



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월26일

(11) 등록번호 10-2710014

(24) 등록일자 2024년09월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/22 (2015.01) **A61K 35/44** (2015.01)
A61P 13/12 (2006.01) **C12N 5/071** (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/22 (2013.01)
A61K 35/44 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7016715(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년05월08일
 심사청구일자 2024년05월20일
- (85) 번역문제출일자 2024년05월20일
- (65) 공개번호 10-2024-0090622
- (43) 공개일자 2024년06월21일
- (62) 원출원 특허 10-2023-7044395
 원출원일자(국제) 2014년05월08일
 심사청구일자 2024년01월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/037275
- (87) 국제공개번호 WO 2014/182885
 국제공개일자 2014년11월13일
- (30) 우선권주장
 61/855,146 2013년05월08일 미국(US)
 61/855,152 2013년05월09일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 US20110117162 A1
 US20120301958 A1
 KR101735125 B1

(73) 특허권자

인리젠

케이만군도 그랜드 케이만 케이와이1-1104 조지
 타운 사우스 처치 스트리트 어글랜드 하우스 피.
 오. 박스 309

(72) 발명자

바수, 조이딕

미국 27103 노스캐롤라이나주 윈스턴-세일럼 웨스
 트포인트 볼러바드 #지 3929

브루스, 앤드류

미국 27103 노스캐롤라이나주 윈스턴-세일럼 웨스
 트포인트 볼러바드 #지 3929

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이윤기

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김정태

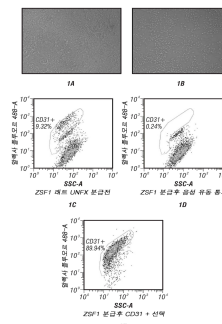
(54) 발명의 명칭 단리된 신장 세포를 포함하는 오가노이드 및 이의 용도

(57) 요약

선택된 생리활성 원시 신장 세포 및 생리활성 세포 집단, 예를 들면, 내피 세포 집단, 예를 들면, HUVEC 세포의 혼합물을 포함하는 오가노이드, 및 이러한 오가노이드를 사용하여 이를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 또한, 관형 및 에리트로포이에틴(EPO)-생성 신장 세포 집단, 및/또는 내피 세포 집단을

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



포함할 수 있는, 단리된 신장 세포는 자가, 동계, 동종이계 또는 이계 기원, 또는 이의 조합일 수 있다. 오가노이드를 사용하여 이를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61P 13/12 (2018.01)

C12N 5/0697 (2013.01)

C12N 2502/256 (2013.01)

C12N 2502/28 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

(72) 발명자

켈리, 러스티

미국 27103 노스캐롤라이나주 윈스턴-세일럼 웨스
트포인트 불러바드 #지 3929

거스리, 켈리

미국 27103 노스캐롤라이나주 윈스턴-세일럼 웨스
트포인트 불러바드 #지 3929

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 이종 신장 세포 집단 및 생리활성 세포 집단을 포함하는 세포의 클러스터; 및

(ii) 라벨을 포함하는 용기

를 포함하는 제조 물품이며,

여기서 이종 신장 세포 집단은 개시 신장 세포 집단보다 더 큰 퍼센트의 신장 EPO-생성 세포를 포함하며,

여기서 생리활성 세포 집단은 비-신장 내피 세포 집단, 비-신장 내피 조상세포 집단, 비-신장 간엽 줄기 세포 집단, 또는 비-신장 지방질-유도된 조상세포 집단인 것인,

제조 물품.

청구항 2

제1항에 있어서, EPO-생성 세포가 약 5% 산소 미만의 산소 수준에서 배양될 때 EPO 발현을 증가시키는 것인 제조 물품.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포의 클러스터가 신장 질환의 치료에 효과적이고, 용기가 멸균된 접근 포트를 포함하는 것인 제조 물품.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 용기가 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 스톱퍼를 갖는 용액 백 또는 바이알인 제조 물품.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 라벨이 환자에게 세포의 클러스터를 투여하기 위한 설명을 포함하는 것인 제조 물품.

청구항 6

제3항에 있어서, 라벨이 환자에게 세포의 클러스터를 투여하기 위한 설명을 포함하는 것인 제조 물품.

청구항 7

제4항에 있어서, 라벨이 환자에게 세포의 클러스터를 투여하기 위한 설명을 포함하는 것인 제조 물품.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 바늘을 추가로 포함하는 제조 물품.

청구항 9

제4항에 있어서, 바늘을 추가로 포함하는 제조 물품.

청구항 10

제5항에 있어서, 바늘을 추가로 포함하는 제조 물품.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 선택된 생리활성 주요 신장 세포 및 추가의 생리활성 세포 집단의 혼합물, 및 이를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 관형 및 에리트로포이에틴(EPO)-생성 신장 세포 집단을 포함하는, 단리된 신장 세포를 포함하는 오가노이드, 및 당해 오가노이드를 사용하여 필요한 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 만성적 신장 질환(CKD)은 미국에서 1900만명 이상의 사람에게 영향을 미치며 흔히 비만, 당뇨병, 및 고혈압을 포함하는, 대사성 장애의 결과이다. 데이터의 실험은, 증가율이 또한 전세계적으로 증가하고 있는 2개의 질병인, 고혈압 및 비-인슐린 의존성 진성 당뇨병(NIDDM)의 진행에 기인함을 나타내고 있다(참고: United States Renal Data System: Costs of CKD and ESRD. ed. Bethesda, MD, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2007 pp 223-238). 비만, 고혈압, 및 불량한 혈당 조절은 모두 신장 손상에 대한 독립적인 위험 인자로서, 사구체 및 관형 병변을 유발하고 단백뇨 및 신장 여과 기능에 있어서 다른 전신으로-검출가능한 변경을 초래하는 것으로 밝혀져 왔다(참고: Aboushwareb, *et al.*, World J Urol, 26: 295-300, 2008; Amann, K. *et al.*, Nephrol Dial Transplant, 13: 1958-66, 1998). 진행의 1 내지 3기의 CKD 환자는 생활방식의 변화 및 직면하는 질병 상태(들)을 조절하는데 목표를 둔 약리적 개입에 의해 관리되지만, 4-5기 환자들은 투석 및, 고혈압제, 적혈구 산출 자극제(ESA), 철 및 비타민 D 보충물을 전형적으로 포함하는 약물 요법에 의해 관리된다. 미국 신장 데이터 서비스(United States Renal Data Service: USRDS)에 따르면, 평균 말기 신장 질환(ESRD) 환자는 주사가능한 적혈구 산출-자극제(ESA), 비타민 D 보충물, 및 철 보충물에 대해 매달 \$600 초과를 지출한다(참고: United States Renal Data System: Costs of CKD and ESRD. ed. Bethesda, MD, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2007 pp 223-238). 투석의 연간 평균 비용(\$65,405)과 쌍을 이루는 경우, 1명의 환자의 유지를 위한 보건 비용은 \$72,000/연 이상으로 상승하며(참고: United States Renal Data System: Costs of CKD and ESRD. ed. Bethesda, MD, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2007 pp 223-238), 이 숫자는, 표준 절차상 비용만을 반영하며 기타 합병증, 응급 절차, 또는 투석 접근을 위한 혈관 이식체의 대체와 같은 보조 과정의 치료는 포함하지 않는다. 2005년에 CKD 및 ESRD에 대한 합해진 보건 비용은 총 \$62B이며, 이는 그해에 소비되는 모든 보건비의 19%를 차지한다(참고: United States Renal Data System: Costs of CKD and ESRD. ed. Bethesda, MD, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2007 pp 223-238). 신장 이식은 투석을 피하기 위해 또는 투석이 더 이상 질병 상태를 관리하기에 충분하지 않은 경우에, 예방 조치로서 4-5기 환자에 대한 효과적인 선택사항이지만, 전체 신장 이식으로부터 유리할 수 있는 미국에서 5기 CKD 환자의 수(>400,000)는 어떠한 제공된 년도에서도 이용가능한 적합한 공여자 신장의 수(~16,000)를 훨씬 초과하고 있다(참고: Powe, NR *et al.*, Am J Kidney Dis, 53: S37-45, 2009). 따라서, 새로운 치료 패러다임이 투석에 있어서의 의존성을 지연시키거나 감소시키고 공여자 신장의 단점에 의한 공백기를 충족시키기 위해 요구되고 있다.
- [0003] 점진적인 신장 질환은 초기 질병 손상(예를 들면, 고혈압)에 이어, 이러한 손상에 대한 부적응 신장 반응의 조합으로부터 산출된다. 이러한 반응은 전-염증성 및 전-섬유증성 사이토킨 및 성장 인자의 생성을 포함한다. 따라서, CKD 진행을 지연시키기 위한 한가지 전략은 염증 및 섬유증성 반응을 완화시키고 신장 조직의 보수 및/또는 재생을 통해 신장 변성을 경감시키거나 역전시키는 것이 요구된다.
- [0004] 만성적 신부전은 사람 및 일부 애완 동물에서 우세하다. 신부전이 있는 환자는 신장 기능의 손실(요독증)을 경험할 뿐만 아니라, 적혈구 산출을 통한 충분한 수의 적혈구 세포(RBC)를 생성하는 골수의 불능으로 인해 요독증으로 발전한다. 적혈구 항상성은 신장내에 있는 특수화된 간질성 섬유아세포에 의한 에리트로포이에틴(EPO)의 생성 및 EPO에 반응하여 보다 많은 RBC를 제조하는 골수내 표적화된 적혈구 조상세포의 능력에 의존한다. 신부전의 빈혈은 신장에서 EPO의 감소된 생성 및 골수내 EPO의 작용시 요독 인자의 부정적인 효과 둘 다에 기인한다.
- [0005] 지금까지, 만성 신부전의 치료에 대한 임상 접근법은 투석 및 신장 여과 및 소변 생성의 회복을 위한 신장 이식, 및 적혈구 덩어리를 복원하기 위한 재조합체 EPO 또는 EPO 유사체의 전신계 전달을 포함한다. 투석은 중

간 내지 말기 단계 신부전 환자에게 생존적 이점을 제공하지만, 유의적인 삶의 질 생점을 유발한다. 신장 이식은 신부전의 말기 단계 환자에 대한 매우 바람직한(및 종종 유일한) 선택사항이지만, 고 품질의 공여자 신장의 공급이 신부전 집단에 대한 요구를 충족시키지 못한다. 빈혈을 치료하기 위한 재조합체 EPO를 사용한 거환 투여(bolus dosing)가 현재 심각한 하류 건강 위험과 관련되어 약물에 대한 FDA로부터의 복약 주의사항 경고(black box warning)을 초래하고, 당해 집단에서 적혈구 항상성을 회복하기 위한 대체 치료로의 추가의 조사가 필요하도록 하고 있다. 전임상 연구는 유전자 치료요법 접근법을 통해 산출된 EPO-생성 세포의 생체내 효능 및 안전성에 있어서 시험되어 왔다. 이들 연구는, epo-생성 세포의 생체내 전달에 의해 적혈구생성 및 RBC 수를 일시적으로 자극하는 것이 가능함을 입증하였다. 그러나, 지금까지, 이들 접근법중 어느 것도 조절된 적혈구 항상성 또는 장기간 생체내 작용성을 제공하지 못하고 있다. 결과적으로, HCT 및 RBC의 수는 흔히 정상 값을 초과하여 증가하여, 진성 적혈구 증가증 및 다른 합병증을 초래한다. 치료학적으로 관련되어 재조합체 EPO의 전달을 능가하는 장점을 제공하는 EPO-생성 세포의 전달은 HCT를 증가시켜야 할 뿐 아니라, 완전한 양성 및 음성적 조절 기전들 다를 사용하여, 적혈구 항상성을 회복시켜야 한다. EPO-결핍성 빈혈은, 신장 질환 환자에게서 만연하지만, 또한 심부전, 다중-기관계 부전, 및 다른 만성병을 포함하는, 다른 질병 상태의 결과로서 진행될 수 있다.

