

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-529877

(P2017-529877A)

(43) 公表日 平成29年10月12日(2017.10.12)

(51) Int.Cl.

C 12 M 1/00 (2006.01)
C 12 Q 1/02 (2006.01)
C 12 N 5/071 (2010.01)

F 1

C 12 M 1/00
C 12 Q 1/02
C 12 N 5/071

A

テーマコード(参考)

4 B 02 9
4 B 06 3
4 B 06 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2017-538187 (P2017-538187)
(86) (22) 出願日 平成27年10月6日 (2015.10.6)
(85) 翻訳文提出日 平成29年5月16日 (2017.5.16)
(86) 國際出願番号 PCT/US2015/054315
(87) 國際公開番号 WO2016/057571
(87) 國際公開日 平成28年4月14日 (2016.4.14)
(31) 優先権主張番号 62/060,416
(32) 優先日 平成26年10月6日 (2014.10.6)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 62/140,285
(32) 優先日 平成27年3月30日 (2015.3.30)
(33) 優先権主張国 米国(US)

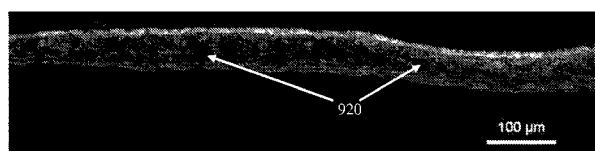
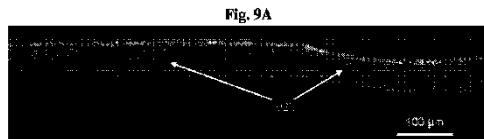
(71) 出願人 516296485
オルガノボ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 92121 カリフォル
ニア州 サンディエゴ ナンシー リッジ
ドライブ 6275 スイート 110
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人 100160923
弁理士 山口 裕幸
(74) 代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】人工の腎臓組織、そのアレイ、およびその作製方法

(57) 【要約】

腎臓線維芽細胞および内皮細胞を含む腎臓間質組織の層と;尿細管上皮細胞を含む腎臓上皮組織の層であって、人工の三次元生体腎臓組織を形成するように腎臓間質組織の層と接触している、腎臓上皮組織の層とを含む、腎臓組織およびそのアレイが開示される。それを製作および使用する方法も開示される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

a. 腎臓線維芽細胞および内皮細胞を含む腎臓間質組織の層と、
b. 尿細管上皮細胞を含む腎臓上皮組織の層であって、人工の三次元生体尿細管モデルを形成するように腎臓間質組織の層と接触している、腎臓上皮組織の層とを含む、人工の三次元生体尿細管モデルであって、
但し、前記間質組織が間質バイオインクを含み、前記上皮組織が上皮バイオインクを含み、人工の三次元生体尿細管モデルを形成する、
人工の三次元生体尿細管モデル。

【請求項 2】

腎臓間質組織の層が頂端面および側底面を有する、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 3】

腎臓上皮組織の層が腎臓間質組織の層の頂端面と接触している、請求項2記載の尿細管モデル。

【請求項 4】

腎臓上皮組織の層が尿細管上皮細胞から本質的になる、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 5】

腎臓上皮組織の層が初代尿細管上皮細胞から本質的になる、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 6】

初代尿細管上皮細胞が、腎機能に影響を及ぼす疾患をもつ対象から単離されている、請求項5記載の尿細管モデル。

【請求項 7】

初代尿細管上皮細胞が、多発性囊胞腎をもつ対象から単離されている、請求項5記載の尿細管モデル。

【請求項 8】

初代尿細管細胞が、II型糖尿病をもつ対象から単離されている、請求項5記載の尿細管モデル。

【請求項 9】

腎臓上皮組織の層が腎細胞癌細胞を含む、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 10】

腎臓上皮組織の層が実質的に単層である、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 11】

腎臓間質組織の層が実質的に単層である、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 12】

腎臓上皮組織の層が腎臓間質組織の層と途切れることなく接触している、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 13】

腎臓上皮組織の層が、腎臓間質組織の層の頂端面と接触しており、かつそれを50%以上覆っている、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 14】

腎臓上皮組織の層が、腎臓間質組織の層の頂端面と接触しており、かつそれを70%以上覆っている、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 15】

腎臓上皮組織の層が、腎臓間質組織の層の頂端面と接触しており、かつそれを90%以上覆っている、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 16】

腎臓上皮組織の層にある細胞の少なくとも50%が、腎臓上皮組織の層の別の細胞と密着結合を形成している、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

腎臓上皮組織の層にある細胞の少なくとも70%が、腎臓上皮組織の層の別の細胞と密着結合を形成している、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項18】

腎臓上皮組織の層にある細胞の少なくとも90%が、腎臓上皮組織の層の別の細胞と密着結合を形成している、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項19】

50～500 μm 厚である、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項20】

約100 μm 厚である、請求項19記載の尿細管モデル。

【請求項21】

腎臓上皮組織の層が押出材料をさらに含む、請求項1記載の尿細管モデル。

10

【請求項22】

線維芽細胞および内皮細胞が約95:5～約5:95の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質組織の層に存在する、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項23】

線維芽細胞および内皮細胞が約75:25～約25:75の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質組織の層に存在する、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項24】

線維芽細胞および内皮細胞が約60:40～約40:60の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質組織の層に存在する、請求項1記載の尿細管モデル。

20

【請求項25】

線維芽細胞および内皮細胞が約50:50の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質組織の層に存在する、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項26】

腎臓間質組織の層が分泌細胞をさらに含む、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項27】

腎臓間質組織の層が免疫細胞をさらに含む、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項28】

腎臓間質組織の層が押出材料をさらに含む、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項29】

腎臓間質組織の層が糸球体細胞を含む、請求項1記載の尿細管モデル。

30

【請求項30】

使用時に、前もって形成されたスキヤフォールドを実質的に伴わない、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項31】

腎臓線維芽細胞、内皮細胞、および尿細管上皮細胞が哺乳動物細胞である、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項32】

腎臓間質組織の層または腎臓上皮組織の層のどちらかが少なくとも30体積%生細胞である、請求項1記載の尿細管モデル。

40

【請求項33】

腎臓間質組織の層または腎臓上皮組織の層のどちらかが少なくとも70体積%生細胞である、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項34】

腎臓間質組織の層または腎臓上皮組織の層のどちらかが少なくとも90体積%生細胞である、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項35】

実質的に平らである、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項36】

実質的に均一な厚さである、請求項1記載の尿細管モデル。

50

【請求項 3 7】

バイオプリントされた少なくとも1種類の成分を含む、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 3 8】

押出しによってバイオプリントされた少なくとも1種類の成分を含む、請求項37記載の尿細管モデル。

【請求項 3 9】

生体適合膜をさらに含む、請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 4 0】

孔径が約0.4 μm 超の生体適合膜をさらに含む、請求項39記載の尿細管モデル。

【請求項 4 1】

孔径が約1 μm の生体適合膜をさらに含む、請求項39記載の尿細管モデル。

【請求項 4 2】

アレイを形成するように構成されている、複数の請求項1記載の尿細管モデル。

【請求項 4 3】

それぞれの尿細管モデルの間に約20 μm ~ 約100 μm のスペースをとるように構成されている、請求項42記載の複数の尿細管モデル。

【請求項 4 4】

a. 腎臓間質バイオインクを調製する工程であって、該間質バイオインクが複数の間質細胞タイプを含み、該間質細胞タイプが腎臓線維芽細胞および内皮細胞を含む、工程；腎臓上皮バイオインクを調製する工程であって、該上皮バイオインクが尿細管上皮細胞を含む、工程；

b. 腎臓間質バイオインクの層の少なくとも1つの表面に腎臓上皮バイオインクが層を形成するように、前記腎臓間質バイオインクおよび前記腎臓上皮バイオインクを付着させる工程；ならびに

c. 細胞を密着させて、人工の三次元生体尿細管モデルを形成するように、前記付着されたバイオインクを細胞培養培地で成熟させる工程
を含む、人工の三次元生体尿細管モデルを製作する方法。

【請求項 4 5】

腎臓間質組織バイオインクを付着させる工程が、頂端面および側底面を有する腎臓間質組織の層を形成する、請求項44記載の方法。

【請求項 4 6】

腎臓上皮バイオインクが、腎臓間質組織の層の頂端面と接觸して付着される、請求項44記載の方法。

【請求項 4 7】

腎臓上皮バイオインクが尿細管上皮細胞から本質的になる、請求項44記載の方法。

【請求項 4 8】

腎臓上皮バイオインクが初代尿細管上皮細胞から本質的になる、請求項44記載の方法。

【請求項 4 9】

初代尿細管上皮細胞が、腎機能に影響を及ぼす疾患をもつ対象から単離されている、請求項48記載の方法。

【請求項 5 0】

初代尿細管上皮細胞が、多発性囊胞腎をもつ対象から単離されている、請求項48記載の方法。

【請求項 5 1】

初代尿細管上皮細胞が、II型糖尿病をもつ対象から単離されている、請求項48記載の方法。

【請求項 5 2】

腎臓上皮バイオインクが腎細胞癌細胞を含む、請求項44記載の方法。

【請求項 5 3】

腎臓上皮バイオインクが単層で付着される、請求項44記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 4】

腎臓間質組織バイオインクが単層で付着される、請求項44記載の方法。

【請求項 5 5】

腎臓上皮組織の層が腎臓間質組織の層と途切れることなく接触して付着される、請求項44記載の方法。

【請求項 5 6】

腎臓上皮バイオインクが、腎臓間質組織の層の頂端面を50%以上覆う層を形成する、請求項44記載の方法。

【請求項 5 7】

腎臓上皮バイオインクが、腎臓間質組織の層の頂端面を70%以上覆う層を形成する、請求項44記載の方法。

【請求項 5 8】

腎臓上皮バイオインクが、腎臓間質組織の層の頂端面を90%以上覆う層を形成する、請求項44記載の方法。

【請求項 5 9】

腎臓上皮層の腎臓上皮細胞の少なくとも50%が、他の腎臓上皮細胞と密着結合を形成する、請求項44記載の方法。

【請求項 6 0】

腎臓上皮層の腎臓上皮細胞の少なくとも70%が、他の腎臓上皮細胞と密着結合を形成する、請求項44記載の方法。

【請求項 6 1】

腎臓上皮層の腎臓上皮細胞の少なくとも90%が、他の腎臓上皮細胞と密着結合を形成する、請求項44記載の方法。

【請求項 6 2】

尿細管モデルが50~500 μm 厚である、請求項44記載の方法。

【請求項 6 3】

尿細管モデルが約100 μm 厚である、請求項44記載の方法。

【請求項 6 4】

腎臓上皮バイオインクが押出材料をさらに含む、請求項44記載の方法。

【請求項 6 5】

線維芽細胞および内皮細胞が約95:5~約5:95の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する、請求項44記載の方法。

【請求項 6 6】

線維芽細胞および内皮細胞が約75:25~約25:75の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する、請求項44記載の方法。

【請求項 6 7】

線維芽細胞および内皮細胞が約60:40~約40:60の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する、請求項44記載の方法。

【請求項 6 8】

線維芽細胞および内皮細胞が約50:50の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する、請求項44記載の方法。

【請求項 6 9】

腎臓間質バイオインクが分泌細胞をさらに含む、請求項44記載の方法。

【請求項 7 0】

腎臓間質バイオインクが免疫細胞をさらに含む、請求項44記載の方法。

【請求項 7 1】

腎臓間質バイオインクが押出材料をさらに含む、請求項44記載の方法。

【請求項 7 2】

腎臓間質バイオインクが糸球体細胞を含む、請求項44記載の方法。

【請求項 7 3】

10

20

30

40

50

前もって形成されたスキヤフォールドを実質的に伴わずに前記モデルが製作される、請求項44記載の方法。

【請求項 7 4】

腎臓線維芽細胞、内皮細胞、および尿細管上皮細胞が哺乳動物細胞である、請求項44記載の方法。

【請求項 7 5】

腎臓間質バイオインクまたは腎臓上皮バイオインクのいずれかが、付着後に平らな層を形成する、請求項44記載の方法。

【請求項 7 6】

尿細管モデルが、実質的に均一な厚さの尿細管モデルである、請求項44記載の方法。

【請求項 7 7】

腎臓間質バイオインクを生体適合膜上に付着させる工程をさらに含む、請求項44記載の方法。

【請求項 7 8】

腎臓間質バイオインクを、孔径が $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 超の生体適合膜上に付着させる工程をさらに含む、請求項44記載の方法。

【請求項 7 9】

腎臓間質バイオインクを、孔径が約 $1\text{ }\mu\text{m}$ の生体適合膜上に付着させる工程をさらに含む、請求項44記載の方法。

【請求項 8 0】

人工の三次元生体尿細管モデルが、アレイを形成するように付着される、請求項44記載の方法。

【請求項 8 1】

人工の三次元生体尿細管モデルが、それぞれの尿細管モデルの間に約 $20\text{ }\mu\text{m}$ ～約 $100\text{ }\mu\text{m}$ のスペースをとるように構成されているアレイを形成するように付着される、請求項44記載の方法。

【請求項 8 2】

腎臓間質バイオインクが少なくとも30体積%生細胞である、請求項44記載の方法。

【請求項 8 3】

腎臓間質バイオインクが少なくとも70体積%生細胞である、請求項44記載の方法。

【請求項 8 4】

腎臓間質バイオインクが少なくとも90体積%生細胞である、請求項44記載の方法。

【請求項 8 5】

腎臓間質バイオインクが押し出しバイオプリンティングによって付着される、請求項44記載の方法。

【請求項 8 6】

腎臓上皮バイオインクがインクジェットバイオプリンティングによって付着される、請求項44記載の方法。

【請求項 8 7】

尿細管モデルのどの層もインビトロ培養で3日後に生存可能である、請求項44記載の方法。

【請求項 8 8】

尿細管モデルのどの層もインビトロ培養で10日後に生存可能である、請求項44記載の方法。

【請求項 8 9】

a. 腎臓間質バイオインクを調製する工程であって、該間質バイオインクが複数の間質細胞タイプを含み、該間質細胞タイプが腎臓線維芽細胞および内皮細胞を含む、工程；腎臓上皮バイオインクを調製する工程であって、該上皮バイオインクが尿細管上皮細胞を含む、工程；

b. 間質バイオインクの少なくとも1つの表面に上皮バイオインクが層を形成するように

10

20

30

40

50

、前記間質バイオインクおよび前記上皮バイオインクを付着させる工程;ならびに
c.細胞を密着させて、人工の三次元生体尿細管モデルを形成するように、前記付着されたバイオインクを細胞培養培地中で成熟させる工程;
d.治療剤を構築物と接触させる工程;
e.尿細管上皮細胞の生存能力または機能を測定する工程;ならびに
f.尿細管上皮細胞の測定された生存能力または機能に基づいて治療剤の腎毒性を評価する工程

を含む、治療剤の腎毒性を評価する方法。

【請求項 9 0】

間質バイオインクが押し出しバイオプリンティングによって付着される、請求項89記載の方法。 10

【請求項 9 1】

上皮バイオインクがインクジェットバイオプリンティングによって付着される、請求項89記載の方法。

【請求項 9 2】

間質バイオインクまたは上皮バイオインクのいずれかが治療用分子または治療用物質をさらに含む、請求項89記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、2014年10月6日に出願された米国特許出願第62/060,416号、および2015年3月30日に出願された米国特許出願第62/140,285号の恩典を主張する。これらの全開示は参照により本明細書に組み入れられる。 20

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

新薬を市場に出す、すなわち、臨床試験を通じた発見から認可までの総費用は、典型的には、数億米ドルまたは数十億米ドルである。これは、一つには、ヒトにおいて試験された実験薬の95%が有効でも安全でもないことが理由である。腎毒性は臨床試験段階での薬物減少の大きな原因であり、この毒性の主な部位は近位尿細管内にある。 30

