 이해되어야 한다. 실제로, 세포 및 분자 생물학 또는 관련 분야의 당업자에게 자명한 본 발명을 실시하기 위한 설명된 형태의 다양한 변형이 다음 청구범위 내에 속하도록 의도된다.

표 1

각각의 배양 배지에서 얻은 결과의 비교. 풀드 변화는 월리엄스 E 배지 단독
에 비교된 것으로서 표시된다.

	70% P	80% P	90% P	100% P	70% B	80% B	90% B	100% B
CYP 유도	29	25	23	21	21	24	19	10
ATP 함량	28	27	29	27	21	24	21	15
일부민	25	31	26	33	20	21	18	19

B = 70%, 80%, 90% 및 100%(v/v)에서의 원천한 B-ALI[™] 배지. 70%, 80%
및 90%(v/v)에서, 나머지 용액은 월리엄스 E 배지로 최대 100%(v/v)까지 구성된다.

P = 70%, 80%, 90% 및 100%(v/v)에서의 PneumaCult-ALI 배지. 70%,
80% 및 90%(v/v)에서, 나머지 용액은 월리엄스 E 배지로 최대 100%(v/v)까지 구성
된다.

[0334]

표 2

필리엄스 B 배지의 조성

성분	분자량	농도(mg/L)	nM
9미노산			
글리신	76.0	50.0	0.6666667
L-달라닌	89.0	90.0	1.011236
L-아르기닌	174.0	50.0	0.28755632
L-아스파라간-H ₂ O	150.0	20.0	0.13333334
L-아스파르트 산	138.0	30.0	0.2255391
L-시스테인	121.0	40.0	0.3905785
L-시스チン HCl	313.0	26.07	0.08239073
L-글루탐 산	147.0	50.0	0.34013805
L-하이드록시	155.0	15.0	0.09977419
L-아소록산	131.0	50.0	0.3616794
L-류신	131.0	75.0	0.57251906
L-코아신 히아이드로콜로라이트	183.0	87.46	0.47792348
L-에티오닌	148.0	15.0	0.10087114
L-페닐알라닌	165.0	25.0	0.15151516
L-프로린	115.0	30.0	0.26069556
L-세린	105.0	10.0	0.0952381
L-트레오닌	119.0	40.0	0.3813446
L-트립토판	204.0	10.0	0.04901961
L-티로신 디스톨 염 이수화물	261.0	50.65	0.19406131
L-발린	117.0	50.0	0.42735043

[0335]

성분	분자량	농도(mg/L)	nM
비타민			
아스코르브 산	176.0	2.0	0.011363637
비오틴	244.0	0.5	0.0020491802
염화 풀린	140.0	1.5	0.0107142486
D-질수 판토테네이트	477.0	1.0	0.002099436
에르고칼시페롤	397.0	0.1	2.518917E-4
엽산	441.0	1.0	0.002875737
메나다온 증강산 나트륨	276.0	0.01	3.6231882E-5
나이신이미드	122.0	1.0	0.000196721
염산 피리독을	204.0	1.0	0.004901981
리보플라빈	376.0	0.1	2.659744E-4
티아민 염산염	337.0	1.0	0.002987359
비타민 A (아세테이트)	328.0	0.1	3.0487805E-4
비타민 B12	1955.0	0.2	1.4760147E-4
알파 토코페롤 포스페이트 나트륨 염	554.7	0.01	1.8027762E-5
1-이노시톨	180.0	2.0	0.011111111
무기 염			
암화 칼슘(CaCl ₂)(무수률)	111.0	200.0	1.8018018
황산동(CuSO ₄ ·5H ₂ O)	250.0	1.0E-4	3.9999998E-7
질산 캐 2 철(Fe(NO ₃) ₂ · 9H ₂ O)	404.0	1.0E-4	2.4752475E-7
황산 마그네슘(MgSO ₄)(무수률)	120.0	97.87	0.8139166
방간 염화물(MnCl ₂ ·4H ₂ O)	198.0	1.0E-4	5.050505E-7

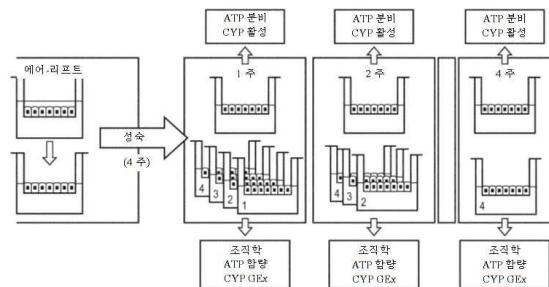
[0336]