[0006] 재생성 의학 기술은 만성적 신장 질환(CKD)에 대한 차세대 치료학적 선택사항을 제공한다. 문헌(참고: Presnell et al. WO/2010/056328 및 Ilagan et al. PCT/US2011/036347)은 관형 및 에리트로포이에틴(EPO)-생성 신장 세포 집단을 포함하는, 단리된 생리활성 신장 세포, 및 이를 분리 및 배양하는 방법, 및 당해 세포 집단을 사용하여 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법을 기술하고 있다.

[0007] 필요로 하는 대상체에 대해 개선되고 보다 표적화된 재생 의학 치료학적 선택사항이 요구되고 있다.

[0008] **발명의 요약**

[0009] 오가노이드, 이의 제조 방법 및 용도가 본원에 제공된다.

[0010] 본원에 기술된 오가노이드는 스캐폴드(scaffold)를 사용하지 않고 필요로 하는 대상체에게 치료학적 이점을 제공한다.

[0011] 일 측면에서, 이종 신장 세포 집단 및 생리활성 세포 집단을 포함하는 오가노이드를 형성하는 방법이 제공된다. 일 구현예에서, 당해 방법은 이종 신장 세포 집단과 생리활성 세포 집단을 i) 2D 배양물; ii) 3D 배양물: COL(I) 겔; iii) 3D 배양물: 매트릭스(Matrigel); iv) 3D 배양물: 스피너(spinner)에 이어, COL(I)/매트릭스; 및 v) 3D 배양물: COL(IV) 겔로 이루어진 그룹으로부터 선택된 배양 시스템 내에서 배양함을 포함한다. 일부 구현예에서, 이종 신장 세포 집단은 생리활성 신장 세포 집단을 포함한다. 특정의 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단은 관형 세포의 풍부한 집단을 포함하는 B2 세포 집단을 포함하고, 여기서 이종의 신장 세포 집단에는 B1 세포 집단 및/또는 B5 세포 집단 또는 이의 조합이 감손되어 있다. 일부 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단은 B2, B2/B3, B2/B4, 및 B2/B3/B4로부터 선택된 세포 집단을 포함한다. 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단은 에리트로포이에틴(EPO)-생성 세포를 포함한다.

[0012] 다른 구현예에서, 생리활성 세포 집단은 내피 세포 집단이다. 특정의 구현예에서, 내피 세포 집단은 세포주이다. 일부 구현예에서, 내피 세포 집단은 사람 체대로부터 기원한다. 일부 구현예에서, 생리활성 세포 집단은 내피 전구 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 생리활성 세포 집단은 간엽성 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 내피 세포 집단은 성체-공급된다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 이종, 동계, 동종이계, 자가 및 이의 조합으로부터 선택된다.

[0013] 다른 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단 및 생리활성 세포 집단은 제1의 기간 동안 별도로 배양되어, 제2의 기간 동안 결합되고 배양된다. 특정의 구현예에서, 신장 세포 집단 및 생리활성 세포 집단은 1:1의 비로 합해진다. 대부분의 구현예에서, 신장 세포 집단 및 생리활성 세포 집단은 성장 배지 내에서 합해지며, 예를 들면, 현탁된다. 일부 구현예에서, 제2의 기간은, 길이가 24 내지 72 시간, 바람직하게는 24 시간이다.

[0014] 다른 구현예에서 오가노이드가 제공된다. 일부 구현예에서, 오가노이드는 본원에 기술된 방법에 따라 제조된다. 모든 구현예에서, 오가노이드는 이종의 신장 세포 집단 및 생리활성 세포 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 생리활성 세포 집단은 내피 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 내피 세포 집단은 세포주이다. 특정의 구현예에서, 내피 세포 집단은 HUVEC 세포를 포함한다.

[0015] 일부 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단은 관형 세포의 풍부한 집단을 포함하는 B2 세포 집단을 포함하며, 여기서 이종의 신장 세포 집단에는 B1 세포 집단이 감손되어 있다. 특정의 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단에는 B5 세포 집단이 추가로 감손되어 있다. 선택된 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단은 B2, B2/B3, B2/B4, 및

B2/B3/B4로부터 선택된 세포 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단은 에리트로포에틴 (EPO)-생성 세포를 포함한다.

[0016] 추가의 측면에서, 적어도 하나의 오가노이드 및 액상 배지를 포함하는 주사가능한 제형이 제공된다. 일 구현예에서, 액상 배지는 세포 성장 배지, DPBS 및 이의 조합으로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 오가노이드는 액상 배지 내에 현탁된다.

[0017] 제2의 구현예에서, 주사가능한 제형은 오가노이드 및 (i) 약 8°C 이하에서 실질적으로 고체 상태이고, (ii) 약 주위 온도 이상에서 실질적으로 액체를 유지하는 온도-민감성 세포-안정화 바이오재료를 포함한다. 다른 일 구현예에서, 생리활성 세포는 본원에 기술된 바와 같은 신장 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 생리활성 세포는 세포-안정화 생물 물질의 용적 전체에 실질적으로 균일하게 분산된다. 다른 구현예에서, 바이오재료는 약 8°C 내지 약 주위 온도 이상에서 고체-대-액체 전이 상태를 갖는다. 일 구현예에서, 실질적으로 고체 상태는 겔 상태이다. 다른 구현예에서, 세포-안정화된 바이오재료는 하이드로겔이다. 다른 일 구현예에서, 하이드로겔은 젤라틴을 포함한다. 다른 구현예에서, 젤라틴은 제형 내에 약 0.5% 내지 약 1%(w/v)로 존재한다. 일 구현예에서, 젤라틴은 제형 내에 약 0.75%(w/v)로 존재한다.

[0018] 일 측면에서 이종의 신장 세포 집단 및 생리활성 세포 집단을 포함하는 적어도 하나의 오가노이드를 투여함을 포함하여 요구되는 대상체에서 신장병을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 생리활성 세포 집단은 내피 세포 집단이다. 특정의 구현예에서, 내피 세포 집단은 세포주이다. 일 구현예에서, 내피 세포 집단은 HUVEC 세포를 포함한다.

[0019] 대부분의 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단은 관형 세포의 풍부한 집단을 포함하는 B2 세포 집단을 포함하며, 여기서 이종의 신장 세포 집단에는 B1 세포 집단이 감소되어 있다. 선택된 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단에는 B5 세포 집단이 감소되어 있다. 일부 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단은 B2, B2/B3, B2/B4, 및 B2/B3/B4로부터 선택된 세포 집단을 포함한다. 대부분의 구현예에서, 이종의 신장 세포 집단은 에리트로포에틴 (EPO)-생성 세포를 포함한다.

[0020] 일 구현예에서, 필요로 하는 대상체에서 신장병을 치료하는 방법은 본원에 기술된 바와 같은 주사가능한 제형을 투여함을 포함한다. 모든 구현예에서, 대상체는 개, 고양이, 말, 토끼, 동물원 동물, 암소, 돼지, 양, 및 영장류로부터 선택된 포유동물이다. 구체적인 구현예에서, 포유동물은 인간이다. 모든 구현예에서, 대상체는 신장병을 지닌다. 구현예에서, 다음의 빈혈의 척도(Hct, Hgb, RBC), 염증(WBC), 뇨 농도(spGrav) 및 질소혈(BUN) 중의 어느 하나에 있어서의 개선이 관찰된다.

[0021] 다른 측면에서, 신장 병의 치료용 의약의 제조시 오가노이드의 용도가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0022] **도 1**은 파이브로넥틴-코팅된 플레이트 상에서 일차 ZSF1 세포의 세포 배양 형태학을 나타낸다. **A.** 5x 배율에서 관찰된 p0 미분획화 예비분극(unfractionated presort); **B.** 5x 배율에서 관찰된 p1 CD31⁺; **C.** KGM 중 파이브로넥틴-처리된 플라스크 상에서 21% O₂ 내에서 성장된 0기 말기에서의 미분획화 신장 세포의 일차 배양물; **D.** 밀테나이(Miltenyi) 마이크로-비드 선택으로부터의 음성 통과액 (CD31⁻); 및 **E.** EGM2 완전히 보강된 배지 내에서 파이브로넥틴 코팅된 플라스크 상에서 성장된 1기 말기에서 선택된 90% CD31⁺ 세포.

도 2는 5x에서 관찰된 인간 세포 배양 형태학을 나타낸다. **A.** KGM 내의 TC-처리된 플라스크 상의 21% O₂ 내에서 성장된 p0 말기에서 미분획화 신장 세포; **B.** KGM 내의 TC-처리된 플라스크 상에서 2% O₂ O/N에 노출되어 성장된 0기의 말기에서의 미분획화 신장 세포; **C.** EGM2 완전히 보강된 배지 내에서 파이브로넥틴 코팅된 플라스크 상에서 0기의 말기에서의 성장된 미분획화 신장 세포; **D.** 완전히 보강된 EGM2 배지 내에서 파이브로넥틴 코팅된 플라스크 상에서 성장된 1기 말기에서 CD31⁺ 양성으로 선택된 세포.

도 3a는 배양물 기간 동안 선택된 샘플 내에서 양성 CD31 내피 세포 백분율을 나타내는 FACS 분석을 나타낸다. 미분획화(UNFX) 내피 조성물은 파이브로넥틴 상에서 플레이팅되고 EGM-2 배지 내에서 배양되는 경우 p0에서 <3% 이었고 p1에서 ~15배 강화되었다.

도 3b는 계통 추적 연구를 위한 Bigeneic Cre/loxP 리포터를 나타낸다.

A. Six2-Cre x R26td 토마토 레드(상피 세포: 벽쪽, 근위 및 원위 상피 세포를 교차 추적하나, 간질성 또는 집합관은 추적하지 않는다). B. 표지되지 않은 대조군. C. p1 배양물(3일의 노르복식(normoxic)에 이은 1일의 저 산소 배양물)로부터의 6개의 2 양성.