【発明の概要】

【0 0 0 3】

現行の上皮細胞単層などのインビトロ腎毒性モデルや、生きているげっ歯類などのインビオモデルはヒトでの薬物の作用、毒性、または代謝を効果的に予測することができない。例えば、従来の腎臓細胞培養モデルには天然組織の複雑さが無く、従って、組織レベルの応答を予測する能力が乏しい。さらに、ヒト腎機能と動物腎機能との間に、傷害に対する感受性の差を含む種特異的な違いがあるために、前臨床動物試験の予測能力は限られている。必要とされるものは、天然様組織構造をもつ人工の腎臓組織モデル、具体的には、尿細管間質組織界面の層構造を再現するように細胞が空間的に組織化されている組織モデルである。このような人工の腎臓組織モデルはヒトでのインビオ応答を予測する能力が高く、腎毒性のモデル化、腎臓疾患(例えば、多発性囊胞腎、感染症、自己免疫疾患、線維症、および高血圧または糖尿病による慢性腎臓病)のモデル化、ならびに輸送(例えば、高分子の排出および/または取り込み)のモデル化に有用だろう。 40

【0 0 0 4】

本明細書に記載の人工の組織は、ヒト腎臓近位尿細管上皮細胞の最適な形態および機能が容易になるようにヒト腎臓間質組織がヒト腎臓近位尿細管上皮細胞を支持している尿細管間質界面のモデルである。三次元尿細管間質界面が作り出されると、低分子、化学物質、汚染物質、または生物製剤がどのように腎臓近位尿細管に影響を及ぼすのか正確に研究するために、薬物輸送体および代謝に必要な受容体を正しく局在化することが容易 50

になる。これは、ヒトまたはイヌ腎臓上皮細胞の二次元単層の、さらに生理学的な関連性のある代替物であり、腎機能の種による違いが結果の解釈を妨げる動物試験の補助として、または場合によっては代用として役立つ。

【0005】

本明細書に記載の人工の組織は、化合物がどのように腎臓近位尿細管に影響を及ぼすかを正確に研究する機会を与え、それに加えて、尿細管輸送、細胞間相互作用が関与する発病プロセスや、尿細管間質線維症、例えば、慢性腎臓病、多発性囊胞腎、またはII型糖尿病において発症する可能性がある尿細管間質線維症の発症をモデル化する。

【0006】

人工の三次元生体尿細管モデルであって、腎臓線維芽細胞および内皮細胞を含む腎臓間質組織の層と、尿細管上皮細胞を含む腎臓上皮組織の層であって、人工の三次元生体尿細管モデルを形成するように腎臓間質組織の層と接触している、腎臓上皮組織の層とを含み、但し、間質組織が間質バイオインクを含み、上皮組織が上皮バイオインクを含み、人工の三次元生体尿細管モデルを形成する、人工の三次元生体尿細管モデルが本明細書において提供される。ある特定の態様において、腎臓間質組織の層は頂端面および側底面を有する。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は腎臓間質組織の層の頂端面と接触している。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は尿細管上皮細胞から本質的になる。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は初代尿細管上皮細胞から本質的になる。ある特定の態様において、初代尿細管上皮細胞は、腎機能に影響を及ぼす疾患をもつ対象から単離されている。ある特定の態様において、初代尿細管上皮細胞は、多発性囊胞腎をもつ対象から単離されている。ある特定の態様において、初代尿細管細胞は、II型糖尿病をもつ対象から単離されている。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は腎細胞癌細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は実質的に単層である。ある特定の態様において、腎臓間質組織の層は実質的に単層である。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は腎臓間質組織の層と途切れることなく接觸している。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は腎臓間質組織の層の頂端面と接觸しており、かつそれを50%以上覆う。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は、腎臓間質組織の層の頂端面と接觸しており、かつそれを70%以上覆う。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は、腎臓間質組織の層の頂端面と接觸しており、かつそれを90%以上覆う。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層にある細胞の少なくとも50%は腎臓上皮組織の層の別の細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層にある細胞の少なくとも70%は腎臓上皮組織の層の別の細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層にある細胞の少なくとも90%は腎臓上皮組織の層の別の細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、尿細管モデルは50～500 μm 厚である。ある特定の態様において、尿細管モデルは約100 μm 厚である。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は押出材料をさらに含む。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は、約95:5～約5:95の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質組織の層に存在する。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は、約75:25～約25:75の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質組織の層に存在する。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は、約60:40～約40:60の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質組織の層に存在する。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は、約50:50の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質組織の層に存在する。ある特定の態様において、腎臓間質組織の層は分泌細胞をさらに含む。ある特定の態様において、腎臓間質組織の層は免疫細胞をさらに含む。ある特定の態様において、腎臓間質組織の層は押出材料をさらに含む。ある特定の態様において、腎臓間質組織の層は糸球体細胞を含む。ある特定の態様において、前記モデルは、使用時に、前もって形成されたスキヤフォールドを実質的に伴わない。ある特定の態様において、腎臓線維芽細胞、内皮細胞、および尿細管上皮細胞は哺乳動物細胞である。ある特定の態様において、腎臓間質組織の層または腎臓上皮組織の層のどちらかが少なくとも30体積%生細胞である。ある特定の態様において、腎臓間質組織の層または腎臓上皮組織の層のどちらかが少なくとも70体積%生細胞である。ある特定の態様において、腎臓間質

10

20

30

40

50

組織の層または腎臓上皮組織の層のどちらかが少なくとも90体積%生細胞である。ある特定の態様において、尿細管モデルは実質的に平らである。ある特定の態様において、尿細管モデルは実質的に均一な厚さの尿細管モデルである。ある特定の態様において、尿細管モデルは、バイオプリントされた少なくとも1種類の成分を含む。ある特定の態様において、尿細管モデルは、押し出しによってバイオプリントされた少なくとも1種類の成分を含む。ある特定の態様において、尿細管モデルは生体適合膜をさらに含む。ある特定の態様において、尿細管モデルは、孔径が約0.4 μm 超の生体適合膜をさらに含む。ある特定の態様において、尿細管モデルは、孔径が約1 μm の生体適合膜をさらに含む。ある特定の態様において、複数の尿細管モデルがアレイを形成するように構成されている。ある特定の態様において、複数の尿細管モデルは、それぞれの尿細管モデルの間に約20 μm ～約100 μm のスペースをとるように構成されている。ある特定の態様において、間質バイオインクまたは上皮バイオインクのいずれかが治療用分子または治療用物質をさらに含む。

【0007】

人工の三次元生体尿細管モデルを製作する方法であって、腎臓間質バイオインクを調製する工程であって、間質バイオインクが複数の間質細胞タイプを含み、間質細胞タイプが腎臓線維芽細胞および内皮細胞を含む、工程；腎臓上皮バイオインクを調製する工程であって、上皮バイオインクが尿細管上皮細胞を含む、工程；腎臓間質バイオインクの層の少なくとも1つの表面に腎臓上皮バイオインクが層を形成するように腎臓間質バイオインクおよび腎臓上皮バイオインクを付着させる工程；ならびに、細胞を密着させて、人工の三次元生体尿細管モデルを形成するように、付着されたバイオインクを細胞培養培地中で成熟させる工程を含む、方法も本明細書において提供される。ある特定の態様において、腎臓間質組織バイオインクを付着させる工程は、頂端面および側底面を有する腎臓間質組織の層を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは腎臓間質組織の層の頂端面と接触して付着される。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは尿細管上皮細胞から本質的になる。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは初代尿細管上皮細胞から本質的になる。ある特定の態様において、初代尿細管上皮細胞は、腎機能に影響を及ぼす疾患をもつ対象から単離されている。ある特定の態様において、初代尿細管上皮細胞は、多発性嚢胞腎をもつ対象から単離されている。ある特定の態様において、初代尿細管上皮細胞は、II型糖尿病をもつ対象から単離されている。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは腎細胞癌細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは単層で付着される。ある特定の態様において、腎臓間質組織バイオインクは単層で付着される。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は腎臓間質組織の層と途切れることなく接触して付着される。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは、腎臓間質組織の層の頂端面を50%以上覆う層を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは、腎臓間質組織の層の頂端面を70%以上覆う層を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは、腎臓間質組織の層の頂端面を90%以上覆う層を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮層の腎臓上皮細胞の少なくとも50%は他の腎臓上皮細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮層の腎臓上皮細胞の少なくとも70%は他の腎臓上皮細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮層の腎臓上皮細胞の少なくとも90%は他の腎臓上皮細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、尿細管モデルは50～500 μm 厚である。ある特定の態様において、尿細管モデルは約100 μm 厚である。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは押出材料をさらに含む。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は、約95:5～約5:95の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は、約75:25～約25:75の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は、約60:40～約40:60の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は、約50:50の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは分泌細胞をさらに含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは免疫

10

20

30

40

50

細胞をさらに含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは押出材料をさらに含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは糸球体細胞を含む。ある特定の態様において、前記モデルは、前もって形成されたスキヤフォールドを実質的に伴わずに製作される。ある特定の態様において、腎臓線維芽細胞、内皮細胞、および尿細管上皮細胞は哺乳動物細胞である。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクまたは腎臓上皮バイオインクのいずれかが、付着後に平らな層を形成する。ある特定の態様において、尿細管モデルは実質的に均一な厚さの尿細管モデルである。ある特定の態様において、前記方法は、生体適合膜上に腎臓間質バイオインクを付着させる工程をさらに含む。ある特定の態様において、前記方法は、孔径が0.4 μm超の生体適合膜上に腎臓間質バイオインクを付着させる工程をさらに含む。ある特定の態様において、前記方法は、孔径が約1 μmの生体適合膜上に腎臓間質バイオインクを付着させる工程をさらに含む。ある特定の態様において、前記方法は、アレイを形成するように付着された、人工の三次元生体尿細管モデルを含む。ある特定の態様において、前記方法は、それぞれの尿細管モデルの間に約20 μm～約100 μmのスペースをとるように構成されているアレイを形成するように付着された、人工の三次元生体尿細管モデルを含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは少なくとも30体積%生細胞である。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは少なくとも70体積%生細胞である。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは少なくとも90体積%生細胞である。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは押し出しバイオプリンティングによって付着される。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクはインクジェットバイオプリンティングによって付着される。ある特定の態様において、尿細管モデルのどの層も、インビトロ培養で培養状態で3日後に生存可能である。ある特定の態様において、尿細管モデルのどの層も、インビトロ培養で10日後に生存可能である。ある特定の態様において、間質バイオインクまたは上皮バイオインクのいずれかが治療用分子または治療用物質をさらに含む。

10

20

30

40

【0008】

治療剤の腎毒性を評価する方法であって、腎臓間質バイオインクを調製する工程であって、間質バイオインクが複数の間質細胞タイプを含み、間質細胞タイプが腎臓線維芽細胞および内皮細胞を含む、工程；腎臓上皮バイオインクを調製する工程であって、上皮バイオインクが尿細管上皮細胞を含む、工程；間質バイオインクの層の少なくとも1つの表面上に上皮バイオインクが層を形成するように間質バイオインクおよび上皮バイオインクを付着させる工程；ならびに、細胞を密着させて、人工の三次元生体尿細管モデルを形成するように、付着されたバイオインクを細胞培養培地中で成熟させる工程；治療剤を構築物と接触させる工程；尿細管上皮細胞の生存能力または機能を測定する工程；ならびに尿細管上皮細胞の測定された生存能力または機能に基づいて治療剤の腎毒性を評価する工程を含む、方法も本明細書において提供される。ある特定の態様において、間質バイオインクは押し出しバイオプリンティングによって付着される。ある特定の態様において、上皮バイオインクはインクジェットバイオプリンティングによって付着される。ある特定の態様において、間質バイオインクまたは上皮バイオインクのいずれかが治療用分子または治療用物質をさらに含む。

40

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】模式的概念図、この場合、間質層と、その上にある極性化した上皮单層を図示した模式的な概念図の非限定的な例を示す。

【図2】構造模式図、この場合、実施例1の構造1の構造を図示した構造模式図の非限定的な例(図2A)、および組織が融合して48時間後の、バイオプリント尿細管モデルの非限定的な例(図2B)を示す。

【図3】実施例1の構造1を図示した顕微鏡写真、この場合、H&E染色(図3A:100x全倍率；図3B:200x全倍率)の非限定的な例を示す。

【図4】実施例1の構造1を図示した顕微鏡写真の非限定的な例を示す。この場合、CD31(410)およびTE7(420)に対する抗体による染色がHUVEC網(430)を示す。

50

【図5】実施例1の構造1を図示した低倍率顕微鏡写真の非限定的な例を示す。染色は、尿細管構造を取り囲むE-カドヘリン(540)に対する抗体と、TE7(520)に対する抗体を用いた。

【図6】構造模式図、この場合、実施例2の構造2の構造を図示した構造模式図の非限定的な例を示す。

【図7】実施例2の構造2、この場合、H&E染色(黒色の矢印は上皮細胞を示す)を図示した顕微鏡写真の非限定的な例を示す。

【図8】実施例2の構造2を図示した顕微鏡写真、この場合、内皮細胞の組織化を証明する顕微鏡写真の非限定的な例を示す(図8A)。HUVECSについては810、CD31染色、線維芽細胞については820、TE7染色を示した。この実施例では、上皮細胞はE-カドヘリン染色によって組織表面に検出される(図8B、840)。

【図9】実施例3からの構築物の顕微鏡写真を示し、3D腎臓組織内に、極性化の特徴を示す腎臓近位尿細管上皮細胞(RPTEC)を図示する。RPTECの間にある外側膜にE-カドヘリン(940および明るい染色)が観察された。これは、密着結合における局在化に対応する。線維芽細胞についてはTE7による染色920も示した。低倍率(図9A)、中倍率(図9B)、および高倍率(図9C)を示した。

【図10】実施例3からのバイオプリント腎臓組織構築物のH&E(図10A)およびトリクローム(図10B)染色を示す。

【図11】図11からの構築物を示す。刷子縁(図11A、矢印)とコラーゲン沈着(図11B、矢印)を強調した。

【図12】広範囲にわたる内皮細胞網が、実施例3からの3Dバイオプリント腎臓組織構築物において観察されたことを示す。CD31(内皮細胞、明るい染色)とTE7(線維芽細胞、1220)の染色を示した。内皮細胞で裏打ちされた推定内腔をもつ網には(*)が付いている。

【図13】2D hTERT-RPTECおよび間質細胞のみと比較した、実施例3からの3Dバイオプリント腎臓組織におけるGGT活性を示す。図13は、2D共培養と比較した培養中の3D尿細管モデルの持続的な生存能力を示す。

【図14】様々な線維芽細胞:内皮細胞比を含む間質層を用いてバイオプリントした尿細管モデルを肉眼で見たものを示す。図14Aは、90:10の線維芽細胞:内皮細胞比を示す。図14Bは、75:25の線維芽細胞:内皮細胞比を示す。図14Cは、50:50の線維芽細胞:内皮細胞比を示す。

【図15】様々な線維芽細胞:内皮細胞比を含む間質層を用いてバイオプリントした尿細管モデルの組織構造を示す。図15Aは、90:10の線維芽細胞:内皮細胞比を示す。図15Bは、75:25の線維芽細胞:内皮細胞比を示す。図15Cは、50:50の線維芽細胞:内皮細胞比を示す。

【図16】バイオプリント尿細管モデルの表面積および厚さ均一性データを示す。図16Aは、バイオプリント尿細管モデルを肉眼で見たものを示す。図16Bは、Keyence表面マッピングデータを示す。

【図17】様々な量の内皮細胞および様々な血清濃度を用いてバイオプリントした尿細管モデルの組織構造を示す。図17Aは、無血清培地中に 1.25×10^5 細胞/ウェルの濃度の上皮細胞を示す。図17Bは、2%血清中に 1.25×10^5 細胞/ウェルの濃度の上皮細胞を示す。図17Cは、2%血清中に 2.5×10^5 細胞/ウェルの濃度の上皮細胞を示す。図17Dは、2%血清中に 5.0×10^5 細胞/ウェルの濃度の上皮細胞を示す。

【図18】3D尿細管モデルの応答と標準的な2D共培養モデルの応答を比較した、アンホテリシンBを用いた毒性試験の比較を示す。

【図19】3D尿細管モデルを用いたアンホテリシンB(AmpB)毒性試験の例を示す。図19Aは、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)放出アッセイを示す。図19Bは、-グルタミル-トランスフェラーゼ(GGT)活性を示す。

