



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 111433351 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 11

(21) 申请号 201880070169.0	(72) 发明人 M • 利特尔 S • V • 库马尔
(22) 申请日 2018.10.31	(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111433351 A	专利代理师 康健 王思琪
(43) 申请公布日 2020.07.17	(51) Int.Cl.
(30) 优先权数据 2017904424 2017.10.31 AU	C12N 5/071 (2010.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.04.27	A61K 35/22 (2015.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/AU2018/051178 2018.10.31	A61P 13/12 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/084612 EN 2019.05.09	C12Q 1/02 (2006.01)
(73) 专利权人 默多克儿童研究所 地址 澳大利亚维多利亚州	(56) 对比文件
	CN 102725409 A, 2012.10.10
	CN 105473706 A, 2016.04.06
	CN 107208051 A, 2017.09.26
	审查员 纪圆圆
	权利要求书1页 说明书38页 附图13页

(54) 发明名称

组合物和方法

(57) 摘要

本公开涉及肾脏类器官及其制造方法。所述类器官和方法可用于多种应用中,例如疾病建模、药物筛选、再生医学和肾细胞的扩大生产。

1. 一种包含少于50个肾单位的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官的直径小于500 μm ,并且包含NPHS1+足细胞、LTL+近端区段、ECAD+远端区段和ECAD+GATA3+集合管。
2. 根据权利要求1所述的肾脏类器官,其中,相对于没有涡旋培养的肾脏类器官,所述肾脏类器官包含表达高水平的PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11、GATA3、PAX8、EYA1和/或CITED1中的任一种或多种的细胞。
3. 根据权利要求2所述的肾脏类器官,其中,相对于没有涡旋培养的肾脏类器官,所述肾脏类器官包含表达低水平的PDGFRA、MEIS2、WT1和/或C-RET中的任一种或多种的细胞。
4. 根据权利要求3所述的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官包含至少25%的成熟肾单位和至少15%的基质。
5. 根据权利要求4所述的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官包含 1×10^4 至 5×10^4 个细胞。
6. 根据权利要求5所述的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官的直径为250至500 μm 。
7. 根据权利要求6所述的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官在涡旋培养中保持存活至少三周。
8. 根据权利要求7所述的肾脏类器官,其中所述类器官肾单元包括GATA3+ECAD+集合管、GATA3-LTL-ECAD+早期远端小管、LTL+ECAD-早期近端小管和WT1+肾小球。
9. 根据权利要求1-8任一项所述的肾脏类器官或通过用单独的蛋白酶、蛋白酶与乙二胺四乙酸的组合或胶原酶解离所述肾脏类器官制备的所述肾脏类器官的细胞组合物在制备用于治疗肾病的组合物中的用途。

组合物和方法

发明领域

[0001] 本公开涉及肾脏类器官及其制造方法。类器官和方法可用于多种应用,例如疾病建模、药物筛选、再生医学和扩大肾细胞产生。

[0002] 发明背景

[0003] 肾脏在清除废物和维持体液量方面起着重要作用。功能性工作单位被称为肾单位。人类肾脏包含多达200万个负责血液过滤的上皮肾单位,所有这些均在出生后产生。在出生后的人类肾脏中不存在肾单位祖细胞。这种祖细胞群体的缺乏不能确保肾单位自我更新的能力,因此,随后的损伤,衰老和疾病可能导致终末期肾病(ESDR)。用于治疗ESDR的有限治疗选择通常会对已经受损的肾脏带来更多压力。肾病晚期唯一可用但昂贵的治疗选择是透析和/或肾脏移植,它们均具有明显的缺点并影响患者的生活质量。

[0004] 人多能干细胞(hPSC)(包括人胚胎干细胞(hES)和人诱导性多能干细胞(hiPS))向不同细胞终点的定向分化已使得能够生成多种人组织(包括肾脏)的类器官模型。先前的类器官模型(例如Takasato等人(2015)Nature, Vol. 526:564-568中讨论的那些)价格昂贵,并且可能产生具有复杂三维结构的类器官,从而限制了它们在成像和筛选应用中的使用。这些类器官在培养三周后也可能受到扩散限制,从而限制了它们产生增加的细胞数量的能力和它们成熟的能力。这进而使得当前用于肾脏类器官产生的方案成为用于再生医学或疾病建模的次最佳细胞来源。因此,需要新的肾脏类器官及其制造方法。

发明内容

[0005] 本发明人惊奇地鉴定了具有简化的三维结构的肾脏类器官。这种类器官是有利的,因为它们更易于成像和长期培养。因此,在一个实例中,本公开涵盖包含少于50个肾单位的肾脏类器官。在另一个实例中,肾脏类器官包含少于25个肾单位。在另一个实例中,肾脏类器官包含少于15个肾单位。在另一个实例中,肾脏类器官包含5至12个肾单位。在一个实例中,通过在足以促进肾脏类器官发育的条件下使中间中胚层(IM)细胞群体在细胞培养基中涡旋来产生肾脏类器官。在该实例中,IM细胞培养基可包含约180至220ng/ml的FGF9。

[0006] 在一个实例中,通过涡旋 0.5×10^6 至 1.5×10^6 IM细胞/ml来产生肾脏类器官。在另一个实例中,通过涡旋约 0.8 至 1.2×10^6 IM细胞/ml来产生肾脏类器官。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达高水平的肾单位标记物的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达高水平的PAX2、LHX1、SIX1、OSR1、WNT11和GATA3的任一种或多种的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包括表达高水平的PAX2、LHX1、SIX1、OSR1、WNT11和GATA3的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达高水平的PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11、GATA3、PAX8、EYA1和CITED1中的任一种或多种和/或低水平的PDGFRA、MEIS2、WT1和/或C-RET中的任一种或多种的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达高水平的PAX2、LHX1、SIX1、OSR1、WNT11、GATA3、PAX8、EYA1和CITED1的细胞。

[0007] 在另一个实例中,肾脏类器官衍生自选自以下组成的组的干细胞:H9、hES3、iPSC GAPTrap td-Tomato、CRL1502.C32、CLR1502.3、hES3 SOX17mCherry或H9 GAPTrap

Luc2。

[0008] 在另一实例中,肾脏类器官包含表达低水平的基质标记物的细胞。在另一实例中,肾脏类器官包含表达低水平的PDGFRA、MEIS2、WT1和/或C-RET的细胞。在另一实例中,肾脏类器官包含NPHS+足细胞、LTL+近端区段、ECAD+远端区段、ECAD+/GATA3+集合管或其组合。在另一实例中,肾脏类器官包含约 1×10^4 至 5×10^4 个细胞。在另一实例中,肾脏类器官包含约 1.5×10^4 至 2.5×10^4 个细胞。在另一实例中,肾脏类器官的直径为约250至500 μm 。在另一实例中,肾脏类器官在涡旋培养中保持存活至少十八天。在另一实例中,肾脏类器官在涡旋培养中保持存活至少三周。在另一实例中,肾脏类器官在涡旋培养中保持存活至少四周。在另一实例中,肾脏类器官肾单位包括集合管(GATA3+;ECAD+)、早期远端小管(GATA3-;LTL-;ECAD+)、早期近端小管(LTL+;ECAD-)和肾小球(WT1+)。

[0009] 本发明人还惊奇地鉴定了,本文公开的肾脏类器官的细胞在涡旋培养中7天后(例如D7+7)继续分裂。不希望受任何特定理论的束缚,这可能表明使用涡旋培养产生的类器官更适合于治疗应用,例如移植。

[0010] 在另一实例中,本公开涵盖包含本文定义的肾脏类器官的组合物。在另一实例中,本公开涵盖包含本文定义的肾脏类器官或其消化物的组合物。例如,本公开涵盖包含本文定义的肾脏类器官或其酶促消化物的组合物。

[0011] 再次,不希望受任何特定理论的束缚,认为本文公开的肾脏类器官的低复杂性可使它们更适合于生产用于移植的组合物。例如,由低复杂性肾脏类器官产生的组合物可能更倾向于分化成正确的细胞类型,而不是形成畸胎瘤或软骨。在另一实例中,本公开涵盖一种组合物,其包含本文定义的肾脏类器官的酶促消化。

[0012] 在另一实例中,本公开涵盖治疗肾病的方法,其包括向有此需要的受试者施用本文定义的组合物。在一个实例中,组合物包含整个类器官。在另一实例中,组合物包含本文公开的一类器官的消化物。例如,肾病可以是肾衰竭。在一个实例中,将组合物静脉内施用。在另一实例中,将组合物通过肾动脉注射、肾实质注射、植入或包膜下移植来施用。

[0013] 在另一实例中,本公开涵盖产生肾脏类器官的体外方法,该方法包括在包含FGF的细胞培养基中涡旋中间中胚层(IM)细胞群体。

[0014] 在一实例中,该方法提供了一种用于在体外扩大肾细胞类型的生产的成本有效的手段。在一实例中,将IM细胞在含有FGF、CHIR和肝素的培养基中涡旋。在一实例中,将IM细胞在培养物中涡旋至少5天,其中前24小时包括将细胞在包含FGF、肝素、CHIR和ROCK抑制剂的细胞培养基中涡旋,而接下来的四天包括将细胞在包含FGF、肝素和CHIR的细胞培养基中培养。在该实例中,ROCK抑制剂在前24小时内存在于细胞培养基中,并在随后的几天中不存在于细胞培养基中。在一实例中,细胞培养基包含100至300ng/ml FGF9。在一实例中,细胞培养基包含180至220ng/ml FGF9。在一实例中,细胞培养基包含PVA和MC。在一实例中,前24小时包括将细胞在包含FGF、0.5至1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肝素、0.5至1.5 μM CHIR和9至11 μM ROCK抑制剂的细胞培养基中涡旋。在另一实例中,接下来的四天包括将细胞在包含FGF、0.5至1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肝素和0.5至1.5 μM CHIR的细胞培养基中涡旋。在该实例中,接下来的四天细胞培养基中不存在ROCK抑制剂。在另一实例中,接下来的四天包括将细胞在包含FGF9、肝素、CHIR、MC和PVA的细胞培养基中培养。在另一实例中,接下来的四天包括将细胞在包含FGF9、肝素、CHIR、0.05至0.2%MC和0.05至0.2%PVA的细胞培养基中培养。在另一实例中,在培养的剩

余天数中,在至少五天后,将细胞在包含0.05至1.5%PVA和0.05至1.5%MC的细胞培养基中培养。在该实例中,细胞培养基可包含PVA和MC,而不含FGF9、肝素、CHIR或ROCK抑制剂。在另一实例中,包含FGF的细胞培养基包含至少100ng/ml FGF9。在另一实例中,包含FGF的细胞培养基包含至少150ng/ml FGF9。在另一实例中,包含FGF的细胞培养基包含150至250ng/ml FGF9。在另一实例中,包含FGF的细胞培养基包含180至220ng/ml FGF9。

[0015] 在一些实例中,与在没有涡旋的情况下产生的类器官获得的细胞产量(例如Takasato等人(2015)中描述的那些)相比,本文公开的产生肾脏类器官的方法导致改善的细胞产量。在一实例中,在涡旋培养10天后,可以观察到从加入到涡旋培养的IM细胞的起始数量起细胞产量增加30倍。在另一实例中,在涡旋培养10天后,可以观察到从加入到涡旋培养的IM细胞的起始数量起细胞产量增加35倍。在另一实例中,在涡旋培养12天后,可以观察到从加入到涡旋培养的IM细胞的起始数量起细胞产量增加40倍。在另一实例中,在涡旋培养12天后,可以观察到从加入到涡旋培养的IM细胞的起始数量起细胞产量增加45倍。在另一实例中,在涡旋培养12天后,可以观察到从加入到涡旋培养的IM细胞的起始数量起细胞产量增加30至40倍。在另一实例中,在涡旋培养18天后,可以观察到从加入到涡旋培养的IM细胞的起始数量起细胞产量增加30至40倍。

[0016] 在一实例中,IM细胞在30与90rpm之间涡旋。在另一实例中,将IM细胞涡旋18至24天。

[0017] 在另一实例中,通过将干细胞群体培养至少7天来产生IM细胞,其中前4至5天包括将干细胞在包含至少6 μ M Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养基中培养,剩余的培养天数包括将细胞在包含FGF和至少0.5 μ M Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养基中培养。在一实例中,Wnt/ β -连环蛋白激动剂是CHIR。在这些实例中,包含FGF的细胞培养基可包含100至300ng/ml的FGF9。在这些实例中,包含FGF的细胞培养基可包含0.5至1.5 μ M CHIR。在这些实例中,包含FGF的细胞培养基可以进一步包含0.5至1.5 μ g/ml肝素。在一实例中,将IM细胞用EDTA或胰蛋白酶或TrypLE™select解离,并在涡旋之前通过筛网。在一实例中,干细胞是多能干细胞、胚胎干细胞或诱导性多能干(iPS)细胞。在一实例中,干细胞选自H9、hES3、iPSC GAPTrap td-Tomato、CRL1502.C32、CLR1502.3、hES3 SOXUmCherry或H9 GAPTrap Luc2组成的组。

[0018] 本发明人鉴定了,本公开的方法需要相对低的起始细胞数。这是有利的,因为其允许成本有效地扩大类器官和细胞培养。因此,在另一实例中,本公开的方法包括将 0.5×10^6 IM细胞/ml至 3×10^6 IM细胞/ml的群体涡旋。在另一实例中,本公开的方法包括将约 0.8×10^6 IM细胞/ml至 1.2×10^6 IM细胞/ml的群体涡旋。因此,在一实例中,本公开涵盖本文公开的肾脏类器官,其中该类器官是通过将IM细胞群体涡旋而产生的。本文公开了用于涡旋IM细胞群体以产生肾脏类器官的示例性发生时间和培养基。在一实例中,通过将包含 0.5×10^6 IM细胞/ml至 3×10^6 IM细胞/ml的IM细胞群体涡旋来产生类器官。在另一实例中,通过将包含少于 2×10^6 IM细胞的IM细胞群体涡旋来产生类器官。在另一实例中,通过将包含 0.5×10^6 IM细胞/ml至 1.5×10^6 IM细胞/ml的IM细胞群体涡旋来产生类器官。在另一实例中,通过将包含 0.8×10^6 IM细胞/ml至 1.2×10^6 IM细胞/ml的IM细胞群体涡旋来产生类器官。

[0019] 在另一实例中,本公开涵盖通过本文定义的方法产生的肾脏类器官。

[0020] 在另一实例中,本公开涵盖针对肾毒性筛选候选化合物的方法,该方法包括使本

文定义的肾脏类器官与候选化合物接触以确定该候选化合物是否具有肾毒性。在一实例中,候选化合物是小分子。

[0021] 在另一实例中,当用于产生肾脏或肾脏细胞或组织时,本公开涵盖本文定义的肾脏类器官,细胞群体或组合物。在另一实例中,本公开涵盖本文定义的用于治疗肾病的肾脏类器官,细胞群体或组合物。在一些实例中,细胞群体是指来源于肾脏类器官的酶促消化的细胞。

[0022] 本发明人还惊奇地鉴定了,长时间在包含低浓度CHIR并激活Wnt/ β -连环蛋白信号传导的培养基中培养干细胞有利于产生改良的中间中胚层。

[0023] 在一实例中,本公开涵盖一种产生中间中胚层(IM)细胞的体外方法,该方法包括在包含FGF和少于4 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养基中培养后原线(PPS)细胞群体2至5天。

[0024] 在另一实例中,可将干细胞最初在CHIR中培养约7天,其中将干细胞在包含高浓度CHIR的培养基中培养前4至5天,然后在包含低浓度CHIR和FGF的培养基中培养剩余的天数。因此,在另一实例中,本公开涵盖产生中间中胚层(IM)细胞的体外方法,该方法包括将干细胞群体培养至少7天,其中前4至5天包括将干细胞在包含至少6 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养基中培养,剩余的培养天数包括将细胞在包含FGF和至少0.5 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养基中培养。在一实例中,剩余的培养天数包括在包含FGF的细胞培养基中培养细胞,所述细胞培养基包含0.5至3 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一实例中,剩余的培养天数包括在包含FGF的细胞培养基中培养细胞,所述细胞培养基包含0.8至1.2 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一实例中,前4天包括将干细胞在包含至少6 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养基中培养。在另一实例中,前4天包括将干细胞在包含7 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养基中培养。在一实例中,包含FGF的细胞培养基包含100至300ng/ml的FGF9。在一实例中,包含FGF的细胞培养基包含180至220ng/ml的FGF9。在另一实例中,包含FGF9的细胞培养基还包含肝素。例如,细胞培养基可以包含至少1.0 μ g/ml的肝素。在一实例中,干细胞是多能干细胞、胚胎干细胞或诱导性多能干(iPS)细胞。在另一实例中,干细胞选自由H9、hES3、iPSC GAPTrap td-Tomato、CRL1502.C32、CLR1502.3、hES3 SOX17mCherry或H9 GAPTrap Luc2组成的组。

[0025] 在另一实例中,本公开涵盖一种生物打印肾脏的方法,该方法包括由本文定义的一类器官或细胞群体制备生物墨水并生物打印肾脏。在一些实例中,细胞群体是指来源于肾脏类器官的酶促消化的细胞。

[0026] 在另一实例中,当用于产生肾脏或肾脏细胞或组织时,本公开涵盖本文定义的一类器官,组合物或细胞群体。在另一实例中,本公开涵盖产生用于细胞疗法的肾单位细胞类型的方法,该方法包括使用本文定义的方法或IM细胞群体产生肾脏类器官。

[0027] 除非另有明确说明,否则本文中的任何实例均应作必要的修改以应用于任何其它实例。

[0028] 本公开的范围不限于本文所述的具体实例,所述具体实例旨在用于举例说明的目的。如本文所述,功能上等效的产物、组合物和方法显然在本公开的范围之内。

[0029] 在整个说明书中,除非另有明确说明或上下文另有要求,否则对单个步骤、物质组合物、步骤组或物质组合物组的引用应视为涵盖一个和多个(即一个或多个)那些步骤、物

质组合物、步骤组或物质组合物组。

[0030] 在下文中,通过以下非限制性实例并参考附图来描述本公开。

附图说明

[0031] 图1. 悬浮培养中肾脏类器官的产生。(A) 通过使用CRL1502.C32细胞进行的分化的图像概述肾脏微类器官分化方案。(B) 显示第7+18天的均匀肾脏微类器官的明视场图像(比例为100mm)。(C,D1和D2) 微类器官的免疫荧光和共聚焦图像,其显示了独立于微类器官大小和形状的肾单位节段的形成,包括血管结构的发育(比例为100mm)。(E) 柱状图,其显示了在第7+0天对于FGF9+/-1 μ MCHIR99021的通过qPCR的中间中胚层基因表达谱的平均倍数变化。数据表示为平均值,(F) 对于FGF9+/-1 μ M CHIR99021治疗的PAX2的免疫荧光(比例为50 μ m)(D7+11)。(G) 肾脏微类器官内肾单位区室的免疫荧光和共聚焦图像;足细胞(PHS1+和MAFB+),近端小管(LTL+、CUBN+、LRP2+和HNF4A+),远端小管(ECAD),集合管(ECAD+GATA3+)和内皮细胞(SOX17+和PECAM1+) (比例为50 μ m)。

[0032] 图2. 悬浮培养中的微肾脏类器官显示功能性近端小管,初始Wnt信号传导对于肾脏类器官发育和成熟是重要的。(A) 第7+18天的微肾脏类器官小管的共聚焦图像,其显示FITC白蛋白摄取(比例为5 μ m)。(B) 使用4种不同细胞系(包括hES(H9 GAP-Trap Luc2、hES3 SOX17mCheny)和iPS(CRL1502.C32和CRL1502.3))生成的微肾脏类器官在第7+18天的共聚焦图像,其中抗体标记了不同的肾单位节段(比例为50 μ m)。(C,D和E) 在暴露于初始7 μ M CHIR99021不同天数进行3、4、5和6天治疗后生成的hES3 SOX17mCherry衍生的微类器官,其显示明视场(C,比例为100 μ m)和免疫荧光共聚焦图像,其显示SOX17+脉管系统(D)和MEIS1/2/3+基质(E) (比例为100 μ m)。

[0033] 图3. 微类器官内肾脏分化的转录验证。(A) 第7+18天CRL1502-C32微类器官的单细胞RNA-seq的Seurat聚类后的t-SNE图,其显示了11种不同簇。(B) 热图,其显示了簇内关键标记基因的比例基因表达。(C) t-SNE图,其表明了所选肾单位细胞类型的关键标记基因的表达。颜色强度按基因缩放,蓝色表示较高的表达。

[0034] 图4. 肾脏微类器官为高效hPSC衍生的肾细胞放大提供了更好的平台。(A) 在第7+11天的标准肾脏类器官的明场图像(左,比例为500 μ m),整个标准类器官的免疫荧光和共聚焦图像(瓦片扫描),其显示了肾单位结构在类器官边缘存在空间限制(中间,比例为200 μ m)和类器官内肾单位的放大图像(右,比例为200 μ m)。(B) 肾脏微类器官的明场图像和单个肾脏微类器官的放大的明场图像,肾脏微类器官在第D7+11天的共聚焦图像(比例为200 μ m)。(C) 类器官在不同发育阶段的大小变化。(D) 与标准类器官相比,总细胞数从起始细胞数随时间的变化以及微类器官的可扩展能力。(E-F) 在第D7+18天的C32微类器官的免疫荧光和Bitplane-Imaris 3D重建显示,清晰的肾单位节段以极化方式相互连接,从肾小球(PHS1)、近端小管(LTL+)、远端小管(ECAD+)、集合管(ECAD+GATA3+)和间质细胞(GATA3+)开始。

[0035] 图5. 标准肾脏类器官和微类器官的比较单细胞转录谱显示了等效的肾原性模式。(A) 对来自第7+18天(CRL1502.32)的肾脏微类器官(Micro-org)和标准类器官(Stand-org) 10x scRNA-Seq数据进行综合Seurat分析后的t-SNE图。(B) t-SNE图,其代表微类器官和标准类器官对每个簇中细胞类型的贡献,按照类器官类型着色(C) 柱形图,其代表分配给每个转录簇和分化谱系类型的每个微类器官或标准类器官数据集的比例。(D) 分裂点图,其显示

了每个簇中肾脏标记物在肾脏微类器官与标准类器官之间的基因表达。(E) Violin和散点图,其显示了微类器官和标准类器官中肾单位(PAX2、SIX1、LHX1)和基质相关基因(PDGFR α 、MEIS2)的每个细胞的对数归一化计数。(F) 免疫荧光,其显示PAX2和MEIS1/2/3在微类器官和标准类器官之间的表达(比例为50 μ m)。