도 4는 SRC 오가노이드 형성에 사용된 스피너 플라스크 (A) 및 로테이터 상의 저 결합 플레이트(B)를 나타낸다.

도 5는 크기에 있어서 균일성을 나타내는 A. 랫트 및 B. 인간 SRC, C. 오가노이드 발현 펜-카드헤린 표현형(그린), 핵(블루)(20x)의 상 이미지화 (10x)를 나타낸다.

도 6은 3D 콜라겐 I/IV 겔 내에서 배양된 인간 오가노이드를 나타낸다. A. 저 배양의 오가노이드 관 형성(화이트의 고리)를 나타내는 상 이미지. B. 나머지 오가노이드와 함께 보다 높은 배양(화이트의 고리)에서의 상 이미지. C. 20x 배양에서의 GGT-1 표현형 발현(그린), 핵(블루) D. CK18 발현(그린), 핵(블루).

도 7은 막 염료 표지된 오가노이드를 나타낸다. A. x100 배양에서 DiL(레드) 만으로 표지된 SRC. B. x100 배양에서 오가노이드 플러스(plus), DiL(레드)로 표지된 SRC, DiO(그린)로 표지된 HuVEC.

도 8은 SRC 집단(레드) 및 내피 세포(그린) 둘다의 존재를 나타내는 패널 A, B, 및 C에서 자가-산출된 오가노이드 플러스의 Col I/IV 겔 내에서 3D 관생성 검정을 나타낸다. 병합하는 경우, 집단은 황색으로 나타난다. 20x 배양에서 핵 염색 (블루).

도 9는 주사 전 SPI0 로다민 표지된 오가노이드(레드)를 나타낸다.

도 10은 오가노이드 체류 후-이식 그린=세포의 자기 공명 영상 (MRI)을 나타낸다. A. 24시간. B. 주사 후 48시간.

도 11은 저 및 고 배양에서 세포 체류 및 바이오-분포를 나타내는 이식된 오가노이드의 푸루시안 블루 염색을 나타낸다. A. 임플란트 후 24시간째에 이식된 좌측 신장. B. 임플란트 후 48시간째에 이식된 좌측 신장.

도 12는 본원에 기재된 오가노이드가 투여된 랫트 신장에서 인간 세포의 HLA1 염색을 나타내는 사진의 패널이다. A. 정상 인간 신장; B. 랫트 신장에서 인간 신장 세포. C. 처리되지 않은 신장적출된 랫트 신장. D. NKO 처리됨(저전력 현미경검사). E. NKO 처리됨(고전력 현미경검사). F. 제 2 NKO 처리된 동물. 패널 A 및 B는 정상 인간 신장 조직 뿐만 아니라 설치류 신장에 급성으로 전달된 인간 신장 세포(그린 화살표)의 염색(갈색)을 입증한다. 배경 염색은 황색 화살표에 의해 패널 C 및 F에서 확인된 것으로서 단백질성 캐스트(cast) 및 손상된 관의 "점성" 특성으로 인한 것으로 추정되는 비-처리된 질병이 있는 랫트 신장 연구의 말기에 존재한다. 이러한 염색은 전형적으로 색상에 있어서 더 열지만 때때로 어둡고 세포보다 크기가 더 작다. 패널 D, E 및 F는 암색으로 염색되는 세포를 확인하기 위한 스크리닝에 활용된 보다 낮은 배율을 입증하고, 이후에 HLA1 염색 세포(그린 화살표)의 보다 높은 배율을 입증한다.

특허 또는 출원 문서는 색상을 나타내는 적어도 하나를 함유한다. 채색된 도면(들)을 지닌 이들 특허 또는 특허 공보의 사본은 요청 및 필요한 요금의 지불시 사무국에 의해 제공될 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 발명의 상세한 설명

[0024] 많은 세포형이 신장 실질내 기능 단위인, 네프론을 구성한다. 정상 및 질병이 있는 동물 및 인간으로부터 치료학적으로 생리활성인 신장 세포를 분류하는 능력이 최근에 확립되었다¹⁻³. 이들 연구에 사용된 방법은 부력 밀도 구배 원심분리를 사용하여, 병든 조직 생검에 존재하는 신장 세포의 혼합물의 단리에 의존한다.

[0025] 일 측면에서, 본 발명은 신규의, 다중 강화된 세포형이 선택된 혼합물로서 조합될 수 있도록 하는 다양한 네프론 구획 또는 틈새의 선택된 개별적인 세포 집단의 단리, 확인 및 팽창에 관한 것이다. 본 발명의 신규의 선택된 혼합물은 신장 질환의 임상 및 병리생리학적 기초와 연관된 특수한 구조적 및 기능적 결핍의 개선된 표적화를 제공한다. 네프론을 구성하고 선택된 혼합물로서 조합된 다중의, 개별적인 세포형의 단리 및 강화는 특수한 신장 질환 집단의 개선된 표적화된 치료를 가능하도록 한다.

[0026] 세포형 예컨대 혈관 내피, 관형 및 집합관 상피, 간질성 세포, 사구체 세포, 간엽 줄기세포, 등은 생체외에서 단리되고, 확인되며 팽창될 수 있다. 각각의 세포형이 하위-배양물을 위한 독특한 방법 및 배지 체계를 필요로 할 수 있으나, 이들은 오가노이드 클러스터로서 선택적 조합 또는 혼합물로 다시 가해져서 기저를 이루는 신장

조직/특수한 급성 및/또는 만성적 신장 질환 환자 증후군/집단⁸과 연관된 세포 결핍에 대한 증대된 전달 및 개선된 치료를 제공할 수 있다.

[0027] 본 발명은 내피 세포에 대한 신장 관형 상피 세포의 소정의 비를 사용하여 맥관구조의 질병(예를 들면, 고혈압, 미세혈관병성 빈혈)과 연관된 신장 손상을 치료하는 방법을 고려한다. 선택적 배양계 및 자기성 분급을 사용하여 신장 내피 세포를 단리하고, 특성화하며 확장시키는 능력은 정제된 신장 내피 세포(SRC+)의 특수한 퍼센트를 지닌 이전에 특성화된 선택적 재생성 신장 상피 세포 (SRC) 집단^{2,4}의 강화를 허용한다. 본 발명의 SRC+ 세포 집단은 이전에 기재된 및 또한 본원에 기술된 바와 같은, 선택된 신장 세포(SRC 또는 BRC), 및 내피 세포, 내피 조상세포, 간엽 줄기세포, 및/또는 지방질-유도된 조상세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 추가의 생리활성 세포 집단으로 구성된다. 일 구현예에서, 추가의 생리활성 세포 집단은 신장 공급원으로부터 공급된다. 다른 구현예에서, 추가의 생리활성 세포 집단은 비-신장 공급원으로부터 공급된다.

[0028] 일 측면에서, 본 발명은 이중 혼합물 또는 선택된 또는 생리활성 신장 세포(SRC 또는 BRC) 또는 SRC+ 세포 집단의 분획을 포함하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드, 이를 단리하여 배양하는 방법, 및 본원에 기술된 바와 같은 오가노이드를 사용하는 치료 방법에 관한 것이다. SRC 또는 SRC+ 집단의 오가노이드로서 신장으로의 지시된 전달은 세포 체류를 개선시킴으로써, 개선된 전체 치료적 결과를 초래한다. 본 발명은 또한 SRC+ 세포 집단을 사용한 치료 방법에 관한 것이다.

[0029] **정의**

[0030] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술 및 과학 용어들은, 본 발명이 속한 당해 분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 가진다. 문헌[참고: *Principles of Tissue Engineering*, 3rd Ed. (Edited by R Lanza, R Langer, & J Vacanti), 2007]은 당해분야의 숙련자에게 본원에 사용된 많은 용어들에 대한 일반적인 안내를 제공한다. 당해 분야의 숙련자는 본 발명의 실시에서 사용될 수 있는, 본원에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 물질을 인식할 것이다. 실제로, 본 발명은 기재된 방법 및 물질에 사실상 제한되지 않는다.

[0031] 본원에 사용된 것으로서 용어 "세포 집단"은 적합한 조직 공급원, 일반적으로 포유동물로부터 직접 단리에 의해 수득된 세포의 수를 말한다. 단리된 세포 집단은 *시험관내*에서 차후에 배양될 수 있다. 당해분야의 숙련자는 본 발명과 함께 사용하기 위한 세포 집단을 단리하고 배양하는 다양한 방법 및 본 발명에서 사용하기에 적합한 세포 집단에서 다양한 수의 세포를 인식할 것이다. 세포 집단은 신장으로부터 유도된 미분획화, 이중성 세포 집단일 수 있다. 예를 들면, 이중성 세포 집단은 신장 생검 또는 전체의 신장 조직으로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, 이중성 세포 집단은 포유동물 세포의 *시험관내* 배양물로부터 유도되고, 신장 생검 또는 전체의 신장 조직으로부터 확립될 수 있다. 미분획화 이중성 세포 집단은 또한 비-강화된 세포 집단으로 불릴 수 있다.

[0032] 용어 "원상태 신장"은 살아있는 대상체의 신장을 의미할 수 있다. 대상체는 건강하거나 비-건강할 수 있다. 비-건강한 대상체는 신장 질환을 지닐 수 있다.

[0033] 용어 "재생 효과"는 원상태 신장에 대해 이점을 제공하는 효과를 의미할 수 있다. 당해 효과는 원상태 신장에 대한 손상의 정도에 있어서의 감소 또는 원상태 신장 기능에 있어서의 개선, 회복, 또는 안정화를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 신장 손상은 섬유증, 염증, 사구체 비대 등의 형태일 수 있으며 상기 대상체에서 신장 질환과 관련되어 있다.

[0034] 본원에 사용된 것으로서 용어 "재생성 잠재능" 또는 "잠재적 재생성 생리활성"은 본원에 기재된 생리활성 세포 제제 및/또는 혼합물을 포함함으로써 재생 효과를 제공하는 오가노이드의 잠재능을 말한다.

[0035] 본원에서 사용된 것으로서 용어 "혼합물은 미분획화, 이중성 세포 집단으로부터 유도된 2개 이상의 단리된, 강화된 세포 집단의 조합을 말한다. 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 세포 집단은 신장 세포 집단이다.

[0036] "강화된" 세포 집단 또는 제제는 개시 집단에서의 세포형의 퍼센트보다 더 큰 퍼센트의 특이적인 세포형을 함유하는 개시 신장 세포 집단(예를 들면, 미분획화, 이중성 세포 집단)으로부터 기원한 세포 집단을 말한다. 예를 들면, 개시 신장 세포 집단은 제 1, 제 2, 제 3, 제 4, 제 5 등의 목적한 세포 집단에 대해 강화될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포 집단", "세포 제제" 및 "세포 표현형"은 상호교환적으로 사용된다.