【図20】ビヒクル(図20A)、 $10 \mu M$ AmpB(図20B)、または $50 \mu M$ AmpB(図20C)で処理した3D尿細管モデルからの、図19に対応する組織構造を示す。矢印は上皮層を示す。

【図21】3D尿細管モデルを用いたシスプラチニン毒性試験の例を示す。図21Aは、生存能

10

20

30

40

50

力についてのalamarBlueアッセイを示す。図21Bは、-グルタミル-トランスフェラーゼ(GGT)活性を示す。図21Cは、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)放出アッセイを示す。

【図22】ビヒクル(図22A)、10 μMシスプラチニ(図22B)、50 μMシスプラチニ(図22C)、および50ng/mL TGF(図22D)で処理した尿細管モデルからの、図21に対応する、マッソントリクローム染色した組織構造を示す。

【図23】初代内皮細胞と不死化内皮細胞を比較した、3D尿細管モデルを用いたシスプラチニ毒性試験の例を示す。図23Aは、生存能力についてのalamarBlueアッセイを示す。図23Bは、-グルタミル-トランスフェラーゼ(GGT)活性を示す。図23Cは、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)放出アッセイを示す。

【図24】バイオプリント間質組織に孔径が及ぼす効果を示す。図24Aは、孔径0.4 μmでプリントした間質組織を示す。図24Bは、孔径1.0 μmでプリントした間質組織を示す。

【図25】組織構造のH&E染色による、培養中の3D尿細管モデルの長期生存能力を示す。図25Aは、培養状態で6日後の尿細管モデルを示す。図25Bは、培養状態で10日後の尿細管モデルを示す。図25C24Bは、培養状態で27日後の尿細管モデルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

発明の詳細な説明

人工の三次元生体尿細管モデルであって、腎臓線維芽細胞および内皮細胞を含む腎臓間質組織の層と、尿細管上皮細胞を含む腎臓上皮組織の層であって、人工の三次元生体尿細管モデルを形成するように腎臓間質組織の層と接触している、腎臓上皮組織の層を含み、但し、間質組織が間質バイオインクを含み、上皮組織が上皮バイオインクを含み、人工の三次元生体尿細管モデルを形成する、人工の三次元生体尿細管モデルが本明細書において提供される。

【0011】

人工の三次元生体尿細管モデルを製作する方法であって、腎臓間質バイオインクを調製する工程であって、間質バイオインクが複数の間質細胞タイプを含み、間質細胞タイプが腎臓線維芽細胞および内皮細胞を含む、工程；腎臓上皮バイオインクを調製する工程であって、上皮バイオインクが尿細管上皮細胞を含む、工程；腎臓間質バイオインクの層の少なくとも1つの表面に腎臓上皮バイオインクが層を形成するように腎臓間質バイオインクおよび腎臓上皮バイオインクを付着させる工程；ならびに、細胞を密着させて、人工の三次元生体尿細管モデルを形成するように、付着されたバイオインクを細胞培養培地内で成熟させる工程を含む、方法も本明細書において提供される。

【0012】

治療剤の腎毒性を評価する方法であって、腎臓間質バイオインクを調製する工程であって、間質バイオインクが複数の間質細胞タイプを含み、間質細胞タイプが腎臓線維芽細胞および内皮細胞を含む、工程；腎臓上皮バイオインクを調製する工程であって、上皮バイオインクが尿細管上皮細胞を含む、工程；間質バイオインクの少なくとも1つの表面に上皮バイオインクが層を形成するように間質バイオインクおよび上皮バイオインクを付着させる工程；ならびに、細胞を密着させて、人工の三次元生体尿細管モデルを形成するように、付着されたバイオインクを細胞培養培地内で成熟させる工程；治療剤を構築物と接触させる工程；尿細管上皮細胞の生存能力または機能を測定する工程；ならびに尿細管上皮細胞の測定された生存能力または機能に基づいて治療剤の腎毒性を評価する工程を含む、方法も本明細書において提供される。

【0013】

ある特定の定義

特に定義のない限り、本明細書において用いられる技術用語は全て、本発明が属する当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈によってはっきりと規定されていない限り複数への言及を含む。本明細書における「または」についての、あらゆる言及は、特に定めのない限り、「および/または

10

20

30

40

50

」を包含することが意図される。

【0014】

本明細書で使用する「アレイ」とは、1つの試料に対して複数の試験を行うことができるよう、複数の試料に対して1つまたは複数の試験を行うことができるよう、またはその両ができるように空間的に並べられた複数の要素のつながりを含む科学ツールを意味する。

【0015】

本明細書で使用する「アッセイ」とは、有機試料または生物試料(例えば、細胞凝集物、組織、臓器、生物など)の中にある物質(例えば、化学物質、分子、生化学物質、タンパク質、ホルモン、または薬物など)の存在または活性を試験または測定するための手順を意味する。

10

【0016】

本明細書で使用する「層」とは、厚さが1個または複数個の細胞である、X面およびY面にある細胞のつながりを意味する。一部の態様において、本明細書に記載の尿細管は1つの層を含む。他の態様において、本明細書に記載の尿細管は複数の層を含む。様々な態様において、層は、連続した、実質的に連続した、または連続しない細胞シートを形成する。一部の態様において、本明細書に記載の尿細管の各層は、X軸、Y軸、およびZ軸に複数個の細胞を含む。

【0017】

本明細書で使用する「組織」とは細胞が凝集したものを意味する。

20

【0018】

本明細書で使用する「バイオインク」とは、バイオプリンティングにおいて使用するための液体、半固体、または固体の組成物を意味する。一部の態様において、バイオインクは、細胞溶液、細胞凝集物、細胞を含むゲル、多細胞体、または組織を含む。一部の態様において、バイオインクは、バイオプリンティングを可能にする特定の生化学的特性を提供する非細胞材料をさらに含む。一部の態様において、バイオインクは押出材料を含む。場合によっては、押出材料はバイオプリンティングプロセス後に取り除かれるように操作される。他の態様において、プリント後に、押出材料の少なくとも、ある部分は細胞と一緒に混入されたままであり、取り除かれない。間質バイオインクは、間質に由来する少なくとも1種類の細胞、例えば、線維芽細胞、間葉系細胞、または間質特徴をもつように誘導された多能性細胞を含む。上皮バイオインクは、近位尿細管細胞を含む少なくとも1種類の上皮細胞タイプを含む。

30

【0019】

本明細書で使用する「バイオプリンティング」とは、自動または半自動のコンピュータ支援三次元プロトタイピング装置(例えば、バイオプリンター)と適合する方法を介した、細胞(例えば、細胞溶液、細胞含有ゲル、細胞懸濁液、細胞濃縮物、多細胞凝集物、多細胞体など)の三次元の正確な付着を利用することを意味する。適切なバイオプリンターには、Organovo, Inc. (San Diego, CA)のNovogen Bioprinter(登録商標)が含まれる。

【0020】

本明細書で使用する「スキャフォールド」とは、合成スキャフォールド、例えば、ポリマースキャフォールドおよび多孔性ヒドロゲル、非合成スキャフォールド、例えば、前もって形成された細胞外マトリックス層、死細胞層、および脱細胞化組織、ならびに人工の組織の物理構造に不可欠であり、かつ組織を損傷/破壊することなく組織から除去することができない他の任意のタイプの前もって形成されたスキャフォールドを指す。さらなる態様において、脱細胞化組織スキャフォールドには、脱細胞化天然組織、または任意の手法で培養細胞によって生成された脱細胞化細胞材料、例えば、生きている間に細胞層が產生したECMを残しながら、死滅させた、または脱細胞化した細胞層が含まれる。従って、「スキャフォールドレス(scaffoldless)」という用語は、前もって形成されたスキャフォールドが、使用時に、除去されているか、または人工の組織の不活性成分として残っているので、人工の組織の不可欠な部分ではないことを意味することが意図される。「スキャ

40

50

「フォールドレス」は「スキヤフォールドフリー」および「前もって形成されたスキヤフォールドを伴わない」と同義に用いられる。

【0021】

本明細書で使用する「対象」とは、ヒト、靈長類、類人猿、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウマなどを含むが、これに限定されない任意の哺乳動物種の生物である。対象は、生きている任意の哺乳動物種でもよく、死んでいる任意の哺乳動物種でもよい。対象には、最近死んだ対象、または生きている対象から採取した生検試料が含まれる。

【0022】

本明細書で使用する「治療用物質」とは、疾患を治療するために認可されたか、疾患を治療するために研究されているか、または生物学的応答、例えば、DNA、RNA、ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質の変化を誘発する、任意の分子、生物製剤、化合物、または組成物を意味する。

10

【0023】

本明細書で使用する「生存率」とは、少なくとも1回の生存率試験によって確かめられた時に、バイオインクまたは組織層の中にある細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、またはそれより多くが生きていることを意味する。生存率試験は当技術分野において公知であり、生体染色色素(vital dye)、アポトーシスマーカーの染色、TUNEL染色、DNA断片化分析、AlamarBlue染色、機能測定などを含むが、これに限定されない。

20

【0024】

尿細管モデルの組成

一部の態様において、組織内の細胞は、尿細管間質組織界面の層構造を再現するように空間的に組織化される。極性化した尿細管上皮は、内皮細胞をベースとする微小血管網を含む腎臓間質組織の層の上に存在する。任意で、EPO産生細胞などの専門化した細胞が管周囲空間内に含まれる。一部の態様において、上皮は刷子縁を有するか、または発生する。

20

【0025】

特定の非限定的な態様において、本明細書に記載の人工の腎臓組織は、2つの主要な部分:1)成人腎臓線維芽細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)で構成される間質層と、2)正常ヒト腎臓近位尿細管上皮細胞(RPTEC)、メイディン・ダービー・イヌ腎臓細胞(MDCK)、ラット初代RPTEC細胞、および/または不死化RPTEC細胞のいずれかで構成される極性化した上皮単層を含み、不死化は、任意で、hTERT不死化RPTEC細胞を形成するようにhTERTを遺伝子操作することによって成し遂げられる。前記細胞は、上皮層が間質層の頂端側にあるようにNovogen MMX Bioprinterを用いて付着される(図1を参照されたい)。時間が経つにつれて分解する温度応答性ヒドロゲル(Novogel(登録商標)2.0)と混合した細胞の空間的に制御された付着と、圧縮ガス推進(インクジェットスプレー)によるエアロゾル化細胞材料の付着を組み合わせることによって、構造が作り出される。

30

【0026】

図1を見ると、特定の態様では、人工の三次元尿細管モデルは間質層および上皮層を含む。この態様では、2つの層は一緒にになって腎臓遠位尿細管の壁をモデル化する。この構成は、インビオ組織をモデル化し、天然の組織応答を予測するのに重大な意味をもつ。上皮層の応答は薬物、化学物質、または生物学的薬剤に対する天然の組織応答を予測し、毒性または効力に関する情報を提供する可能性がある。間質層は、上皮が正しく機能するのに重大な意味をもち、天然の組織線維症、特に、腎臓尿細管間質線維症のモデルとして役立つ。

40

【0027】

図2Aを見ると、特定の態様では、連続付着法を用いて間質層がバイオプリントされる。この態様では、間質シートがバイオプリントされた後に、3つの面がある容器を形成するように間質の縁端部(border)がバイオプリントされる。次いで、再度、連続付着法を用い

50

て、間質容器の中に上皮層がバイオプリントされる。この態様は、間質層と上皮層との間の必要な接触を提供する。図2Bは、組織が合体して48時間後に示された実際のバイオプリント尿細管モデルを図示する。一部の態様において、組織は4時間以内、6時間以内、8時間以内、12時間以内、または24時間以内に合体する。

【0028】

図6Aおよび6Bを見ると、特定の態様では、連続付着法を用いて間質層がバイオプリントされる。この態様では、インクジェット付着法を用いて上皮層が間質層上にバイオプリントされる。実質的に連続した上皮層はインビオ組織と一致しており、生理学的な関連性のある構造を複製するのに欠くことができない。インクジェット付着法によって、1つまたは複数の薄い上皮細胞層を、間質層の潜在的に不規則な表面に付着させる能力が得られる。このような態様において、上皮層のインクジェット付着は、任意で、間質層をバイオプリントした直後に、または間質層が成熟した後に行われる。

10

【0029】

一部の態様において、前記細胞はバイオプリントされる。さらなる態様において、バイオプリントされた細胞は密着されて、人工の尿細管モデルを形成する。なおさらなる態様において、人工の尿細管モデルは、製作時または使用時に、前もって形成されたスキャフォールドを伴わないか、または実質的に伴わない。場合によっては、バイオプリントイングを用いると、天然組織の適切な細胞充実性を模倣する組織を製作することが可能になる。

20

【0030】

一部の態様において、本明細書に記載の人工の三次元尿細管モデルは、三次元である、前もって形成されたスキャフォールドを伴わない、細胞から本質的になる、および/または細胞密度が高い(例えば、細胞が30%超、細胞が40%超、細胞が50%超、細胞が60%超、細胞が70%超、細胞が80%超、細胞が90%超、もしくは細胞が95%超)という事実があるために、以前の技術によって製作された組織とは区別される。

【0031】

一部の態様において、本明細書に記載の人工の三次元尿細管モデルは、神経支配されていない(例えば、神経組織を実質的に伴わない)、成熟した脈管構造を実質的に伴わない、および/または血液成分を実質的に伴わないという事実があるために、天然(例えば、操作されていない)組織と区別される。例えば、様々な態様において、人工の三次元尿細管モデルは、血漿、赤血球、血小板など、および/または内因的に生じた血漿、赤血球、血小板などを伴わない。ある特定の態様において、人工の尿細管モデルには、免疫細胞、例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、好塩基球、マスト細胞、または好酸球を伴わない。一部の態様において、前記モデルは、天然の腎臓近位尿細管のように管の形をしておらず、平ら、またはシート状である。これにより、都合良く、インピトロアッセイおよび分析をすることが可能になる。一部の態様において、線維芽細胞は腎臓由来でない。

30

一部の態様において、内皮細胞は腎臓由来でない。一部の態様において、上皮細胞はヒト由来でない。ある特定の態様において、人工の尿細管モデルは未分化細胞を伴わない。ある特定の態様において、人工の尿細管モデルは未分化腎臓細胞を伴わない。一部の態様において、本明細書に記載の人工の三次元尿細管モデルは平らであるか、または実質的に平らである点で天然尿細管組織と区別される。ある特定の態様において、本明細書に記載の人工の三次元尿細管モデルは天然尿細管組織より優れた機能的改善を有する。一例は、培養が長期間続いた後に、培養状態で少なくとも7日間、10日間、または27日間たつまで生存率が高いことである。一部の態様において、尿細管モデルにおいて用いられる細胞は形質転換されているか、または不死化されている。一部の態様において、尿細管モデルにおいて用いられる細胞はトランスジェニックであり、EGFP、GFP、RFP、YFP、またはCFPのような蛍光タンパク質とのタンパク質融合を含有する。一部の態様において、尿細管モデルにおいて用いられる細胞はトランスジェニックであり、EGFP、GFP、RFP、YFP、GFPのような蛍光タンパク質、またはホタルルシフェラーゼもしくはウミシイタケ(*renilla*)ルシフェラーゼのような発光タンパク質を用いたレポーター構築物を含有する。ある特定の態

40

50

様において、前記細胞はいずれも、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個の遺伝子、またはそれより多くの遺伝子の欠失または挿入を含有する。一部の態様において、3D尿細管モデルはキメラであり、少なくとも1つの細胞は、3D尿細管モデルの他の細胞とは異なる哺乳動物種に由来する。一部の態様において、3D尿細管モデルはキメラであり、少なくとも1つの細胞は、3D尿細管モデルの他の細胞とは異なるヒトドナーに由来する。