[0036] 图6.微类器官和标准类器官中肾单位和基质标记的比较。(A和B) 标准和微类器官scRNA-Seq数据中肾单位和基质基因的t-SNE特征图。

[0037] 图7.全反式视黄酸有助于改善肾脏微类器官中的肾小球成熟。涡旋悬浮培养产生的C32涡旋器类器官的免疫荧光分析。(A) 在atRA下未补充而产生的类器官。(B) 从第D7+5天到第D7+10天使用atRA生成的类器官显示出改善的肾小球足细胞成熟。(C) 在不同时间点(第D7+11天和第D7+18天)使用和不使用atRA生成的类器官的qPCR分析。

[0038] 图8.肾脏微类器官为药物毒性筛选提供了平台。阿霉素治疗(24小时)可通过增加凋亡标记物TUNEL的表达来诱导对肾脏微类器官(A-C)的剂量依赖性毒性。(D) 阿霉素治疗还降低了微类器官中肾脏特异性基因的表达。

具体实施方式

[0039] 除非另有明确定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均应具有本领域普通技术人员通常理解的相同含义(例如,分子生物学、细胞培养、干细胞分化、细胞疗法、基因修饰、疾病建模、生物化学、生理学和临床研究)。

[0040] 除非另有说明,否则本公开中使用的分子和统计技术是本领域技术人员众所周知的标准程序。在整个文献资料中描述和解释了这种技术,例如J.Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J.Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A.Brown (编辑), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, 第1和2卷, IRL出版社 (1991), D.M.Glover和B.D.Hames (编辑), DNA Cloning: A Practical Approach, 第1-4卷, IRL出版社 (1995和1996), 和F.M.Ausubel等人 (编辑), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience (1988, 包括到目前为止的所有更新), Ed Harlow和David Lane (编辑) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), J.E.Coligan等人 (编辑) Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons (包括到目前为止的所有更新), Michos Odysse (编辑) Kidney Development: Methods and Protocols (Springer), Robert Lanza (编辑) Handbook of Stem Cells, 第1卷, Embryonic Stem Cells (Elsevier)。

[0041] 如在本说明书和所附权利要求中所使用的,单数和单数形式的术语“一(a)”,“一(an)”和“所述”例如任选地包括复数指示物,除非内容另有明确规定。因此,例如,对“一种肾脏类器官”的提及任选地包括一种或多种肾脏类器官。

[0042] 如本文所用,除非有相反的说明,否则术语“约”是指指定值的 $\pm 10\%$,更优选 $\pm 5\%$,更优选 $\pm 1\%$ 。

[0043] 术语“和/或”,例如“X和/或Y”应理解为意指“X和Y”或“X或Y”,并且应被理解为对两种含义或任一含义提供明确支持。

[0044] 在整个说明书中,单词“包括(comprise)”或诸如“包括(comprises)”或“包括

(comprising)”的变体应理解为暗示包括所陈述的元素、整数或步骤,或元素、整数或步骤组,但不排除任何其它元素、整数或步骤,或元素、整数或步骤组。

[0045] 可以向各种受试者施用根据本公开的细胞组合物。在一实例中,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是伴侣动物,例如狗或猫,或家畜动物,例如马或牛。在另一实例中,受试者是人。诸如“受试者”、“患者”或“个体”的术语是在上下文中可以在本公开中互换使用的术语。

[0046] 如本文所用,术语“治疗”是指被设计为在临床病理过程中改变所治疗的个体或细胞的自然过程的临床干预。理想的治疗效果包括降低疾病进展速度,改善或减轻疾病状态以及缓解或改善预后。例如,如果减轻或消除了与疾病有关的一种或多种症状,则成功地“治疗”个体。在一实例中,术语“治疗”是指针对肾病、贫血、EPO缺陷、小管转运缺陷或肾小球滤过缺陷的治疗性治疗和防御性或预防性措施,其中目的是逆转、预防或减慢(减轻)目标障碍。需要治疗的患者包括已经患有肾病、贫血、EPO缺陷、小管转运缺陷或肾小球滤过缺陷的患者,倾向于患有此类障碍的患者或需要预防此类障碍的患者。在一实例中,治疗包括肾功能的稳定和/或改善。

[0047] “有效量”是指至少在一定剂量和所需时间段内有效达到所需治疗或预防效果的量。可以在一次或多次施用中提供有效量。在本公开的一些实例中,术语“有效量”用于指实现如上所述的肾脏疾病或病症的治疗所必需的量。有效量可以根据要治疗的疾病或病症以及还根据体重、年龄、种族背景、性别、健康和/或身体状况以及与所治疗的哺乳动物有关的其它因素而变化。通常,有效量将落入可以通过医师的常规试验和实验而确定的相对较宽的范围(例如“剂量”范围)内。有效量可以以单剂量或在治疗期间内重复一次或多次的剂量施用。

[0048] “治疗有效量”至少是实现特定肾病(例如,肾炎、肾细胞癌)的可测量的改善所需的最小浓度。本文中的治疗有效量还可以根据诸如患者的疾病状态、年龄、性别和体重以及细胞组合物在个体中引起期望的反应的能力的因素而变化。治疗有效量也是这样的一种量,其中治疗有益效果超过了组合物的任何毒性或有害作用。在肾细胞癌的情况下,治疗有效量可以减少癌细胞的数量;减少原发肿瘤的大小;抑制(即在某种程度上减慢并且在某些实例下停止)癌细胞浸入周围器官;抑制(即在某种程度上减慢并且在某些实例下停止)肿瘤转移;在某种程度上抑制或延迟肿瘤生长或肿瘤进展;和/或在某种程度上减轻了与肾细胞癌有关的一种或多种症状。对于肾细胞癌疗法,例如,可以通过评估存活时间、疾病进展时间(TTP)、反应率(RR)、反应时间和/或生活质量来测量体内功效。

[0049] “中间中胚层(IM)”细胞是指胚胎中胚层细胞,其源自定形中胚层,该定形中胚层继而衍生自后原线,并最终发展成泌尿生殖系统,包括输尿管和肾脏以及其它组织,例如性腺。表征或代表中间中胚层的标记物的非限制性实例包括PAX2、OSR1和/或LHX1。

[0050] 还应理解,IM细胞的产生并不意味着IM细胞是IM细胞的纯或均质群体,而没有其它细胞类型存在(例如定形中胚层)。因此,对“IM细胞”或“IM细胞群体”的提及是指细胞或细胞群体包含IM细胞。适当地,根据本发明,IM细胞是通过使后原线细胞与一种或多种促进后原线细胞分化成IM细胞的药剂接触而产生的,这将在下文中更详细地描述。优选地,IM细胞是通过使后原线细胞与一种或多种促进后原线细胞分化成IM细胞的药剂接触而产生的。

[0051] “后原线(PPS)”细胞是指可从哺乳动物胚胎发育早期在囊胚中形成的原线结构的

后端的细胞获得的细胞或与之在功能上和/或在表型上对应的细胞。后原线建立双侧对称性,确定原肠胚形成部位并启动胚层形成。通常,后原线是中胚层的祖细胞(即推测的中胚层),而前原线是内胚层的祖细胞(即推测的内胚层)。表征或代表后原线的标记物的非限制性实例包括Brachyury (T)。表征或代表前原线的标记物的非限制性实例是SOX17。MIXL1可以通过前后原线表达。

[0052] 还应理解,后原线细胞的产生并不意味着暗示后原线细胞是后原线细胞的纯或均质群体,而没有其它细胞类型存在。因此,对“后原线细胞”或“后原线细胞群体”的提及是指细胞或细胞群体包含后原线细胞。后原线细胞是通过使hPSC细胞与一种或多种促进hPSC细胞分化为后原线细胞的药剂接触而产生,这将在下文中更详细地描述。例如,一种或多种药剂可包括骨形态发生蛋白4 (BMP4)、激活素A和/或Wnt激动剂,例如CHIR99021。

[0053] 肾脏类器官

[0054] 本公开涵盖中间中胚层(IM)细胞的产生。在本公开的上下文中使用术语“中间中胚层(IM)”是指胚胎中胚层细胞,其源自定形中胚层,该定形中胚层继而衍生自后原线,并最终发展成泌尿生殖系统,包括输尿管和肾脏以及其它组织,例如性腺。表征或代表中间中胚层的标记物的非限制性实例包括PAX2、OSR1和/或LHX1。

[0055] 在一个实例中,提供培养条件以允许这些IM细胞“自组织”并形成肾脏类器官。在本公开的上下文中使用术语“肾脏类器官”来指细胞的异质3D聚集,其概括了天然肾脏中存在的细胞自组织、结构和信号传导相互作用的方面。肾脏类器官的实例在Takasato等人(2015)Nature,第526卷:564-568、WO 2014/197934和WO 2016/094948中描述。在本公开的上下文中,术语“肾类器官”和“肾脏类器官”可以互换使用。

[0056] 本发明人惊奇地鉴定了具有简化的三维结构的肾脏类器官。这种类器官是有利的,因为它们更易于成像和长期培养。例如,健康成年人的每个肾脏中有0.8至2百万个肾单位,通常约1百万个。相反,本公开所涵盖的类器官包含低得多的肾单位数。因此,在一个实例中,本公开涵盖肾脏类器官,其包含具有减少数量的肾单位的天然肾脏的结构特征。在一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官可包含一个或多个肾单位。在一个实例中,肾单位分段成远端和近端小管,早期亨利环和肾小球。在另一实例中,类器官包括被内皮细胞,血管周细胞和肾间质包围的分段的肾单位。在另一实例中,本公开的类器官不显示脉管系统的存在。

[0057] 在其它实例中,根据本公开的类器官至少部分血管化。例如,类器官可以包含含有足细胞的肾单位,所述足细胞形成足突并经历血管化。

[0058] 在一个实例中,肾脏类器官以肾单位%、基质%和/或脉管系统%来表征。在该实例中,可以使用单细胞RNA测序来表征肾脏类器官。以下提供了单细胞测序的实例。在一个实例中,肾脏类器官包含至少20%的成熟肾单位。在另一个实例中,肾脏类器官包含至少25%的成熟肾单位。在另一个实例中,肾脏类器官包含至少30%的成熟肾单位。在另一个实例中,肾脏类器官包含至少31%的成熟肾单位。在另一个实例中,肾脏类器官包含至少32%的成熟肾单位。在这些实例中,肾脏类器官还包含至少15%的基质。在另一个实例中,肾脏类器官还包含至少20%的基质。在另一个实例中,肾脏类器官还包含至少25%的基质。在另一个实例中,肾脏类器官不包含任何实质性脉管系统。在另一个实例中,肾脏类器官不包含脉管系统。

[0059] 在一个实例中,根据本发明的肾脏类器官包含少于100个肾单位。在另一个实例中,根据本发明的肾脏类器官包括少于90个、少于80个、少于70个、少于60个肾单位。在另一个实例中,根据本发明的肾脏类器官包含少于50个肾单位。在另一个实例中,根据本公开的肾脏类器官包括少于40个、少于30个、少于20个、少于10个肾单位。在另一个实例中,根据本公开的肾脏类器官包含少于5个肾单位。在另一个实例中,根据本公开的肾脏类器官包括少于4个、少于3个肾单位。

[0060] 在另一个实例中,根据本公开的肾脏类器官包含2至100个肾单位。在另一个实例中,根据本公开的肾脏类器官包含2至50个肾单位。在另一个实例中,根据本公开的肾脏类器官包含2至10个肾单位。在另一个实例中,根据本公开的肾脏类器官包含5至12个肾单位。在另一个实例中,根据本公开的肾脏类器官包含6至10个肾单位。在另一个实例中,根据本公开的肾脏类器官包含2至6个肾单位。在另一个实例中,根据本公开的肾脏类器官包含2至4个肾单位。

[0061] “肾单位”是肾脏的功能性工作单位,其在从血液/血浆中清除废物和维持体液量方面起着重要作用。本领域技术人员可以使用各种方法在本文公开的一类器官中对它们进行鉴定和计数。例如,可以使用共聚焦显微镜和免疫荧光标记(例如WT1+肾小球;NPHS+足细胞,LTL+ECAD-近端小管,ECAD+远端小管和ECAD+GATA3+集合管)对肾单位进行可视化和计数。

[0062] 通常,本公开涵盖的肾脏类器官的物种身份,无论是哺乳动物,例如小鼠、人还是其它,都由用于产生肾脏类器官的细胞决定。在一实例中,本公开涵盖哺乳动物肾脏类器官。在这个实例中,哺乳动物多能干细胞用于产生肾脏类器官。哺乳动物肾脏类器官可以代表来自伴侣动物(例如犬科或猫科)或家畜动物(例如马或牛)的肾脏。因此,在这些实例中,来自犬科、猫科等的干细胞用于产生肾脏类器官。在另一个实例中,哺乳动物肾脏类器官代表来自小鼠或大鼠的肾脏。在另一个实例中,肾脏类器官代表来自高等灵长类例如食蟹猴或恒河猴的肾脏。在另一个实例中,哺乳动物肾脏类器官代表来自人类的肾脏。当使用来自特定物种的多能干细胞生成肾脏类器官,可以根据该物种鉴定所得的肾脏类器官。例如,当使用人干细胞生成肾脏类器官时,所得的肾脏类器官可以被鉴定为人肾脏类器官。因此,在一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官包括来源于人干细胞的人肾脏类器官。下文讨论了适于产生肾脏类器官的干细胞的各种其它实例。

[0063] 在另一个实例中,可以基于分子标记物的表达来表征肾脏类器官。标记物表达可以使用多种技术进行表征,例如免疫组织化学或荧光激活细胞分选。免疫组织化学通常涉及使用对目标标记物具有特异性的一抗。一抗与标记物的结合可以通过各种已知方法可视化。例如,可以使用识别一抗的标记的二抗。在该实例中,标记可以是酶,例如辣根过氧化物酶、放射性同位素、荧光报道基因、电化学发光标签。标记的二抗与一抗的结合可通过细胞学评估或通过自动平板读数器检测。

[0064] 在一个特定的实例中,使肾脏类器官或其切片或样品与特定的一抗接触。然后洗涤肾脏类器官或其切片或样品以除去任何未结合的一抗,然后将对一抗具有特异性并与过氧化物酶连接的二抗施加到样品上。然后洗涤肾脏类器官或其切片或样品以除去任何未结合的二抗,并将3,3'-二氨基联苯胺(DAB)施加到样品上。通过常规细胞学评估可将DAB转化为有色产物可视化,其中有色产物的存在表明标记物存在于样品中。在一个实例中,可以使

用Image J或可从供应商例如Perkin Elmer和Leica商购的各种其它软件包来量化有色产物的水平。

[0065] 在另一个实例中,细胞悬浮液是由代表性的肾脏类器官,其群体或其切片或样品产生的。将悬浮液中的细胞与对特定标记物具有特异性的荧光标记抗体接触。使用诸如荧光激活细胞分选(FACS)的技术鉴定对特定标记物呈阳性的细胞。

[0066] 对于给定标记物被称为“阳性”的细胞可以表达该标记物的低(lo或暗淡)或高(明亮,bri)水平,这取决于标记物在细胞表面上的存在程度,其中术语涉及荧光强度或细胞分选过程中使用的其它标记物。lo(或暗淡或模糊)和bri的区别将在所分选的特定细胞群体上使用的标记物的上下文中理解。对于给定标记物被称为“阴性”的细胞不一定完全不存在于该细胞中。该术语意指标记物由该细胞或群体以相对较低或非常低的水平表达,并且当可检测到标记它会产生非常低的信号或在背景水平(例如使用同种型对照抗体检测到的水平)以上无法检测到。

[0067] 在一个实例中,可以使用荧光报道基因来检测本文所述的肾脏类器官的标记物。例如,可以监测特定标记物的表达以实时追踪肾脏类器官或其包含的细胞的发育。例如,可以对干细胞进行基因工程化以在给定的一组条件下表达一种或多种荧光或化学发光的报道基因。报道基因可用于实时追踪细胞身份、细胞活力或细胞功能。

[0068] 合适的报道基因的实例在下面举例说明,其中产生敲入的iPSC系,其具有在内源性MAFB基因座的起始密码子处插入的mTagBFP2荧光报道基因(MAFB^{mTagBFP2/+})。MAFB在发育的足细胞中高度表达,因此,可以监测MAFB的表达以实时追踪肾脏类器官中足细胞的发育。适用于本文公开的方法的报道细胞系的其它实例包括GATA3mCherry、RETtdTOMATO或Six2Cre。

[0069] 在另一个实例中,肾脏类器官包含表达高水平的一种或多种肾单位标记物的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达高水平的PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11、GATA3、PAX8、EYA1和CITED1中的一种或多种的细胞。例如,肾脏类器官可以表达高水平的PAX2。在另一个实例中,肾脏类器官可以表达高水平的SIX1。在另一个实例中,肾脏类器官可以表达高水平的LHX1。在另一个实例中,肾脏类器官可以表达高水平的OSR1。在另一个实例中,肾脏类器官可以表达高水平的WNT11。在另一个实例中,肾脏类器官可以表达高水平的GATA3。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达高水平PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11和GATA3的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达高水平PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11、GATA3、PAX8、EYA1和CITED1的细胞。在这些实例中,相对于具有至少100个肾单位的肾脏类器官,肾脏类器官可以表达高水平的参考标记物,例如PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11、GATA3、PAX8、EYA1和CITED1中的一种或多种。在另一个实例中,相对于具有超过50个肾单位的肾脏类器官,肾脏类器官可以表达高水平的参考标记物,例如PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11、GATA3、PAX8、EYA1和CITED1中的一种或多种。在另一个实例中,相对于包含至少 1×10^5 个细胞的肾脏类器官,肾脏类器官可以表达高水平的参考标记物,例如PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11和GATA3中的一种或多种。在另一个实例中,相对于包含至少 1×10^6 个细胞的肾脏类器官,肾脏类器官可以表达高水平的参考标记物,例如PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11和GATA3中的一种或多种。在另一个实例中,相对于没有涡旋产生的肾脏类器官,例如Takasato等人(2015)描述的那些,肾脏类器官可以表达高水平的参考标记物,例如PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11

和GATA3中的一种或多种。

[0070] 在另一个实例中,肾脏类器官包含表达低水平WT1的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达低水平C-RET的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达低水平FOXD1的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达低水平PDGFRA的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达低水平MEIS2的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达低水平WT1和C-RET的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达低水平WT1、C-RET和FOXD1的细胞。在这些实例中,相对于具有至少100个肾单位的肾脏类器官,肾脏类器官可以表达低水平的参考标记物,例如WT1、C-RET和FOXD1中的一种或多种。在另一个实例中,相对于具有超过50个肾单位的肾脏类器官,肾脏类器官可以表达低水平的参考标记物,例如WT1、C-RET和FOXD1中的一种或多种。

[0071] 在另一个实例中,肾脏类器官包含表达高水平PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11和GATA3以及低水平WT1、C-RET、PDGFRA、MEIS2和FOXD1的细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含表达高水平PAX2、SIX1、LHX1、OSR1、WNT11、GATA3、PAX8、EYA1和CITED1以及低水平WT1、C-RET、PDGFRA、MEIS2和FOXD1的细胞。

[0072] 在上述实例中,高和低表达水平是相对于在没有涡旋下培养的肾脏类器官而言的,例如Takasato等人(2015)Nature,第526卷:564-568所述的那些。在这个实例中,高表达至少高1倍。在另一实例中,高表达至少高1.5倍。在另一个实例中,高表达至少高2倍。在一个实例中,低表达至少低1倍。在另一个实例中,低表达至少低1.5倍。在另一个实例中,低表达至少低2倍。

[0073] 可以使用诸如聚合酶链式反应的技术来测量表达水平,所述聚合酶链式反应包括用于目的标记物的合适的引物。例如,在反转录并进行PCR和分析之前,可以从类器官中提取总RNA。

[0074] 在一个实例中,肾脏类器官包含肾单位,其包含WT1+肾小球、NPHS+足细胞、LTL+ECAD-近端小管、ECAD+远端小管和ECAD+GATA3+集合管中的一种或多种。在另一个实例中,肾脏类器官包含肾单位,其包含NPHS+足细胞、LTL+近端区段、ECAD+远端区段和ECAD+GATA3+集合管。包含上述示例性组分的肾脏类器官可以以各种方式鉴定。在一实例中,在使用共聚焦显微镜和免疫荧光标记进行可视化评估之前,可以将肾脏类器官固定并整体安装。

[0075] 在一个实例中,在用于以下讨论的筛选方法后,可以基于一种或多种上述参考标记物来表征肾脏类器官。在另一个实例中,在选择表达合适的标记物的肾脏类器官用于下文讨论的筛选方法之前,可以基于一种或多种上述参考标记物来表征代表更广泛群体的肾脏类器官。例如,可以使用本文公开的方法产生肾脏类器官的群体。在选择肾脏类器官用于下文讨论的筛选方法之前,可以在来自群体的肾脏类器官中证实一种或多种上述标记物的表达。

[0076] 在另一个实例中,根据本公开的一类器官包含 0.5×10^4 至 8×10^4 个细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包括 0.8×10^4 至 7×10^4 个细胞。在另一个实例中,根据本公开的一类器官包含 1×10^4 至 5×10^4 个细胞。在另一个实例中,根据本公开的一类器官包含至少 1×10^4 个细胞。在另一个实例中,根据本公开的一类器官包含少于 3×10^4 个细胞。在另一个实例中,根据本公开的一类器官包含 2×10^4 至 2.5×10^4 个细胞。

[0077] 在另一个实例中,根据本公开的一类器官的直径小于 $2,500\mu\text{m}$ 。在另一个实例中,根

据本公开的一类器官的直径小于 $2,000\mu\text{m}$ 。在另一个实例中,根据本公开的一类器官的直径小于 $1,000\mu\text{m}$ 。在另一个实例中,根据本公开的一类器官的直径小于 $500\mu\text{m}$ 。在另一个实例中,根据本公开的一类器官的直径小于 $400\mu\text{m}$ 。在另一个实例中,根据本公开的一类器官的直径小于 $300\mu\text{m}$ 。在另一个实例中,根据本公开的一类器官的直径为 150 至 $600\mu\text{m}$ 。在另一个实例中,根据本公开的一类器官的直径为 200 至 $500\mu\text{m}$ 。例如,根据本公开的一类器官的直径可以为 $200\mu\text{m}$ 至 $2,000\mu\text{m}$ 。在另一个实例中,根据本公开的一类器官的直径可以为 $200\mu\text{m}$ 至 $1,000\mu\text{m}$ 。在另一个实例中,根据本发明的类器官的直径可在 $200\mu\text{m}$ 至 $400\mu\text{m}$ 之间。在另一个实例中,根据本公开的一类器官的直径可以为 $200\mu\text{m}$ 至 $300\mu\text{m}$ 。在另一个实例中,根据本公开的一类器官的直径可以为 $250\mu\text{m}$ 至 $300\mu\text{m}$ 。