[0037] 일 측면에서, 본원에 사용된 것으로서 용어 "강화된" 세포 집단은 개시 신장 세포 집단에서 EPO를 생성할 수 있는 세포의 백분율보다 더 큰 EPO를 생성할 수 있는 세포의 백분율을 함유하는 개시 신장 세포 집단(예를 들면,

신장 생검 또는 배양된 포유동물 신장 세포로부터의 세포 현탁액)으로부터 유도된 세포 집단을 말한다. 예를 들면, 용어 "B4"는 개시 집단과 비교하여 보다 큰 백분율의 EPO-생성 세포, 사구체 세포, 및 혈관형 세포를 함유하는 개시 신장 세포 집단으로부터 유도된 세포 집단이다. 본 발명의 세포 집단은 하나 이상의 세포형으로 강화되고 하나 이상의 다른 세포형이 감소될 수 있다. 예를 들면, 강화된 EPO-생성 세포 집단은 간질성 섬유아세포로 강화되고 비-강화된 세포 집단, 즉 강화된 세포 집단이 유도된 개시 세포 집단에서 간질성 섬유아세포 및 관형 세포에 대해 관형 세포 및 집합관 상피 세포를 감소할 수 있다. EPO-강화된 또는 "B4" 집단을 인용하는 모든 구현예에서, 강화된 세포 집단은 내인성 원상태 EPO 유전자로부터 산소-조절가능한 EPO 발현에 의해 입증된 바와 같이, 산소-조절된 방식으로 EPO를 생성할 수 있는 세포를 함유하는 세포의 이중성 집단이다.

[0038]

또 하나의 측면에서, 개시 집단에서 세포형의 백분율보다 더 큰 백분율의 특이적인 세포형, 예를 들면, 혈관, 사구체, 또는 내분비 세포를 함유하는 강화된 세포 집단은 또한 건강한 개인 또는 대상체로부터 기원한 개시 신장 세포 집단과 비교하여, 하나 이상의 특이적인 세포형, 예를 들면, 혈관, 사구체, 또는 내분비 세포를 결여하거나 결핍할 수 있다. 예를 들면, 일 구현예에서 용어 "B4", 또는 "B4 프라임"은 건강한 개인과 비교하여, 개시 표본의 질병 상태에 따라 하나 이상의 세포형, 예를 들면, 혈관, 사구체 또는 내분비를 결여하거나 결실하는 개시 신장 세포 집단으로부터 기원한 세포 집단이다. 일 구현예에서, B4' 세포 집단은 만성적 신장 질환을 지닌 대상체로부터 유도된다. 일 구현예에서, B4' 세포 집단은 국소 분절 사구체경화증(FSGS)을 지닌 대상체로부터 기원한다. 또 하나의 구현예에서, B4' 세포 집단은 자가면역 사구체신염을 지닌 대상체로부터 기원한다. 또 하나의 측면에서, B4' 세포 집단은 모든 세포형, 예를 들면, 혈관, 사구체, 또는 내분비 세포를 포함하는 개시 세포 집단으로부터 유도되며, 이는 후에 하나 이상의 세포형, 예를 들면, 혈관, 사구체, 또는 내분비 세포를 감소하거나 결실하게 된다. 또 하나의 측면에서, B4'는 모든 세포형, 예를 들면, 혈관, 사구체, 또는 내분비 세포를 포함하는 개시 세포 집단으로부터 유도된 세포 집단으로부터 유도된 세포 집단이며, 여기서 하나 이상의 특이적인 세포형, 예를 들면, 혈관, 사구체, 또는 내분비 세포는 후에 강화된다. 예를 들면, 일 구현예에서, B4' 세포 집단은 혈관형 세포로 강화될 수 있으나 사구체 및/또는 내분비 세포를 감소할 수 있다. 또 하나의 구현예에서, B4' 세포 집단은 사구체 세포로 강화될 수 있으나 혈관 및/또는 내분비 세포를 감소할 수 있다. 또 하나의 구현예에서, B4' 세포 집단은 내분비 세포로 강화될 수 있으나 혈관 및/또는 사구체 세포를 감소할 수 있다. 또 하나의 구현예에서, B4' 세포 집단은 혈관 및 내분비 세포로 강화될 수 있으나 사구체 세포를 감소할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 단독으로 또는 또 하나의 강화된 세포 집단, 예를 들면, B2 및/또는 B3과 혼합된 B4' 세포 집단은 치료적 특성을 보유할 수 있다. 예를 들면, B4' 세포 집단은 본원의 실시예, 예를 들면, 실시예 7 내지 9에 기재되어 있다.

[0039]

또 하나의 측면에서, 강화된 세포 집단은 또한 하나 이상의 혈관, 사구체 및 근위 관형 마커를 발현하는 세포의 백분율과 개시 집단에서 일부 EPO-생성 세포와 함께 하나 이상의 혈관, 사구체 및 근위 관형 마커를 발현하는 세포의 백분율보다 큰 일부 EPO-생성 세포를 함유하는 상기 논의된 바와 같은 개시 신장 세포 집단으로부터 유도된 세포 집단을 말할 수 있다. 예를 들면, 용어 "B3"는 개시 집단과 비교하여 보다 큰 백분율의 근위 관형 세포 뿐만 아니라 혈관 및 사구체 세포를 함유하는 개시 신장 세포 집단으로부터 기원한 세포 집단을 말한다. 일 구현예에서, B3 세포 집단은 개시 집단과 비교하여 더 큰 백분율의 근위 관형 세포를 함유하지만 B2 세포 집단과 비교하여 더 적은 백분율의 근위 관형 세포를 함유한다. 또 하나의 구현예에서, B3 세포 집단은 개시 집단과 비교하여 일부 EPO-생성 세포와 함께 더 큰 백분율의 혈관 및 사구체 세포 마커를 함유하지만 B4 세포 집단과 비교하여 일부 EPO-생성 세포와 함께 보다 적은 백분율의 혈관 및 사구체 세포 마커를 함유한다.

[0040]

또 하나의 측면에서, 강화된 세포 집단은 또한 개시 집단에서 하나 이상의 관형 세포 마커를 발현하는 세포의 백분율보다 더 큰 하나 이상의 관형 세포 마커를 발현하는 세포의 백분율을 함유하는 상기에서 논의된 바와 같은 개시 신장 세포 집단으로부터 유도된다. 예를 들면, 용어 "B2"는 개시 집단과 비교하여 더 큰 백분율의 관형 세포를 함유하는 신장 세포 집단으로부터 유도된 세포 집단을 말한다. 또한, 하나 이상의 관형 세포 마커(또는 "B2")를 발현하는 세포가 강화된 세포 집단은 집합관 시스템으로부터의 일부 상피 세포를 함유할 수 있다. 하나 이상의 관형 세포 마커(또는 "B2")를 발현하는 세포가 강화된 세포 집단은 EPO-생성 세포, 사구체 세포, 및 혈관형 세포를 비교적 감소하고 있지만, 강화된 집단은 개시 집단과 비교시 더 작은 백분율의 이들 세포(EPO-생성, 사구체, 및 혈관)를 감소하고 있다. 일반적으로, 이중성 세포 집단은 하나 이상의 세포형을 감소함으로써 감소된 세포 집단이 감소 전의 이중성 세포 집단 내에 강화된 세포형(들)의 집단과 비교하여 보다 적은 비율의 세포형(들)을 함유하도록 한다. 감소될 수 있는 세포형은 임의의 유형의 신장 세포이다. 예를 들면, 어떤 구현예에서, 감소될 수 있는 세포형은 "B1"으로서 언급된 < 약 1.045 g/ml의 입도(granularity)를 갖는 집합관 및 관형 시스템의 거대 과립성을 지닌 세포를 포함한다. 어떤 다른 구현예에서, 감소될 수 있는 세포형은, "B5"로서 언급된 > 약 1.095 g/ml의 밀도를 지닌 저 입도 및 생존능의 잔해 및 소세포를 포함한다. 일

부 구현예에서, 관형 세포로 강화된 세포 집단은 다음의 "B1", "B5", 산소-조절가능한 EPO-발현 세포, 사구체 세포, 및 혈관형 세포 모두가 비교적 감소되어 있다.