【0032】

細胞インプット

一部の態様において、本明細書に記載の人工の組織、アレイ、および方法は複数の細胞タイプを含む。一部の態様において、尿細管モデルは、哺乳動物線維芽細胞および哺乳動物内皮細胞を含む間質組織の層を含む。様々な態様において、適切な内皮細胞はヒト臍帯静脈(HUVEC)、ヒト初代、ヒト腎臓に由来するか、または人工多能性幹細胞(iPS)もしくはヒト胚性幹細胞(hES)の方向付けられた分化に由来する。一部の態様において、線維芽細胞は腎臓間質線維芽細胞である。様々な態様において、適切な腎臓間質線維芽細胞は、ヒト腎臓から単離された初代細胞に由来する。一部の態様において、線維芽細胞は起源が真皮または血管である。一部の態様において、細胞成分の1つまたは複数は非ヒト哺乳動物に由来する。一部の態様において、間質組織は腫瘍細胞または癌細胞を含む。一部の態様において、間質組織の層は実質的に単層である。一部の態様において、間質組織の層は、その表面積の95%を覆う単層を含む。一部の態様において、間質組織の層は、その表面積の90%を覆う単層を含む。一部の態様において、間質組織の層は、その表面積の80%を覆う単層を含む。一部の態様において、間質組織の層は1個の細胞より厚い。一部の態様において、間質組織の層は2個の細胞より厚い。一部の態様において、間質組織の層は3個の細胞より厚い。一部の態様において、間質組織の層は4個の細胞より厚い。一部の態様において、間質組織の層は10個の細胞より厚い。一部の態様において、間質組織の層は20個の細胞より厚い。一部の態様において、間質組織の層は50個の細胞より厚い。一部の態様において、間質組織の層は100個の細胞より厚い。一部の態様において、間質組織の層は200μm厚より厚い。一部の態様において、間質組織の層は300μm厚より厚い。一部の態様において、間質組織の層は400μm厚より厚い。一部の態様において、間質組織の層は500μm厚より厚い。一部の態様において、間質組織の層は1000μm厚より厚い。一部の態様において、間質組織の層は200μm厚未満である。一部の態様において、間質組織の層は300μm厚未満である。一部の態様において、間質組織の層は400μm厚未満である。一部の態様において、間質組織の層は500μm厚未満である。一部の態様において、間質組織の層は600μm厚未満である。一部の態様において、間質組織の層は1000μm厚未満である。

【0033】

一部の態様において、尿細管モデルは、哺乳動物上皮細胞を含む上皮組織の層を含む。さらなる態様において、上皮細胞は尿細管上皮細胞(例えば、近位尿細管上皮細胞)である。なおさらなる態様において、適切な尿細管上皮細胞は初代分離細胞であるか、または幹細胞の方向付けられた分化から得られた(人工多能性幹細胞(iPS)由来および/もしくはヒト胚性幹細胞(hES)由来)細胞である。一部の態様において、尿細管上皮細胞はメイディン・ダービー・イヌ腎臓(MDCK)細胞である。一部の態様において、尿細管上皮細胞は不死化ヒト細胞である。他の態様において、尿細管上皮細胞は、hTERT-RPTEC細胞、HK-2細胞、LC-PK1細胞、またはOK細胞などの不死化細胞である。一部の態様において、上皮細胞は、例えば、ラット、マウス、ブタ、または靈長類などの非ヒト哺乳動物に由来する。一部の態様において、上皮組織の層は尿細管上皮細胞から本質的になる。一部の態様において、

10

20

30

40

50

上皮組織の層は初代尿細管上皮細胞から本質的になる。一部の態様において、上皮組織の層は腎臓近位尿細管上皮細胞から本質的になる。一部の態様において、上皮組織の層は初代腎臓近位尿細管上皮細胞から本質的になる。一部の態様において、上皮組織の層は実質的に単層である。一部の態様において、上皮組織の層は腫瘍細胞を含む。一部の態様において、上皮組織の層は腫瘍細胞を含む。一部の態様において、上皮組織の層は、その表面積の95%を覆う単層を含む。一部の態様において、上皮組織の層は、その表面積の90%を覆う単層を含む。一部の態様において、上皮組織の層は、その表面積の80%を覆う単層を含む。一部の態様において、上皮組織の層は1個の細胞より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は2個の細胞より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は3個の細胞より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は4個の細胞より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は5個の細胞より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は10個の細胞より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は20個の細胞より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は50個の細胞より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は100個の細胞より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は20 μm 厚より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は30 μm 厚より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は40 μm 厚より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は50 μm 厚より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は100 μm 厚より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は200 μm 厚より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は500 μm 厚より厚い。一部の態様において、間質組織の層は600 μm 厚より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は1000 μm 厚より厚い。一部の態様において、上皮組織の層は1000 μm 厚未満である。一部の態様において、間質組織の層は600 μm 厚未満である。一部の態様において、上皮組織の層は500 μm 厚未満である。一部の態様において、上皮組織の層は200 μm 厚未満である。一部の態様において、上皮組織の層は100 μm 厚未満である。一部の態様において、上皮組織の層は50 μm 厚未満である。一部の態様において、上皮組織の層は40 μm 厚未満である。一部の態様において、上皮組織の層は30 μm 厚未満である。一部の態様において、上皮組織の層は20 μm 厚未満である。

【0034】

任意で、尿細管モデルは他の細胞タイプ(例えば、EPO産生細胞、免疫細胞など)を含む。一部の態様において、免疫細胞はT細胞である。一部の態様において、免疫細胞はB細胞である。一部の態様において、免疫細胞はNK細胞である。一部の態様において、免疫細胞は樹状細胞である。一部の態様において、免疫細胞はマクロファージ細胞である。

【0035】

広範囲の細胞比が適している。一部の態様において、上皮層は近位尿細管上皮細胞を含むか、近位尿細管上皮細胞からなるか、または近位尿細管上皮細胞から本質的になる。一部の態様において、間質層は、特定の比の線維芽細胞および内皮細胞を含むか、特定の比の線維芽細胞および内皮細胞からなるか、または特定の比の線維芽細胞および内皮細胞から本質的になる。適切な割合の線維芽細胞は、非限定的な例として、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、および95%の線維芽細胞を含み、その中の增加分を含む。適切な割合の内皮細胞は、非限定的な例として、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、および95%の内皮細胞を含み、その中の增加分を含む。ある特定の態様において、間質層は、指定された線維芽細胞:内皮細胞比を含むか、指定された線維芽細胞:内皮細胞比から本質的になるか、または指定された線維芽細胞:内皮細胞比からなる。ある特定の態様において、線維芽細胞:内皮細胞比は、少なくとも5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:65、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、または95:5であり、その中の增加分を含む。ある特定の態様において、線維芽細胞:内皮細胞比は、わずか5:95、10:90、15:85、20:80、25:75、30:70、35:65、40:60、45:65、50:50、55:45、60:40、65:35、70:30、75:25、80:20、85:15、90:10、または95:5であり、その中の增加分を含む。ある特定の態様において、線維芽細胞:内皮細胞比は約50:50である。ある特定の

10

20

30

40

50

態様において、線維芽細胞:内皮細胞比は約60:40～約40:60である。

【0036】

広範囲の細胞濃度がバイオインクに適している。バイオインクは、非限定的な例として、バイオインク1ミリリットルあたり、約100万個、200万個、300万個、400万個、500万個、600万個、700万個、800万個、900万個、1000万個、2000万個、3000万個、4000万個、5000万個、6000万個、7000万個、8000万個、9000万個、1億個、1億1000万個、1億2000個、1億3000万個、1億4000万個、1億5000万個、1億6000万個、1億7000万個、1億8000万個、1億9000万個、2億個、2億2500万個、2億5000万個、2億7500万個、3億個、またはそれより多い細胞を含む細胞濃度を用いて、連続付着バイオプリンティング法のために適切に調製される。特定の態様において、連続付着バイオプリンティングのために調製されたバイオインクは約100万～2億個の細胞/mLを含む。バイオインクは、非限定的な例として、バイオインク1ミリリットルあたり、約25万個、50万個、100万個、200万個、300万個、500万個、1000万個、1500万個、またはそれより多い細胞を含む細胞濃度を用いて、インクジェット付着バイオプリンティング法のために適切に調製される。特定の態様において、インクジェット付着バイオプリンティングのために調製されたバイオインクは約100万個～500万個の細胞/mLを含む。特定の態様において、インクジェット付着バイオプリンティングのために調製されたバイオインクは約100万～400万個の細胞/mLを含む。特定の態様において、インクジェット付着バイオインクは約100万～300万個の細胞/mLを含む。特定の態様において、インクジェット付着バイオプリンティングのために調製されたバイオインクは約100万～200万個の細胞/mLを含む。

10

20

30

40

【0037】

ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり5000万～10億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり5000万～9億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり5000万～8億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり5000万～7億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり5000万～6億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり5000万～5億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり5000万～4億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり5000万～3億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり5000万～2億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり7500万～6億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり1億～6億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり1億～5億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり1億～4億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり1億～3億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり1億～2億個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは1ミリリットルあたり1億～1億5000万個の細胞を含む。

【0038】

ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり25万～500万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり25万～400万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり25万～300万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり25万～200万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり25万～100万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり50万～5百万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり50万～400万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり50万～3

50

00万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり50万～200万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり50万～100万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり100万～5百万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり100万個～400万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり100万個～300万個の細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは1ミリリットルあたり100万個～200万個の細胞を含む。

【0039】

ある特定の態様において、上皮バイオインクの密度は間質バイオインクの密度より小さい。ある特定の態様において、間質バイオインクの密度と上皮バイオインクの密度の比は、約300:1; 約275:1; 約250:1; 約225:1; 約200:1; 約175:1; 約150:1; 約125:1; 約100:1、約75:1、または約50:1である。ある特定の態様において、間質バイオインクの密度と上皮バイオインクの密度の比は約300:1～約50:1である。ある特定の態様において、間質バイオインクの密度と上皮バイオインクの密度の比は約250:1～約75:1である。ある特定の態様において、間質バイオインクの密度と上皮バイオインクの密度の比は約200:1～約75:1である。ある特定の態様において、間質バイオインクの密度と上皮バイオインクの密度の比は約150:1～約75:1である。ある特定の態様において、間質バイオインクの密度と上皮バイオインクの密度の比は約125:1～約75:1である。

【0040】

ある特定の態様において、バイオインクは粘性液体である。ある特定の態様において、バイオインクは半固体である。ある特定の態様において、バイオインクは固体である。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は100センチポアズより大きい。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は200センチポアズより大きい。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は500センチポアズより大きい。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は1,000センチポアズより大きい。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は2,000センチポアズより大きい。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は5,000センチポアズより大きい。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は10,000センチポアズより大きい。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は20,000センチポアズより大きい。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は50,000センチポアズより大きい。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は100,000センチポアズより大きい。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は100センチポアズ未満である。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は200センチポアズ未満である。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は500センチポアズ未満である。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は1,000センチポアズ未満である。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は2,000センチポアズ未満である。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は5,000センチポアズ未満である。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は10,000センチポアズ未満である。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は20,000センチポアズ未満である。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は50,000センチポアズ未満である。ある特定の態様において、バイオインクの粘度は100,000センチポアズ未満である。

【0041】

一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は少なくとも50μmである。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は少なくとも100μmである。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は少なくとも200μmである。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は少なくとも300μmである。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は少なくとも400μmである。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は少なくとも500μmである。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は少なくとも600μmである。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は少なくとも700μmである。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は少なくとも800μmである。一部の態

10

20

30

40

50

様において、尿細管モデルの厚さの平均は少なくとも900 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は少なくとも1000 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は50 μm ~1000 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は75 μm ~1000 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は100 μm ~1000 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は200 μm ~1000 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は500 μm ~1000 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は50 μm ~500 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は50 μm ~300 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は50 μm ~200 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は50 μm ~150 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は50 μm ~125 μm である。一部の態様において、尿細管モデルの厚さの平均は75 μm ~100 μm である。

10

【0042】

一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.01 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.02 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.03 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.04 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.05 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.06 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.07 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.08 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.09 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.10 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.11 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は少なくとも0.12 cm^2 である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は0.5 cm^2 未満である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は0.4 cm^2 未満である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は0.3 cm^2 未満である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は0.2 cm^2 未満である。一部の態様において、尿細管モデルの表面積は0.1 cm^2 未満である。

20

【0043】

尿細管モデルの構造特徴

本開示の尿細管モデルは数多くの構成で構造的に配置することができる。ある特定の態様において、上皮組織層および間質組織層は、直接接觸している別々の構造的に異なる層であるか、または1 μm 、2 μm 、3 μm 、4 μm 、5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 、9 μm 、10 μm 、15 μm 、20 μm 分だけ、もしくはそれより長く、この中の増加分を含めて分離されている別々の構造的に異なる層である。ある特定の態様において、この分離は、2つの層の間に細胞外マトリックスが分泌および付着したことによるものであり、本開示の目的では接觸しているとみなされる。正常な生理学的組織では、細胞および細胞層は頂端(内腔に面する)面と、他の細胞または組織マトリックスに面する側底面を有するように極性化している。本明細書において開示された尿細管モデルの目的では、側底面とは、別の細胞、細胞外マトリックス、または生体適合膜もしくは培養容器の表面に面している面を指す。本明細書において開示された尿細管モデルの目的では、頂端面とは、生体適合膜もしくは培養容器の表面から離れた所に面している面を指す。ある特定の態様において、間質組織層の側底面は、生体適合膜もしくは培養容器に取り付けられた面であり、間質組織層の頂端面は、生体適合膜にも培養容器にも取り付けられていない面である。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の頂端面に付着されるか、または間質組織層の頂端面に層を形成し、従って、2つの構造的に異なる層が形成される。ある特定の態様において、上皮組織層および間質組織層は途切れることなく接觸している。ある特定の態様において、上皮組織層の少なくとも99%は間質組織層と途切れることなく接觸している。ある特定の態様において、上皮組織層の少なくとも95%は間質組織層と途切れることなく接觸している。ある特定の態様において、上皮組織層の少なくとも90%は間質組織層と途切れることなく接觸している。ある特定の態様において、上皮組織層の少なくとも80%は間質組織層と途切

30

40

50

れることなく接触している。ある特定の態様において、上皮組織層の少なくとも70%は間質組織層と途切れることなく接触している。ある特定の態様において、上皮組織層の少なくとも60%は間質組織層と途切れることなく接触している。ある特定の態様において、上皮組織層の少なくとも50%は間質組織層と途切れることなく接触している。ある特定の態様において、上皮組織層の99%未満は間質組織層と途切れることなく接触している。ある特定の態様において、上皮組織層の98%未満は間質組織層と途切れることなく接触している。ある特定の態様において、上皮組織層の97%未満は間質組織層と途切れることなく接觸している。ある特定の態様において、上皮組織層の95%未満は間質組織層と途切れることなく接觸している。ある特定の態様において、上皮組織層の90%未満は間質組織層と途切れることなく接觸している。ある特定の態様において、上皮組織層の80%未満は間質組織層と途切れることなく接觸している。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の頂端面を完全に覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の頂端面の少なくとも99%を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の頂端面の少なくとも95%を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の頂端面の少なくとも90%を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の頂端面の少なくとも80%を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の頂端面の少なくとも70%を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の頂端面の少なくとも60%を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の頂端面の少なくとも50%を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の99%未満を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の98%未満を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の97%未満を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の90%未満を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の80%未満を覆う。ある特定の態様において、上皮組織層は間質組織層の頂端面の70%未満を覆う。

【0044】

上皮組織層の構造

通常、上皮組織細胞は、隣接する細胞と密着結合を形成する。密着結合は、膜貫通タンパク質ファミリーであるカドヘリンを特徴とする。これらの1つであるE-カドヘリンは腎臓組織にある密着結合において特に顕著であり、密着結合の形成を特徴とする。ある特定の態様において、上皮組織層は、密着結合を形成する細胞からなる。ある特定の態様において、上皮組織層にある実質的に全ての細胞が、少なくとも1つの隣接する細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、上皮組織層にある細胞の少なくとも99%が、少なくとも1つの他の細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、上皮組織層にある細胞の少なくとも95%が、少なくとも1つの他の細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、上皮組織層にある細胞の少なくとも90%が、少なくとも1つの他の細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、上皮組織層にある細胞の少なくとも80%が、少なくとも1つの他の細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、上皮組織層にある細胞の少なくとも70%が、少なくとも1つの他の細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、上皮組織層にある細胞の少なくとも60%が、少なくとも1つの他の細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、上皮組織層にある細胞の少なくとも50%が、少なくとも1つの他の細胞と密着結合を形成する。

【0045】

細胞層の生存率および密度

本開示の方法によるバイオプリンティングの利点は高い密度および高い生存率で細胞をプリントできることである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は少なくとも 1×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は少なくとも 5×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は少なくとも 10×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は少なくとも 20×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は少なくとも 50×10^6 細胞/mLである。ある特定