[0078] 本领域技术人员将理解,可以通过例如光学显微镜和诸如ImageJ的附带软件来测量类器官大小。例如,本领域技术人员可以通过测量其三维结构的最宽点的宽度来鉴定上述示例性大小的类器官。

[0079] 在另一个实例中,根据本公开的一类器官在培养物中保持存活至少三周。在另一个实例中,根据本公开的一类器官在培养物中保持存活至少四周。在另一个实例中,根据本公开的一类器官在培养物中保持存活至少六周。在另一个实例中,根据本公开的一类器官在培养物中保持存活至少三至四周。例如,本文公开的肾脏类器官在培养三至六周后可能仅出现扩散限制(即影响营养物转移至包含类器官结构的细胞的限制)。在这些实例中,参考时间段是从D7+1开始测量的。因此,换句话讲,根据本公开的一类器官在培养物中保持存活直到至少D7+21、D7+28或D7+42。在一个实例中,细胞增殖速率可以用作扩散限制的量度。这是因为在缺乏足够营养物的情况下,细胞通常不会继续分裂。因此,可以随时间追踪本文公开的类器官中的细胞增殖,以确定何时发生扩散限制。在一个实例中,在3至6天的时间内细胞增殖速率的降低表明扩散限制。在另一个实例中,在3至6天的时间内细胞增殖的平稳期表明扩散限制。

[0080] 本公开涵盖与人肾脏相比包含少量肾单位的肾脏类器官。本领域技术人员将理解,肾脏类器官是人工产物,并且尽管它们共有哺乳动物肾脏的许多生理和生物化学特征,但它们并非天然存在。例如,本文公开的肾脏类器官可能未连接到完整的脉管系统和/或以下一个或多个特征:

- [0081] -具有少于50个肾单位;
- [0082] -包括约 0.5×10^4 至 8×10^4 个细胞;
- [0083] -具有小于 $100\mu\text{m}$ 的直径(优选约 250 至 $350\mu\text{m}$);
- [0084] -是独立的三维结构,不属于组织或器官的一部分;以及,
- [0085] -通过涉及干细胞体外分化的方法产生。

[0086] 细胞组合物和治疗方法

[0087] 本公开的一类器官或细胞可用于产生治疗组合物。在一个实例中,可以将本文公开的整个类器官以治疗组合物提供。在另一个实例中,本公开涵盖由本文公开的肾脏类器官产生的细胞组合物。例如,细胞组合物通过酶促消化根据本公开的一类器官来制备。例如,细胞组合物可以通过单独地或与乙二胺四乙酸(EDTA)组合使用蛋白酶例如胰蛋白酶消化本文定义的一类器官来制备。在另一个实例中,细胞组合物可以通过用胶原酶例如胶原酶I和/或胶原酶II(例如,可商购的liberaseTM(Roche))消化本文定义的一类器官来制备。在一个实

例中,将酶促消化物部分纯化或纯化以耗尽一种或多种细胞类型。例如,可耗尽血管和/或内皮细胞。在另一个实例中,将酶促消化物部分纯化或纯化以富集一种或多种细胞类型。例如,可以将酶促消化物部分纯化或纯化以提供肾单位祖细胞和/或输尿管上皮祖细胞的富集组合物。

[0088] 在另一个实例中,本公开涵盖的组合物包含使用本文公开的方法培养的细胞。例如,组合物可以包含表达高水平PAX2、LHX1和OSR1(帽间充质)以及Wnt11和GATA3(输尿管上皮)的改良的IM细胞。如以上实例中所述,IM细胞可以使用本文定义的方法进行培养,并进行部分纯化或纯化以富集一种或多种细胞类型,例如肾单位祖细胞和/或输尿管上皮祖细胞。

[0089] 因此,在另一个实例中,本公开涵盖细胞组合物,其包含从通过本文定义的方法产生的类器官或细胞群体中纯化的肾单位祖细胞和/或输尿管上皮祖细胞群体。

[0090] 在一个实例中,本文公开的治疗组合物包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。术语“载体”和“赋形剂”是指本领域常规使用的物质组合物,用以促进活性化合物的储存,施用和/或生物活性(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Mac Publishing Company(1980))。载体还可以减少活性化合物的任何不希望的副作用。合适的载体例如是稳定的,例如不能与组合物中的其它成分反应。在一个实例中,在用于治疗的剂量和浓度下,载体不会在接受者中产生明显的局部或全身性不良反应。

[0091] 用于本公开的合适的载体包括常规使用的那些,例如盐水、右旋糖水溶液、乳糖、林格氏溶液、缓冲溶液、透明质素和二醇是示例性液体载体,特别是(等渗时)用于溶液。合适的药物载体和赋形剂包括淀粉、纤维素、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0092] 在另一个实例中,载体是培养基组合物,例如细胞或整个类器官在其中生长或悬浮。例如,这样的培养基组合物在对其施用的受试者中不会引起任何不良反应。在一个实例中,细胞培养基可包含本文公开的基础培养基。在一个实例中,基础培养基可以包含PVA和MC。例如,基础培养基可以包含0.05至0.5%PVA和0.05至0.5%MC。

[0093] 在一实例中,载体或赋形剂提供缓冲活性以将细胞维持在合适的pH下,从而发挥生物活性,例如,载体或赋形剂为磷酸盐缓冲盐水(PBS)。PBS代表有吸引力的载体或赋形剂,因为它与细胞和因子的相互作用最小,并且允许细胞和因子的快速释放,在这种情况下,本公开的组合物可以以液体产生,用于直接施用于血流或进入肾脏或肾脏周围或邻近的区域,例如通过注射。因此,在一个实例中,本文公开的细胞组合物或整个类器官在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中提供。

[0094] 在另一个实例中,可以将细胞组合物或整个类器官掺入或包埋在与接受者相容并降解成对接受者无害的产物的支架内。这些支架为将要移植到接受受试者中的细胞提供支持和保护。天然和/或合成的可生物降解的支架是此类支架的实例。各种不同的支架可以成功地用于本公开的实践中。示例性的支架包括但不限于生物可降解支架。天然可生物降解支架包括胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白支架。用于细胞移植支架的合适的合成材料应能够支持广泛的细胞生长和细胞功能。这样的支架也可以是可再吸收的。合适的支架包括聚乙醇酸支架,例如,如Vacanti,等人J.Ped.Surg.23:3-9 1988;Cima,等人Biotechnol.Bioeng.38:1451991;Vacanti,等人Plast.Reconstr.Surg.88:753-9 1991所

述;或合成聚合物,例如聚酸酐、聚原酸酯和聚乳酸。在另一个实例中,细胞可以在凝胶支架(例如来自Upjohn Company的Gelfoam)中施用。在另一个实例中,细胞可以在去细胞化的肾支架中施用。在一个实例中,细胞可以在去细胞化的人肾或其细胞外基质(ECM)组分中施用。

[0095] 在一个实例中,组合物包含有效量或治疗有效量的细胞或整个类器官。在另一个实例中,细胞或整个类器官被包含在一个腔室中,该腔室不允许该细胞或类器官进入受试者的循环系统,但是允许该细胞或类器官分泌的因子进入循环系统。以这种方式,可通过允许细胞或类器官将因子分泌到受试者的循环系统中来向受试者施用可溶性因子。这样的腔室同样可以植入受试者的部位以增加可溶性因子的局部水平,例如植入肾脏中或附近。

[0096] 在一个实例中,本文公开的组合物可以全身施用,例如通过静脉内、动脉内或腹膜内施用。在一个实例中,将本文公开的组合物静脉内施用。在另一个实例中,将组合物动脉内施用。在另一个实例中,将组合物通过肾动脉注射、肾实质注射或包膜下移植到正常或患病的肾脏中来施用。在另一个实例中,植入组合物。例如,可将整个类器官植入到受试者的肾脏附近。

[0097] 在一个实例中,可以根据本公开的细胞组合物冷冻保存。可以使用本领域已知的慢速冷却方法或“快速”冷冻方案进行细胞或整个类器官的冷冻保存。优选地,与未冷冻的细胞或整个类器官相比,冷冻保存的方法保持相似的表型,细胞表面标记物和冷冻保存的细胞或整个类器官的生长速率。冷冻保存的组合物可以包含冷冻保存溶液。冷冻保存溶液的pH通常为6.5至8,优选为7.4。

[0098] 冷冻保存溶液的实例包括非热原性等渗溶液,例如,PlasmaLyte A®。100mL PlasmaLyte A®包含526mg氯化钠,USP (NaCl);502mg葡萄糖酸钠($C_6H_{11}NaO_7$);368mg三水合乙酸钠,USP ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$);37mg氯化钾,USP (KCl);和30mg氯化镁,USP ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)。它不包含抗微生物剂。

[0099] 在一个实例中,本公开涵盖细胞疗法的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用本文公开的组合物。例如,本公开涵盖通过向有此需要的受试者施用本文公开的组合物来治疗肾病的方法。在本公开的上下文中使用术语“肾病”是指与急性或慢性肾衰竭的任何阶段或程度有关的障碍,所述肾衰竭导致肾脏执行血液过滤和从血液中清除过量流体,电解质和废物的功能的能力丧失。肾病的实例包括内分泌功能障碍,例如贫血(促红细胞生成素缺乏症)和矿物质失衡(维生素D缺乏症)。肾病也可能源自肾脏或可能继发于多种病症,包括(但不限于)心力衰竭、高血压、糖尿病、自身免疫性疾病或肝病或药物诱导的毒性。在一个实例中,肾病可能是在肾脏的急性损伤后发展的慢性肾衰竭的病症。例如,由缺血和/或暴露于毒物引起的对肾脏的损伤可能会导致急性肾衰竭;急性肾损伤后的不完全恢复可能导致慢性肾衰竭的发展。肾病的其它实例包括先天性肾病综合征(CNS),包括类固醇抗性肾病综合征和芬兰肾病、局灶性节段性肾小球肾炎(FSGS)、Alport综合征和PierSon综合征。

[0100] 在一个实例中,本公开涵盖通过将本文公开的整个类器官植入到有此需要的受试者中来治疗肾病的方法。在另一个实例中,本公开涵盖通过向有此需要的受试者施用本文公开的细胞组合物来治疗肾病的方法。

[0101] 在其它实例中,可以提供本文公开的组合物或细胞用于去细胞化的肾支架的再细

胞化。在另一个实例中,本公开涵盖包含本文公开的组合物或细胞的生物材料或支架。

[0102] 干细胞

[0103] 本公开的方面涵盖干细胞的培养。在本公开的上下文中使用术语“干细胞”是指祖细胞的子集,其在特定环境下具有分化为更特异化或分化表型的能力或潜力,并且在某些环境下保留增殖而没有实质性分化的能力。在一个实例中,术语干细胞通常是指天然存在的母细胞,其子代(后代)通常在不同的方向上通过分化(例如通过获得完全的个体特征)而特异化,如在胚胎细胞和组织的逐渐多样化中所发生的。细胞分化是通常通过许多细胞分裂发生的复杂过程。分化细胞可以衍生自多能细胞,其本身衍生自多能细胞等。虽然这些多能细胞中的每一个都可以被认为是干细胞,但是细胞类型的范围各自可能引起相当大的变化。一些分化细胞也具有产生更大发育潜力的细胞的能力。这样的能力可以是自然的,也可以在用各种因素处理后人工诱导。在许多生物学实例中,干细胞也是“多能的”,因为它们可以产生一种以上不同细胞类型的后代,但这不是“干性”所必需的。自我更新是干细胞定义的另一个经典部分。从理论上讲,自我更新可以通过两种主要机制中的任一种发生。干细胞可能不对称地分裂,一个子代保留干态,另一个子代表达一些不同的其它特定功能和表型。或者,群体中的一些干细胞可以对称地分为两个干,从而整体上维持群体中的某些干细胞,而群体中的其它细胞仅产生分化的后代。

[0104] 在一个实例中,干细胞是人干细胞。在一个实例中,干细胞是培养扩增的人干细胞的群体。在一个实例中,干细胞可以体外或离体培养扩增。在一个实例中,培养扩增的干细胞已经传代了至少一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、10次。

[0105] 在一个实例中,干细胞是多能干细胞。在另一个实例中,干细胞是人胚胎干细胞。通常,多能干细胞在处于多能状态时显示OCT4、NANOG和SSEA1的表达,并且这些标记物的表达通常会随着分化而丧失。在另一个实例中,干细胞是人胚胎干细胞(“hES”或“hESC”)。

[0106] 在另一个实例中,干细胞是诱导的多能干细胞。例如,干细胞可以是人诱导的多能干细胞。术语“诱导的多能干细胞”及其缩写“iPSC”是指衍生自,可获自或源自通过表达外源基因(例如转录因子,包括OCT4、SOX2、KLF4和c-MYC的优选组合)重编程为多能态的任何类型的人成年体细胞的细胞。人iPSC的多能性水平与hESC相当,但可衍生自用于在分化和细胞递送之前同时进行或不进行基因校正的自体疗法的患者。产生诱导的多能干细胞的合适方法描述于例如US 7,615,374和US2014273211,Barberi等人;Plos medicine,第2(6)卷:0554-0559(2005),和Vodyanik等人Cell Stem cell,第7卷:718-728(2010)中。在一个实例中,iPSC衍生自成纤维细胞。在另一个实例中,iPSC衍生自血液。例如,iPSC可以衍生自白细胞。在另一个实例中,iPSC衍生自成纤维细胞。在另一个实例中,iPSC衍生自白细胞或成纤维细胞。

[0107] 在一个实例中,干细胞是H9或hES3。因此,在一个实例中,本公开涵盖本文公开的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官衍生自H9干细胞。在另一个实例中,本公开涵盖本文公开的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官衍生自hES3干细胞(Kao等人,2016;Ng等人,2016;van den Berg等人,2018)。例如,肾脏类器官可以衍生自hES3-SOX17mCherry或H9 GAPTrapLuc2。因此,在一个实例中,本公开涵盖包含少于50个肾单位的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官衍生自H9或hES3干细胞。在另一个实例中,肾脏类器官包含少于15个肾单位,并且衍生自H9或hES3干细胞。在这些实例中,干细胞可以表达报道基因。

[0108] 在另一个实例中,干细胞是iPSC GAPTrap td-Tomato、CRL1502.C32或CLR1502.3 (Briggs等人,2013;Takasato等人,2015)。因此,在一个实例中,本公开涵盖本文定义的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官衍生自iPSC GAPTrap td-Tomato。

[0109] 因此,在一个实例中,本公开涵盖包含少于50个肾单位的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官衍生自iPSC GAPTrap td-Tomato、CRL1502.C32或CLR1502.3。在另一个实例中,肾脏类器官包含少于15个肾单位,并且衍生自iPSC GAPTrap td-Tomato、CRL1502.C32或CLR1502.3。同样,在这些实例中,干细胞可以表达报道基因。

[0110] 在一个实例中,可能期望产生代表特定受试者和/或疾病的肾脏类器官。下面描述该实施例的各种实例。与本部分相关的是可用于产生肾脏类器官的iPS细胞。在一个实例中,人iPS细胞衍生自患有遗传性肾病的人受试者。在该实例中,可以从患有遗传性肾病的受试者中分离血液样品,并且可以从血液样品中的细胞(例如白细胞)中诱导iPS细胞。受试者可以患有多种示例性遗传性肾病中的一种。实例包括先天性肾病综合征(CNS),包括类固醇抗性肾病综合征和芬兰肾病、局灶性节段性肾小球肾炎(FSGS)、Alport综合征和PierSon综合征。因此,在一个实例中,本公开涵盖代表选自以下组成的组的肾病的肾脏类器官:先天性肾病综合征(CNS),包括类固醇抗性肾病综合征和芬兰肾病、局灶性节段性肾小球肾炎(FSGS)、Alport综合征和PierSon综合征。因此,在一个实例中,肾脏类器官代表CNS。在另一个实例中,肾脏类器官代表类固醇抗性肾病综合征。

[0111] 在一个实例中,肾脏类器官可用于建模发育中的肾脏和/或肾病。因此,在一个实例中,本公开涵盖本文公开的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官用于建模肾脏发育。在另一个实例中,本公开涵盖本文公开的肾脏类器官,其中所述肾脏类器官用于建模肾病。在一个实例中,肾病是CNS或另一种上述疾病。在该实例中,可以通过从患有上述肾病的受试者中诱导iPS细胞并由其产生肾脏类器官来建模疾病。在这个实例中,可以采用基因编辑(例如CRISPR/Cas9基因编辑)以将突变引入与肾病发展相关或潜在相关的受试者来源的iPS细胞的基因中。在其它实例中,采用基因编辑以校正受试者来源的iPS细胞中的突变。在一个实例中,可以产生等基因编辑的iPS细胞(例如,Forbes等人(2018)Am J Hum Genet.102:816-831)。肾脏发育和疾病可以使用不同的发育阶段例如以下讨论的那些中的一种或多种(例如d7+15)的肾脏类器官随时间(例如2、5、10或更多天)建模。在这些实例中,类器官肾小球可以分组培养,每组代表不同的发育阶段(例如d7+11、d7+15、d7+18、d7+20)和/或培养限定的时间段(例如,在涡旋培养中2、5和10天)。可以使用例如视觉评估、免疫组织化学、基因和蛋白质表达分析来评估肾脏类器官以确定发育或疾病阶段。在一个实例中,在这些研究期间,还可以使肾脏类器官与肾毒素,候选化合物和/或治疗化合物接触,并且可以测定肾毒性和/或治疗功效。如上所述,在以上实例中使用的肾脏类器官可以由经过基因修饰以表达报道基因的iPS细胞产生。

[0112] 细胞培养方法

[0113] 用于细胞培养的术语“培养基(media)”或“培养基(medium)”包括细胞周围环境的组成。设想培养基有助于和/或提供足以用于细胞分化和类器官形成的条件。培养基可以是固体,液体,气体或相和材料的混合物。培养基可以包括液体生长培养基以及不维持细胞生长的液体培养基。培养基还包括凝胶状培养基,例如琼脂、琼脂糖、明胶和胶原基质。示例性气体培养基包括在培养皿或其它固体或半固体支持物上生长的细胞所暴露的气相。术语

“培养基”还指用于细胞培养的物质,即使其还没有与细胞接触。

[0114] 本公开的方法中使用的培养基可以通过使用用于培养干细胞或IM细胞的培养基作为基础培养基来制备。基础培养基包括,例如,Eagles最低必需(MEM)培养基,并且没有特别限制,只要其可用于培养干细胞或IM细胞即可。此外,本公开的培养基可包含任何组分,例如脂肪酸或脂质、维生素、生长因子、细胞因子、抗氧化剂、缓冲剂、无机盐等。本公开中使用的细胞培养基包含所有必需氨基酸,也可以包含非必需氨基酸。通常,氨基酸分为必需氨基酸(Thr、Met、Val、Leu、He、Phe、Trp、Lys、His)和非必需氨基酸(Gly、Ala、Ser、Cys、Gin、Asn、Asp、Tyr、Arg、Pro)。在其它实例中,基础培养基包括例如APEL、mTESR-E6或E8化学成分确定的培养基(StemCell Technologies)。基础培养基也可以补充有无蛋白的杂交瘤培养基(PFHM)(例如3.5%)。在一个实例中,基础培养基补充有血清替代品。例如,基础培养基可以补充有敲除血清替代品(Thermo Fisher)。

[0115] 如本领域技术人员将理解的,本文所公开的培养基将需要随时间被替换。确定培养基替换的适当时机被认为在所述技术熟练者的技能范围内。例如,在细胞培养基中通常使用各种可商购的比色指示剂,以指示何时需要替换培养基。作为指导,对于在多孔培养皿中的细胞培养,可以每24或48小时替换一次培养基。例如,可以每两天替换一次培养基。

[0116] 肾脏类器官

[0117] 本公开涵盖一种产生肾脏类器官的方法。在一个实例中,通过使包含中间中胚层(IM)细胞群体的培养基涡旋来产生肾脏类器官。在一个实例中,将IM细胞在悬浮培养中涡旋。为了避免疑问,在本公开的上下文中使用“悬浮培养”是指其中单个细胞或小细胞聚集体增殖同时悬浮在搅拌的液体培养基中的细胞培养。例如,单个细胞或小细胞聚集体在悬浮培养中增殖并形成肾脏类器官。

[0118] 在一个实例中,IM细胞培养基包含FGF。在一些实例中,FGF可选自FGF9超家族,其包括FGF9、FGF16和FGF20。在一些实例中,FGF是FGF9。例如,IM细胞培养基可从D7到至少D7+10包含FGF。在一个实例中,IM细胞培养基可从D7到至少D7+15包含FGF。下文提供了FGF的示例浓度。例如,细胞培养基包含至少50ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含至少100ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含至少150ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含至少200ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含至少300ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含至少350ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含至少400ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含至少500ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至400ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至300ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至250ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含100ng/ml至200ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含180ng/ml至220ng/ml的FGF。在另一个实例中,细胞培养基包含190ng/ml至210ng/ml的FGF。

[0119] 在一个实例中,IM细胞培养基可包含FGF9。在一个实例中,细胞培养基包含至少50ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少100ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少150ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少200ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少300ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少350ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少400ng/ml的FGF9。在另

一个实例中,细胞培养基包含至少500ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至400ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至300ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至250ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含100ng/ml至200ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含180ng/ml至220ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含190ng/ml至210ng/ml的FGF9。

[0120] 在另一个实例中,将以上参考水平的FGF9替代为FGF2。例如,IM细胞培养基可以包含50ng/ml至400ng/ml的FGF2。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至300ng/ml的FGF2。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至250ng/ml的FGF2。在另一个实例中,细胞培养基包含100ng/ml至200ng/ml的FGF2。在另一个实例中,细胞培养基包含180ng/ml至220ng/ml的FGF2。在另一个实例中,细胞培养基包含190ng/ml至210ng/ml的FGF2。

[0121] 在另一个实例中,将以上参考水平的FGF9替代为FGF16。例如,IM细胞培养基可包含50ng/ml至400ng/ml的FGF16。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至300ng/ml的FGF16。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至250ng/ml的FGF16。在另一个实例中,细胞培养基包含100ng/ml至200ng/ml的FGF16。在另一个实例中,细胞培养基包含180ng/ml至220ng/ml的FGF 16。在另一个实例中,细胞培养基包含190ng/ml至210ng/ml的FGF16。

[0122] 在另一个实例中,将以上参考水平的FGF9替代为FGF20。例如,IM细胞培养基可以包含50ng/ml至400ng/ml的FGF20。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至300ng/ml的FGF20。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至250ng/ml的FGF20。在另一个实例中,细胞培养基包含100ng/ml至200ng/ml的FGF20。在另一个实例中,细胞培养基包含180ng/ml至220ng/ml的FGF20。在另一个实例中,细胞培养基包含190ng/ml至210ng/ml的FGF20。在一个实例中,在涡旋培养中5天后从培养基中除去FGF。在一个实例中,在涡旋培养中6天后从培养基中除去FGF。在一个实例中,在涡旋培养4至6天后从培养基中除去FGF。