- [0041] 본원에서 사용된 것으로서 용어 "저산소성" 배양 조건은, 세포가 대기 산소 수준(약 21%)에서 배양되는 표준 배양 조건과 비교하여 배양계에서 이용가능한 산소 수준에 있어서의 감소에 적용된 배양 조건을 말한다. 저-저산소 조건은 본원에서 정상 또는 노르모식 배양 조건(normoxic culture condition)으로 언급된다.
- [0042] 본원에서 사용된 것으로서 용어 "산소-조절가능한"은 세포에 대해 이용가능한 산소의 양을 기준으로 하여 유전자 발현을(상향으로 또는 하향으로) 조절하는 세포의 능력을 말한다. "저산소증-유도가능한"은 산소 긴장(전-유도 또는 개시 산소 긴장에 상관없이)에 있어서의 감소에 반응한 유전자 발현의 상향조절을 말한다.
- [0043] 용어 "스페로이드"는 단층으로서의 성장과 대조되는 것으로서 3D 성장을 허용하도록 배양된 세포의 응집물 또는 어셈블리를 말한다. 용어 "스페로이드"는, 응집물이 기하학적 구형체임을 내포하지 않는다. 응집물은 잘 정의된 형태학으로 고도로 구조화될 수 있거나 비조직화된 덩어리일 수 있고; 이는 단일 세포형 또는 하나 이상의 세포형을 포함할 수 있다. 세포는 일차 분리체, 또는 영구적 세포주, 또는 2개의 조합일 수 있다. 이러한 정의에는 오가노이드 및 유기형 배양물이 포함된다.
- [0044] 본원에서 사용된 것으로서 용어 "오가노이드"은 원상태 기관 내에 존재하는 세포성 자가-구조화, 구조 및 신호 전달 상호작용의 측면의 개요를 말하는 세포의 이중성 3D 응집을 말한다. 용어 "오가노이드"은 서스펜션 세포 배양물로부터 형성된 스페로이드 또는 세포 클러스터를 포함한다.
- [0045] 본원에서 사용된 것으로서 용어 "바이오재료"은 살아있는 조직내로의 도입에 적합한 천연 또는 합성 바이오재료를 말한다. 천연 바이오재료는 살아있는 시스템으로 제조된 물질이다. 합성 바이오재료는 살아있는 시스템으로 제조되지 않은 물질이다. 본원에 개시된 바이오재료는 천연 및 합성 바이오재료의 조합일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 바이오재료는 예를 들면, 폴리머 매트릭스 및 스캐폴드(scaffold)를 포함한다. 당해 분야의 숙련가는, 바이오재료(들)이 다양한 형태, 예를 들면, 액체 하이드로겔 서스펜션, 다공성 폼(porous foam)으로 구성될 수 있으며, 하나 이상의 천연 또는 합성 바이오재료를 포함할 수 있음을 인지할 것이다.
- [0046] 용어 "작제물"은 하나 이상의 합성 또는 천연 발생 바이오재료로 제조된 스캐폴드 또는 매트릭스의 표면 상에 또는 내에 침착된 하나 이상의 세포 집단을 말한다. 하나 이상의 세포 집단은 하나 이상의 합성 또는 천연 발생 생체적합성 폴리머, 단백질, 또는 펩타이드로 제조된 생체물질로 코팅되거나, 내에 포매되거나, 부착되거나, 씨딩되거나, 또는 간헐 수 있다. 하나 이상의 세포 집단은 바이오재료 또는 스캐폴드 또는 매트릭스와 *시험관내* 또는 *생체내*에서 조합될 수 있다. 일반적으로, 스캐폴드/바이오재료를 형성하는데 사용된 하나 이상의 바이오재료는 이에 침착된 적어도 하나의 세포 집단의 다중세포, 3차원, 작제물의 형성을 지시하거나, 촉진하거나, 허용하기 위해 선택된다. 작제물을 산출하는데 사용된 하나 이상의 바이오재료는 작제물 또는 작제물의 세포성 성분과 내인성 숙주 조직의 분산 및/또는 통합을 지시하거나, 촉진하거나, 허용하기 위해, 또는 작제물 또는 작제물의 세포성 성분의 생존, 접목, 내성, 또는 기능적 성능을 지시하거나, 촉진하거나, 허용하기 위해 선택될 수 있다.
- [0047] 용어 "마커" 또는 "바이오마커"는 배양된 세포 집단 내에서 이의 발현 또는 존재가 표준 방법(또는 본원에 개시된 방법)에 의해 검출될 수 있고 특정한 세포 유형인 배양된 세포 집단 내에서 하나 이상의 세포와 일치되는 DNA, RNA, 단백질, 탄수화물, 또는 당지질-계 분자 마커를 말한다. 마커는 세포에 의해 발현된 폴리펩타이드, 염색체, 예컨대 유전자 상의 확인가능한 물리적 위치, 제한 엔도뉴클레아제 인식 부위 또는 원상태 세포에 의해 발현된 폴리펩타이드(예를 들면, mRNA)를 암호화하는 핵산일 수 있다. 마커는 "유전자 발현 마커", 또는 공지된 암호화 기능이 없는 DNA의 일부 분절로 언급된 유전자의 발현된 영역일 수 있다. 바이오마커는 세포-유도된, 예를 들면, 분비된, 생성물일 수 있다.
- [0048] 용어 "차별적으로 발현된 유전자", "차별적인 유전자 발현" 및 상호 교환적으로 사용되는 이들의 동의어는, 이의 발현이 제 2의 세포 또는 세포 집단에서 이의 발현과 비교하여, 제1의 세포 또는 세포 집단에서 보다 높거나 보다 낮은 수준으로 활성화되는 유전자를 말한다. 당해 용어는 또한, 이의 발현이 배양물 내에서 제1 또는 제2의 세포의 계대배양 동안 시간에 걸쳐 상이한 단계에서 보다 높은 또는 보다 낮은 수준으로 활성화되는 유전자를 포함한다. 이는 또한, 차별적으로 발현된 유전자가 핵산 수준 또는 단백질 수준에서 활성화되거나 억제될 수 있거나, 대안적인 스플라이싱에 처해져서 상이한 폴리펩타이드 생성물을 산출할 수 있는 것으로 이해된다. 이러한 차이는 mRNA 수준, 표면 발현, 분비 또는 폴리펩타이드의 다른 분배에 있어서의 변화에 의해 입증될 수 있다. 차별적인 유전자 발현은 2개 이상의 유전자 또는 이의 유전자 생성물의 비교, 또는 2개 이상의 유전자 또

는 이의 유전자 생성물 사이의 발현의 비의 비교, 또는 심지어 제1의 세포와 제2의 세포 사이에서 상이한, 동일한 유전자의 2개의 차별적으로 발현된 생성물의 비교를 포함할 수 있다. 차별적인 발현은 예를 들면, 제1의 세포 및 제2의 세포 중에서 유전자 또는 이의 발현 생성물에 있어서 일시적이거나 세포성 발현 패턴에 있어서 정량적뿐만 아니라 정성적 차이 둘다를 포함한다. 본 발명의 목적을 위해, "차등적 유전자 발현"은, 제1 및 제2의 세포에서 제공된 유전자의 발현 사이에 차이가 존재하는 경우 존재하는 것으로 고려된다. 마커의 차별적 발현은 투여 후 환자로부터의 세포(제 2의 세포)에서의 발현에 대해 상대적인, 세포 집단, 혼합물, 또는 작제물의 투여 전 환자로부터의 세포(제1의 세포)일 수 있다.

[0049] 용어 "억제하다", "하향-조절하다", "하-발현하다(under-express)" 및 "감소하다"는 상호교환적으로 사용되며 유전자의 발현, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 서브유닛을 암호화하는 RNA 분자 또는 등가의 RNA 분자, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 서브유닛의 활성이 하나 이상의 작제물, 예컨대, 예를 들면, 하나 이상의 양성 및/또는 음성 대조군과 비교하여 감소된 것을 의미한다. 하-발현은 세포 집단, 혼합물, 또는 작제물의 투여 후 환자로부터의 세포와 비교하여 이의 투여 전 환자로부터의 세포일 수 있다.

[0050] 용어 "상향-조절하다" 또는 "과-발현하다"는, 유전자의 발현, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 서브유닛을 암호화하는 RNA 분자 또는 등가의 RNA 분자의 수준, 또는 하나 이상 단백질 또는 단백질 서브유닛의 활성이 하나 이상의 대조군, 예컨대, 예를 들면, 하나 이상의 양성 및/또는 음성 대조군과 비교하여 상승됨을 의미하는데 사용된다. 과-발현은 세포 집단, 혼합물, 또는 작제물의 투여 전 환자로부터의 세포와 비교하여 이의 투여 후 환자로부터의 세포일 수 있다.

[0051] 본원에 사용된 것으로서 용어 "빈혈"은 대상체의 EPO-생성 세포에 의한 기능적 EPO 단백질의 부적절한 생성, 및/또는 전신계 순환내로 EPO 단백질의 부적절한 방출, 및/또는 EPO 단백질에 반응하기 위한 골수내 적모세포의 무능으로 인한 적혈구 수 및/또는 헤모글로빈 수준에 있어서의 결핍을 말한다. 빈혈이 있는 대상체는 적혈구 항상성을 유지할 수 없다. 일반적으로, 빈혈은 신장 기능의 쇠퇴 또는 손실(예를 들면, 만성적 신부전), 상대적인 EPO 결핍과 관련된 빈혈, 울혈성 심장기능상실과 관련된 빈혈, 골수-억제성 요법, 예컨대 화학요법 또는 항-바이러스 요법(예를 들면, AZT)과 관련된 빈혈, 비-골수 암과 관련된 빈혈, 바이러스성 감염 예컨대 HIV와 관련된 빈혈, 및 만성 질환, 예컨대 자가면역 질환(예를 들면, 류마티스성 관절염), 간 질환, 및 다중-기관계 고장의 빈혈로 발생할 수 있다.

[0052] 용어 "EPO-결핍증"은 빈혈을 포함하는, 에리트로포이에틴 수용체 작용제(예를 들면, 제조합 EPO 또는 EPO 유사체)로 치료가 가능한 어떠한 병태 또는 장애를 말한다.

[0053] 본원에 사용된 것으로서 용어 "기관-관련된 질환"은 이의 기능을 수행하기 위한 기관의 능력의 손실을 초래하는 급성 또는 만성적 기관 부전의 어떠한 단계 또는 정도와 관련된 질환을 말한다.

[0054] 본원에서 사용된 것으로서 "신장 질환"은 혈액 여과의 기능 및 혈액으로부터의 과잉의 유체, 전해질, 및 폐기물의 제거를 수행하는 신장의 능력의 손실을 초래하는 급성 또는 만성적 신부전의 어떠한 단계 또는 정도와 관련된 질환을 말한다. 신장 질환은 또한 내분비 기능이상, 예컨대 빈혈(에리트로포이에틴-결핍), 및 미네랄 불균형(비타민 D 결핍)를 포함한다. 신장 질환은 신장에서 기원할 수 있거나 심부전, 고혈압, 당뇨병, 자가면역 질환, 또는 간 질환을 포함하는(그러나 그에 국한되지 아니하는), 다양한 상태에 대해 2차적일 수 있다. 신장 질환은 신장에 대한 급성 손상 후 발달되는 만성적 신부전의 상태일 수 있다. 예를 들면, 허혈 및/또는 독물에 대한 노출에 의한 신장에 대한 손상은 급성 신부전을 유발할 수 있으며; 급성 신장 손상후 불완전한 회복은 만성적 신부전의 발달을 초래할 수 있다.

[0055] 용어 "치료"는 신장 질환, 빈혈, EPO 결핍, 관형 수송 결핍, 또는 사구체 여과 결핍에 대한 치료적 처치 및 예방 또는 방지적 척도 둘 다를 말하며, 여기서 본 목적은 표적화된 장애를 회복시키거나, 예방하거나 지연(약화)시키는 것이다. 치료가 요구되는 것은 신장 질환, 빈혈, EPO 결핍, 관형 수송 결핍, 또는 사구체 여과 결핍이 이미 있는 것들 뿐만 아니라 신장 질환, 빈혈, EPO 결핍, 관형 수송 결핍, 또는 사구체 여과 결핍을 지니는 경향이 있는 것들 또는 신장 질환, 빈혈, EPO 결핍, 관형 수송 결핍, 또는 사구체 여과 결핍이 예방되어야 하는 것들을 포함한다. 본원에서 사용된 것으로서 용어 "치료"는 신장 기능의 안정화 및/또는 개선을 포함한다.

[0056] 용어 "대상체"는 신장 질환, 빈혈, 또는 EPO 결핍의 하나 이상의 신호, 증상, 또는 다른 전조를 경험하고 있거나 경험한, 치료에 적절한 환자를 포함하는, 어떠한 단일 인간 대상체를 의미한다. 이러한 대상체는 원인에 상관없이, 신장 질환, 빈혈, 또는 EPO 결핍으로 새로이 진단되거나, 이미 진단되었거나 현재 재발생 또는 재발을 경험중이거나, 위협에 있는 대상체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 대상체는 신장 질환, 빈혈, 또는

EPO 결핍에 대해 이미 치료되거나, 또는 치료되지 않을 수 있다.

[0057] 용어 "환자"는 예를 들면, 치료가 요구되는 어떠한 단일 동물, 더 바람직하게는 포유동물(비-인간 동물, 예를 들면, 개, 고양이, 말, 토끼, 동물원 동물, 소, 돼지, 양, 및 비-인간 영장류 포함)을 말한다. 가장 바람직하게는, 본원의 환자는 인간이다.