10

20

30

40

50

の態様において、間質細胞層の密度は少なくとも 100×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は少なくとも 200×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は少なくとも 500×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は約 100×10^6 細胞/mL～約 900×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は約 100×10^6 細胞/mL～約 700×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は約 100×10^6 細胞/mL～約 600×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は約 100×10^6 細胞/mL～約 500×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は約 100×10^6 細胞/mL～約 300×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質細胞層の密度は約 100×10^6 細胞/mL～約 200×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、間質組織層の生存率は99体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、間質組織層の生存率は95体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、間質組織層の生存率は90体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、間質組織層の生存率は80体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、間質組織層の生存率は60体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、間質組織層の生存率は50体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、この生存率は、プリンティング後、少なくとも8時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、またはそれより長く維持される。ある特定の態様において、この生存率は、プリンティング後、少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、21日、またはそれより長く維持される。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は少なくとも 1×10^5 細胞/mLである。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は少なくとも 2×10^5 細胞/mLである。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は少なくとも 5×10^5 /mLである。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は少なくとも 1×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は少なくとも 5×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は少なくとも 10×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は少なくとも 20×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は少なくとも 50×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は少なくとも 100×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は少なくとも 200×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は少なくとも 500×10^6 細胞/mLである。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は 1×10^5 /mL未満である。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は 2×10^5 /mL未満である。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は 5×10^5 /mL未満である。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は 1×10^6 細胞/mL未満である。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は 5×10^6 細胞/mL未満である。ある特定の態様において、上皮細胞層の密度は 10×10^6 細胞/mL未満である。ある特定の態様において、上皮組織層の生存率は99体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、上皮組織層の生存率は95体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、上皮組織層の生存率は90体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、上皮組織層の生存率は80体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、上皮組織層の生存率は60体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、上皮組織層の生存率は50体積%生細胞より大きい。ある特定の態様において、この生存率は、プリンティング後、少なくとも8時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間にわたって維持される。ある特定の態様において、この生存率は、プリンティング後、少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日にわたって維持される。

【0046】

組織構造の均一性

本開示の方法を用いたバイオプリンティングの利点の1つは、対応する組織において反映される、このプロセスによって成し遂げられる高度の均一性である。ある特定の態様において、尿細管モデルの厚さは実質的に均一である。ある特定の態様において、尿細管モデルの99%超が、尿細管モデルの全平均厚さの10%プラスまたはマイナス以内である。あ

10

20

30

40

50

る特定の態様において、尿細管モデルの95%超が、尿細管モデルの全体平均厚さの10%プラスまたはマイナス以内である。ある特定の態様において、尿細管モデルの90%超が、尿細管モデルの全体平均厚さの10%プラスまたはマイナス以内である。ある特定の態様において、尿細管モデルの80%超が、尿細管モデルの全体平均厚さの10%プラスまたはマイナス以内である。ある特定の態様において、尿細管モデルの70%超が、尿細管モデルの全体平均厚さの10%プラスまたはマイナス以内である。ある特定の態様において、尿細管モデルの99%超が、尿細管モデルの全体平均厚さの20%プラスまたはマイナス以内である。ある特定の態様において、尿細管モデルの95%超が、尿細管モデルの全体平均厚さの20%プラスまたはマイナス以内である。ある特定の態様において、尿細管モデルの90%超が、尿細管モデルの全体平均厚さの20%プラスまたはマイナス以内である。ある特定の態様において、尿細管モデルの80%超が、尿細管モデルの全体平均厚さの20%プラスまたはマイナス以内である。ある特定の態様において、尿細管モデルの70%超が、尿細管モデルの全体平均厚さの20%プラスまたはマイナス以内である。

【0047】

バイオインクおよび細胞層の非細胞成分

多くの場合、バイオプリントされる細胞またはバイオインクは、バイオプリンティングに対する適性を改善する賦形剤または押出材料を含有する。押出材料の例には、ゲル、ヒドロゲル、ペプチドヒドロゲル、アミノ酸ベースのゲル、界面活性剤ポリオール(例えば、Pluronic F-127またはPF-127)、温度応答性ポリマー、ヒアルロン酸塩、アルギン酸塩、細胞外マトリックス成分(およびその誘導体)、コラーゲン、ゼラチン、他の生体適合性の天然ポリマーまたは合成ポリマー、ナノファイバー、ならびに自己組織化ナノファイバーが含まれるが、これに限定されない。一部の態様において、押出材料は合成ポリマーを含有する。一部の態様において、押出材料は、哺乳動物組織に通常、関連しない非合成ポリマーを含有する。一部の態様において、押出材料は、バイオプリンティング後に、物理的手段、化学的手段、または酵素的手段によって除去される。一部の態様において、本開示のバイオインクは1重量%超の押出材料を含有する。一部の態様において、本開示の尿細管モデルは1重量%超の押出材料を含有する。一部の態様において、本開示のバイオインクは5重量%未満の押出材料を含有する。一部の態様において、本開示のバイオインクは2重量%未満の押出材料を含有する。一部の態様において、本開示のバイオインクは1重量%未満の押出材料を含有する。一部の態様において、本開示の尿細管モデルは5重量%未満の押出材料を含有する。一部の態様において、本開示の尿細管モデルは2重量%未満の押出材料を含有する。一部の態様において、本開示の尿細管モデルは1重量%未満の押出材料を含有する。一部の態様において、上皮バイオインクはヒドロゲルを伴わない。一部の態様において、上皮バイオインクは押出材料を伴わない。一部の態様において、上皮バイオインクは、賦形剤または押出材料として用いられる合成ポリマーを伴わない。一部の態様において、尿細管モデルは、賦形剤または押出材料として用いられる合成ポリマーを伴わない。一部の態様において、上皮細胞層は、賦形剤または押出材料として用いられる合成ポリマーを伴わない。一部の態様において、間質細胞層は、賦形剤または押出材料として用いられる合成ポリマーを伴わない。

【0048】

プリント表面

生体適合面に取り付けられた尿細管モデルが本明細書において提供される。ある特定の態様において、間質組織層は生体適合面にプリントされる。ある特定の態様において、生体適合面は、孔径が $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 超の膜である。ある特定の態様において、生体適合面の孔径は約 $1\text{ }\mu\text{m}$ である。ある特定の態様において、生体適合面は、細胞付着または生存能力を改善する組成物でコーティングされる。ある特定の態様において、尿細管モジュールは6ウェルプレート、12ウェルプレート、24ウェルプレート、48ウェルプレート、96ウェルプレート、または384ウェルプレートの中にプリントされる。ある特定の態様において、尿細管モジュールは、直径が60mm、100mm、もしくは150mm、またはそれより大きい組織培養プレートの中にプリントされる。ある特定の態様において、尿細管モジュールは組織培養フラ

10

20

30

40

50

スコの中に、またはマイクロ流体チップ上にプリントされる。ある特定の態様において、尿細管モジュールはトランズウェルインサート(transwell insert)の中/上にプリントされる。

【0049】

尿細管モデルを作製するためのプロセス

本開示は、尿細管モデルを製作するための方法およびプロセスを助ける。ある特定の態様において、人工の三次元生体尿細管モデルの製品はバイオプリンティングのプロセスによって作製される。ある特定の態様において、人工の三次元生体尿細管モデルの製品の少なくとも1つの構成要素はバイオプリンティングのプロセスによって作製される。ある特定の態様において、人工の三次元生体尿細管モデルを製作するプロセスは、腎臓間質バイオインクを調製する工程であって、間質バイオインクが複数の間質細胞タイプを含み、間質細胞タイプが腎臓線維芽細胞および内皮細胞を含む、工程；腎臓上皮バイオインクを調製する工程であって、上皮バイオインクが尿細管上皮細胞を含む、工程；腎臓間質バイオインクの層の少なくとも1つの表面に腎臓上皮バイオインクが層を形成するように腎臓間質バイオインクおよび腎臓上皮バイオインクを付着させる工程；ならびに、細胞を密着させて、人工の三次元生体尿細管モデルを形成するように、付着されたバイオインクを細胞培養培地中で成熟させる工程を含む。ある特定の態様において、腎臓間質組織バイオインクは頂端面および側底面を有する腎臓間質組織の層を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは腎臓間質組織の層の頂端面と接触して付着される。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは尿細管上皮細胞から本質的になる。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは初代尿細管上皮細胞から本質的になる。ある特定の態様において、初代尿細管上皮細胞は、腎機能に影響を及ぼす疾患をもつ対象から単離されている。ある特定の態様において、初代尿細管上皮細胞は、多発性囊胞腎をもつ対象から単離されている。ある特定の態様において、初代尿細管上皮細胞は、II型糖尿病をもつ対象から単離されている。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは腎細胞癌細胞を含む。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは単層で付着される。ある特定の態様において、腎臓間質組織バイオインクは単層で付着される。ある特定の態様において、腎臓上皮組織の層は腎臓間質組織の層と途切れることなく接触して付着される。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは、腎臓間質組織の層の頂端面を50%以上覆う層を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは、腎臓間質組織の層の頂端面を70%以上覆う層を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは、腎臓間質組織の層の頂端面を90%以上覆う層を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮層の腎臓上皮細胞の少なくとも50%は他の腎臓上皮細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮層の腎臓上皮細胞の少なくとも70%は他の腎臓上皮細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、腎臓上皮層の腎臓上皮細胞の少なくとも90%は他の腎臓上皮細胞と密着結合を形成する。ある特定の態様において、尿細管モデルは50～500 μm厚である。ある特定の態様において、尿細管モデルは約100 μm厚である。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクは押出材料をさらに含む。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は約95:5～約5:95の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は約75:25～約25:75の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は約60:40～約40:60の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する。ある特定の態様において、線維芽細胞および内皮細胞は、約50:50の線維芽細胞:内皮細胞比で腎臓間質バイオインクに存在する。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは分泌細胞をさらに含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは免疫細胞をさらに含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは押出材料をさらに含む。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは糸球体細胞を含む。ある特定の態様において、前記モデルは、前もって形成されたスキャフォールドを実質的に伴わずに製作される。ある特定の態様において、腎臓線維芽細胞、内皮細胞、および尿細管上皮細胞は哺乳動物細胞である。ある特定の態様において、

10

20

30

40

50

て、腎臓間質バイオインクまたは腎臓上皮バイオインクのいずれかが、付着後に平らな層を形成する。ある特定の態様において、尿細管モデルは均一な厚さの尿細管モデルである。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは生体適合膜上に付着される。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは、孔径が $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 超の生体適合膜上に付着される。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは、孔径が約 $1\text{ }\mu\text{m}$ の生体適合膜上に付着される。ある特定の態様において、人工の三次元生体尿細管モデルはアレイを形成するように付着される。ある特定の態様において、人工の三次元生体尿細管モデルは、それぞれの尿細管モデルの間に約 $20\text{ }\mu\text{m}$ ～約 $100\text{ }\mu\text{m}$ のスペースをとるように構成されているアレイを形成するように付着される。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは少なくとも30体積%生細胞である。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは少なくとも70体積%生細胞である。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは少なくとも90体積%生細胞である。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクは押し出しバイオプリンティングによって付着される。ある特定の態様において、腎臓上皮バイオインクはインクジェットバイオプリンティングによって付着される。ある特定の態様において、腎臓間質バイオインクはインクジェットバイオプリンティングによって付着されない。ある特定の態様において、尿細管モデルのどの層もインビトロ培養で培養状態で3日後に生存可能である。ある特定の態様において、尿細管モデルのどの層もインビトロ培養で10日後に生存可能である。

10

【0050】

ある特定の態様において、本明細書において開示された3D尿細管モデルは付加的な製造プロセスによって作製される。本明細書における3D尿細管モデルのための付加的な製造プロセスは、インビトロ用途の3D尿細管モデルのカスタマイズされた製作を可能にする。このことは、ユーザーによって設定された設計によって組織が製作されるので重要な意味をもつ。ある特定の態様において、3D尿細管モデルは、ユーザーが設定した細胞しか含有しない。ある特定の態様において、3D尿細管モデルは、ユーザーが設定した細胞タイプしか含有しない。ある特定の態様において、3D尿細管モデルは、ユーザーが設定した数の細胞または濃度の細胞しか含有しない。ある特定の態様において、3D尿細管モデルは、製作前または制作中に、低分子、治療用分子、または治療用物質で処理された細胞を含有する。治療用分子または治療用物質は、疾患を治療するか、または生物学的応答を誘発することを目的とする任意の分子である。ある特定の態様において、3D尿細管モデルは、生体適合性プラスチックまたは組織培養プラスチック、生体適合性合成ポリマー、架橋性ゲル、可逆的に架橋したゲル、および他の非細胞構成要素を含有する。

20

【0051】

尿細管モデルの成熟

ある特定の態様において、本開示の尿細管モデルは、バイオプリンティング後に、ある一定の時間にわたって成熟される。ある特定の態様において、前記モデルは、使用前に少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間、25時間、26時間、27時間、28時間、29時間、30時間間、またはそれより長く成熟される。ある特定の態様において、前記モデルは、使用前に少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日間、またはそれより長く成熟される。一部の態様において、組織の出荷または移送は、一つの用途である。ある特定の態様において、本開示の尿細管モデルの間質層は、バイオプリンティング後に、上皮層が加えられる前に、ある一定の時間にわたって成熟される。ある特定の態様において、間質層は、使用前に少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間、25時間、26時間、27時間、28時間、29時間、30時間間、またはそれより長く成熟される。ある特定の態様において、間質層は、使用前に少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日間、またはそれより長く成熟される。一部の態様において、組織の出荷または移送は、一つの用途で

30

40

50

ある。一部の態様において、上皮層は、間質層のバイオプリンティング後、1時間以内、2時間以内、3時間以内、4時間以内、5時間以内、6時間以内、7時間以内、8時間以内、9時間以内、10時間以内、11時間以内、12時間以内、16時間以内、18時間以内、24時間以内に間質層上にバイオプリントされる。一部の態様において、組織の出荷または移送は、一つの用途である。一部の態様において、上皮層は、間質層のバイオプリンティング後、1日以内、2日以内、3日以内、4日以内、5日以内、6日以内、7日以内、8日以内、9日以内、10日以内、11日以内、12日以内、13日以内、14日以内、15日以内、16日以内、17日以内、18日以内、19日以内、20日以内、21日以内、22日以内、23日以内、24日以内、25日以内、26日以内、27日以内、28日以内、29日以内、30日以内に間質層上にバイオプリントされる。

【0052】

10

インビトロアッセイ

一部の態様において、本明細書において開示された尿細管およびアレイはインビトロアッセイにおいて使用するためのものである。一部の態様において、「アッセイ」とは、有機試料または生物試料(例えば、細胞凝集物、組織、臓器、生物など)の中の物質(例えば、化学物質、分子、生化学物質、薬物など)の存在または活性を試験または測定するための手順である。さらなる態様において、アッセイには定性アッセイおよび定量アッセイが含まれる。なおさらなる態様において、定量アッセイは、試料中の物質、例えば、化学物質または生体分子の量を測定する。

【0053】

20

様々な態様において、尿細管およびアレイは、非限定的な例として、画像をベースとするアッセイ、分泌タンパク質の測定、マーカーの発現、およびタンパク質またはmRNAの産生において使用するためのものである。様々なさらなる態様において、尿細管およびアレイは、以下:分子結合(放射性リガンド結合を含む)、分子取り込み、活性(例えば、酵素活性および受容体活性など)、遺伝子発現、タンパク質発現、タンパク質修飾(非限定的な例には、リン酸化、ユビキチン結合、アセチル化、グリコシル化、脂質修飾(lipidation)などが含まれる)、受容体アゴニズム、受容体アンタゴニズム、細胞シグナル伝達、アポトーシス、化学受容性、トランスフェクション、細胞遊走、走化性、細胞生存能力、細胞増殖、安全性、効力、代謝、毒性、感染性、ならびに乱用傾向の1つまたは複数を検出または測定するアッセイにおいて使用するためのものである。様々な態様において、尿細管は毒物学試験、製剤試験、または毒性試験のためのものである。