성분	분자량	농도(mg/L)	nM
염화칼륨(KCl)			
염화칼륨(KCl)	75.0	400.0	5.3933335
중탄산 나트륨(NaHCO ₃)	84.0	2200.0	25.190475
염화나트륨(NaCl)	58.0	6800.0	117.24138
포수 캐 1 인산 나트륨(NaH ₂ PO ₄)	136.0	140.0	1.0144928
황산 아연(ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	288.0	2.0E-4	8.9444445E-7
다른 구성 요소			
D-글루코스(액스트로스)	180.0	2000.0	11.111111
글루타민(감소)	307.0	0.05	1.628645E-4
메틸 리놀레이트	295.0	0.03	1.0169491E-4
페놀 래드	376.4	10.0	0.026567481
스odium 피후베이트	110.0	25.0	0.22727273

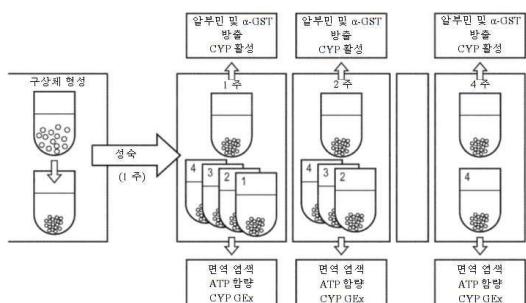
[0337]

도면

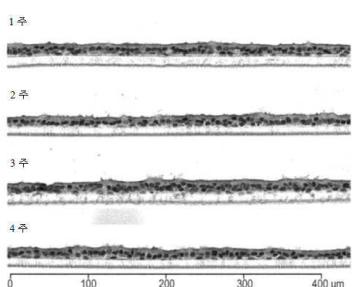
도면1



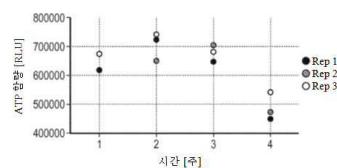
도면2



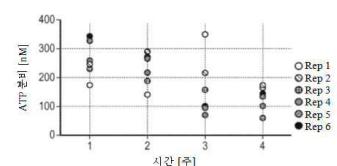
도면3



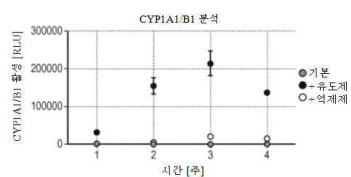
도면4



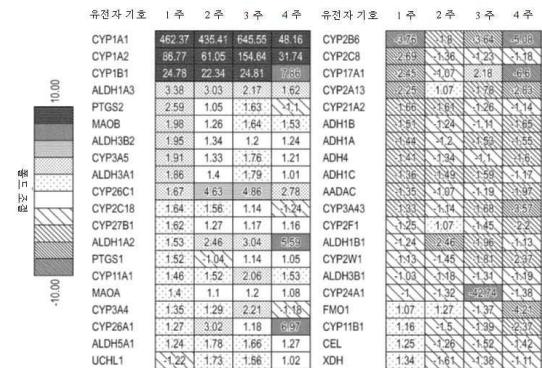
도면5



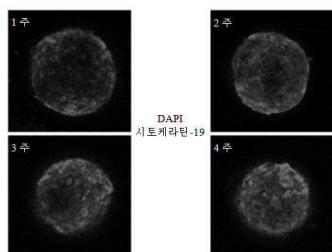
도면6



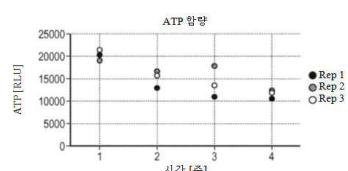
도면7



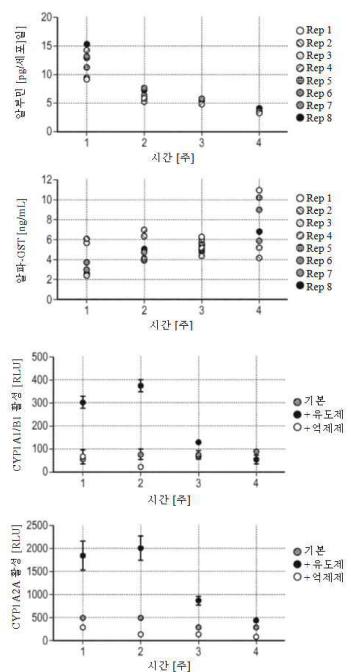
도면8



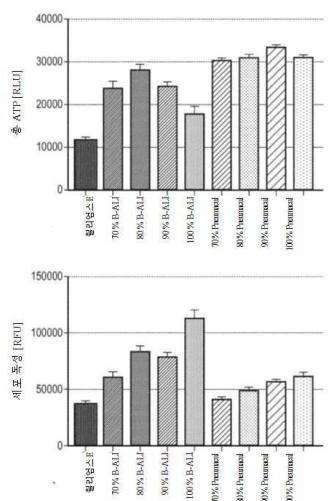
도면9



도면10



도면11



도면12