[0058] 용어 "샘플" 또는 "환자 샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 일반적으로 대상체 또는 환자, 체액, 체 조직, 세포주, 조직 배양, 또는 다른 공급원로부터 수득한 어떠한 생물학적 샘플을 의미할 것이다. 당해 용어는 조직 생검 예컨대, 예를 들면, 신장 생검을 포함한다. 당해 용어는 배양 세포, 예컨대, 예를 들면, 배양된 포유동물 신장 세포를 포함한다. 조직 생검 및 포유동물로부터 배양된 세포를 수득하는 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 용어 "샘플"이 단독으로 사용되는 경우, 이는, "샘플"이 "생물학적 샘플" 또는 "환자 샘플"임을 여전히 의미하는데, 즉, 당해 용어들은 상호교환적으로 사용된다.

[0059] 용어 "시험 샘플"은 본 발명의 방법으로 치료되는 대상체로부터의 샘플을 말한다. 시험 샘플은 비제한적으로, 혈액, 정액, 혈청, 소변, 골수, 점막, 조직 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는 포유동물 대상체에서의 다양한 공급원으로부터 기원할 수 있다.

[0060] 용어 "대조군" 또는 "대조군 샘플"은, 음성 또는 긍정적인 결과가 시험 샘플에서의 결과와 관련되도록 돕는 것으로 기대되는 음성 또는 양성 대조군을 말한다. 본 발명에 적합한 대조군은 정상의 적혈구 항상성의 표지자 특징을 나타내는 것으로 공지된 샘플, 빈혈이 표지자 특징을 나타내는 것으로 공지된 샘플, 빈혈이 아닌 것으로 공지된 대상체로부터 수득된 샘플, 빈혈로 공지된 대상체로부터 수득된 샘플을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 방법에서 사용하기에 적합한 추가의 대조군은 비제한적으로, 적혈구생성을 조절하는 것으로 공지된 약리학적 제제(예를 들면, 재조합 EPO 또는 EPO 유사체)로 치료된 대상체로부터 기원한 샘플을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 대조군은 본 발명의 방법으로 치료되기 전 대상체로부터 수득된 샘플일 수 있다. 추가의 적합한 대조군은, 신장 질환이 어떠한 유형 또는 단계를 지닌 것으로 공지된 대상체로부터 입수된 시험 샘플, 및 신장 질환의 어떠한 유형 또는 단계를 지니지 않은 것으로 공지된 대상체로부터의 샘플일 수 있다. 대조군은 정상의 건강하게 매칭된 대조군일 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 본 발명에 사용하기에 적합한 다른 대조군을 잘 인식할 것이다.

[0061] "재생 진단", "재생적 진단", 또는 "재생용 진단"은 일반적으로 본원에 개시된 세포 집단, 혼합물 또는 작제물의 투여 또는 이식의 정량적 재생 과정 또는 결과의 예상 또는 예측을 말한다. 재생 진단의 경우, 예상 또는 예측은 다음 중 하나 이상에 의해 통지될 수 있다: 이식 또는 투여 후 기능적 기관(예를 들면, 신장)의 개선, 이식 또는 투여 후 기능적 신장의 발달, 이식 또는 투여 후 개선된 신장 기능 또는 능력의 발달, 및 이식 또는 투여 후 원상태 신장에 의한 특징의 마커의 발현.

[0062] "재생된 기관"은 본원에 개시된 바와 같은 세포 집단, 혼합물, 또는 작제물의 이식 또는 투여 후 원상태 기관을 말한다. 재생된 기관은 원상태 장기에서 기능 또는 수용력의 발달, 원상태 장기에서 기능 또는 수용력의 개선, 및 원상태 기관에서 특정 마커의 발현을 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 표지자에 의해 특성화된다. 당해 분야의 숙련가는, 다른 표지자가 재생된 기관을 특성화하는데 적합할 수 있음을 인식할 것이다.

[0063] "재생된 신장"은 본원에 기재된 바와 같은 세포 집단, 혼합물, 또는 작제물의 이식 또는 투여 후 원상태 신장을 말한다. 재생된 신장은 원상태 신장에서의 기능 또는 수용력의 발달, 원상태 신장에서의 기능 또는 수용능의 개선, 및 원상태 신장에서의 특정 마커의 발현을 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 표지자에 의해 특성화된다. 당해 분야의 숙련가는, 다른 표지자도 재생된 신장을 특성화하는데 적합할 수 있음을 인식할 것이다.

[0064] SRC+ 세포 집단

[0065] 본 발명은 특수한 생리활성 성분 또는 세포형이 강화되고/되거나 특수한 불활성 또는 원하지 않는 성분 또는 세포형이 감소된, 신장 세포의 단리된, 이중성 집단을 포함하는 세포 집단 및 급성 또는 만성적 신장 질환을 치료하는데 사용하기 위한, 내피 세포, 내피 조상세포, 간엽 줄기세포, 지방질-유도된 조상세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는 추가의 생리활성 세포 집단을 제공한다. 특수한 생리활성 성분 또는 세포형이 강화되고/되거나 특수한 불활성 또는 원하지 않는 성분 또는 세포형이 감소된, 신장 세포의 단리된, 이중성 집단은 본원에 기재된 바와 같은 세포 집단 중 어느 것도 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 추가의 생리활성 성분, 예를 들면, 내피 세포, 내피 조상세포, 간엽 줄기세포, 지방질-유도된 조상세포는 신장 세포의 단리된, 이중성 집단과 혼합되고/되거나, 특수한 생리활성 성분 또는 세포형에 대해 강화되고/되거나 특수한 불활성 또는 원하지 않는 성분 또는

세포형이 감소된다. 본 발명은, 또 하나의 측면에서, 본원에 기재된 바와 같이 SRC+ 세포 집단을 제조하는 방법을 제공한다. 세포 집단을 포함하는 추가의 생리활성 성분, 예를 들면, 내피 세포, 내피 조상세포, 간엽 줄기세포, 지방질-유도된 조상세포는 세포 또는 조직 결핍을 개선시키는데 충분한 어떠한 백분율로도 존재할 수 있다.

[0066] 본 발명의 세포 집단은 세포 집단을 포함하는 하나 이상의 추가의 생리활성 성분, 예를 들면 비제한적으로, 내피 세포, 내피 조상세포, 간엽 줄기세포, 지방질-유도된 조상세포를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 세포 집단은 2개의 추가의 생리활성 성분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포 집단은 3개의 추가의 생리활성 성분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포 집단은 4개의 추가의 생리활성 성분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포 집단은 5개의 추가의 생리활성 성분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포 집단은 6개의 추가의 생리활성 성분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포 집단은 7개의 추가의 생리활성 성분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포 집단은 8개의 추가의 생리활성 성분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포 집단은 9개의 추가의 생리활성 성분을 포함한다. 어떤 구현예에서, 세포 집단은 10개의 추가의 생리활성 성분을 포함한다.

[0067] 일 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 상피 세포이다. 일 구현예에서, 상피 세포는 근위 관형 상피 세포이다. 또 하나의 구현예에서, 상피 세포는 원위 관형 상피 세포이다. 또 하나의 구현예에서, 상피 세포는 벽쪽 상피 세포이다.

[0068] 또 하나의 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 상피 세포이다. 일 구현예에서, 상피 세포는 정맥 내피 세포이다. 일 구현예에서, 상피 세포는 동맥 내피 세포이다. 일 구현예에서, 상피 세포는 모세혈관 내피 세포이다. 일 구현예에서, 상피 세포는 림프 내피 세포이다.

[0069] 또 하나의 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 집합관형 세포이다. 또 하나의 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 평활근 세포이다. 또 하나의 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 간엽 줄기세포이다. 또 하나의 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 내피, 간엽, 상피 또는 조혈 계통의 조상세포이다. 또 하나의 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 내배엽, 외배엽성 또는 간엽 배아 기원의 조상세포이다. 어떤 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 비제한적으로 배아(ES) 및 유도된 만능성(iPS) 줄기세포를 포함하는, 어떠한 기원 또는 유도의 줄기세포이다. 일부 구현예에서, 추가의 생리활성 성분 비제한적으로 배아(ES) 및 유도된 만능성(iPS) 줄기세포를 포함하는, 어떠한 기원 또는 유도의 줄기세포의 유도체이며, 여기서 상기 유도체는 소분자 및/또는 단백질 및/또는 핵산 분자의 정의된 조합 또는 콕테일에 의해 줄기 세포의 직접적인 분화에 의해 산출될 수 있다. 일 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 내피, 간엽, 상피 또는 조혈 계통의 조상세포의 유도체이며, 여기서 상기 유도체는 소분자 및/또는 단백질 및/또는 핵산 분자의 정의된 조합 또는 콕테일에 의해 줄기세포의 직접적인 분화에 의해 산출될 수 있다. 일 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 내배엽, 외배엽성 또는 간엽 배아 기원의 조상세포의 유도체이며, 여기서 상기 유도체는 소분자 및/또는 단백질 및/또는 핵산 분자의 정의된 조합 또는 콕테일에 의해 줄기세포의 직접적인 분화에 의해 산출될 수 있다. 일 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 어떠한 계통 또는 유도의 유전적으로 변형된 세포이다.

[0070] 또 하나의 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 간질성 세포이다. 일 구현예에서, 간질성 세포는 지지적 섬유아 세포이다. 또 하나의 구현예에서, 간질성 세포는 특화된 피질 에리트로포이에틴-생성 섬유아세포이다.

[0071] 일 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 상기 대상체에 대해 자가조직인 공급원으로부터 유도된다. 다른 일 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 상기 대상체에 대해 동종이계인 공급원으로부터 유도된다. 어떤 구현예에서, 추가의 생리활성 성분은 상기 대상체에 대해 자가 조직인 공급원으로부터 유도되며, 이의 추가의 생리활성 성분은 상기 대상체에 대해 동종이계인 공급원으로부터 유도된 추가의 생리활성 성분과 조합된 혼합물이다.

[0072] 본 발명은 특정 측면에서 본원에 기재된 세포 집단 및/또는 오가노이드 및/또는 바이오재료가 직접적인 전달에 의한 신장 덩어리 및 기능성의 표적화된 재생 방법을 제공한다. 본 발명은 추가로, 어떤 다른 측면에서, 본원에 기재된 세포 집단 및/또는 오가노이드 및/또는 바이오재료의 투여에 의해 급성 또는 만성적 신장 질환을 지닌 환자에서 신장 작용성의 구제 및/또는 회복 방법을 제공한다.