[0123] 在一个实例中,通过向培养基补充Wnt/ β -连环蛋白激动剂来在类器官中启动肾发生。在本公开的上下文中使用术语“Wnt/ β -连环蛋白激动剂”是指在典型Wnt信号传导途径的情况下,但是优选不在其它非典型Wnt信号传导途径的情况下抑制GSK3(例如GSK3-P)的分子。在一些实例中,Wnt/ β -连环蛋白激动剂是GSK3 β 抑制剂。Wnt β -连环蛋白激动剂的实例包括CHIR99021(CHIR)、LiCl、SB-216763、CAS 853220-52-7和可从诸如Santa Cruz Biotechnology和R&D Systems的来源商购获得的其它Wnt/ β -连环蛋白激动剂。

[0124] 因此,在一个实例中,IM细胞培养基可包含上述参考水平的FGF和Wnt/ β -连环蛋白激动剂。例如,IM细胞培养基可包含至少0.5 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,细胞培养基可包含至少0.6 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,细胞培养基可包含至少0.7 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,细胞培养基可包含至少0.8 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,细胞培养基可以包含至少0.9 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,细胞培养基可以包含约1 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,细胞培养基可以包含1.1 μ M或更少的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,细胞培养基可以包含1.2 μ M或更少的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,细胞培养基可以包含1.3 μ M或更少的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,细胞培养基可以包含1.4 μ M或更少的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,细胞培养基可以包含1.5 μ M或更少的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。应当理解,培养基可以包含Wnt/ β -连环蛋白激动剂浓度的这

些上限和下限的任何组合。在另一个实例中,细胞培养基可以包含0.5 μ M至1.5 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,细胞培养基可以包含0.8 μ M至1.2 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在一个实例中,细胞培养基可包含至少0.5 μ M CHIR。在另一个实例中,细胞培养基可以包含至少0.6 μ M CHIR。在另一个实例中,细胞培养基可以包含至少0.7 μ M CHIR。在另一个实例中,细胞培养基可以包含至少0.8 μ MCHIR。在另一个实例中,细胞培养基可以包含至少0.9 μ M CHIR。在另一个实例中,细胞培养基可包含约1 μ M CHIR。在另一个实例中,细胞培养基可以包含1.1 μ M或更少的CHIR。在另一个实例中,细胞培养基可以包含1.2 μ M或更少的CHIR。在另一个实例中,细胞培养基可以包含1.3 μ M或更少的CHIR。在另一个实例中,细胞培养基可以包含1.4 μ M或更少的CHIR。在另一个实例中,细胞培养基可以包含1.5 μ M或更少的CHIR。应当理解,培养基可以包含CHIR浓度的这些上限和下限的任何组合。在另一个实例中,细胞培养基可以包含0.5 μ M至1.5 μ M的CHIR。在另一个实例中,细胞培养基可以包含0.8 μ M至1.2 μ M的CHIR。

[0125] 在另一个实例中,IM细胞培养基可以包含Rho激酶抑制剂(ROCKi),例如Y-27632(StemCell Technologies)。在一个实例中,细胞培养基可包含至少8 μ MROCKi。在另一个实例中,细胞培养基可包含约10 μ M ROCKi。在另一个实例中,细胞培养基可以包含12 μ M或更少的ROCKi。在另一个实例中,细胞培养基可包含8 μ M至12 μ M ROCKi。

[0126] 在以上实例中,IM细胞培养基可包含FGF9、Wnt/ β -连环蛋白激动剂如CHIR和肝素、聚(乙烯醇)(PVA)和甲基纤维素(MC)中的一种或多种或全部。在另一个实例中,细胞培养基也可以包含ROCKi。

[0127] 在一个实例中,IM细胞培养基包含至少0.5 μ g/ml的肝素。在另一个实例中,细胞培养基包含约1 μ g/ml的肝素。在另一个实例中,细胞培养基包含1.5 μ g/ml或更少的肝素。在另一个实例中,细胞培养基包含2 μ g/ml或更少的肝素。在另一个实例中,细胞培养基包含0.2 μ g/ml至2 μ g/ml的肝素。在另一个实例中,细胞培养基包含0.5 μ g/ml至1.5 μ g/ml的肝素。在另一个实例中,细胞培养基包含0.8 μ g/ml至1.2 μ g/ml的肝素。

[0128] 在一个实例中,IM细胞培养基包含至少0.05%的PVA。在另一个实例中,细胞培养基包含约0.1%的PVA。在另一个实例中,细胞培养基包含0.15%或更少的PVA。在另一个实例中,细胞培养基包含0.1%至0.15%的PVA。

[0129] 在一个实例中,IM细胞培养基包含至少0.05%的MC。在另一个实例中,细胞培养基包含约0.1%的MC。在另一个实例中,细胞培养基包含小于0.15%的MC。在另一个实例中,细胞培养基包含0.1%至0.15%的MC。

[0130] 术语“涡旋(swirled)”、“涡旋(swirl)”和“涡旋(swirling)”在本公开的上下文中可互换使用,是指细胞培养基以圆周、扭转或螺旋模式的运动。在一实例中,通过以圆周运动对细胞培养物进行充分的搅拌来使细胞培养基涡旋。例如,可以使用定轨振荡器使细胞培养物涡旋。适用于使细胞培养物涡旋的设备的其它实例包括振荡平台,振荡培养箱或旋转烧瓶。用于涡旋的合适的rpm允许IM细胞聚集并形成类器官。

[0131] 在一个实例中,IM细胞培养物至少以30rpm涡旋。在另一个实例中,细胞培养物至少以40rpm涡旋。在另一个实例中,细胞培养物至少以50rpm涡旋。在另一个实例中,细胞培养物至少以60rpm涡旋。在另一个实例中,细胞培养物至少以70rpm涡旋。在另一个实例中,细胞培养物至少以80rpm涡旋。在另一个实例中,细胞培养物以40至80rpm涡旋。在另一个实

例中,细胞培养物以50至70rpm涡旋。在另一个实例中,细胞培养物以55至65rpm涡旋。在另一个实例中,细胞培养物以30至150rpm涡旋。在另一个实例中,细胞培养物以30至90rpm涡旋。

[0132] 在一个实例中,将IM细胞培养至少五天。在另一个实例中,将IM细胞培养至少七天。在另一个实例中,将IM细胞培养至少十天。在另一个实例中,将IM细胞培养至少12天。在另一个实例中,将IM细胞培养至少14天。在另一个实例中,将IM细胞培养至少20天。在另一个实例中,将IM细胞培养长达42天。在另一个实例中,将IM细胞培养5至20天。在另一个实例中,将IM细胞培养5至18天。在另一个实例中,将IM细胞培养7至14天。例如,可将IM细胞涡旋培养至少十天。例如,可将IM细胞涡旋至少20天。在另一个实例中,可将IM细胞涡旋至少30天。在一个实例中,将IM细胞涡旋10至30天。在另一个实例中,将IM细胞涡旋15至30天。

[0133] 在一个实例中,将IM细胞群体解离并在上述参考培养基中涡旋培养。在一个实例中,IM细胞可以使用EDTA解离。在另一个实例中,IM细胞可以使用胰蛋白酶或TrypLE解离。在一个实例中,在进一步培养之前,将解离的IM细胞通过网筛。在一个实例中,解离后将细胞涡旋培养至少12天。在另一个实例中,解离后将细胞涡旋培养至少13天。在另一个实例中,解离后将细胞涡旋培养至少14天。在另一个实例中,解离后将细胞涡旋培养至少15天。在另一个实例中,解离后将细胞涡旋培养至少20天。在另一个实例中,解离后将细胞涡旋培养至少25天。在另一个实例中,解离后将细胞涡旋培养至少35天。在另一个实例中,解离后将细胞涡旋培养5至18天。

[0134] 在其它实例中,本文定义的IM细胞可以在包含不同组分的多种培养基中培养。例如,可以分阶段培养细胞,其中每个阶段与不同的培养基相关。在一个实例中,将IM细胞分两个阶段进行涡旋培养。在该实例中,阶段1培养基包含以上参考水平的FGF,例如FGF9、CHIR、ROCKi、肝素、PVA和MC,而阶段2培养基包含以上参考水平的FGF,例如FGF9、CHIR、肝素、PVA和MC。例如,阶段1培养基可包含200ng/ml FGF9,1 μ M CHIR,10 μ M ROCKi、1 μ g/ml肝素、0.1%PVA和0.1%MC,而阶段2培养基可包含FGF9、1 μ M CHIR、1 μ g/ml肝素、0.1%PVA和0.1%MC。

[0135] 在另一个实例中,将IM细胞分三个阶段进行涡旋培养。在该实例中,阶段1和阶段2培养基如上所定义,阶段3培养基包括上述参考水平的PVA和MC。例如,阶段3培养基可以包含0.1%PVA和0.1%MC。

[0136] 在一个实例中,将IM细胞在阶段1培养基中培养一天,然后在阶段2培养基中培养四天。在一个实例中,将细胞在阶段1培养基中培养18至24小时,然后在阶段2培养基中培养四天。在这些实例中,可将细胞在阶段3培养基中进一步培养7至20天。在另一个实例中,可以将细胞在阶段3培养基中进一步培养至少15天。在另一个实例中,可以将细胞在阶段3培养基中进一步培养至少30天。

[0137] 本发明人还发现涡旋培养约5至10天后向IM细胞中添加视黄酸改善类器官中的肾小球成熟(改善的肾小球足细胞成熟)。因此,在一个实例中,在涡旋培养5至10天后,将视黄酸添加到细胞培养基中。在一个实例中,将全反式视黄酸(atRA)添加到细胞培养基中。在一个实例中,将至少0.07 μ M视黄酸添加到细胞培养基中。在另一个实例中,将至少0.1 μ M视黄酸添加到细胞培养基中。在另一个实例中,将至少0.2 μ M视黄酸添加到细胞培养基中。在另一个实例中,将至少0.5 μ M视黄酸添加到细胞培养基中。

[0138] 在另一个实例中,将至少1.5 μ M视黄酸添加至细胞培养基。在一个实例中,将至少1.8 μ M视黄酸添加至细胞培养基。在一个实例中,将至少2.0 μ M视黄酸添加至细胞培养基。在另一个实例中,将至少2.5 μ M视黄酸添加至细胞培养基。在另一个实例中,将1.5 μ M至3 μ M的视黄酸添加至细胞培养基。在另一个实例中,将2.0 μ M至3 μ M的视黄酸添加至细胞培养基。

[0139] 在另一个实例中,阶段1和阶段2培养基如上所定义,阶段3培养基包含以上参考水平的PVA、MC和atRA。例如,阶段3培养基可以包含0.1%PVA和0.1%MC。2.5 μ M atRA。

[0140] 本发明人已经发现,使少量的IM细胞在适当的培养基中进行涡旋培养可以指导具有简化的三维结构的肾脏类器官的发育。因此,在一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋包含少于 5×10^5 个IM细胞的IM细胞群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋包含少于 4×10^5 个IM细胞的IM细胞群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋包含少于 3×10^5 个IM细胞的IM细胞群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋包含少于 1×10^5 个IM细胞的IM细胞群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋包含 5×10^4 个IM细胞的IM细胞群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋包含 4×10^4 个IM细胞的IM细胞群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋包含 1×10^4 至 1×10^5 个IM细胞的IM细胞群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋包含 2×10^4 至 1×10^5 个IM细胞的IM细胞群体。在另一个例子中,本公开的方法涵盖涡旋包含 5×10^3 至 3×10^5 个IM细胞的IM细胞群体。

[0141] 在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋 1×10^5 IM细胞/ml至 5×10^6 IM细胞/ml。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋 5×10^5 至 4×10^6 IM细胞/ml。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋 5×10^5 IM至 3×10^6 IM细胞/ml。在其它实例中,本公开的方法涵盖涡旋小于 5×10^6 IM细胞/ml的群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋小于 4×10^6 IM细胞/ml的群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋小于 3×10^6 IM细胞/ml的群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋小于 2×10^6 IM细胞/ml的群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋 1×10^6 IM细胞/ml或更少的群体。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋 5×10^5 至 2×10^6 IM细胞/ml。在另一个实例中,本公开的方法涵盖涡旋 5×10^5 至 1.5×10^6 IM细胞/ml。在这些实例中,可以产生约5,000至15,000个类器官。在另一个实例中,可以产生约8,000至10,000个类器官。在这些实例中,在培养期间,总细胞数从涡旋培养开始时的细胞数增加了30至40倍。在这些实例中,与使用Takasato等人(2015)Nature,第526卷:564-568所述的方案的总细胞数增加相比,总细胞数增加3至4倍。在该实例中,总细胞数从约 1×10^5 至 5×10^6 细胞/ml增加至约 3×10^6 至 2×10^8 细胞/ml。

[0142] 在一个实例中,IM细胞是通过本文公开的方法获得的。

[0143] 在一个实例中,本公开涵盖产生肾脏类器官的方法,其包括:

[0144] -培养干细胞群体7天以产生IM细胞,其中前4到5天涉及在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂如CHIR中培养干细胞,而其余天则涉及在包含FGF9和低浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养基中培养细胞;

[0145] -解离IM细胞;

[0146] -通过在包含FGF9的细胞培养基中使IM细胞涡旋至少5天来产生肾脏类器官,其中前24小时涉及在包含FGF9、肝素、低浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂和ROCKi的细胞培养基中培养细胞和随后的3或4天涉及在包含FGF9、肝素、低浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂PVA和MC的细胞培养基中培养细胞。

[0147] 在以上实例中,干细胞可以培养7天,其中前4天涉及在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂如CHIR中培养干细胞,以及其余天则涉及在包含FGF9和低浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养物中培养细胞。在一个实例中,Wnt/ β -连环蛋白激动剂是CHIR。在一个实例中,高浓度的CHIR为约3 μ M至约12 μ M。在另一个实例中,高浓度的CHIR为约4 μ M至约10 μ M、约5 μ M至约9 μ M、约6 μ M至约8 μ M、约6.5 μ M至约8 μ M、或约6.5 μ M至约7 μ M。在一个实例中,低浓度的CHIR为1 μ M。在一个实例中,IM细胞使用胰蛋白酶解离。在另一个实例中,细胞使用EDTA解离。在一个实例中,将IM细胞在包含200ng/ml FGF9的细胞培养基中涡旋至少4天,其中前24小时涉及在包含200ng/ml FGF9、1 μ l/ml肝素、1 μ M CHIR和10 μ M ROCKi的细胞培养基中培养细胞,以及随后的3或4天涉及在包含200ng/ml FGF9、1 μ g/ml肝素、1 μ M、0.1%PVA和0.1%MC的细胞培养基中培养细胞。

[0148] 在另一个实例中,该方法还包括在不包含CHIR或FGF9的包含PVA和MC的细胞培养基中涡旋细胞。在一个实例中,细胞培养基包含0.1%PVA和0.1%MC。在一个实例中,将细胞在不包含CHIR或FGF9的包含PVA和MC的细胞培养基中涡旋5天或更长时间。

[0149] 中间中胚层

[0150] 本发明人还令人惊奇地发现,在包含低浓度CHIR和激活wnt/ β -连环蛋白信号传导的培养基中培养干细胞更长的时间有益于产生改良的中间中胚层。体外培养方法提供了一种通过后原线(PPS)细胞和中间中胚层(IM)细胞分化干细胞以产生肾脏类器官的系统。

[0151] 因此,在一个实例中,本公开涵盖产生中间中胚层(IM)细胞的体外方法,该方法包括在包含FGF和少于4 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养基中将后原线(PPS)细胞群体培养2至5天。FGF和Wnt/ β -连环蛋白激动剂的合适浓度和培养持续时间如以下关于在培养的前3或4天后的时间段内产生中间中胚层(IM)细胞的方法所述。

[0152] 因此,在一个实例中,本公开涵盖产生中间中胚层(IM)细胞的方法,该方法包括在包含CHIR的细胞培养基中培养干细胞群体约7天,其中FGF例如FGF9是在培养的前3或4天后添加到培养基中。在一个实例中,在培养的前3或4天后,将50ng/ml至400ng/ml的FGF9添加至培养基。在另一个实例中,在培养的前3或4天后,将50ng/ml至300ng/ml的FGF9添加到培养基中。在另一个实例中,在培养的前3或4天后,将50ng/ml至250ng/ml的FGF9添加到培养基中。在另一个实例中,在培养的前3或4天后,将100ng/ml至200ng/ml的FGF9添加到培养基中。在另一个实例中,在培养的前3或4天后,将150ng/ml至250ng/ml的FGF9添加到培养基中。在另一个实例中,在培养的前3或4天后,将175ng/ml至225ng/ml的FGF9添加到培养基中。在另一个实例中,在培养的前3或4天后,将190ng/ml至210ng/ml的FGF9添加到培养基中。在另一个实例中,在培养的前3或4天后,将195ng/ml至205ng/ml的FGF9添加到培养基中。在另一个实例中,在培养的前3或4天后,将约200ng/ml的FGF9添加到培养基中。在一个实例中,在培养的前3或4天后,还将肝素添加到培养基中。在一个实例中,在培养的前3或4天后,将0.5 μ g/ml至2 μ g/ml的肝素添加到培养基中。在另一个实例中,在培养的前3或4天后,将0.5 μ g/ml至1.5 μ g/ml的肝素添加到培养基中。在另一个实例中,在培养的前3或4天后,将0.8 μ g/ml至1.2 μ g/ml的肝素添加到培养基中。在另一个实例中,在培养的前3或4天后,将1 μ g/ml肝素添加到培养基中。在一个实例中,在培养4天后,将上述参考水平的FGF和肝素添加到培养基中。在一个实例中,将干细胞在包含CHIR的细胞培养基中培养7天。

[0153] 特别地,本发明人已经发现,在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂如CHIR中培养干

细胞,然后在低浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂和FGF如FGF9中培养干细胞会产生改良的IM细胞。例如,改良的IM细胞表达高水平的PAX2、LHX1和OSR1 (帽间充质) 以及Wnt11和GATA3 (输尿管上皮)。因此,在一个实例中,可将干细胞在包含高浓度Wnt/ β -连环蛋白激动剂如CHIR的培养基中培养,然后在包含低浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂和FGF如FGF9、FGF16、FGF20或FGF2的培养基中培养。

[0154] 在一个实例中,本公开涵盖产生中间中胚层(IM)细胞的方法,该方法包括:在包含高浓度的CHIR的细胞培养基中培养干细胞群体,然后在包含低浓度的CHIR和FGF如FGF9的细胞培养基中培养干细胞群体。在该实例中,“高浓度”的CHIR为至少5 μ M,而“低浓度”的CHIR小于3 μ M。在另一个实例中,“高浓度”的CHIR为至少6 μ M,而“低浓度”的CHIR小于2 μ M。在另一个实例中,“高浓度”的CHIR为7 μ M,而“低浓度”的CHIR为1 μ M或更低。

[0155] 因此,在另一方面,本公开的方法涵盖产生中间中胚层(IM)细胞的体外方法。在一个实例中,产生IM细胞的方法包括,将干细胞群体培养约7天,其中前4至5天涉及在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂如CHIR中培养干细胞,其余天涉及在包含FGF9和低浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养基中培养细胞。在一方面,产生IM细胞的方法包括,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,在包含FGF9和至少0.5 μ M Wnt/ β -连环蛋白激动剂的细胞培养基中培养干细胞群体。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含至少0.6 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含至少0.7 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含至少0.8 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含至少0.9 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含约1 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含1.1 μ M或更低的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含1.2 μ M或更低的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含1.3 μ M或更低的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含1.4 μ M或更低的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含1.5 μ M或更低的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。应理解,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,培养基可以包含Wnt/ β -连环蛋白激动剂浓度的这些上限和下限的任何组合。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含0.5 μ M至1.5 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含0.8 μ M至1.2 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。因此,在一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含2 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的Wnt/ β -连环蛋白激动剂中培养后,细胞培养基可以包含少于1.5 μ M的Wnt/ β -连环蛋白激动剂。

[0156] 在一个实例中,Wnt/ β -连环蛋白激动剂是CHIR。因此,在一个实例中,前4至5天在

高浓度的CHIR中培养后,细胞培养基可以包含至少0.5 μ M的CHIR。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的CHIR中培养后,细胞培养基可以包含至少0.6 μ M的CHIR。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的CHIR中培养后,细胞培养基可以包含至少0.7 μ M的CHIR。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的CHIR中培养后,细胞培养基可以包含至少0.8 μ M的CHIR。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的CHIR中培养后,细胞培养基可以包含至少0.9 μ M的CHIR。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的CHIR中培养后,细胞培养基可以包含约1 μ M的CHIR。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的CHIR中培养后,细胞培养基可以包含0.5 μ M至1.5 μ M的CHIR。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的CHIR中培养后,细胞培养基可以包含0.8 μ M至1.2 μ M的CHIR。因此,在一个实例中,前4至5天在高浓度的CHIR中培养后,细胞培养基可以包含少于2 μ M的CHIR。在另一个实例中,前4至5天在高浓度的CHIR中培养后,细胞培养基可以包含少于1.5 μ M的CHIR。

[0157] 在一个实例中,前4至5天在高浓度的CHIR中培养后,培养基可以包含低浓度的CHIR(例如以上示例的那些)。在一个实例中,细胞培养基包含至少50ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少100ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少150ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少200ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少300ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少350ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少400ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含至少500ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至400ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至300ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至250ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含100ng/ml至200ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含180ng/ml至220ng/ml的FGF9。在另一个实例中,细胞培养基包含190ng/ml至210ng/ml的FGF9。

[0158] 在另一个实例中,将以上参考水平的FGF9替代为FGF2。例如,细胞培养基可以包含50ng/ml至400ng/ml的FGF2。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至300ng/ml的FGF2。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至250ng/ml的FGF2。在另一个实例中,细胞培养基包含100ng/ml至200ng/ml的FGF2。在另一个实例中,细胞培养基包含180ng/ml至220ng/ml的FGF2。在另一个实例中,细胞培养基包含190ng/ml至210ng/ml的FGF2。

[0159] 在另一个实例中,将以上参考水平的FGF9替代为FGF16。例如,细胞培养基可以包含50ng/ml至400ng/ml的FGF16。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至300ng/ml的FGF16。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至250ng/ml的FGF16。在另一个实例中,细胞培养基包含100ng/ml至200ng/ml的FGF16。在另一个实例中,细胞培养基包含180ng/ml至220ng/ml的FGF16。在另一个实例中,细胞培养基包含190ng/ml至210ng/ml的FGF16。