30

【0054】

一部の態様において、尿細管およびアレイはイムノアッセイにおいて使用するためのものである。イムノアッセイには、例えば、フローサイトメトリー、ハイスループット画像分析またはロースループット画像分析、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫測定法(ELISA)、ウエスタンプロット、ホモジニアスアッセイ(homogenous assay)、例えば、AlphaLISA(商標)、および時間分解蛍光または蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)に頼る関連技術が含まれる。さらなる態様において、イムノアッセイは競合イムノアッセイまたは非競合イムノアッセイである。競合イムノアッセイでは、例えば、試料中の抗原が、抗体と結合する標識抗原と競合し、次いで、抗体部位に結合した標識抗原の量が測定される。非競合イムノアッセイ(「サンドイッチアッセイ」とも呼ばれる)では、例えば、試料中の抗原が抗体部位に結合し、その後に、標識抗体が抗原に結合し、次いで、その部位にある標識抗体の量が測定される。

40

【0055】

一部の態様において、尿細管およびアレイはELISAにおいて使用するためのものである。さらなる態様において、ELISAは、試料における抗体または抗原の存在を検出するのに用いられる生化学的技法である。ELISAでは、例えば、特定の抗原に対する特異性をもつ少なくとも1種類の抗体が利用される。さらなる例として、未知量の抗原を含む試料は、非特異的に(表面への吸着を介して)、または特異的に(「サンドイッチ」ELISAでは、同じ抗原に特異的な別の抗体による捕捉を介して)、固体支持体(例えば、ポリスチレンマイクロタイタープレート)上に固定化される。なおさらなる例として、抗原が固定化された後

50

に、検出抗体は添加されて、抗原と複合体を形成する。検出用抗体は、例えば、酵素に共有結合的に連結されているか、または生体共役反応(bioconjugation)によって酵素に連結された二次抗体によって、そのものが検出される。

【0056】

例えば、一部の態様において、薬物スクリーニングまたは創薬のために細胞、多細胞凝集物、または組織のアレイ、マイクロアレイ、またはチップが用いられる。さらなる態様において、薬物スクリーニング用または創薬用のキットの一部として組織のアレイ、マイクロアレイ、またはチップが用いられる。一部の態様において、それぞれの尿細管は生体適合性マルチウェル容器のウェル内に存在し、この容器は1つまたは複数の自動薬物スクリーニング手順および/または装置と適合する。さらなる態様において、自動薬物スクリーニング手順および/または装置は、コンピュータまたはロボットの支援を受けた任意の適切な手順または装置を含む。

10

【0057】

さらなる態様において、任意の治療分野において潜在的に有用な薬物を研究または開発するために薬物スクリーニングアッセイ用または創薬アッセイ用のアレイが用いられる。なおさらなる態様において、適切な治療分野には、非限定的な例として、感染症、血液学、腫瘍学、小児科学、心臓病学、中枢神経系疾患、神経学、胃腸病学、肝臓学、泌尿器科学、不妊、眼科学、腎臓病学、整形外科学、疼痛管理、精神医学、肺学、ワクチン、創傷治癒、生理学、薬理学、皮膚科学、遺伝子療法、毒物学、毒性、および免疫学が含まれる。

20

【0058】

一部の態様において、前記尿細管およびアレイは細胞ベースのスクリーニングにおいて使用するためのものである。さらなる態様において、細胞ベースのスクリーニングは、1種類または複数種の感染症、例えば、ウイルス感染症、真菌感染症、細菌感染症、または寄生生物感染症を対象としている。さらなる態様において、細胞ベースのスクリーニングは、腎細胞癌、傍糸球体細胞腫瘍(レニノーマ)、血管筋脂肪腫、腎オノコサイトーマ、ベリーニ管癌、腎臓明細胞肉腫、中胚葉腎腫、ウィルムス腫瘍、混合型上皮間質腫瘍(mixed epithelial stromal tumor)、および腎孟の移行上皮癌を含む腎臓癌を対象としている。さらなる態様において、細胞ベースのスクリーニングは、糸球体腎炎、間質性腎炎または尿細管間質性腎炎、腎孟腎炎、ループス腎炎、およびスポーツ性腎炎(athletic nephritis)を含む腎炎を対象としている。さらなる態様において、細胞ベースのスクリーニングは高血圧を対象としている。さらなる態様において、細胞ベースのスクリーニングは糖尿病、I型、II型、およびMODYを対象としている。さらなる態様において、細胞ベースのスクリーニングは、IgA腎症、鎮痛薬腎症、または腫瘍腎症(onconeophropathy)を含む腎症を対象としている。一部の態様において、細胞ベースのスクリーニングは多発性囊胞腎またはキサンチンオキシダーゼ欠損症を対象としている。他の態様において、尿細管およびアレイは、癌の開始、進行、または転移の研究において使用するためのものである。なおさらなる態様において、尿細管およびアレイは、他の細胞タイプ、例えば、癌細胞、病原体を有する細胞、病原性細胞、免疫細胞、血液由来細胞、または幹細胞/前駆細胞の相互作用の研究において使用するためのものである。

30

【0059】

一部の態様において、前記構築物またはそのアレイは、抗体、哺乳動物細胞、細菌、生物学的に活性なタンパク質、ホルモンなどを含む生物製剤の性能の評価において使用するためのものである。他の態様において、前記尿細管またはそのアレイは、前記構築物を含む哺乳動物尿細管と、病原体を有する細胞、生きている病原性細胞、癌細胞、免疫細胞、血球、幹細胞/前駆細胞、または遺伝操作された細胞を含むが、これに限定されない1種類または複数種のさらなる細胞タイプとの間での細胞間相互作用および細胞-組織相互作用の研究において有用である。

40

【0060】

一部の態様において、前記アレイは尿細管と、さらなる組織構築物を含む。さらなる態

50

様において、尿細管構築物は、1つまたは複数の面で、さらなる組織構築物と直接接觸している。なおさらなる態様において、尿細管は、流体経路または共通の流体リザーバーを介して1つまたは複数のさらなる組織構築物または細胞に接続される。なおさらなる態様において、人工の尿細管構築物と接觸する液体培地は、哺乳動物生細胞、例えば、免疫細胞、血液由来細胞、または腫瘍由来細胞を含有する。他の態様において、尿細管と接觸する液体培地は、細菌、菌類、ウイルス、寄生生物、または他の病原体を含有する。

【0061】

本明細書における開示はビジネス方法を含む。一部の態様において、移植するための、またはインビトロアッセイなどの研究・開発用の細胞ベースツールの作製において使用するための尿細管および/または臓器を作製するための産業用施設および/または商業用施設を設計、建設、および運転するために、本明細書において開示された技法および方法のスピードおよび拡張性が利用される。さらなる態様において、前記尿細管および/または臓器ならびにそのアレイは、例えば、細胞アレイ(例えば、マイクロアレイまたはチップ)、組織アレイ(例えば、マイクロアレイまたはチップ)、ならびに生物学的アッセイ用およびハイスループット薬物スクリーニング用のキットとして生産、保管、配布、市販、宣伝、および販売される。他の態様において、人工の尿細管および/または臓器ならびにそのアレイは、生物学的アッセイおよび/または薬物スクリーニングをサービスとして行うために生産および利用される。

10

【0062】

検証

20

理想的な人工の腎臓組織は完全にヒトであり、かつ尿細管上皮細胞、腎臓間質線維芽細胞、および内皮細胞を含む多細胞である。さらに、理想的な人工の腎臓組織は、CYP1A2、CYP2C9、およびCYP3A4活性、アルブミン輸送、ならびにビタミンDヒドロキシル化、-グルタミル-トランスフェラーゼ活性を含むが、これに限定されない特定の機能を示す。さらに、理想的な人工の腎臓組織は密着結合、カドヘリン、輸送体の極性、およびCD31発現でも特徴付けられ、アルブミン輸送、CYP450活性、組織学、および生存能力を含む特定のアッセイによって検証される。一部の態様において、本開示の尿細管モデルは、1日より長く、2日より長く、3日より長く、4日より長く、5日より長く、6日より長く、7日より長く、8日より長く、9日より長く、10日より長く、またはそれより長く培養状態で維持されている2D共培養または組織外植片と比較して増加した特定の機能を示す。一部の態様において、本開示の尿細管モデルは、1日より長く、2日より長く、3日より長く、4日より長く、5日より長く、6日より長く、7日より長く、8日より長く、9日より長く、10日より長く、またはそれより長く培養状態で維持されている2D共培養または組織外植片と比較して2倍増加した特定の機能を示す。一部の態様において、本開示の尿細管モデルは、1日より長く、2日より長く、3日より長く、4日より長く、5日より長く、6日より長く、7日より長く、8日より長く、9日より長く、10日より長く、またはそれより長く培養状態で維持されている2D共培養または組織外植片と比較して5倍以上増加した特定の機能を示す。一部の態様において、本開示の尿細管モデルは、21日より長く、またはそれより長く培養状態で維持されている2D共培養または組織外植片と比較して2倍以上増加した特定の機能を示す。一部の態様において、本開示の尿細管モデルは、27日より長く、またはそれより長く培養状態で維持されている2D共培養または組織外植片と比較して5倍以上増加した特定の機能を示す。一部の態様において、本開示の尿細管モデルは、27日より長く、またはそれより長く培養状態で維持されている2D共培養または組織外植片と比較して2倍以上増加した特定の機能を示す。一部の態様において、本開示の尿細管モデルは、21日より長く、またはそれより長く培養状態で維持されている2D共培養または組織外植片と比較して5倍以上増加した特定の機能を示す。ある特定の態様において、特定の機能は -グルタミル-トランスフェラーゼ活性である。ある特定の態様において、特定の機能はビタミンDヒドロキシル化である。

30

【0063】

一部の態様において、本明細書に記載の人工の組織は、以下：

40

50

尿細管上皮細胞の極性化/細胞内密着結合(E-Cad、ZO-1、およびクローディン)の形成、ならびに輸送体(頂端:OAT4、URAT1)およびインテグリン(側底)の正しい細胞内局在化
尿細管細胞層と、その下にある間質との間での基底膜の発達

組織様尿細管細胞の発達を含む広範囲にわたる間質内微小血管網:微小血管空間関係の確立

尿細管上皮輸送体(キュビリン、メガリン、アクアポリン)、OAT、URAT)、血管マーカー(CD31、vWF)を含む区画(compartment)特異的マーカーの発現、EPOタンパク質産生の証明(該当する場合)

25-(OH)1ヒドロキシラーゼ(10Hアーゼ)を介したビタミンD合成

アンジオテンシンIIの産生

10

キュビリンを介した尿細管内腔からのアルブミン能動輸送

側底面からのシメチジン輸送/蓄積

代謝に関与するCYP450発現およびUGT発現(それぞれ、例えば、CYP2B6、3A5、4A11と、UGT1A9、2B7)

を含むが、これに限定されない組織学的特徴および尿細管特異的機能を含む、インビオヒト腎臓組織に関連する重要な構造的特性および機能的特性を有する。

【実施例】

【0064】

以下の例示的な実施例は、本明細書に記載のソフトウェアアプリケーション、システム、および方法を代表するものであり、限定することは全く意図されていない。

20

【0065】

実施例1-バイオプリント三次元尿細管細胞モデル

寸法が3mmx3mmx0.75mmの3層カップ形状を、12ウェル組織培養プレートの中あるTranswell膜上にバイオプリントした(図2Aおよび図2B)。底面シートと二層の壁は75%成人腎臓線維芽細胞(aRF)と25%ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)で構成された。細胞を1億5000万細胞/mlでNovogel(登録商標)2.0に再懸濁した。カップを、2%ゼラチンに溶解した100万~500万細胞/mlの100%上皮細胞(MDCK)希釈懸濁液で満たした(「構造1」)。バイオプリントした直後に、構造を、溶けたNovogel(登録商標)1.0で取り囲み、次いで、腎臓線維芽細胞培地、HUVEC培地、およびMDCK培地の混合物中で培養した。

【0066】

30

構造1の評価を細胞タイプ特異的マーカーの組織学的染色によって行った。構造1の代表的なH&E染色を図3Aおよび図3Bに示した。HUVEC細胞および線維芽細胞の相対的な位置を評価するために、それぞれ、構築物のCD31 410およびTE7 420を染色した(図4)。両細胞タイプとも間質層全体に分布している。このことは細胞密度が高いことを示している。CD31+細胞の頑強な網は、分析した全ての構築物において見出された。一部の領域は、おそらく、微小血管系形成の証拠を示している(図4、430)。上皮細胞を視覚化するために、組織を、E-カドヘリン(図5、540)およびTE7(図5、520)に対する抗体で染色した。上皮細胞は間質層に隣接して集中し、尿細管様構造を形成した。この構造には、極性化した上皮細胞の増殖および組織化を支持する血管新生した間質層を含む、ヒト腎臓近位尿細管モデルに関する数多くの魅力的な特徴がある。

40

【0067】

実施例2-バイオプリント三次元尿細管細胞モデル

寸法が3mmx3mmx250μmのシートを、12ウェルプレートの中あるTranswell膜上にバイオプリントした。組織シートは、1億5000万細胞/mlでNovogel(登録商標)2.0に再懸濁した75%成人腎臓線維芽細胞と25%HUVECで構成された。シートの端は、Novogel(登録商標)3.0で構成される、500μm厚のバイオプリントヒドロゲルしかない壁で縁取られた。バイオプリントした直後に、50mM塩化カルシウムを用いて境界の壁を2分間、架橋した。次いで、この溶液を吸引し、構築物を、溶けたNovogel(登録商標)1.0で取り囲んだ。次いで、100msの弁開口時間でインクジェットスプレーモジュールセットを用いて付着させることによって、100万細胞/mlの上皮細胞(MDCKまたはhTERT-RPTEC)希釈懸濁液を構造の上面に添加

50

した(「構造2」)。構造2の模式図を図6Aおよび図6Bに示した。インクジェットスプレー モジュールを用いることによって、プリントした直後に上皮細胞を付着させることができる。または、間質組織をプリントし、数日間成熟させた後に、上皮細胞を付着させることができる。これにより、上皮細胞の正しい形態の支持を助ける可能性がある微小血管系および細胞外マトリックスの形成が容易になる。

【0068】

構造2の評価を細胞タイプ特異的マーカーの組織学的染色によって行った。構造2の代表的なH&E染色を図7Aおよび図7Bに示した。この組織は高い細胞密度を示し、薄い上皮細胞層を観察することができる(図7Aおよび図7Bにある黒色の矢印)。驚いたことに、インクジェットスプレー モジュールによって、上皮細胞を間質層の表面に付着させるのが楽になり、組織表面の細胞密度がかなり小さくなった。極性化した単層を形成するには、組織表面の細胞密度をかなり小さくすることが必要である。インクジェット噴霧の後に、細胞は高い生存率:トリパンブルー排除によって測定された時にMDCK細胞については、97%超、hTER-RPTEC細胞については94%を保持した。微小血管組織化の証拠はCD31染色810によって検出され、上皮細胞組織化はE-カドヘリン染色840によって検証された(図8Aおよび図8B)。

【0069】

実施例3-バイオプリント三次元尿細管細胞モデル

間質層の厚さおよび細胞充実性を小さくするために、細胞比を50%線維芽細胞/50%HUECに変えた。これらの細胞の濃度は 1.25×10^8 細胞/mLであった。腎臓近位尿細管モデルの間質層は、Novogel(登録商標)2.0に溶解した腎臓線維芽細胞とHUVECで構成される。本実施例において作製された構築物は、3D腎臓組織内に、極性化の特徴を示す近位尿細管上皮細胞(RPTEC)を示す。RPTECの間の外側膜にあるE-カドヘリン(明るい染色および940)が密着結合に対応する(図9A、図9B、および図9C)。さらに、間質層に対応する基底膜はコラーゲンを産生する(図9Aおよび図9B; 920)。H&E染色を示し(図10A)、刷子縁を示した(図11A、矢印)。トリクローム染色はコラーゲン分泌を示し(図10B、および図11B、矢印)、CD31(図12、明るい染色)染色はHUVEC網の存在を示す(図12、星印)。バイオプリントされた組織は、培養状態で経時増加する-グルタミル-トランスフェラーゼ(GGT)活性を示した。これは、機能している上皮層を示している(図13)。3Dバイオプリント尿細管モデルの上皮成分の成熟度および機能を評価するために、組織をホモジナイズし、グルタミル-トランスフェラーゼ(GGT)活性についてアッセイした。GGTは、上皮細胞の頂端面で発現している酵素であり、グルタチオンホメオスタシスおよび生体異物代謝に関与する。正の対照として、2Dの単層として培養したhTERT-RPTEC細胞を評価した。負の対照として、検出されたGGT活性が上皮特異的であることを検証するために、上皮を伴わないバイオプリント腎臓間質組織もアッセイした。培養3日目、10日目、14日目、21日目、または28日目に、2D hTER-RPTEC、3D間質組織、または3Dバイオプリント尿細管組織をホモジナイズし、Sigma-Aldrichから入手可能な比色アッセイを用いて機能的GGT酵素活性について評価した。バイオプリント尿細管組織は培養10~28日目から安定したGGT活性を示し、バイオプリントされた間質しかない組織では、ごくわずかなGGT活性が検出された。2D hTERT-RPTEC単層培養は、3Dバイオプリント尿細管組織において観察されるものと比較的等しいGGT活性を示したが、2D単層は21日目に機能低下を示し、28日目には生存不可能であった。