[0073] 치료적 오가노이드

[0074] 본 발명은 추가로 불활성 또는 원하지 않는 성분, 예를 들면, 단독 또는 급성 및/또는 만성 신장 질환의 치료에 사용하기 위해 혼합된, B1 및 B5가 감소된, 본원에 기재된 생리활성 성분, 예를 들면, B2, B4, 및 B3을 포함하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드를 제공한다. 일 국면에서, 본 발명은 단독으로 또는 다른 생리활성 소분획, 예를 들면, B2 및/또는 B3와 혼합된, 하나 이상의 세포형, 예를 들면, 혈관, 내분비, 또는 내피에서 감소되거나 결손된 특수한 소분획, B4, 즉, 치료적 특성, 예를 들면, 신장 기능의 안정화 및/또는 개선 및/또는 재생

을 보유한 B4'를 포함하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드를 제공한다. 바람직한 구현예에서, 생리활성 세포 집단은 B2이다. 어떤 구현예에서, B2 세포 집단은 B4 또는 B4'와 혼합된다. 다른 구현예에서, B2 세포 집단은 B3와 혼합된다. 다른 구현예에서, B2 세포 집단은 B3 및 B4 둘 다, 또는 B3 및/또는 B4의 특수한 세포성 성분과 혼합된다. 모든 구현예에서, 본 발명의 오가노이드는 *생체외에서* 형성되어 배양된다. 모든 구현예에서, 오가노이드는 내피 세포, 내피 조상세포, 간엽 줄기세포, 지방질-유도된 조상세포를 포함하는 생리활성 세포 집단을 포함하고/하거나 이로부터 추가로 형성될 수 있다. 일 구현예에서, 내피 세포, 내피 조상세포, 간엽 줄기세포, 지방질-유도된 조상세포를 포함하나 이에 한정되지 않는 추가의 생리활성 세포 집단은 신장 세포의 단리된, 이중성 집단과 혼합되고/되거나, 특수한 생리활성 성분 또는 세포형으로 강화되고/되거나 특수한 불활성 또는 원하지 않는 성분 또는 세포형이 감손되어 있다.

[0075] 일 구현예에서, 본 발명의 오가노이드는 B2 세포 집단을 포함하거나 이로부터 형성되며, 여기서 상기 B2 세포 집단은 관형 세포의 강화된 집단을 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 이중성 신장 세포 집단은 B4 세포 집단을 추가로 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 이중성 신장 세포 집단은 B3 집단을 추가로 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 이중성 신장 세포 집단은 B5 집단을 추가로 포함한다.

[0076] 어떤 구현예에서, 세포 집단은 B2 세포 집단을 포함하며, 여기서 상기 B2 세포 집단은 간형 세포의 강화된 집단을 포함하고 B1 세포 집단, 및/또는 B5 세포 집단이 감손되어 있다.

[0077] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 생리활성 성분, 예를 들면, 불활성 또는 원하지 않는 성분, 예를 들면, 단독의 또는 혼합된 B1 및 B5가 감손된 B2, B4, 및 B3를 포함하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드를 형성하는 방법을 제공한다. 일 측면에서, 본 발명은 단독으로 또는 다른 생리활성 소분획, 예를 들면, B2 및/또는 B3와 혼합되는 경우, 하나 이상의 세포형, 예를 들면, 혈관, 내분비, 또는 내피에서 감손되거나 결손된 특수한 소분획, B4, 즉 치료적 특성, 예를 들면, 신장 기능의 안정화 및/또는 개선 및/또는 재생을 보유한 B4'를 포함하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 생리활성 세포 집단은 B2이다. 어떤 구현예에서, B2 세포 집단은 B4 또는 B4'와 혼합된다. 다른 구현예에서, B2 세포 집단은 B3와 혼합된다. 다른 구현예에서, B2 세포 집단은 B3 및 B4 둘 다, 또는 B3 및/또는 B4의 특수한 세포성 성분과 혼합된다.

[0078] 일 구현예에서, 본 발명의 오가노이드는 B2 세포 집단을 포함하고/하거나 이로부터 형성되며, 여기서 상기 B2 세포 집단은 관형 세포의 강화된 집단이다. 또 하나의 구현예에서, 이중 신장 세포 집단은 B4 세포 집단을 추가로 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 이중성 신장 세포 집단은 B3 집단을 추가로 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 이중성 신장 세포 집단은 B5 집단을 추가로 포함한다.

[0079] 어떤 구현예에서, 세포 집단은 B2 세포 집단을 포함하고, 여기서 상기 B2 세포 집단은 관형 세포의 강화된 집단을 포함하고 B1 세포 집단, 및/또는 B5 세포 집단이 감손되어 있다.

[0080] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 생리활성 세포 제제 및/또는 혼합물을 사용하여 오가노이드를 형성하는 방법을 제공한다. 3D COL(I) 겔 배양물을 사용하여 일차 신장 세포 집단으로부터 소관을 산출하는 일반적인 방법은 예를 들면, 문헌[참고: Joraku *et al.*, Methods. 2009 Feb;47(2):129-33]에서와 같이, 당해 분야에 공지되어 있다. 모든 구현예에서, 본 발명의 오가노이드는 생체외에서 형성되어 배양된다.

[0081] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 생리활성 세포 제제 및/또는 혼합물로부터 오가노이드 및 소관의 형성은 예를 들면 및 비제한적으로, 하기 배양물 방법 또는 시스템을 사용하여 유도시킬 수 있다: i) 2D 배양물; ii) 3D 배양물: COL(I) 겔; iii) 3D 배양물: 매트릭스겔; iv) 3D 배양물: 스핀너(spinner), 이후에 COL(I)/매트릭스겔; 및 v) 3D 배양물: COL(IV) 겔. NKA로부터 오가노이드 및 소관의 형성의 구체적인 예는 하기 2 및 4에서 제공된다.

[0082] 일 구현예에서, 본원에 기재된 생리활성 세포 제제 및/또는 혼합물로부터 형성된 오가노이드는 2D 배양물에서 유도될 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 생리활성 세포 제제 및/또는 혼합물은 표준 2D 플라스틱-웨어에 씨딩(seeding)된다. 일 구현예에서, 세포는 약 5000 세포/cm²의 밀도에서 씨딩된다. 세포는 적절한 배지, 예컨대, 예를 들면 신장 세포 완벽한 성장 배지(RCGM) 내에 씨딩될 수 있다. 일반적으로, 세포 집단은 약 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 일 이상 동안 매 3 내지 4일마다 배지의 일정한 교환과 함께 합치성 후까지 성장시킬 수 있다. 일 구현예에서, 세포는 약 7 내지 약 15 일 사이에 스페로이드 구조, 즉, 오가노이드, 및 소관으로의 자발적인 자가-구조화를 입증한다.

[0083] 또 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 생리활성 세포 제제 및/또는 혼합물로부터 형성된 오가노이드는 3D 배양물 내에서 유도될 수 있다. 일 구현예에서, 오가노이드는 본 발명의 세포 집단과 천연 또는 합성 기원의 바이오 재료 스캐폴드와 함께 산출된다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 제형화된 생리활성 세포 제제 및/또는 혼합물은

이전에 기재된 바와 같이(참고: Guimaraes-Souza et al., 2012. *In vitro reconstitution of human kidney structures for renal cell therapy*. Nephrol Dial Transplant 0: 1-9) 콜라겐 (I) 겔, 콜라겐 (IV) 겔, 매트릭스 또는 이들 중의 어느 것의 혼합물내로 편입될 수 있다. 액체 겔은 중성 pH를 가져올 수 있으며 본원에 기재된 생리활성 세포 제제 및/또는 혼합물은 약 500 내지 2500 세포/u1에서 혼합된다. 일 구현예에서, 약 1000 세포/u1가 혼합된다. 세포/겔 혼합물은 24 웰 플레이트, 예를 들면, (약 200 내지 약 400u1/웰)에 분주되어 37 °C에서 몇 시간 동안 고화되도록 한다. 이후에 세포 배양 배지가 첨가될 수 있고 배양물을 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10 일 동안 배지를 규칙적으로 변화시키면서 성숙시킬 수 있다. 일 구현예에서, 관형 구조의 네트워크는 본원에 기재된 생리활성 세포 제제 및/또는 혼합물에 의해 겔 매트릭스 전체에서 격자 및 고리 형으로서 구조화된다.

[0084] 또 하나의 구현예에서, 오가노이드는 본원에 기재된 생리활성 세포 제제 및/또는 혼합물의 현탁 배양에 의해 스피너 플라스크 또는 저-결합 플라스틱웨어 내에서 형성될 수 있다. 일 구현예에서, 세포는 스피너 플라스크 내의 배지 내에서 최대 4 일 동안 약 80rpm에서 배양될 수 있다. 이후에, 스페로이드를 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10 일 동안 예를 들면, 매트릭스 코팅된 플레이트에서 추가로 배양할 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 생리활성 세포 제제 및/또는 혼합물로부터 형성된 스페로이드는 배양된 스페로이드로부터의 관형 구조의 드노보 발아(de novo budding)에 의해 나타난 바와 같은 관생성 잠재능을 나타낸다.

[0085] 세포 집단

[0086] 본 발명의 SRC+ 세포 집단 및/또는 오가노이드는 신장 질환의 치료시 사용하기 위한, 즉, 이의 전원이 본원에 참고로 편입된 문헌(참고: Presnell et al. U.S. 2011-0117162 및 Ilagan et al. PCT/US2011/036347)에 이미 기술된, 신장 기능의 안정화 및/또는 개선 및/또는 재생을 제공하는, 특수한 생리활성 성분이 강화되고/되거나 특수한 불활성 또는 원하지 않는 성분이 감소된 신장 세포의 단리된, 이종성 집단, 및 이들의 혼합물을 함유하고/하거나 이로부터 형성될 수 있다. 오가노이드는 치료적 특성을 여전히 보유하는, 즉, 신장 기능의 안정화 및/또는 개선 및/또는 재생을 제공하는 건강한 개인과 비교하여 세포 성분을 결여하고 있는 단리된 신장 세포 분획을 함유할 수 있다. 본원에 기재된 세포 집단, 세포 분획, 및/또는 세포의 혼합물은 건강한 개인, 신장 질환을 지닌 개인, 또는 본원에 기재된 바와 같은 대상체로부터 유도될 수 있다.

[0087] 생리활성 세포 집단

[0088] 본 발명은 필요로 하는 대상체에서 기관 또는 조직을 표적화하기 위해 투여될 생리활성 세포 집단을 포함하는 SRC+ 세포 집단 및 치료적 오가노이드를 고려한다. 생리활성 세포 집단은 일반적으로 대상체에 투여 시 치료적 특성을 잠재적으로 지닌 세포 집단을 말한다. 예를 들면, 필요한 대상체에 투여시, 생리활성 신장 세포 집단을 포함하는 오가노이드는 상기 대상체에서 신장 기능의 안정화 및/또는 개선 및/또는 재생을 제공할 수 있다. 치료적 특성은 재생 효과를 포함할 수 있다.

[0089] 생리활성 세포 집단은 비제한적으로, 줄기세포(예를 들면, 만능성, 다능성, 올리고효능성, 또는 단일효능성), 예컨대 배아 줄기 세포, 양막 줄기세포, 성체 줄기 세포(예를 들면, 조혈, 유선, 창자, 간엽, 태반, 폐, 골수, 혈액, 체대, 내피, 치수(dental pulp), 지방질, 신경, 후각, 신경관, 고환), 유도된 만능 줄기 세포; 유전적으로 변형된 세포 뿐만 아니라 신체의 어떤 공급원으로부터 유도된 세포 집단 또는 조직 외식편을 포함할 수 있다. 생리활성 세포 집단은 단리되고, 강화되고, 정제된, 균질성, 또는 천연적으로 이종성일 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 본 발명의 오가노이드를 산출하는데 사용하기에 적합한 다른 생리활성 세포 집단을 인식할 것이다.