[0160] 在另一个实例中,将以上参考水平的FGF9替代为FGF20。例如,细胞培养基可以包含50ng/ml至400ng/ml的FGF20。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至300ng/ml的FGF20。在另一个实例中,细胞培养基包含50ng/ml至250ng/ml的FGF20。在另一个实例中,细胞培养基包含100ng/ml至200ng/ml的FGF20。在另一个实例中,细胞培养基包含180ng/ml至220ng/ml的FGF20。在另一个实例中,细胞培养基包含190ng/ml至210ng/ml的FGF20。

[0161] 在一个实例中,包含高浓度CHIR的培养基不包含FGF。

[0162] 在另一个实例中,前4至5天在高浓度的CHIR中培养后,细胞培养基可以包含低浓

度的CHIR(例如以上示例的那些)、以上示例水平的FGF和肝素。在一个实例中,包含低浓度的CHIR和FGF的细胞培养基还包含肝素。在该实例中,细胞培养基可以包含1 μ g/ml的肝素。在另一个实例中,细胞培养基可以包含1.5 μ g/ml的肝素。在另一个实例中,细胞培养基可以包含2 μ g/ml的肝素。在另一个实例中,细胞培养基可以包含0.5 μ g/ml至2 μ g/ml的肝素。在另一个实例中,细胞培养基可以包含0.5 μ g/ml至1.5 μ g/ml的肝素。在另一个实例中,细胞培养基可以包含0.8 μ g/ml至1.2 μ g/ml的肝素。

[0163] 在一个实例中,本公开的方法涵盖将以上提及的产生IM细胞的方法与在以上示例的产生肾脏类器官的方法中使用这些IM细胞相结合。

[0164] 在一个实例中,干细胞可以使用上文提及的方法培养以产生IM细胞,然后在上文提及的涡旋培养物中解离和培养以产生肾脏类器官。在该实例中,IM细胞可以用EDTA、胰蛋白酶或TrypLE解离。在另一个实例中,细胞可以在通过网筛并在上文提及的涡旋培养物中培养以产生肾脏类器官之前用EDTA解离。在另一个实例中,细胞可以在离心和将得到的沉淀重悬于上文提及的涡旋培养物中以产生肾脏类器官之前用胰蛋白酶解离。

[0165] 可以基于培养的天数来描述本公开涵盖的肾脏类器官。培养的天数可以分为两个部分,包括从干细胞产生IM细胞的天数(X)和从IM细胞形成肾脏类器官的天数(Y)。在一个实例中,将从干细胞产生IM细胞与从IM细胞产生肾脏类器官区分的步骤是IM细胞的解离。代表从干细胞产生IM细胞的培养天数和从IM细胞形成肾脏类器官的天数的一种方法是(d) X+Y天(例如d7+12将描述从干细胞产生IM细胞的7天,然后将IM细胞解离,和从IM细胞形成类器官的12天(即Y=作为类器官的天数))。

[0166] 在一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+12肾脏类器官。在另一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+14肾脏类器官。在另一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+15或更晚的肾脏类器官。在另一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+17肾脏类器官。

[0167] 在另一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+20肾脏类器官。在另一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+22肾脏类器官。在另一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+25肾脏类器官。在另一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+30肾脏类器官。在另一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+13至d7+30。在另一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+14至d7+30。在另一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+15至d7+30。在另一个实例中,本公开涵盖的肾脏类器官是d7+15至d7+25。在上述提及的实例中,IM细胞可以培养8、9或10天(即d8+Y、d9+Y或d10+Y)。

[0168] 在另一个实例中,本文公开的肾脏类器官的细胞在D7+7之后增殖。在另一个实例中,本文公开的肾脏类器官的细胞在D7+10之后增殖。在另一个实例中,本文公开的肾脏类器官的细胞在D7+12之后增殖。在另一个实例中,本文公开的肾脏类器官的细胞在D7+5与D7+10之间增殖。在另一个实例中,本文公开的肾脏类器官的细胞在D7+5与D7+12之间增殖。在这些实例中,可以通过使用本文公开的方法制备类器官的群体,并在特定时间点(例如,D7+5、D7+7、D7+10等)从群体中分离和解离类器官,并在每个时间点使用例如自动细胞计数器(例如Life Technologies)中的锥虫蓝染料排斥试验测定细胞数来检测细胞增殖。

[0169] 筛选

[0170] 本公开涵盖的肾脏类器官可以在各种筛选应用中使用。在一个实例中,肾脏类器

官可用于筛选毒性。例如,肾脏类器官可用于筛选肾毒性。

[0171] 因此,在一个实例中,本公开涵盖筛选候选化合物的肾毒性的方法,该方法包括使本文公开的肾脏类器官与候选化合物接触并确定该候选化合物是否具有肾毒性。

[0172] 在一个实例中,在评估肾毒性副作用之前,使本文所述的肾脏类器官与候选化合物接触。示例性的肾毒性副作用包括直接肾小管作用、足细胞损伤、间质性肾炎和肾小球肾炎。肾毒性也可以通过用于体外肾细胞功能的任何适当测试来评估或测量,包括使用市售工具(包括例如来自Qiagen的Human Nephrotoxicity RT² ProfilerTM PCR Array或来自Eurofins的High Content Analysis (HCA) 多重肾毒性测定)分析生物标记物的表达。在另一个实例中,通过与候选化合物接触后测量本文公开的肾脏类器官中肾小球细胞的急性细胞凋亡来评估肾毒性。在其它实例中,可以使用电子显微镜(例如透射EM或扫描EM)评估肾毒性。指示肾毒性的标准的其它实例包括足细胞标记基因表达或蛋白质表达的丧失和足突的丧失(脱落)。

[0173] 在另一个实例中,本公开涵盖筛选在治疗肾病中具有治疗功效的候选化合物的方法,该方法包括在确定候选化合物是否在治疗上有效的条件下使本文公开的肾脏类器官与候选化合物接触。在该实例中,该方法可包括在肾毒性化合物存在下使本文公开的肾脏类器官与候选化合物接触,并确定该候选化合物是否在治疗上有效。

[0174] 筛选治疗功效的其它实例包括评估代表肾病的肾脏类器官。例如,肾病可以选自自由先天性肾病综合征(CNS),包括类固醇抗性肾病综合征和芬兰肾病、局灶性节段性肾小球肾炎(FSGS)、Alport综合征和PierSon综合征组成的组。在一个实例中,肾病是CNS。

[0175] 在本公开的上下文中使用术语“治疗功效”是指其中治疗有益作用超过候选化合物或包含其的组合物的任何毒性或有害作用的反应。可以基于改善的肾细胞功能;维持肾细胞功能;抑制(即在某种程度上减慢并且在某些实例中停止)肾细胞功能衰退;抑制(即在某种程度上减慢并且在一些实例中停止)肾细胞死亡来确定治疗功效。在一个实例中,基于适当的足细胞蛋白质的存在和它们被适当极化的证据来确定治疗功效。一个实例包括将NPHS1、NPHS2和NEPH-1定位在足细胞的膜上,其中NPHS1、NPHS2和NEPH-1是使用免疫组织化学测定的。

[0176] 对于涉及代表肾病的肾脏类器官的研究,可以相对于基于无病肾脏类器官中相应的肾细胞功能确定的预定标准确定肾毒性和治疗功效。在另一个实例中,可以基于代表肾病的肾脏类器官和代表健康肾脏的肾脏类器官之间的肾脏细胞功能的比较来确定改善的肾细胞功能。

[0177] 对于涉及使肾脏类器官与肾毒性化合物和候选化合物接触的研究,可以基于与未与肾毒性化合物接触的肾脏类器官和/或单独与肾毒性化合物接触的肾脏类器官的比较来确定改善的肾细胞功能。

[0178] 在本公开的上下文中使用术语“候选化合物”是指要筛选的药剂。候选化合物可以包括例如小分子,例如小有机化合物(例如,分子量在约50与约2,500Da之间的有机分子)、肽或其模拟物、包括肽和非肽配体的配体、多肽、核酸分子如适体、肽核酸分子及其组分、组合和衍生物。

[0179] 认为诸如“接触”、“暴露”或“施加”的术语是在上下文中可以在本公开中互换使用的术语。术语接触要求候选化合物与本文公开的肾小球接触。在一个实例中,如果化合物是

水溶性的或与水不混溶的,则该化合物可以溶解在细胞培养基中。否则,可以将合适的底物浸入化合物中,并置于培养的肾脏类器官上方。为了筛选挥发性候选化合物,可以将本文公开的肾脏类器官暴露于空气或包含该化合物的其它气体混合物中。或者,可以将肾脏类器官暴露于挥发性化合物在细胞培养基中的溶液或悬浮液中。同样,如果可能的话,挥发性化合物可以溶解或稳定化。否则,可以将合适的底物浸入化合物中,并置于培养的肾脏类器官上方。

[0180] 在执行本公开的方法中,可使多种候选化合物与肾脏类器官接触。例如,至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少17种、至少18种、至少19种、至少20种、至少25种、至少30种、至少35种、至少40种、至少45种、至少50种、至少55种、至少60种、至少70种、至少80种、至少90种、至少100种、至少200种、至少300种、至少400种、至少500种、至少600种、至少700种、至少800种、至少900种、至少1,000种、至少2,000种、至少3,000种、至少5,000种、至少10,000种、至少20,000种、至少40,000种、至少50,000种、至少100,000种、至少200,000种或更多种候选化合物可与肾脏类器官接触。在一个实例中,候选化合物可以与相同或单独的肾脏类器官接触。例如,可以筛选候选化合物的特定组合。

[0181] 在一个实例中,在筛选之前标记候选化合物。在一个实例中,候选化合物可以是组合物。例如,候选化合物可以存在于制剂中或包含化合物或分子的混合物。例如,候选化合物可以是血清。例如,候选化合物可以是患有肾病的受试者中分离的血清。在一个实例中,从患有CNS的受试者中分离血清。例如,可以从患有类固醇抗性肾病综合征的受试者中分离血清。在另一个实例中,从已经进行肾脏移植的受试者中分离血清。在另一个实例中,从肾移植后呈现肾病综合征的受试者中分离血清。

[0182] 示例性肾毒素包括氨基糖苷类抗生素、 β -内酰胺抗生素、顺铂、放射性造影剂、NSAID、ACE抑制剂、锂、CsA和抗癫痫药如苯妥英。

[0183] 培养各种时间长度的肾脏类器官可用于本文公开的筛选应用。因此,作为一个实例,可以使用d7+15或更晚的肾脏类器官进行筛选。在另一个实例中,可以使用d7+18与d7+25之间的肾脏类器官进行筛选。在另一个实例中,可使用未成熟的肾脏类器官进行筛选。例如,可以使用d7+11至d7+18进行筛选。在各种实例中,IM细胞可以培养更长时间,因此可以使用d8+Y、d9+Y或d10+Y肾脏类器官进行筛选。

[0184] 在一个实例中,筛选方法包括使候选化合物与肾脏类器官文库接触。例如,可以使用处于不同发育阶段的肾脏类器官来筛选候选化合物。例如,可以使用d7+10、d7+15和d7+25肾脏类器官。在另一个实例中,可以使用代表不同肾病的肾脏类器官来筛选候选化合物。

[0185] 如本领域技术人员将理解的,可以采用多种不同的筛选程序来筛选候选化合物。例如,本文公开的肾脏类器官可以以单孔或多孔形式提供,并与候选化合物接触一段设定的时间。在一个实例中,在多孔板中提供肾脏类器官。在一个实例中,每孔提供一个肾脏类器官。在另一个实例中,每个孔提供两个肾脏类器官。在另一个实例中,每孔提供三个肾脏类器官。在另一个实例中,每孔提供四个肾脏类器官。在另一个实例中,每孔提供五个肾脏类器官。在另一个实例中,每孔提供10个肾脏类器官。在另一个实例中,每孔提供20个或更多个肾脏类器官。在一个实例中,在96孔板中提供肾脏类器官。

[0186] 本公开涵盖高通量筛选方法。在此实例中,高通量筛选涉及提供包含大量候选化

合物的文库。然后在一种或多种测定法中筛选此类文库以鉴定表现出期望的活性水平(例如治疗功效)的那些文库成员(例如特定的化学物种或亚类)。

[0187] 高通量筛选系统是可商购的,并且通常使整个程序自动化,包括所有样品和试剂的移液,液体分配,定时孵育以及培养板(例如96孔格式)在适合测定的检测器中的最终读数。这些可配置的系统提供了快速启动以及高度灵活性和定制性。此类系统的制造商(例如Invitrogen, Thermo Fisher Scientific等)提供了详细的使用方案。

[0188] 在一个实例中,以上提及的方法还包括选择展现出治疗功效的化合物。例如,在肾毒素存在下和/或与代表肾病的肾脏类器官接触时维持肾细胞功能;抑制(即在某种程度上减慢并且在某些实例中停止)肾细胞功能衰退;抑制(即在某种程度上减慢并且在一些实例中停止)肾细胞死亡的化合物。在另一个实例中,以上提及的方法还包括选择降低肾毒性的化合物。例如,可以选择抑制肾小球肾炎的化合物。在另一个实例中,可以选择改善肾细胞功能的化合物。在这些实例中,可以使用市售工具(包括例如来自Qiagen的Human Nephrotoxicity RT² ProfilerTM PCR Array或High Content)基于生物标记物的表达来确定肾细胞功能。

[0189] 个性化医学与分层

[0190] 在代表受试者的肾病的肾脏类器官中显示治疗功效的候选化合物在受试者中更可能表现出治疗功效。因此,在一个实例中,这些肾脏类器官可用于选择更可能影响受试者的肾病的治疗或预防的药剂。

[0191] 在另一个实例中,可以制备代表多个受试者的肾病的肾脏类器官。这些肾脏类器官可用于选择更可能影响多个受试者的肾病的治疗或预防或鉴定更可能对特定药剂治疗产生反应的受试者组的药剂。此类方法可用于在测试治疗肾病的能力的药剂的临床试验中对受试者进行分层。基于肾脏类器官筛选对受试者群体进行分组可以消除或减少由于遗传因素导致的治疗结果的差异,从而更准确地评估潜在药物的功效。因此,在一个实例中,本公开涵盖用于对一组受试者进行分层以进行治疗剂的临床试验的方法,该方法包括从一组受试者中获得iPS细胞群体,或从每个受试者iPS细胞群体中产生肾脏类器官或其群体,将肾脏类器官与治疗剂接触,确定治疗剂是否具有治疗效果,并使用确定结果选择更可能对治疗有反应的受试者。在该实例中,该方法可以包括在确定治疗剂是否在治疗上有效之前,使肾脏类器官与治疗剂和肾毒素接触。治疗剂的实例包括以上讨论的候选化合物,例如,一种或多种小分子、多核苷酸、肽、蛋白质、抗体、抗体片段、病毒、细菌、干细胞、包括肾病患者来源的血清的血清。为了避免疑问,可以从患有特定肾病的受试者中分离血清,并使其与本文公开的肾脏类器官接触。本文讨论了肾病的各种实例,并且可以从代表这些疾病的各种受试者中分离血清。从受试者中分离血清的方法是本领域已知的。在一个实例中,使用离心从全血样品中纯化血清。

[0192] 生物打印

[0193] 在一个实例中,本公开涵盖使用本文公开的组合物或细胞产生的“生物打印的”肾脏结构,例如肾脏或其它含肾单位的器官、类器官或器官样结构。在本公开的上下文中使用诸如“生物打印的”或“生物打印”的术语是指经由与自动化的计算机辅助的三维原型设备(例如生物打印机)兼容的方法利用细胞(例如,细胞溶液、含细胞的凝胶、细胞悬浮液、细胞浓缩物、多细胞聚集体、多细胞体、生物墨水等)的三维精确沉积的过程。在WO 2012/054195

和WO 2013/040087中公开了适用于生物打印的方法的实例。在一个实例中,使用器官打印机进行生物打印,该器官打印机使用水凝胶支架将人细胞放置在期望的方向上以重建人器官(例如Organovo/Invetech)。

[0194] 在一个实例中,肾脏结构是由生物墨水生物打印的。在本公开的上下文中使用术语“生物墨水”是指包含本文定义的组合物或细胞的液体,半固体或固体组合物。在一个实例中,生物墨水包括细胞溶液、细胞聚集体、包含细胞的凝胶、多细胞体或组织。在另一个实例中,生物墨水还包括支撑材料。

[0195] 本公开涵盖的生物打印的肾脏结构具有肾脏或其组分的一种或多种功能特征,或者能够发展出肾脏或其组分的一种或多种功能特征。例如,生物打印的肾脏结构可以包括肾小球、近肾小球器、间质组织、集合管、鲍曼氏囊、近端和/或远端曲管。在一个实例中,生物打印的肾脏结构没有血管化。在另一个实例中,生物打印的肾脏结构包括脉管系统,例如小动脉、动脉、静脉和/或毛细血管。

[0196] 在一个实例中,生物打印的肾脏结构是可植入或以其它方式可过继转移到宿主中。

[0197] 组合物/试剂盒

[0198] 在一个实例中,本公开涉及一种用于筛选应用的试剂盒或测定。例如,本公开涵盖用于筛选候选化合物的肾毒性和/或治疗功效的试剂盒或测定。在一个实例中,在培养物中提供本文所述的肾脏类器官,然后使候选化合物与肾脏类器官接触并筛选其肾毒性和/或治疗功效。因此,在一个实例中,本公开涵盖用于筛选的测定,该测定包括在培养物中的本文公开的肾脏类器官。在一个实例中,该测定用于肾毒性筛选。在一个实例中,该测定用于治疗功效筛选。在一个实例中,肾脏类器官被提供有培养基或其它组分,以在培养物中维持肾脏类器官。在一个实例中,肾脏类器官被提供有用于执行本公开的方法的书面说明。在一个实例中,该测定包括本文所述的肾脏类器官。在其它实例中,该测定包括一个以上的肾脏类器官。例如,该测定可以包含10、20、30或更多个肾脏类器官。肾脏类器官可以以单孔或多孔形式提供,例如96孔板。

[0199] 实例

[0200] 实例1-hPSC的培养和维持

[0201] 在补充了10%KOSR(Life technologies)和bFGF的DMEM培养基中,使人ES细胞(H9细胞)在小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)饲养细胞上生长。在使用TrypLE(Life technologies)分裂之前,将细胞培养至80%汇合。分化之前,在MEF条件培养基和bFGF中,在MEF饲养细胞不存在下,使ES细胞适应基质胶(Corning)表面。

[0202] 使人iPS细胞作为单个菌落在Geltrex(Life Technologies)包被的平板上在E8培养基(Life Technologies)中生长。一旦细胞达到60-70%汇合或每3天,用EDTA传代iPS细胞一次。

[0203] 使用TrypLE将hPSC解离成单细胞,并将细胞以15,000个细胞/cm²接种在以matrigel包被的平板上。使用血细胞计数器测定细胞数。使用MEF条件培养基接种适应Matrigel的hES细胞。将人iPS细胞以单细胞接种在matrigel包被的平板上的使用revita细胞(1:100稀释度)的E8培养基中过夜。

[0204] 实例2-改进的IM的产生

[0205] 通过前4天将细胞在含有3.5%无蛋白杂交瘤培养基(PFHM)(Thermo Fischer)、APEL(Stem cell technologies)或E6培养基(Stem cell technologies)的APEL2或TeSR-E6培养基(Stem cell technologies)中暴露于高浓度的CHIR(7 μ M),将hPSCs或hES分化为中间中胚层。在第2天更新培养基。除了FGF9和肝素之外,将培养物再接受另外3天(接种后第5-7天)的低浓度CHIR(1 μ M)(图1A,实施例1-3)。这导致中间中胚层(IM)细胞的混合物的诱导。

[0206] 通过qPCR对D7+0时的涡旋悬浮培养物进行的基因表达谱显示,与较短的暴露时间相比,添加低浓度和更长持续时间暴露的CHIR导致帽间充质细胞的增加(图1E左图)。与短CHIR暴露组相比,PAX2、LHX1和OSR1细胞的表达高2倍以上(图1E左图)。与短CHIR暴露组相比,将细胞暴露于低浓度的CHIR也导致输尿管上皮的增加,例如Wnt11和GATA3的表达增加2倍以上(图1E右图)。添加低浓度的CHIR以更长持续时间激活Wnt/ β -连环蛋白信号传导证明了一种产生改良的中间中胚层的方法。

[0207] 实例3-涡旋悬浮培养

[0208] 在第7天,使用1ml EDTA溶液解离使用实例2中的方法产生的IM细胞,在1ml EDTA中于37 $^{\circ}$ C进一步孵育3分钟,并通过抽吸除去EDTA溶液,而不会干扰IM细胞层(图1A)。IM细胞也可以使用1.5ml的TrypLETMselect在37 $^{\circ}$ C下解离3分钟,并通过在15ml falcon管中通过1500RPM下的离心去除多余的TrypLETM。

[0209] 加入阶段1培养基(基础培养基,FGF9 200ng/ml,肝素1 μ g/ml,1 μ MCHIR,0.1%PVA,0.1%MC)(2ml)和10 μ M Rho激酶抑制剂(ROCKi,1:1000稀释度,stem cell technologies)使用Gilson移液管将细胞轻轻分离为团块。将细胞悬浮液转移至6cm²低粘附培养皿(Greiner bio)中,并通过40 μ m细胞过滤器(BD biosciences)。

[0210] 将阶段1培养基上样至5ml,并将培养皿在标准细胞培养箱中于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下在Ratek轨道振荡器中以60rpm涡旋。在将培养皿置于轨道振荡器上24小时后,自发形成直径为20至40 μ m的类器官。在涡旋培养24小时后,将阶段1培养基用阶段2培养基(基础培养基,FGF9 200ng/ml,肝素1 μ g/ml,1 μ MCHIR,0.1%PVA,0.1%MC)替换。将细胞在阶段2培养基中再培养4天。从第7+5天开始,每隔几天用阶段3培养基(基础培养基,0.1%PVA,0.1%MC)更新所有类器官,并培养至第7+18天。