【0070】

実施例4-様々な腎臓線維芽細胞:内皮細胞比を用いてバイオプリントした三次元尿細管モデル

組織形態に及ぼす線維芽細胞:内皮細胞比の影響を確かめる実験を試みた。90:10、75:5、および50:50(線維芽細胞:内皮細胞)の比の腎臓線維芽細胞およびHUVEC細胞を含むバイオインクを用いて尿細管モデルをバイオプリントした。図14および図15は、この実験の結果を示す。図14は、プリントした尿細管モデルを肉眼で見たものを示す。これに対して、図15は、マッソントリクロームで染色した対応する組織構造を示す。プリントして6日後に、50:50比を含む尿細管モデルは実質的に平ら、または平らであった。図14Cおよび図15

10

20

30

40

50

C. 90:10(図14Aおよび図15A)ならびに72:25(図14Bおよび図15B)でプリントした尿細管モデルは、プリントして6日後に反りを示した。

【0071】

実施例5-三次元尿細管モデルの均一な厚さ

尿細管モデルの厚さおよび表面トポロジーの均一性を確かめる実験を試みた。尿細管モデルを12ウェルプレートのウェルの中にバイオプリントし(図16A)、Keyence技術を用いて分析した(図16B)。バイオプリント尿細管モデルを14日間、培養し、Keyence VHX-700デジタル顕微鏡を用いて表面積および厚さについて分析した。Novogel3.0縁端部(実施例3を参照されたい)の内部にある面積は0.068cm²であると見積もられた。縁端部の内部にある組織全体にわたって、厚さの平均は約106.8umであることが分かり、示されたヒートマップによって立証されたように厚さは比較的均一であった(極めて薄い領域が1650である)。色の対比を強め、組織表面のマッピングを楽にするために、組織をメチルブルーで染色した。2つ別々の領域がヒートマップの青色の範囲1650の中にある。これは、これらの領域が、約20um厚のかなり薄い小さな「くぼみ」であることを示している。構築物の厚さの平均は100μmである。データから、表面形態が極めて均一で、平らで、滑らかであり、小さなくぼみの証拠があることが分かる。

10

【0072】

実施例6-様々な濃度の初代腎臓上皮細胞を用いて製作された三次元尿細管モデル

50:50の線維芽細胞:内皮細胞比を含む間質層を24ウェルプレートの各ウェルにバイオプリントした。構築物を、2%FBSを含有する培地の存在下(図17B、図17C、および図17D)または非存在下(図17A)で、 1.25×10^5 個(図17Aおよび図17B)、 2.5×10^5 個(図17C)、または 5.0×10^5 個(図17D)のRPTEC細胞のいずれかとインキュベートした。組織構造を11日目に採取し、H&E染色した。

20

【0073】

実施例7-尿細管モデルを用いた毒性アッセイ

インビトロ毒性アッセイ実験に対する尿細管モデルの適性を確かめるために、一般的な細胞傷害剤であるアンホテリシンB、シスプラチニン、およびTGF β を用いてインビトロ毒性アッセイ実験を行った(図18～図23)。前の実施例の方法に従って尿細管モデルをプリントした。

30

【0074】

図18は、間質組織および上皮組織の層を含むバイオプリント3D尿細管モデル(丸);hTERT RPTECの標準的な2D共培養(四角);ならびに間質組織のみ(三角)におけるalamarBlueアッセイによるアンホテリシンB(AmpB)毒性を示す。間質組織のみはAmpB処理に対して耐性があったのに対して、3D尿細管モデルは用量依存的な細胞傷害性を示した。

【0075】

3D尿細管モデルは、AmpBによる上皮細胞機能の用量阻害を示す。図19Aは、様々な濃度のAmpBで処理した3D尿細管モデルからの細胞毒性指標である乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)放出の時間経過を示す。低用量のAmpBでは3日目までにLDH放出が上昇したのに対して、高用量では1日目までにAmpB放出レベルが高くなかった。図19Bは、AmpB処理に応答した用量依存的なGGT活性低下を示す。図20は、図19Bからの3D尿細管モデルの組織構造を図示し、未処理対照(図20A)と比較して、10μM(図20B)および50μM(図20C)のAmpBでの上皮特異的な細胞死を示す。

40

【0076】

3D尿細管モデルは、シスプラチニンによる上皮細胞機能の用量依存的な阻害を示す。図21Aは、AlamarBlueアッセイによる3D尿細管モデルにおける細胞傷害性の増加を示す。図21Bは、GGT活性の用量依存的な低下を示す。図21Cは、3日目に50μMシスプラチニン、5日目に10μMシスプラチニンで処理した尿細管モデルによるLDH放出の増加を示す。図22は、ビヒクル(図22A)、10μMシスプラチニン(図22B)、50μMシスプラチニン(図22C)、および50ng/mL TGF β (図22D)で処理した尿細管モデルのマッソントリクローム染色を示す。特に、TGF β による処理は、シスプラチニン処理組織の明らかな細胞死を伴わず、線維症が増加したことを示

50

す。

【 0 0 7 7 】

図23は、初代細胞(070615-RPTEC)を含む上皮層の効果と、不死化細胞株(hTERT-RPTEC)を含む上皮層の効果を比較した実験から編集したデータを示す。両タイプの細胞とも、alamarBlueアッセイによって、シスプラチニン処理後の用量依存的な毒性増加(図23A)、GGT活性(図23B)、およびLDH放出(図23C)を示した。特に、初代細胞はGGTアッセイにおいてシスプラチニンに対する高い感受性を示した。

【 0 0 7 8 】

実施例8-組織形態に及ぼすプリント表面の影響

実施例8は、ヒドロゲルしかないNovogel3.0の縁端部を用いて作製されたバイオプリント尿細管組織について説明する。この縁端部またはNovogel1.0の堀(moat)は、0.4 μm孔径のトランズウェルインサートが培養表面として用いられた時に、トランズウェル膜に組織を付着させるのを容易にするのに必要である。尿細管モデル50:50腎臓線維芽細胞:HUVECのバイオプリント腎臓間質部分を様々な表面上で製作し、トランズウェル膜への付着について評価した。図24Aは、バイオプリント組織が縁端部または堀の非存在下では培養して3日後に浮遊することを示す。無傷の障壁および輸送体機能を評価するために、培養表面全体を覆う組織が必要である。バイオプリント尿細管組織の付着および成長を容易にするために、ならびにバイオプリント尿細管モデルの表面積被覆度を改善するために、縁端部または堀の非存在下で組織付着を促進する培養表面を使用することが望ましい。図24Bに示した、好ましい態様のバイオプリント腎臓間質組織(50:50腎臓線維芽細胞:HUVEC)は付着し、堀もヒドロゲル縁端部も伴わない状態で1 μm孔径膜上に広がる。

【 0 0 7 9 】

実施例9-培養状態での尿細管モデルの長期生存能力

本開示の3D尿細管モデルの利点の1つは培養状態で持続的な生存能力があることである。多くの場合、この生存能力は通常の2D培養または組織外植片の生存能力より長く続く。図25は、培養状態で6日目(図25A)、10日目(図25B)、および27日目(図25C)の3D尿細管モデルを示す。

【 0 0 8 0 】

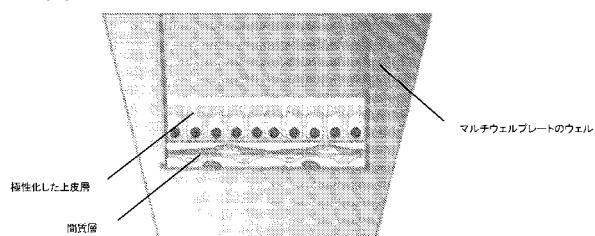
本発明の好ましい態様が本明細書において示され、説明されたが、このような態様は単に例として示されたことが当業者に明らかである。今や、本発明から逸脱することなく、非常に多くの変化、変更、および置換が当業者の頭に浮かぶ。本明細書に記載の本発明の態様の様々な代案が本発明の実施において用いられ得ることが理解されるはずである。

10

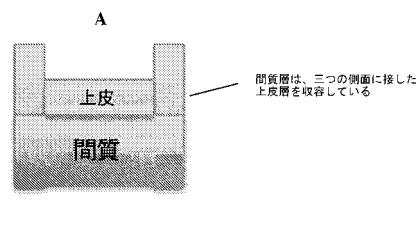
20

30

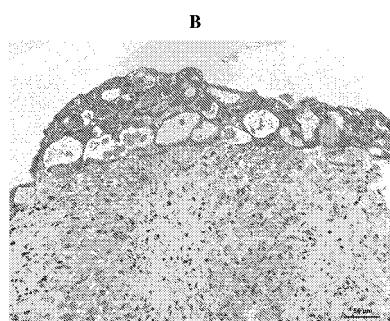
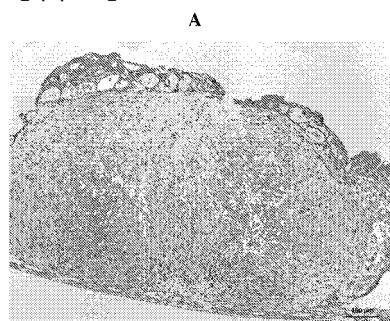
【図 1】