[0211] 在聚集后18天(第7+18天)后,每个肾脏类器官都显示出管状上皮结构,如通过明视野、高碘酸Schiff(PAS)染色和共聚焦显微镜分析证实6-10个肾单位的存在所证实(图1和图2)。这些肾单位显示出早期模式和分割的证据。从NPHS1和MAFB的阳性染色可以明显看出肾小球的形成。近端肾单位节段是EpCAM⁺,并且对LTL、CUBN、LRP2和HNF4A染色呈阳性(图1G)。LTL⁺节段能够在添加至培养基的24小时内内吞FITC-白蛋白,这表明功能性白蛋白摄取途径。远端肾单位节段用ECAD和EpCAM染色,而假定的集合管为ECAD⁺/GATA3⁺。当使用SOX17mCherry报道细胞系(Ng等人,2016)产生肾脏类器官时,也注意到内皮细胞(PECAM1⁺/SOX17⁺)的存在(图ID;图2C、D和E)。作为该方案在人多能干细胞系之间的可移植性的指示,提供了有关从4种不同细胞系成功生成肾脏类器官的数据,包括hESC报道细胞系(H9 GAPTrapLuc2,hES3-SOX17mCherry)(Kao等人,2016;Ng等人,2016;van den Berg等人,2018)和人iPSC(CRL1502.C32,CRL1502.3)(Briggs等人,2013;Takasato等人,2015)。所有hPSC系均对方案一致反应,并且对肾脏类器官具有相似的模式(图2B)。

[0212] 实例4-经典Wnt信号传导的持续时间、浓度和发生时间对肾脏类器官模式的影响

[0213] 为了优化肾脏类器官方案中的分化,在低CHIR和FGF9+肝素存在下继续培养至第7天之前,使用固定浓度的CHIR99021 (7 μ M) 刺激hPSC单层不同的持续时间(3、4、5和6天)(图2C、2D和2E)。18天后,使用共聚焦显微镜评估得到的肾脏类器官的肾脏结构(图2C、2D和2E)。经典Wnt激活仅3天未能产生肾脏形态(图2B,左图)。相反,存在的上皮结构表现出具有大的囊腔的不确定的上皮,并且没有肾单位形成的证据。用4或5天的7 μ MCHIR99021进行初始诱导产生含有模式性肾单位的肾脏类器官,包括分别指示内皮和间质基质细胞的周围SOX17⁺和MEIS1/2/3⁺群体的存在(图2C、2D和2E,中图)。然而,Wnt激活6天,尽管产生具有更大NPHS1染色的更大的肾脏类器官,但包含扩大的MEIS1⁺基质群体,明显损害上皮结构(图2C、2D和2E,右图)。4天的初始7 μ MCHIR99021诱导被证实是最佳的,并用于进一步研究。

[0214] 实例5-肾脏类器官的解离

[0215] 肾脏类器官代表直径约250-300 μ m的异质上皮结构。使用苛性酶可能会破坏细胞表面标记,从而导致供以后使用的细胞身份丧失。用冷的活性蛋白酶(LiberaseTM,Roche)进行轻度解离,以产生最大的活单细胞。用5ml血清移液管将肾脏类器官转移至15ml falcon管中并使其沉降。使用真空除去培养基上清液,然后使用0.1M PBS将类器官沉淀洗涤三次。然后将类器官用500 μ l的1 μ g/ml LiberaseTM溶液处理,并在4 $^{\circ}$ C下孵育20分钟,每5分钟持续研磨。20分钟后,肾脏类器官解离为单细胞,并使用含有10%FCS的DMEM培养基洗涤两次以灭活LiberaseTM,并将最终的细胞沉淀悬浮于含有10%FCS的DMEM培养基中。

[0216] 实例6-涡旋的中间中胚层细胞在悬浮培养中产生微肾脏类器官

[0217] 用于产生肾脏类器官的现有方法是劳动密集型的、昂贵的并且产生低质量的类器官。发明人已经产生了经济、简单和快速的方法来在悬浮培养中产生肾脏类器官。与先前的方法相比,由于在低粘附培养板中培养之前单层的最小解离和低速涡旋,因此在分化的中间中胚层(IM)阶段(第7天)形成了细胞聚集体。这导致形成8,000-10,000个肾脏类器官,这些类器官比使用先前的方法产生的类器官小得多。悬浮培养18天后,每个肾脏类器官包含约6-10个肾单位,具有早期模式和分段的证据,包括近端和远端上皮以及含有肾小球的足细胞的形成。重要的是,单细胞转录谱已经揭示了这些较小的类器官与使用先前方法产生的标准类器官之间在细胞多样性和成熟度方面的等效性。与先前的方法相比(例如基于Takasato等人(2015)Nature,第526卷:564-568的那些),使用这种方法进行定向分化导致在21天的培养过程中细胞扩增了30-40倍,代表每百万个类器官衍生的肾细胞产量提高了3至4倍,成本降低了4倍。

[0218] 在图1A中示例并在实例1-3中描述的公开方法涉及向涡旋培养的培养基中添加0.1%聚乙烯醇(PVA)和0.1%甲基纤维素(MC)以增强中间中胚层(IM)细胞的内聚力,从而自发聚合为3D球形类器官。涡旋培养24小时后,类器官形成了外层粘连蛋白基底膜。

[0219] 收集培养另外12至18天的C32类器官,整装并对NPHS、LTL、ECAD和GATA3进行染色以进行共聚焦显微镜分析。为了评估脉管系统的存在,将类器官用小鼠抗人CD31(1:300,BD biosciences)染色,对于成熟的近端小管,使用山羊抗人CUBN。对D7+12的类器官的免疫荧光染色分析显示,主要的肾单位节段为肾病蛋白阳性肾小球、LTL阳性近端小管、ECAD阳性远端小管以及ECAD和GATA3双阳性集合管细胞(包括GATA3阳性基质细胞)的不同表达形式(图1G和4E和F),其与跨孔类器官系统相当(图4A)。在肾单位数量(每个类器官中5至10个肾

单位)和非肾脏细胞类型的存在方面,与跨孔类器官相比,涡旋微肾脏类器官表现出简单的形态。

[0220] 总之,结果证明了一种涡旋悬浮法,该方法产生了组织化的类器官并具有产生具有所有肾单位节段的复杂的多细胞肾脏类器官的能力。该方法已成功用人ES以及产生类器官的iPS细胞系进行了测试。已经证明诸如APEL、APEL2和E6的不同基础培养基条件适用于所公开的方法。因此,该方法对于用于个性化医学,药物筛选和再生细胞疗法的肾细胞培养物的扩大可能是有用的。

[0221] 实例7-适于扩大iPS衍生的肾细胞的悬浮培养中的微肾脏类器官

[0222] 为了评估悬浮培养的扩大,按实例1和2所述,将C32 iPS细胞分化以产生IM。通过从D7+0开始测量培养基中的细胞大小和总数来监测类器官的生长(图4C和4D)。

[0223] 使用涡旋悬浮培养产生的C32类器官的明场图像显示大小的增加并维持上皮结构(图4A和4B)。通过NIS-Elements显微镜软件(Nikon),在多达10个随机取样的类器官的明场图像中测量了类器官大小。以不同的生长速率间隔随机抽取多达10个类器官的样品,并测量类器官的直径。据报道大小从低到高。观察到类器官大小随着时间进展而一致增加,并且检测到的类器官的直径为30 μ m至300 μ m(图4C)。用TrypLE™select解离后评估总细胞数,并使用血细胞计数器手动计数。与D7+0的接种密度相比,观察到细胞数截至D7+12到D7+18增加了40倍(图4D)。

[0224] 实例8-悬浮培养中的微肾脏类器官显示出组织化的肾单位节段和清晰的管状内腔

[0225] 经典的跨孔类器官表现出复杂的形态,从而限制了研究单个肾单位的3D结构的能力。通过本文描述的方法产生的涡旋微肾脏类器官更简单并且含有更少数量的肾单位。

[0226] 类器官具有清晰的3D形态,可以研究3D空间中的肾单位。使用实例1-3中所述的方法产生C32衍生的肾脏类器官,并使用针对NPHS1、LTL、ECAD和GATA3的抗体进行免疫染色,以在高通量共聚焦显微镜中观察肾单位节段,Z分辨率与针孔匹配。

[0227] 将肾脏类器官收集在15ml Flacon管中,并用PBS洗涤(两次)以去除多余的培养基,并在4℃下在新鲜制备的2%PFA中固定20分钟。然后通过用含0.3%TritonX100的PBS(PBST)洗涤类器官3次来去除多余的PFA,并在4℃下储存在PBST中直至染色。将固定的类器官用含10%驴血清的PBST(封闭缓冲液)中封闭至少1小时,然后与在封闭缓冲液中稀释的一抗孵育。通过对主要肾单位节段染色来证实对肾脏类器官的分化能力的评估,使用的主要抗体是:绵羊抗人NPHS1(1:300R&D Systems),生物素抗人LTL(1:300Vector laboratories),小鼠抗人ECAD(1:300Life technologies)和兔抗人GATA3(1:300Cell signalling technologies)小鼠抗人CD31(1:300,BD biosciences)和山羊抗人CUBN(1:300Santa Cruz)和LRP2(1:300Sapphire Bioscience)。将类器官在4℃下于一抗中孵育过夜,然后在PBST中洗涤5次,然后与具有荧光标记的物种匹配的二抗孵育。染色后,如Dodt HU等人(Dodt等人,2007)先前所述,使用不同浓度的甲醇使类器官脱水,然后使用BABB(苯醇和苯甲酸苄酯,比例为1:2)进行澄清。将澄清的类器官安装在MatTek玻璃底盘上,并使用倒置的Zeiss LSM 780显微镜进行共聚焦显微镜检查。使用ZEN软件(Zeiss)分析图像。

[0228] 使用Imaris软件对图像进行分析,以重建所采集的共聚焦图像的3D渲染(图4E和4F)。3D图像显示清晰的肾单位节段以极化方式相互连接,从肾小球(NPHS1)、近端小管(LTL

+)、远端小管 (ECAD+)、集合管 (ECAD+GATA3+) 和间质性细胞 (GATA3+) 开始 (图5E)。剪断工具的使用使管状细胞中形成的内腔可视化 (图5F)。图5E和5F的结果表明,本文所述的涡旋器方法可用于允许研究3D空间中发育的肾脏类器官的形态。

[0229] 实例9-单细胞RNA测序分析显示有希望的肾脏表型

[0230] 为了进一步广泛表征涡旋器肾脏类器官,在D7+18对C32衍生的微肾脏类器官进行了单细胞RNA测序分析。使用相同的hPSC系 (APEL培养基中的CRL1502.C32) 将约40-50个微肾脏类器官和1个完整的标准类器官培养至第7+18天。收集类器官,并用PBS洗涤3次以除去过量的培养基。通过每5分钟使用1ml移液管搅拌,在4°C下用400 μ l的1 μ g/ml LiberaseTM (Roche) 溶液处理类器官20分钟。在20分钟内,类器官解离为单细胞。将细胞培养基 (2ml) 添加到非活性LiberaseTM中。将细胞以1300-1500rpm离心3-5分钟以形成沉淀。除去上清液,并将沉淀重悬在新鲜的DMEM F12培养基中,并通过20 μ m细胞过滤器以除去团块,并储存在冰上直至分析。通过在自动细胞计数器 (life technologies) 中进行FACS和锥虫蓝染料排斥试验分析了生存力和细胞数量。将细胞储存在冰上直至分析。使用大口径1ml移液器尖端将细胞充分混合,并将约4000个活细胞用于RNA测序分析。使用通过10X基因组学技术开发的铬单细胞3'溶液。根据10x Genomics单细胞方案进行样品制备 (进一步信息可在网上获取的铬单细胞3'试剂试剂盒v2用户指南中获得)。将单细胞悬浮液、凝胶珠和分配油装入10x铬芯片的适当孔中。芯片将用10x垫片固定,并将完整的组件装入10x铬控制器中。这将自动生成包被在包含对于每个细胞独特的UMI的油滴中的单细胞的悬浮液。该悬浮液将用于常规RT-PCT以扩增转录物。

[0231] 使用纳升级的Gel Bead-In-EMulsions (GEM) 和UMI对细胞进行条形码化,以分别索引每个细胞的转录组。条形码后,使用磁珠以去除残留的试剂和引物。使用全长条形码化cDNA以PCR扩增转录组,从而产生足够的质量用于文库构建。这些文库针对UMI和cDNA片段以2种不同读数同时进行测序。使用Cell RangerTM进行文库分析,使得能够以单细胞分辨率研究表达数据。使用Cell Ranger管道 (1.3.1版) 用于执行样品解复用,条形码处理和单细胞基因计数 (Zheng等人,2017)。将样品解复用以为每个样品产生一对FASTQ文件。将包含序列信息的读数与GRCh38参考基因组比对。过滤细胞条形码以去除空的液滴,并通过选择细胞条形码,UMI和基因ID的独特组合来去除PCR复本,最终结果是用于进一步分析的基因表达矩阵,这使得能够以单细胞分辨率研究表达数据。使用Seurat R软件包 (2.3.1版) 进行了进一步的分析,以代表细胞聚集,细胞类型分类和差异基因表达。

[0232] 将Cell Ranger中生成的基因表达矩阵导入Seurat (Satija等人,2015) 以进行质量控制和进一步分析。所有细胞均通过初始过滤,以去除少于3个细胞中表达的基因,以及表达少于200个基因的细胞。进一步过滤除去线粒体转录物大于15%的1个细胞。使用Scran中的流式功能 (Lun等人,2016;Scialdone等人,2015) 来指定与每个细胞处于G1、S或G2M阶段的可能性相关的得分,并根据这个得分指定细胞周期阶段。

[0233] 对表达数据进行归一化和缩放,其中变异性与UMI数量,线粒体表达百分比,核糖体表达百分比和使用Seurat ScaleData函数回归出的G2M得分相关。使用前15个主成分和1.2的分辨率值,使用在Seurat中实现的基于共享最近邻模块化优化的聚类算法对细胞进行聚类。使用Seurat FindAllMarkers函数生成标记基因列表,以发现簇之间差异表达的基因,其对数倍数变化高于0.25。

[0234] 对于标准和肾脏类器官数据集的综合分析,如上所述,在Cell Ranger中生成基因-细胞矩阵。所有细胞都通过了初始过滤,过滤出少于3个细胞中表达的基因,以及表达少于200个基因的细胞。对每个数据集进行归一化和缩放,针对UMI数量,线粒体表达百分比,核糖体表达百分比和在Scran中生成的S、G1和G2M得分进行回归分析。聚类是基于使用RunCCA和AlignSubspace函数在Seurat中计算的比对组合成分(Butler等人,2018)。对于组合的数据集,以0.6的分辨率进行聚类(Butler等人,2018)。

[0235] 分析了通过本文所述方法和经典跨孔方法产生的类器官的单细胞RNA基因表达谱。将UMI计数绘制为tSNE图,并根据细胞内存在的基因进行自动聚类(图6A-6B)。所有簇的GO富集分析显示,肾单位为22.3%,总基质为37.5%,脉管系统为9.8%(图6A),而涡旋器微肾脏类器官显示,成熟肾单位为32.5%(不包括帽间充质和肾单位祖细胞),基质为25.9%,但是,涡旋器C32类器官没有显示脉管系统的存在(图6B)。因此,与跨孔类器官相比,涡旋微肾脏类器官显示出更好的肾脏发育标记。与跨孔培养类器官相比,微肾脏类器官还显示出增强的肾单位组成(图4)。

[0236] 实例10-肾脏类器官内肾脏分化的转录验证

[0237] 使用单细胞RNA测序(scRNA-seq)对肾脏类器官中存在的细胞类型进行表征。使用冷活性蛋白酶Liberase™将20-30个肾脏类器官池解离成活的单细胞。这导致产生了89.4%的单细胞,其中88.5%的细胞是活的(数据未显示)。使用Cell Ranger(10×Genomics)生成每个细胞的UMI计数矩阵,使用Seurat R软件包(2.3.1版)将其导入以进行进一步分析(Satija等人,2015)。过滤的数据代表1673个细胞,每个细胞的表达基因中值为3759个。使用Seurat R软件包进行聚类,以0.6的分辨率产生了7个不同的细胞簇(图3A和3B,表1)。进行差异表达测试以鉴定每个簇的标记,并使用PANTHER基因本体套件对每个簇中最显著上调的基因进行基因本体和功能富集分析(Mi等人,2013;表1)。

[0238] 表1:用于肾脏微类器官中不同簇的基因本体术语。

[0239]

簇	基因本体生物过程完成	基因本体术语	富集倍数	FDR
0	前肾发育中涉及的模式规定	GO:0039017	>100	0.01
	前肾领域规定	GO:0039003	>100	0.01
	后肾单位形态发生涉及的间充质 细胞凋亡过程的负调控	GO:0072305	>100	0.01
1	后肾小球毛细血管形成	GO:0072277	80.16	3.36E-02
	后肾小球血管形态发生	GO:0072276	80.16	3.35E-02
	后肾小球形态发生	GO:0072275	80.16	3.34E-02
2	细胞对 X 射线反应的调控	GO:2000683	>100	5.35E-03
	内胚层消化道形态发生	GO:0061031	>100	7.99E-03
	输尿管芽形成的正向调控	GO:0072107	>100	1.14E-02
3	前肾发育中涉及的模式规定	GO:0039017	99.73	1.80E-02
	前肾领域规定	GO:0039003	99.73	1.80E-02
	后肾单位形态发生涉及的间充质 细胞凋亡过程的负调控	GO:0072305	99.73	1.80E-02
4	间充质细胞凋亡过程的正调控	GO:2001055	96.97	3.43E-02
	神经肌肉接头发育的负调控	GO:1904397	96.97	3.41E-02
	皮质脊髓束形态发生	GO:0021957	48.48	6.53E-03
5	突触前膜组织化的调控	GO:1901629	>100	2.85E-02
	肾单位形态发生涉及的间充质细 胞凋亡过程的负调控	GO:0072040	85.31	2.71E-03

[0240]

	肾单位形态发生涉及的间充质细 胞凋亡过程的调控	GO:0072039	85.31	2.69E-03
6	神经纤毛蛋白信号传导通路	GO:0038189	32.61	1.48E-02
	肾小球毛细血管形成	GO:0072104	26.09	2.17E-02
	肾小球血管形态发生	GO:0072103	26.09	2.16E-02

[0241] 虽然使用整体安装的组织器官的免疫荧光法可明显看出,但在scRNA-seq数据中,内皮(簇1的子集)和足细胞(簇6,18个细胞)仅由少量单个细胞代表。簇3(293个细胞)和簇5(122个细胞)显示与肾单位上皮一致的基因表达,簇0显示肾小泡/S形小体基因(早期肾单位)的表达,而上皮细胞簇5还显示远端小管/集合管标记物如GFRA1的表达(图3C)。簇2显示了肾单位祖细胞标记物SIX1、SIX2和CITED1,以及先前与肌源性Wilms肿瘤相关的基质标记物PAX3的表达(Hueber等人,2009)。簇2中的细胞还表达肌原性命运的标记物,例如MYF5和MYF6,而非PAX7、MYOD1和TBX6。代表最大簇的簇0(430个细胞)显示了更定型的肾单位祖细胞特征,其表达了早期肾囊泡标记物PAX2、PAX8、LHX1和JAG1以及人NP标记物LYPD1和DAPL1(Lindstrom等人,2018)。簇1(337个细胞)显示出基质特征,如PDGFRB和MEIS2。簇4在表达早期肾单位标记钙粘着蛋白CDH6的同时,显示出神经转录特征,这表明存在神经脱靶群体,如先前在肾脏类器官中所报道的(Wu等人,2017)。该分析强烈支持了在免疫荧光水平上在肾脏类器官内观察到的细胞类型的鉴定。

[0242] 实例11-标准和肾脏类器官的比较性单细胞转录谱证明了肾原性模式的等效性。

[0243] 为了直接将肾脏类器官中的细胞组分与另一种肾脏类器官方法进行比较,将肾脏类器官scRNA-seq数据与来自使用相同iPSC细胞系(CRL1502.C32)和Takasato等人2016的标准肾脏类器官方案生成的1421个肾脏类器官细胞的数据相结合。使用在Seurat(Butler等人,2018)中实现的对准算法将两个数据集结合,该算法使用相关组分分析,然后进行动态时间规整。聚类在组合数据集内鉴定了8个转录簇,代表定型的肾单位祖细胞(簇0),肾单位上皮(簇6),足细胞(簇7),基质(簇1和3),内皮细胞(簇5),PAX3⁺ve细胞(簇2)和神经脱靶群体(簇4)(图5A和图5B)。两个数据集中显示了所有簇,但归属于每个簇的细胞比例有所不同(图5B-5D)。对每个簇的关键标记物的直接比较显示,尽管在方案之间对每个簇的贡献比例存在明显差异(图5B和5C),但在两种方案之间在任何给定簇中鉴定的细胞之间存在强转录一致性(图5D)。在肾脏类器官中鉴定的神经脱靶群体在标准类器官中也是明显的。总体而言,与标准类器官数据集相比,肾脏类器官数据集包含更高比例的肾单位细胞和更低比例的基质细胞(图5E)。通过对整体安装的组织器官的免疫荧光分析,证实了与标准类器官相比,肾脏类器官中表达PAX2的肾单位细胞的增加,表达MEIS1/2/3的基质细胞的减少(图5F和图6)。

[0244] 实例12-肾脏类器官为有效的hPSC衍生的肾细胞扩大提供了更好的平台

[0245] 由于生成的类器官组织的大小,因此在Transwell™过滤器上培养的标准肾脏类器官可能会在培养3周后面临扩散限制(图4A)。此后对肾单位节段进行的免疫荧光染色表明,肾单位结构在类器官的边缘存在空间限制。相比之下,肾脏类器官在整个结构中都包含肾小管(图4B)。还可以使用定轨振荡器同时大量形成肾脏类器官,从而避免了标准类器官方案中涉及的繁琐的人工操作过程。结果,可能在5-10分钟内生成约8000至10000个大小均一的肾脏类器官,相比之下,标准类器官方案在60分钟内生成约30个类器官。与标准类器官(3000-5000μm)相比,肾脏类器官表现出小得多的最终尺寸(250-300μm)(图4C)。如免疫荧光所显示,与肾脏类器官相比,标准类器官中形成的肾单位存在于组织外围周围的边缘中(图4A)。但是,这些结构比肾脏类器官大得多。为了直接比较每种方法的效率和成本,在从第7天开始的分化方案的多个时间点,将各自使用iPSC和hESC报道细胞系生成的标准类器官和肾脏类器官解离为单细胞悬浮液,用以定量总细胞数(图4D)。在第7+7天后,标准类器

官没有显示每个类器官的总细胞计数的显著变化,而直到第7+12天,肾脏类器官的总细胞数仍继续增加。总体而言,在标准类器官条件下,细胞计数增加了8-10倍,而在肾脏类器官的情况下,达到30-40倍。这表示使用此修改方案,细胞产量提高了3-4倍。

[0246] 实例13-全反式视黄酸的添加改善了肾小球足细胞的成熟

[0247] 为了确定添加全反式视黄酸 (atRA) 是否将促进通过实例1-3中所述的涡旋培养方法产生的类器官的肾小球成熟,在D7+0之后在培养基中补充atRA。从D7+5到D7+10将全反式视黄酸 (2.5 μ M) 添加到C32衍生的旋流器类器官上(图5)。D7+18后,免疫荧光分析表明,与对照组相比,添加atRA改善足细胞表型(图7A和7B)。结果通过mRNA表达证实,对D7+11和D7+18样品的qPCR分析表示,与对照相比,添加2.5 μ M atRA增加了肾小球标记物如MPHS1和近端小管标记物如CUBN的表达(图7C)。

[0248] 实例14-微肾脏类器官中的药物毒性测试

[0249] 为了评估使用本文所述的悬浮培养方法体外测试肾脏的药物毒性的适宜性,进行了药物毒性研究。收集在第7+18天通过该方法产生的类器官,并在250 μ l培养基中的24孔低附着板中随机分为治疗组。用不同浓度的细胞毒性药物阿霉素 (0、2.5和5 μ g/ml) 刺激类器官24小时。刺激后,除去培养基,用2%PFA固定类器官,用于通过使用TUNEL染色进行细胞凋亡的免疫荧光染色分析,并裂解一些类器官用于RNA分析(图8A-8D)。

[0250] 实例15-肾脏类器官产生的改善的总结

[0251] 由上述示例方法产生的肾脏类器官显示出在单细胞转录水平上与先前描述的肾脏类器官方案中存在的那些等价的肾脏肾单位上皮,基质和内皮细胞组分的可靠形成(Takasato等人,2016;Takasato等人,2015)。但是,培养条件的改变导致相对细胞产量提高了3-4倍,而产生的每百万个肾细胞的成本却降低了4倍。通过使用2种不同的hESC (H9和hES3) 和3种不同的iPSC系 (iPSC GAPTrap td-Tomato、CRL1502.C32和CLR1502.3) (包括hES3 SOX17mCherry、H9 GAPTrap Luc2和iPSC GAPTrap td-Tomato荧光报道细胞系) 成功重演肾脏类器官生成的能力证明了示例方法的稳健性。

[0252] 本领域技术人员将理解,在不脱离如广泛描述的本公开的精神或范围的情况下,可以对如具体实施例中所示的本公开进行许多变化和/或修改。因此,本实施例在所有方面都被认为是说明性的而不是限制性的。

[0253] 本申请要求于2017年10月31日提交的AU 2017904424的优先权,其公开内容通过引用并入文中。

[0254] 本文讨论和/或引用的所有出版物均全文并入本文。

[0255] 本说明书中已经包括的对文件、行为、材料、装置、物品等的任何讨论仅是为了提供本发明的上下文。不应因为其在在本申请的每个权利要求的优先权日之前就存在而视为承认任何或所有这些内容形成现有技术基础的一部分或者是与本发明相关的领域中的公知常识。

[0256] 参考文献

[0257] Barberi等人,(2005)Plos Medicine 2(6):0554-0559。

[0258] Briggs等人,(2013)Stem Cells 31:467-78。

[0259] Butler等人,(2018)Nat Biotechnol 36:411-420。

[0260] Cima等人,(1991)Biotechnol.Bioeng.38:145 1991。

- [0261] Dodt等人, (2007)Nat Methods 4:331-6。
- [0262] Forbes等人, (2018)Am J Hum Genet.102:816-831。
- [0263] Hueber等人, (2009)Pathol.12:347-54。
- [0264] Kao等人, (2016)Stem Cell Reports 7:518-526。
- [0265] Lindstrom等人, (2018)J Am Soc Nephrol.29:806-824。
- [0266] Lun等人, (2016)F1000Res 5:2122。
- [0267] Mi等人, (2013)Nat Protoc 8:1551-1556。
- [0268] Ng等人, (2016)Nat Biotechnol 34:1168-1179。
- [0269] Satija等人, (2015)Nat Biotechnol,33:495-502。
- [0270] Scialdone等人, (2015)Methods 85:54-61。
- [0271] Takasato等人, (2015)Nature 526:564-8。
- [0272] Vacanti等人, (1988)J.Ped.Surg.23:3-9。
- [0273] Vacanti, 等人, (1991)Plast.Reconstr.Surg.88:753-9。
- [0274] van den Berg等人, (2018)Stem Cell Reports 10:751-765。
- [0275] Vodyanik等人, (2010)Cell Stem cell 7:718-728。
- [0276] Wu等人, (2017)。
- [0277] Zheng等人, (2017)Nat Commun 8:14049。