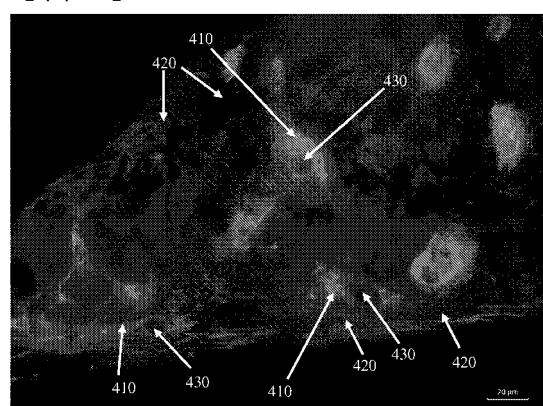
【図 2】



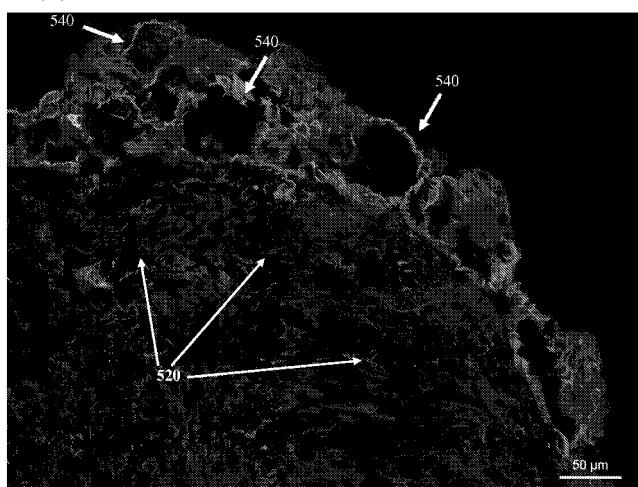
【図 3】



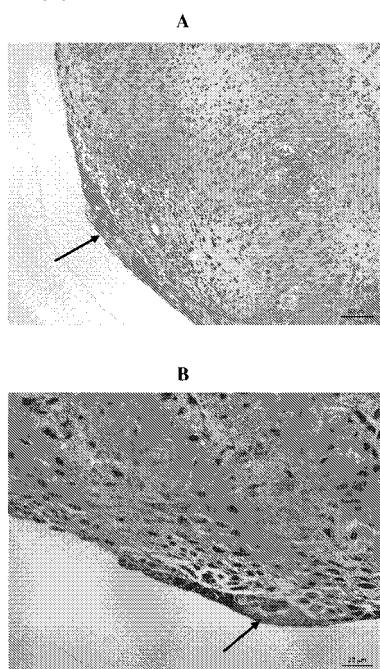
【図 4】



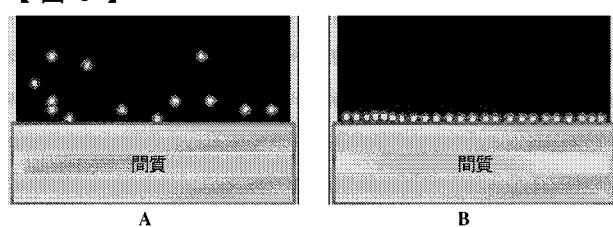
【図5】



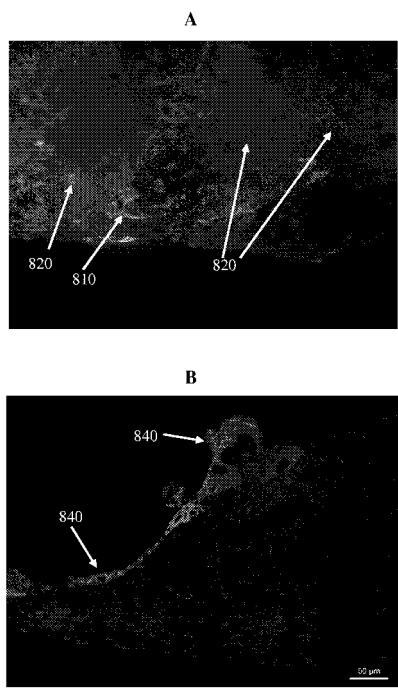
【図7】



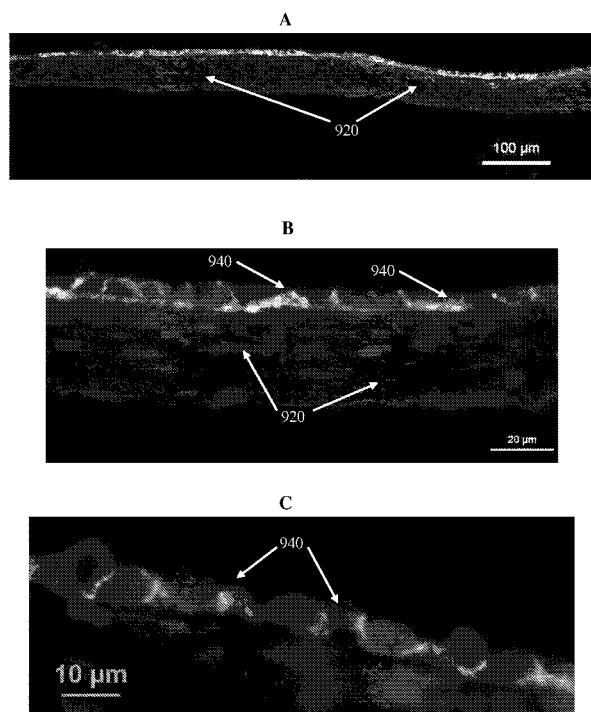
【図6】



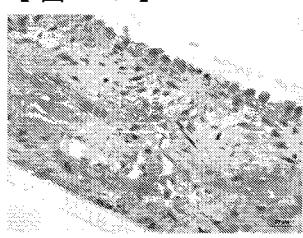
【図8】



【図9】



【図 1 0】

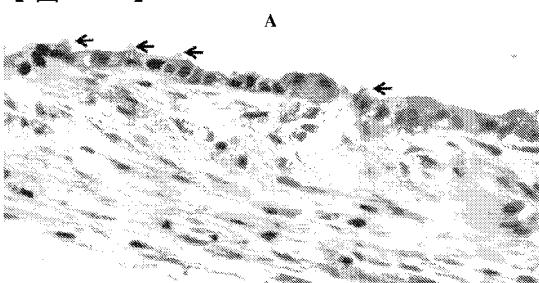


A



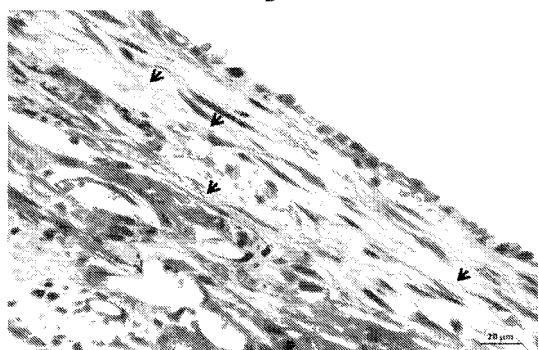
B

【図 1 1】

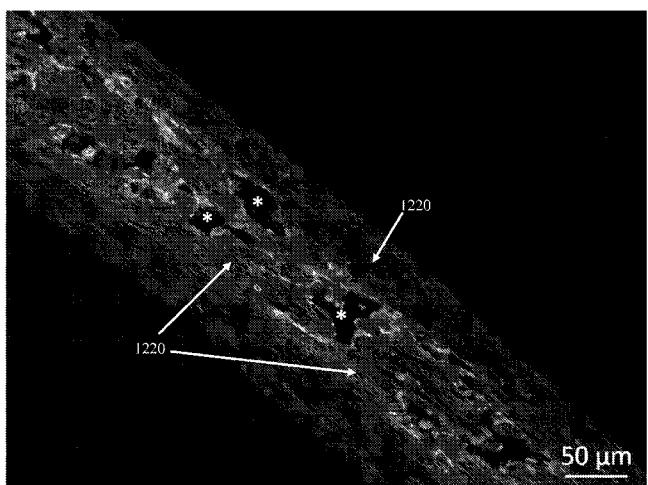


A

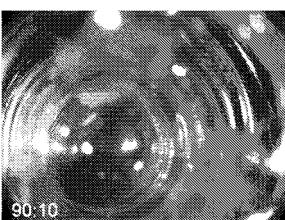
B

20 μm

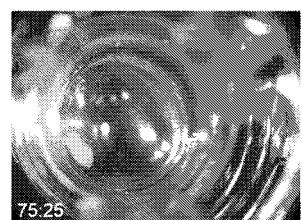
【図 1 2】

50 μm

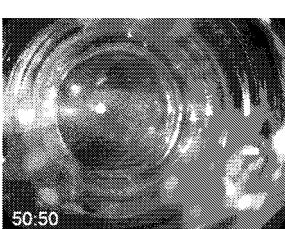
【図 1 4】



A

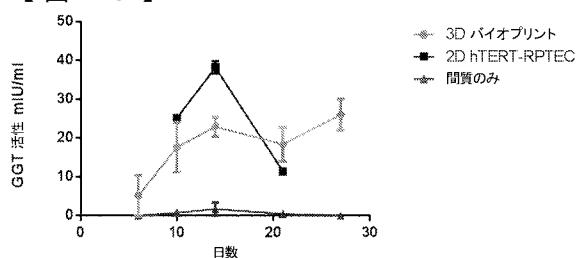


B

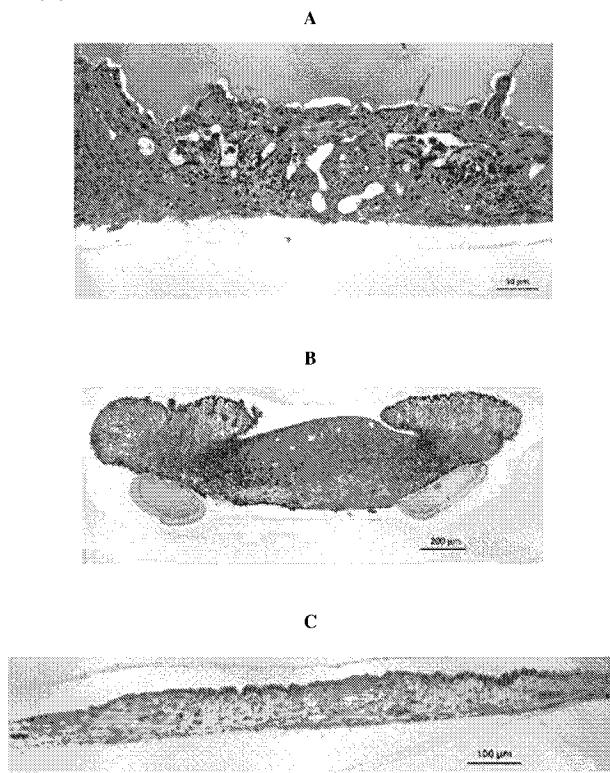


C

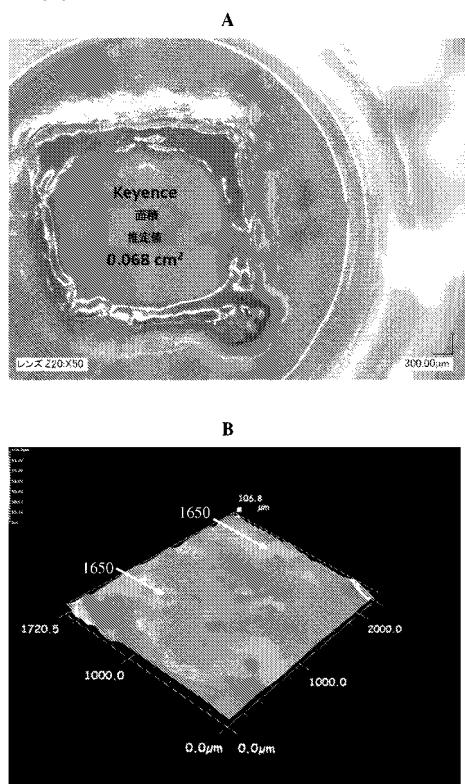
【図 1 3】



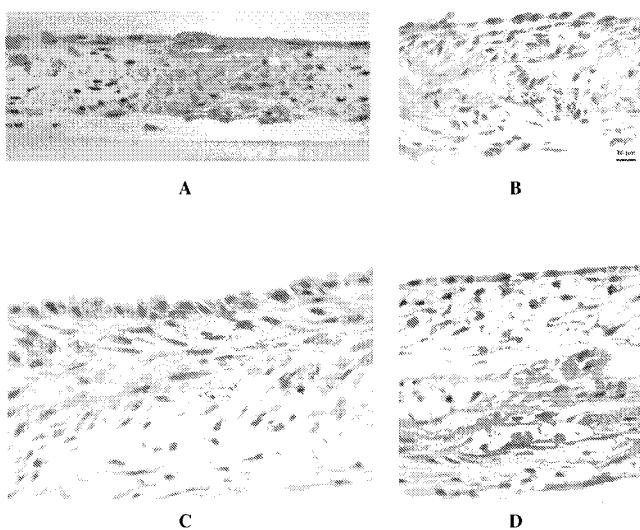
【図15】



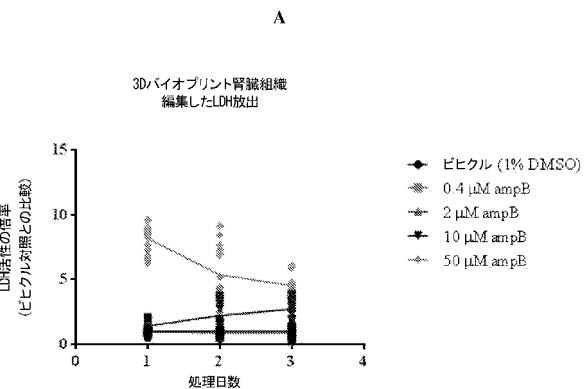
【図16】



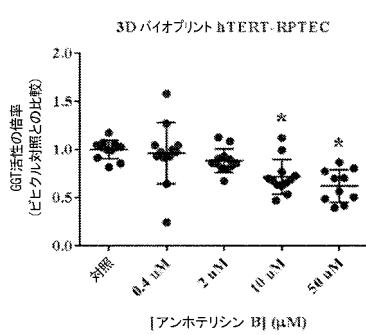
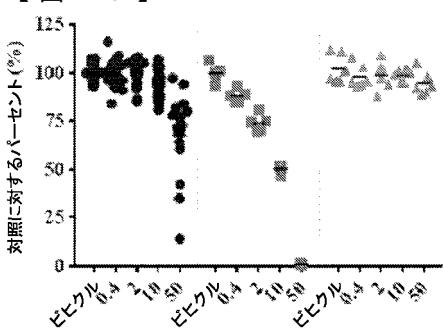
【図17】



【図19】



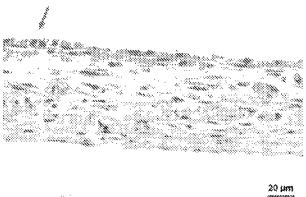
【図18】



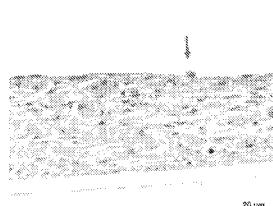
【図20】



A

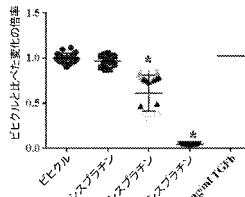


B

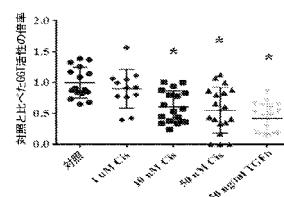


C

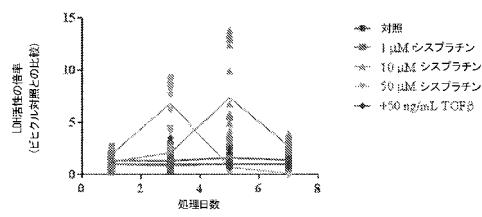
【図21】



A

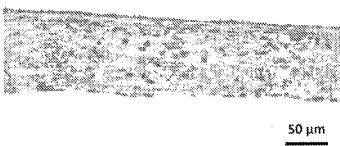


B

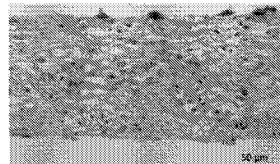


C

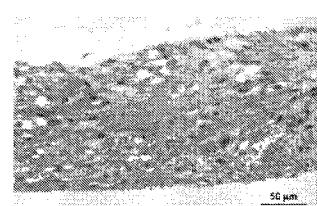
【図22】



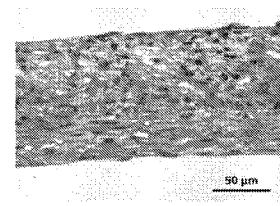
A



B

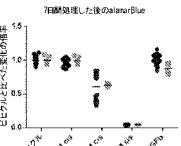


C

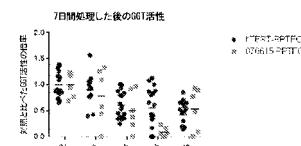


D

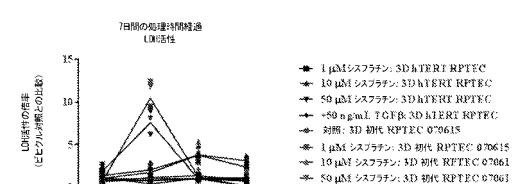
【図23】



A

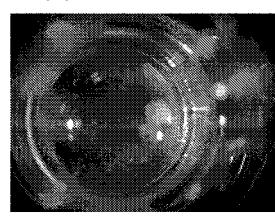


B

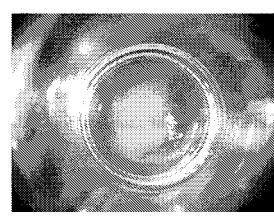


C

【図24】

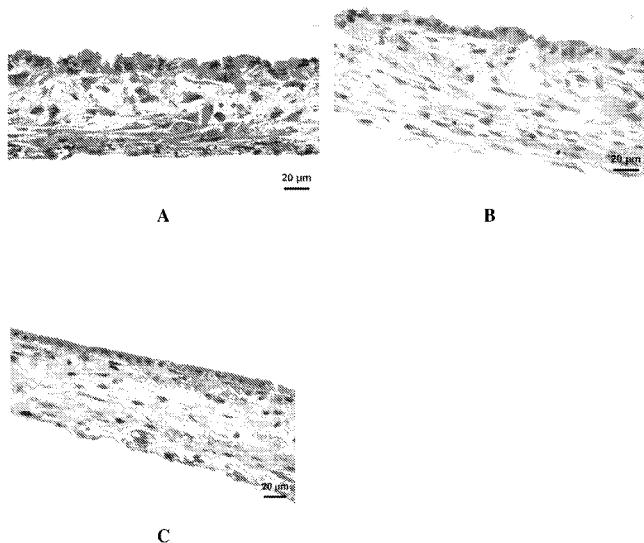


A



B

【図25】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/054315
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/07(2010.01)i, C12N 5/09(2010.01)i, G01N 33/50(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/07; C12N 5/071; C12N 5/02; G01N 33/50; C12N 5/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: engineered renal tubule model, renal interstitial tissue, renal epithelial tissue, bio ink, biocompatible membrane, array		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2013-0190210 A1 (MURPHY, KEITH et al.) 25 July 2013 See paragraph [0083]; claim 1; figure 18D.	1-92
A	JAKAB, KAROLY et al., 'Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells', Biofabrication, 2010, Vol.2, No.2, Article No.022001 (internal pages 1-14) See the whole document.	1-92
A	US 2008-0070304 A1 (FORGACS, GABOR et al.) 20 March 2008 See the whole document.	1-92
A	SHIM, JIN-HYUNG et al., 'Bioprinting of a mechanically enhanced three-dimensional dual cell-laden construct for osteochondral tissue engineering using a multi-head tissue/organ building system', Journal of Micromechanics and Microengineering, 2012, Vol.22, No.8, Article No.085014 (internal pages 1-11) See the whole document.	1-92
A	US 2014-0274802 A1 (ORGANOVO, INC.) 18 September 2014 See the whole document.	1-92
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 19 January 2016 (19.01.2016)	Date of mailing of the international search report 20 January 2016 (20.01.2016)	
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140	Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-8150 	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2015/054315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013-0190210 A1	25/07/2013	AU 2012-308715 A1 CA 2848043 A1 CN 103946374 A EP 2756073 A2 EP 2756073 A4 HK 1200483 A1 IL 231449 D0 JP 2014-531204 A KR 10-2014-0072883 A RU 2014113641 A WO 2013-040078 A2 WO 2013-040078 A3	24/04/2014 21/03/2013 23/07/2014 06/05/2015 07/08/2015 30/04/2014 27/11/2014 13/06/2014 20/10/2015 21/03/2013 10/05/2013
US 2008-0070304 A1	20/03/2008	US 2012-0288938 A1 US 2015-0004273 A1 US 8241905 B2 US 8852932 B2 WO 2005-081970 A2 WO 2005-081970 A3	15/11/2012 01/01/2015 14/08/2012 07/10/2014 09/09/2005 02/04/2009
US 2014-0274802 A1	18/09/2014	AU 2014-236780 A1 CA 2903844 A1 KR 10-2015-0122260 A US 2014-0287960 A1 WO 2014-151921 A1	17/09/2015 25/09/2014 30/10/2015 25/09/2014 25/09/2014

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IDL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 グエン デボラ リン グリーン

アメリカ合衆国 92129 カリフォルニア州 サンディエゴ サマンサ アベニュー 133
66

(72)発明者 キング シエルビー マリー

アメリカ合衆国 92131 カリフォルニア州 サンディエゴ カミニート アルカダ 111
67

(72)発明者 プレスネル シャロン シー.

アメリカ合衆国 92064 カリフォルニア州 パウウェイ ロストラータ ヒル ロード 1
6224

Fターム(参考) 4B029 AA02 BB11 CC02 GA08

4B063 QA07 QA20 QQ02 QX01

4B065 AA90X AC20 CA44 CA46