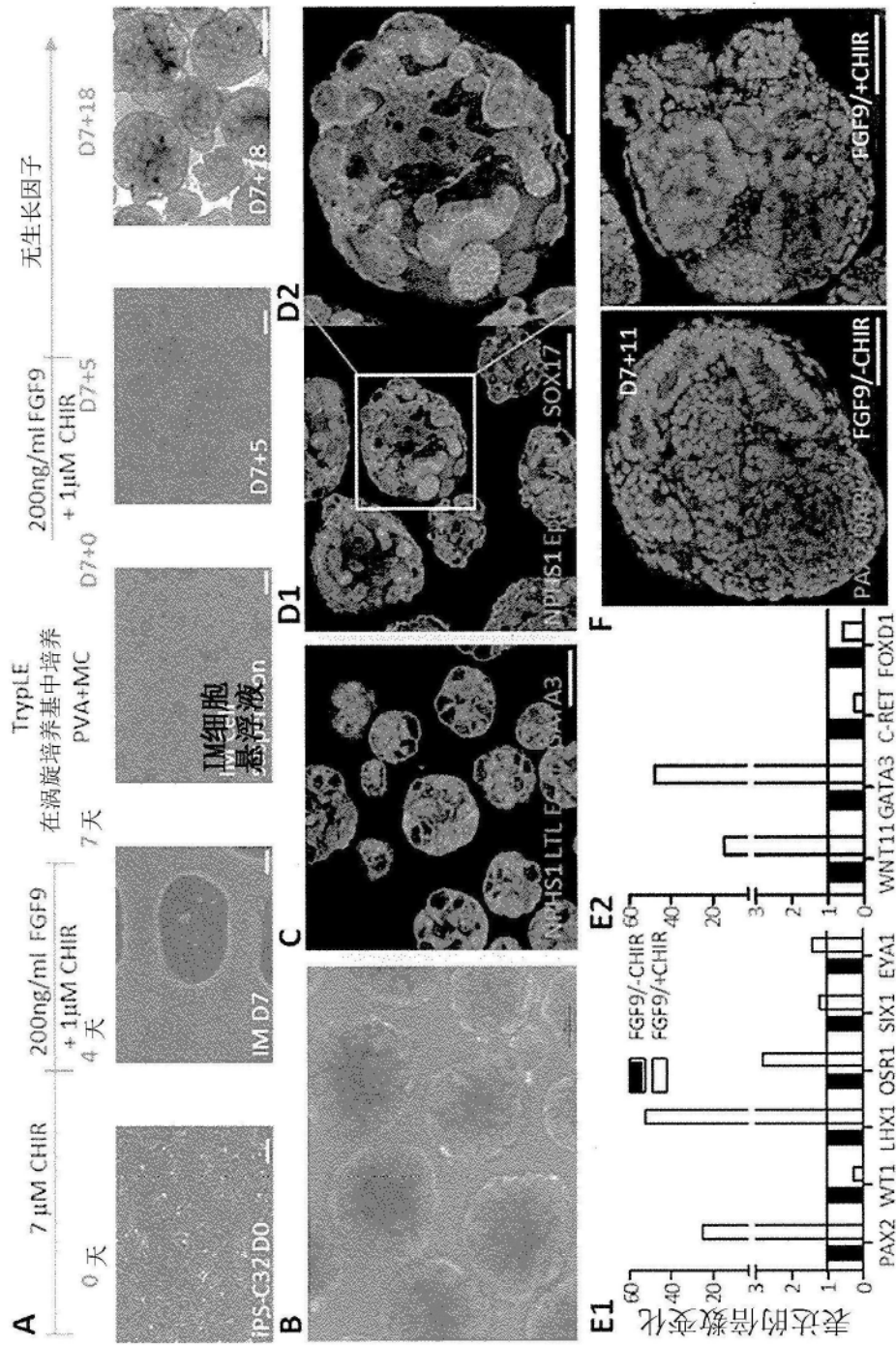


图1-1

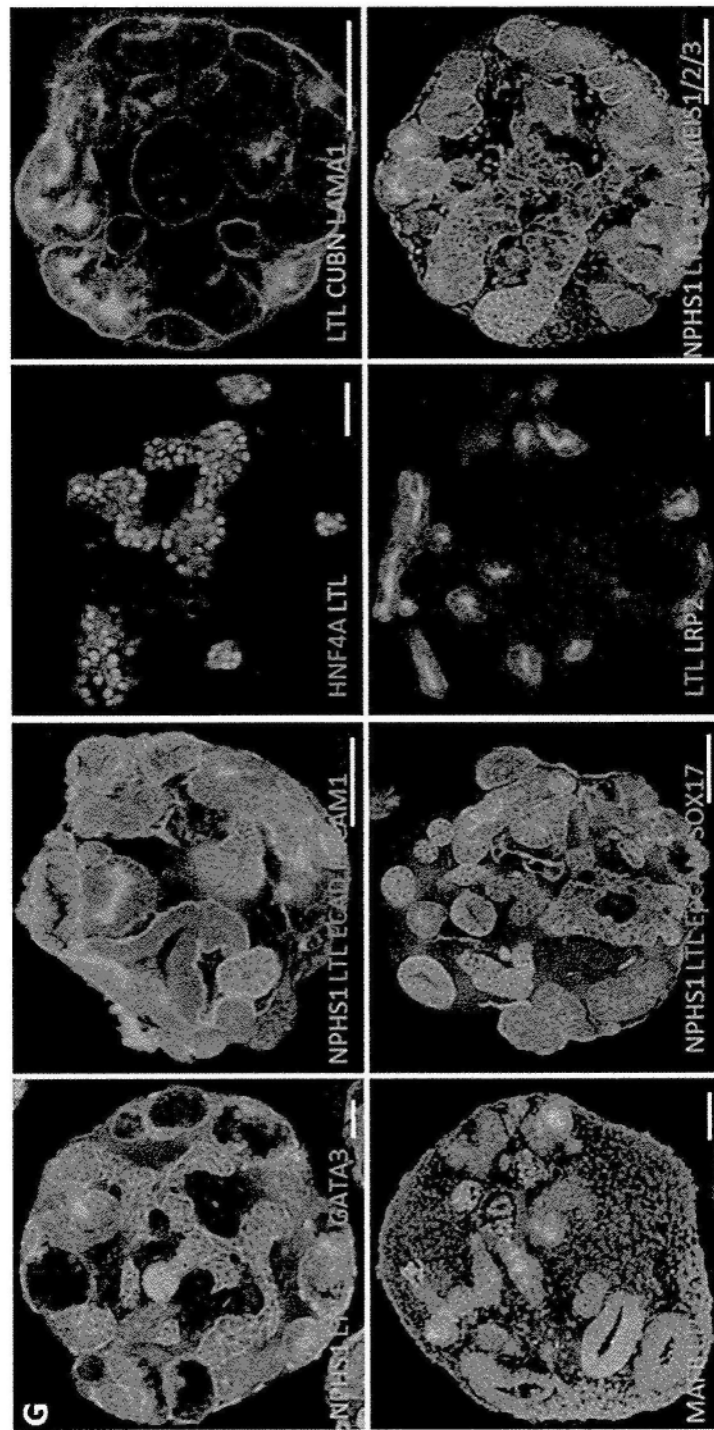


图1-2

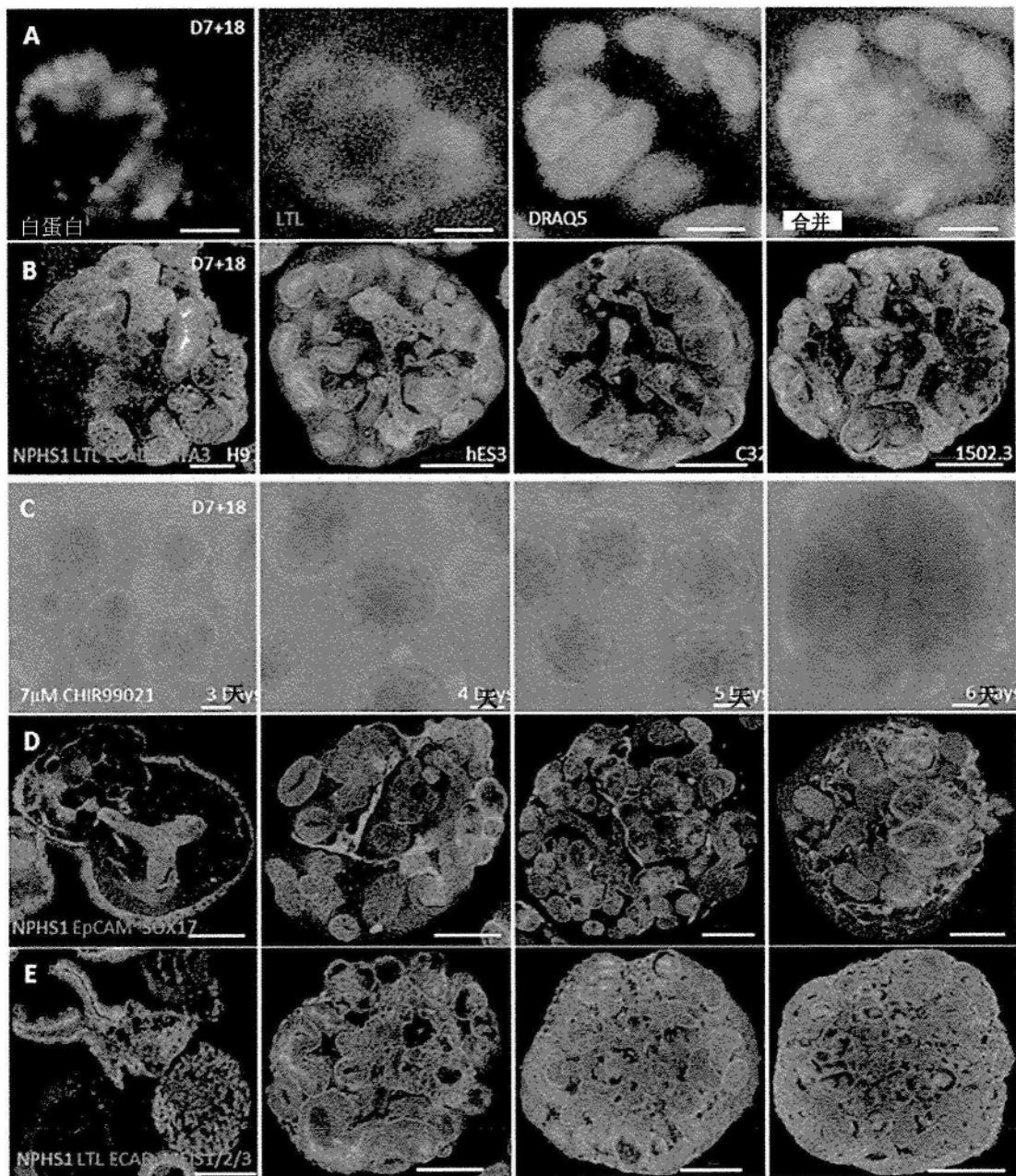


图2

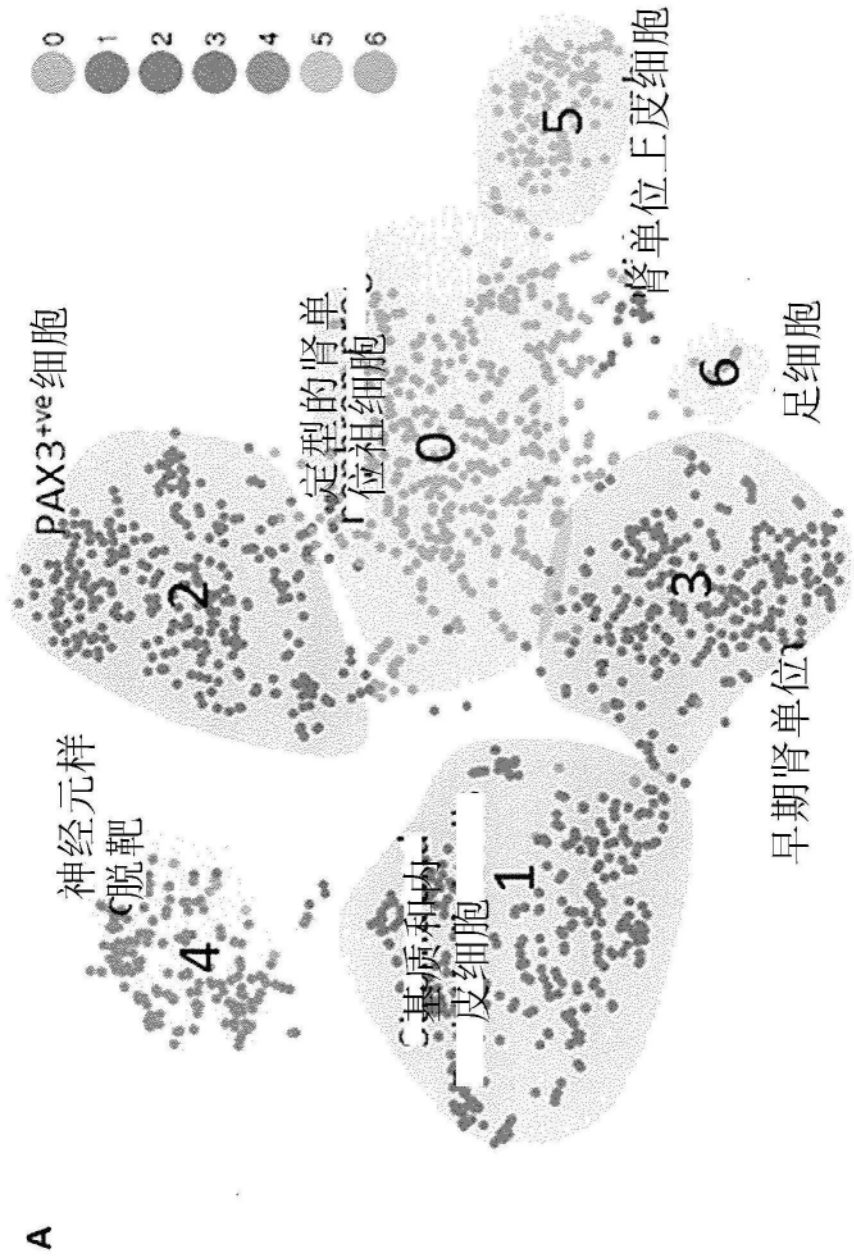


图3-1

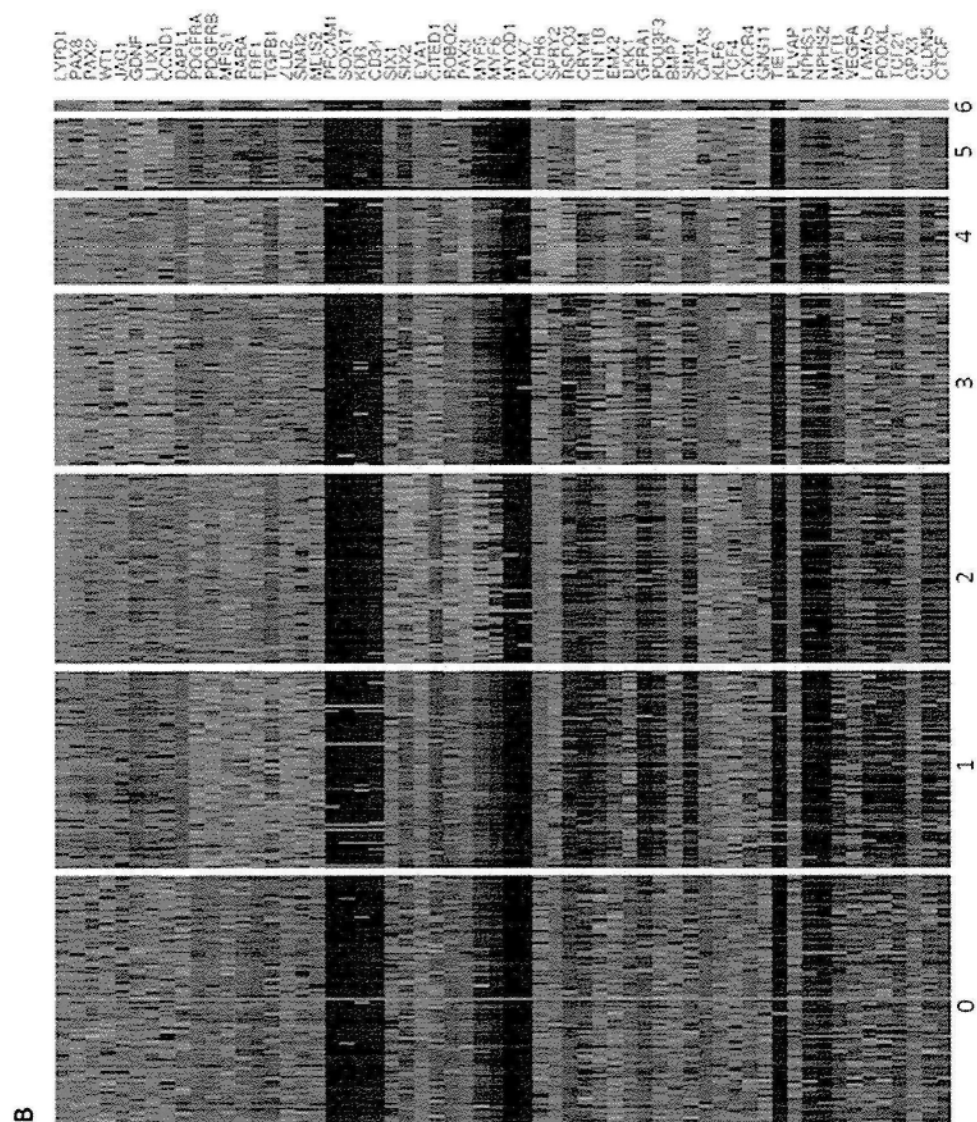


图3-2

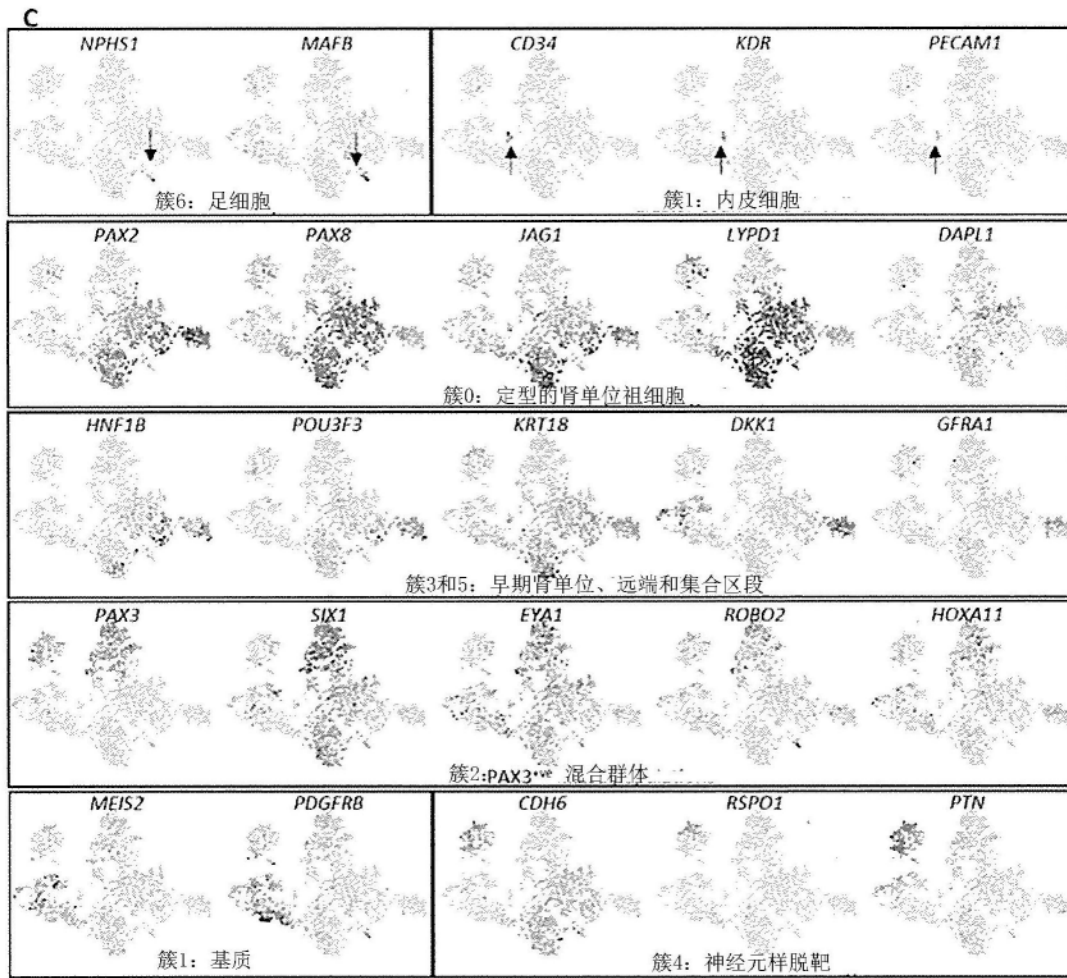


图3-3

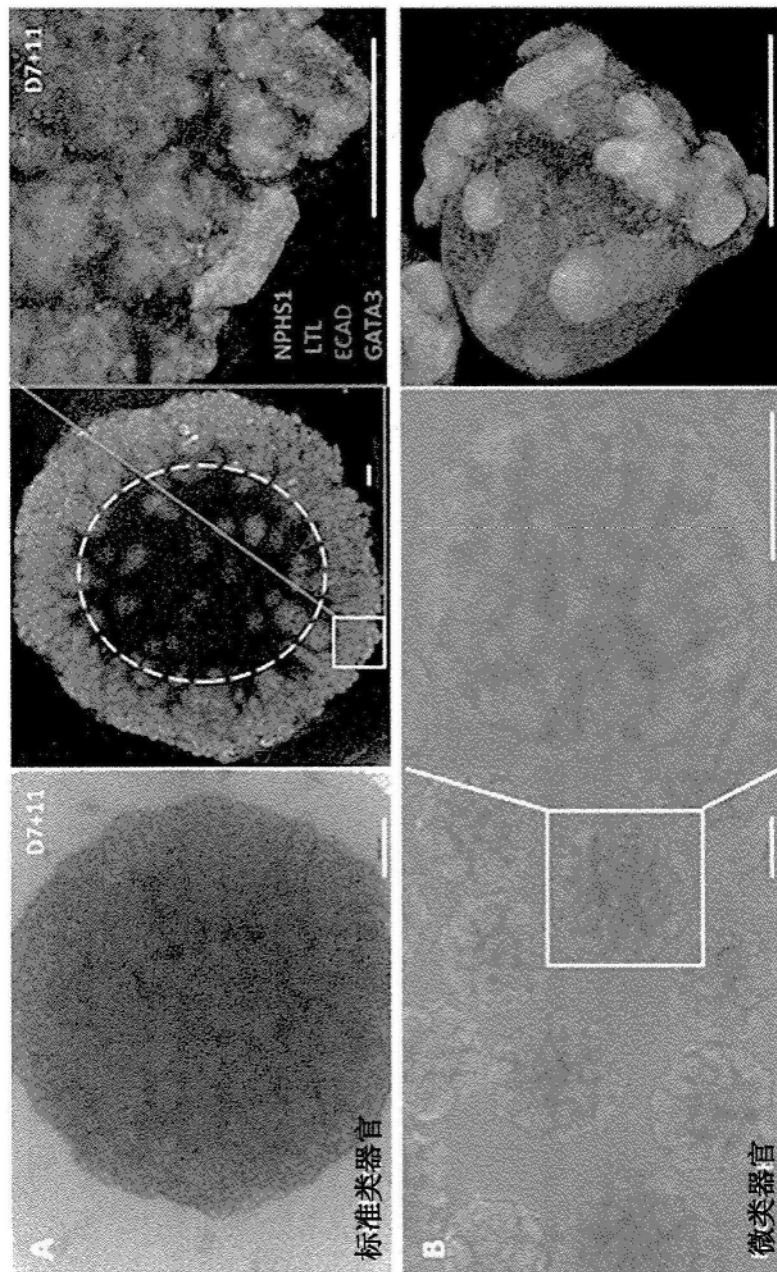


图4-1

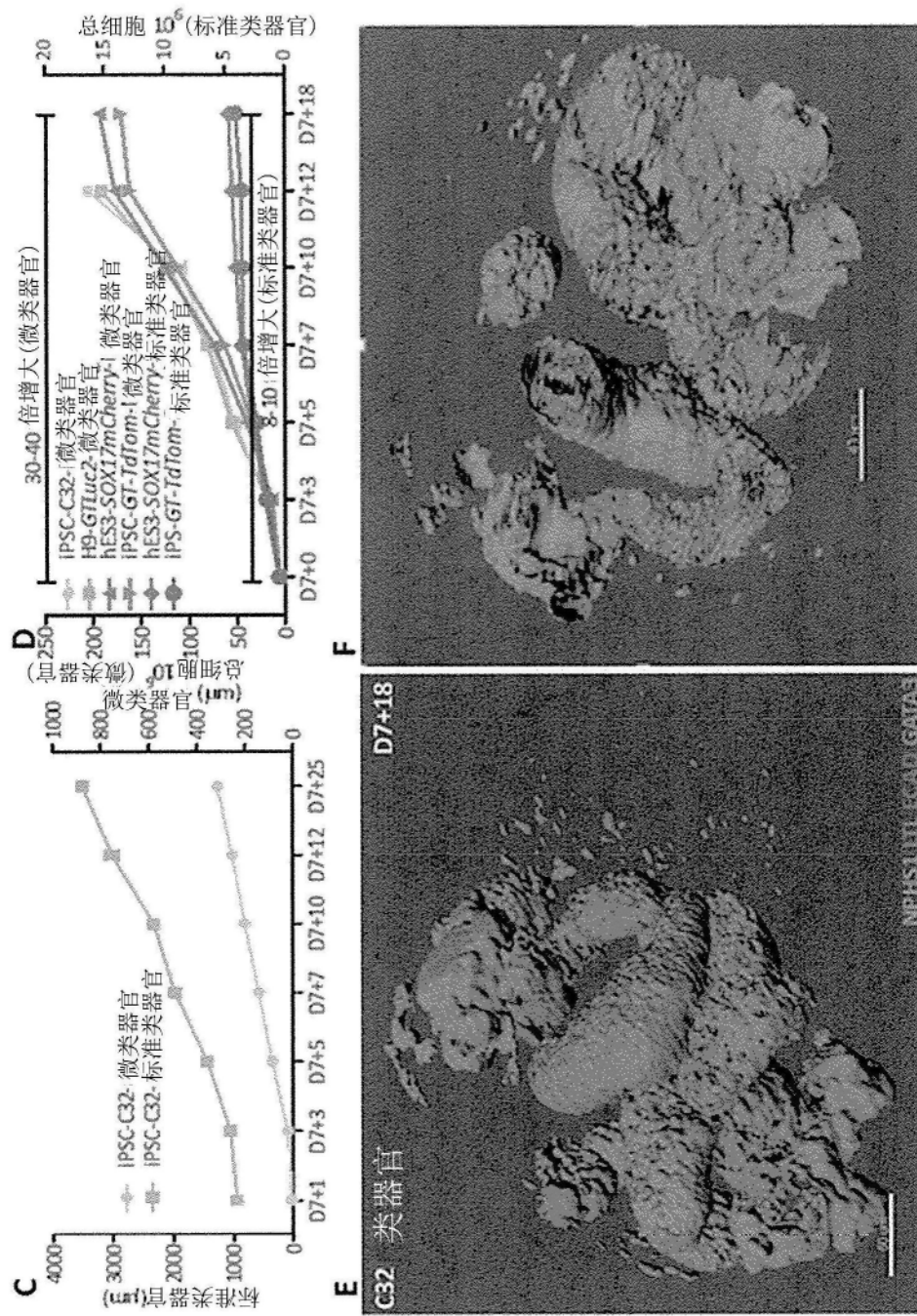


图4-2



图5-1

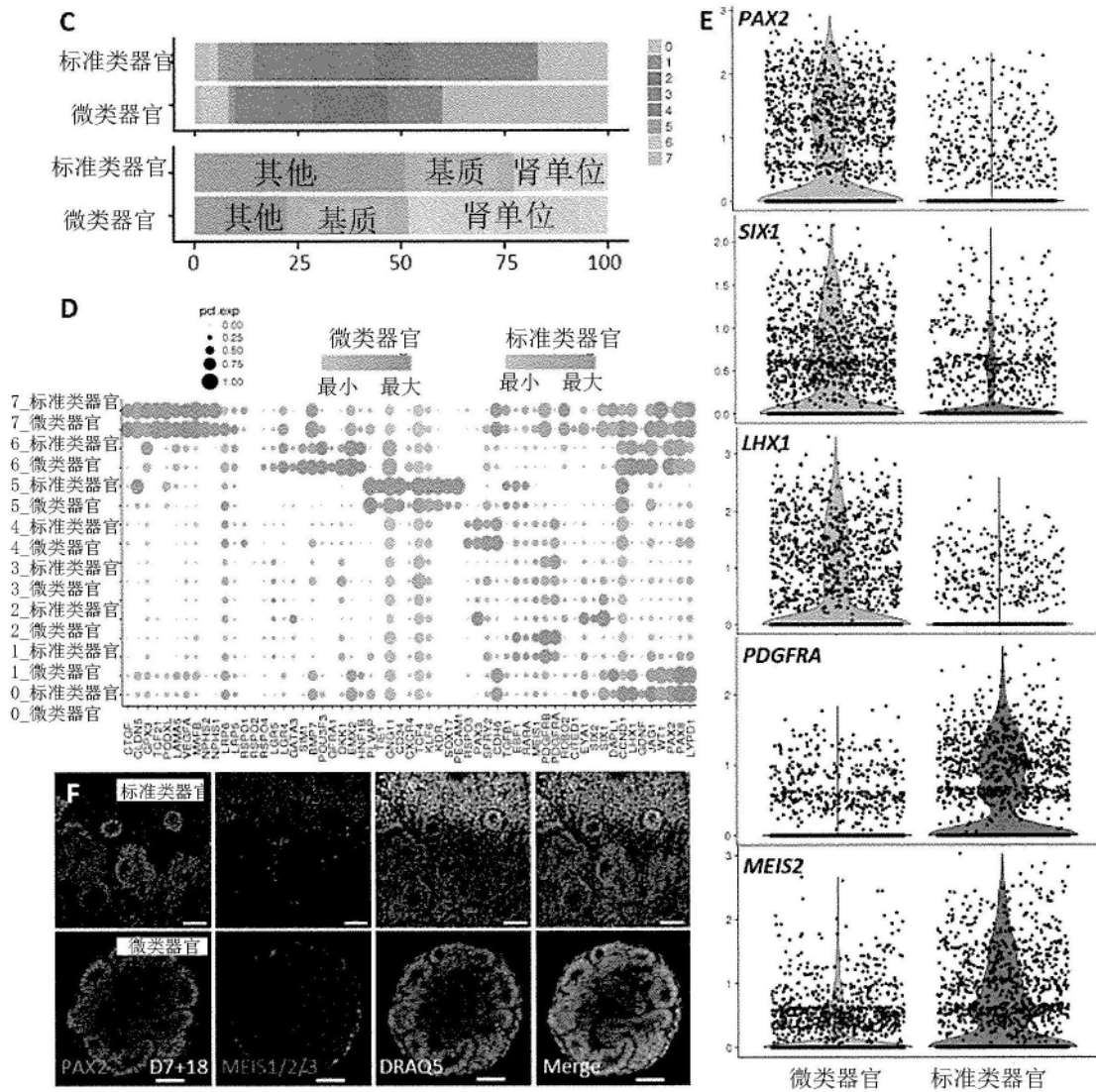


图5-2

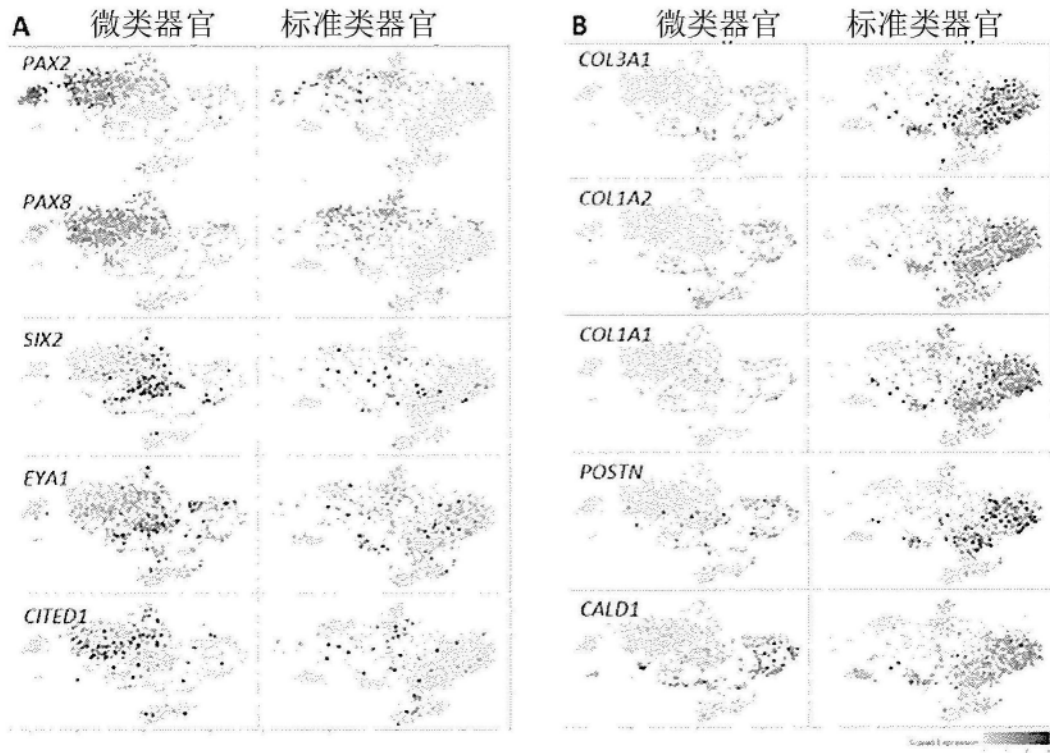


图6

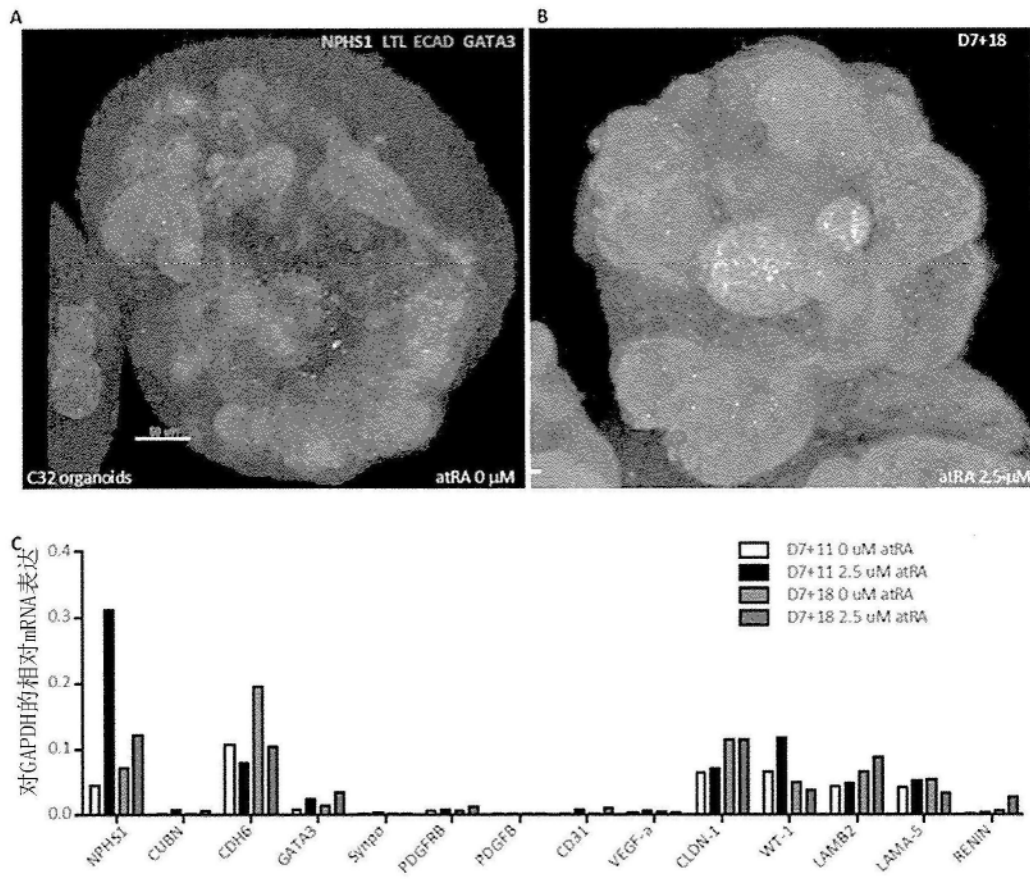


图7

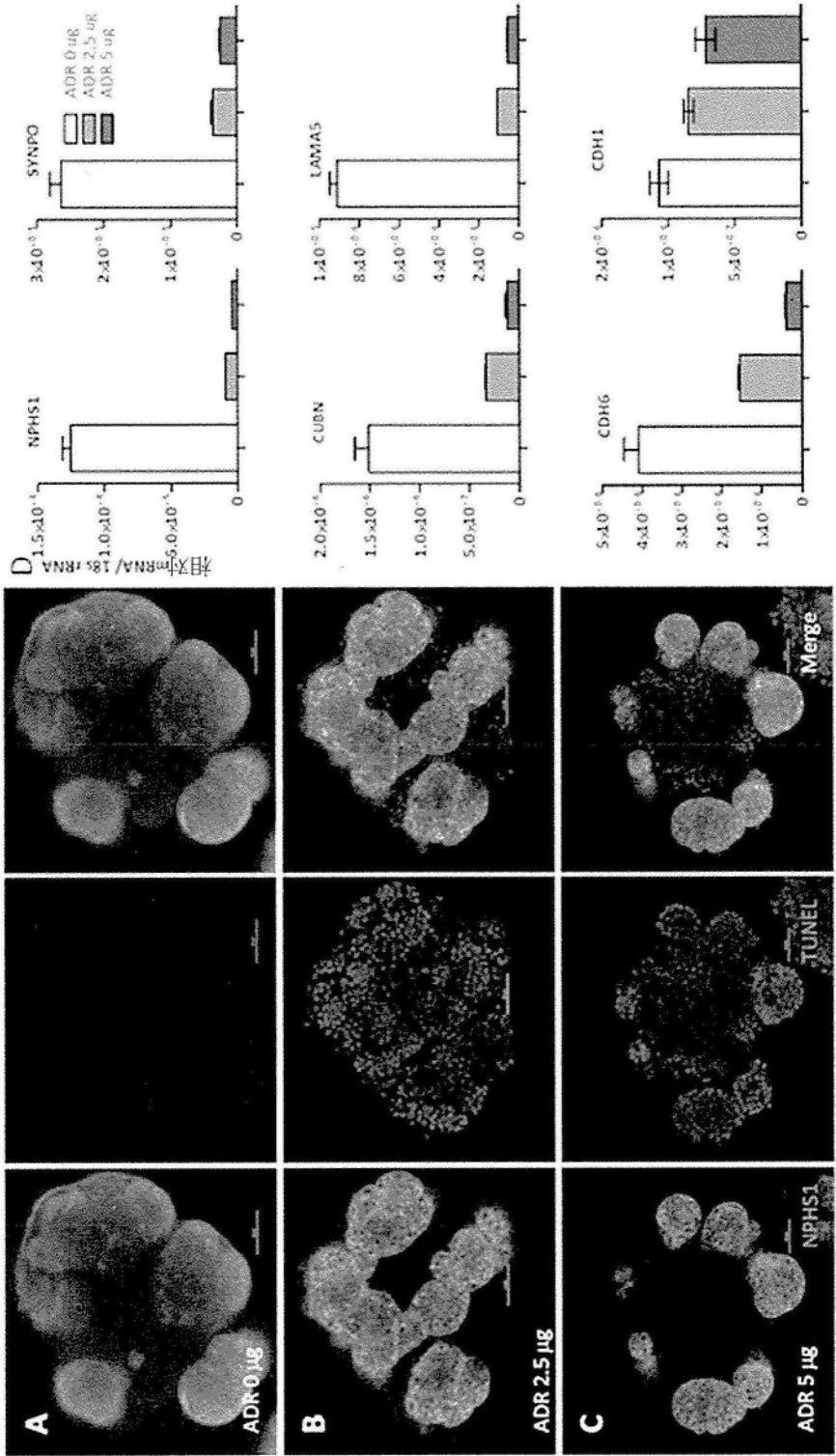


图8