[0090] 일 구현예에서, 세포의 공급원은 의도된 표적 장기 또는 조직과 동일하다. 예를 들면, 신장 세포는 신장으로부터 공급되어 신장에 투여될 오가노이드를 산출할 수 있다. 또 하나의 구현예에서, 세포의 공급원은 의도된 표적 장기 또는 조직과 동일하지 않다. 예를 들면, 에리트로포이에틴-발현 세포는 신장 지방질로부터 공급되어 신장에 투여될 오가노이드를 산출할 수 있다.

[0091] 일 측면에서, 본 발명은 개시 집단보다 우수한 치료적 및 재생 결과를 제공하는 생리활성 성분이 강화되고 불활성 또는 원하지 않는 성분이 감소된 신장 세포의 이종 집단의 특징의 소분획을 포함하는 오가노이드를 제공한다. 예를 들면, 단독으로 또는 혼합된, 불활성 또는 원하지 않는 성분, 예를 들면, B1 및 B5이 감소된, 본원에 기재된 생리활성 신장 세포, 예를 들면, B2, B4, 및 B3을 사용하여 신장 기능의 안정화 및/또는 개선 및/또는 재생에 사용될 오가노이드를 산출할 수 있다.

[0092] 또 하나의 측면에서, 오가노이드는 단독으로, 또는 다른 생물학적 소 분획, 예를 들면, B2 및/또는 B3와 혼합되

는 경우, 하나 이상의 세포형, 예를 들면, 혈관, 내분비, 또는 내피에서 감손되거나 결손된 특수한 소분획, B4, 즉, 치료적 특성, 예를 들면, 신장 기능의 안정화 및/또는 개선 및/또는 재생을 보유한 B4'를 함유한다. 바람직한 구현예에서, 생리활성 세포 집단은 B2이다. 어떤 구현예에서, B2 세포 집단은 B4 또는 B4'와 혼합된다. 다른 구현예에서, B2 세포 집단은 B3와 혼합된다. 다른 구현예에서, B2 세포 집단은 B3 및 B4 둘 다와 혼합되거나, B3 및/또는 B4의 특수한 세포성 성분과 혼합된다.

[0093] B2 세포 집단은 다음 중의 하나 이상으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 관형 세포 마커의 마커에 의해 특징화된다: 메갈린, 쿠빌린, 하이알루론산 합성효소 2 (HAS2), 비타민 D3 25-하이드록실라제(CYP2D25), N-카드헤린 (Ncad), E-카드헤린 (Ecad), 아쿠아포린-1(Aqp1), 아쿠아포린-2(Aqp2), RAB17, 멤버 RAS 종양유전자 패밀리 (Rab17), GATA 결합 단백질 3(Gata3), FXD 도메인-함유 이온 수송 조절물질 4 (Fxd4), 용질 담체 패밀리 9 (나트륨/수소 교환기), 멤버 4(Slc9a4), 알데하이드 탈수소효소 3 패밀리, 멤버 B1(Aldh3b1), 알데하이드 탈수소효소 1 패밀리, 멤버 A3(Aldh1a3), 및 칼페인-8(Capn8), 및 집합관 마커 아쿠아포린-4(Aqp4). B2는 B3 및/또는 B4보다 더 크고 더 과립화되므로 약 1.045g/ml 내지 약 1.063g/ml(설치류), 약 1.045g/ml 내지 1.052 g/ml (인간), 및 약 1.045g/ml 내지 약 1.058g/ml(개과)의 부력 밀도를 갖는다.

[0094] B3 세포 집단은 B2 및 B4와 비교하여 중간 크기 및 입도이어서 약 1.063g/ml 내지 약 1.073 g/ml(설치류), 약 1.052 g/ml 내지 약 1.063 g/ml(인간), 및 약 1.058 g/ml 내지 약 1.063 g/ml(개과)의 부력 밀도를 갖는, 일부 EPO-생성 세포를 지닌 혈관, 사구체 및 근위 관형 마커의 발현에 의해 특징화된다. B3는 다음 중의 하나 이상으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 마커의 발현에 의해 특징화된다: 아쿠아포린 7(Aqp7), FXD 도메인-함유 이온 수송 조절물질 2(Fxd2), 용질 담체 패밀리 17 (나트륨 포스페이트), 멤버 3(Slc17a3), 용질 담체 패밀리 3, 멤버 1(Slc3a1), 클라우딘 2(Cldn2), 납신 A 아스파르트산 펩티다아제(납사(Napsa)), 용질 담체 패밀리 2(촉진된 글루코오스 수송체), 멤버 2(Slc2a2), 알라닌(막) 아미노펩티다아제 (Anep), 막통과 단백질 27(Tmem27), 아실-CoA 합성효소 중간-사슬 패밀리 멤버 2 (Acsm2), 글루타티온 퍼옥시다아제 3(Gpx3), 푸룩토오스-1,6- 비포스파타제 1(Fbp1), 및 알라닌-글리옥실레이트 아미노기전달효소 2(Agxt2). B3는 또한 혈관 발현 마커 혈소판 내피 세포 접합 부착(Pecam) 및 사구체 발현 마커 포도신(Podn)에 의해 특징화된다.

[0095] B4 세포 집단은 하기: PECAM, VEGF, KDR, HIF1a, CD31, CD146 중의 하나 이상을 함유하는 혈관 마커 세트; 하기: 포도신(Podn), 및 네프린(Neph) 중의 하나 이상을 함유하는 사구체 마커 세트; 및 미분획화(UNFX), B2 및 B3와 비교하여 산소-조절가능한 EPO 강화된 집단의 발현에 의해 특징화된다. B4는 또한 하기 마커: 케모카인 (C-X-C 모티프) 수용체 4(Cxcr4), 엔도텔린 수용체 B형(Ednrb), 콜라겐, V형, 알파 2(Co15a2), 카드헤린 5(Cdh5), 플라스미노겐 활성제, 조직(Plat), 안지오프이에틴 2(Angpt2), 키나아제 삽입체 도메인 단백질 수용체 (Kdr), 분비된 단백질, 산성, 시스테인-풍부 (오스테오넥틴)(Sparc), 세르글리신(Srgn), TIMP 메탈로펩티다아제 억제제 3(Timp3), 윌름스 종양 1(Wt1), 윌리스-형(wingless-type) MMTV 통합 부위 패밀리, 멤버 4(Wnt4), G-단백질 신호전달 4의 조절물질(Rgs4), 혈소판 내피 세포 접합 부착(Pecam), 및 에리트로포이에틴(Epo) 중의 하나 이상의 발현에 의해 특징화된다. B4는, 또한 부력 밀도가 약 1.073 g/ml 내지 약 1.091g/ml(설치류), 약 1.063g/ml 내지 약 1.091g/ml(인간 및 개과)인, B2 또는 B3와 비교하여 보다 작은, 덜 과립화된 세포에 의해 특징화된다.

[0096] B4' 세포 집단은, 부력 밀도가 1.063 g/mL 내지 1.091 g/mL이고 하기 마커: PECAM, vEGF, KDR, HIF1a, 포도신, 네프린, EPO, CK7, CK8/18/19 중의 하나 이상을 발현하는 것으로 정의된다. 일 구현예에서, B4' 세포 집단은 다음 중 하나 이상을 함유하는 혈관 마커 세트의 발현에 의해 특징화된다: PECAM, vEGF, KDR, HIF1a, CD31, CD146. 또 하나의 구현예에서, B4' 세포 집단은 내분비 마커 EPO의 발현에 의해 특징화된다. 일 구현예에서, B4' 세포 집단은 하기 중의 하나 이상을 함유하는 사구체 마커 세트의 발현에 의해 특징화된다: 포도신(Podn), 및 네프린(Neph). 어떤 구현예에서, B4' 세포 집단은 하기 PECAM, vEGF, KDR, HIF1a 중의 하나 이상을 함유하는 혈관 마커 세트의 발현에 의해 및 내분비 마커 EPO의 발현에 의해 특징화된다. 또 하나의 구현예에서, B4'는, 또한 부력 밀도가 약 1.073 g/ml 내지 약 1.091g/ml(설치류), 약 1.063 g/ml 내지 약 1.091 g/mL(인간 및 개과)인, B2 또는 B3와 비교하여 더 작은, 덜 과립화된 세포에 의해 특징화된다.

[0097] 일 측면에서, 본 발명은, 밀도가 1.063 g/mL 내지 1.091 g/mL인 에리트로포이에틴 (EPO)-생성 세포, 혈관형 세포, 및 사구체 세포 중의 적어도 하나를 포함하는 사람 신장 세포의 단리되고, 강화된 B4' 집단을 함유하는 오가노이드를 제공한다. 일 구현예에서, B4' 세포 집단은 혈관 마커의 발현에 의해 특징화된다. 어떤 구현예에서, B4' 세포 집단은 사구체 마커의 발현에 의해 특징화되지 않는다. 일부 구현예에서, B4' 세포 집단은 산소-조절 가능한 에리트로포이에틴(EPO)을 발현할 수 있다.

- [0098] 일 구현예에서, 본 발명의 오가노이드는 B4' 세포 집단을 함유하지만 밀도가 1.045 g/mL 내지 1.052 g/mL인 관형 세포를 포함하는 B2 세포 집단을 포함하지 않는다. 또 하나의 구현예에서, B4' 세포 집단-함유 오가노이드는, 밀도가 < 1.045 g/mL인 집합관 및 관형 시스템의 거대 과립 세포를 포함하는 B1 세포 집단을 포함하지 않는다. 또 하나의 구현예에서, B4' 세포 집단 오가노이드는, 밀도가 > 1.091 g/mL인 저 입도 및 생존력의 잔해 및 소세포를 포함하는 B5 세포 집단을 포함하지 않는다.
- [0099] 일 구현예에서, B4' 세포 집단-함유 오가노이드는 밀도가 1.045 g/mL 내지 1.052 g/mL인 관형 세포를 포함하는 B2 세포 집단; 밀도가 < 1.045 g/mL인 집합관 및 관형 시스템의 거대 과립 세포를 포함하는 B1 세포 집단; 및 밀도가 > 1.091 g/mL인 저 입도 및 생존력의 잔해 및 소세포를 포함하는 B5 세포 집단을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, B4' 세포 집단은 신장 질환을 지닌 대상체로부터 유도될 수 있다.
- [0100] 일 측면에서, 본 발명은, 밀도가 1.045 g/mL 내지 1.052 g/mL인 관형 세포의 단리된, 강화된 집단을 포함하는 제1의 세포 집단, B2, 및 에리트로포이에틴 (EPO)-생성 세포 및 혈관형 세포를 포함하지만 밀도가 약 1.063 g/mL 내지 1.091 g/mL인 사구체 세포는 감손된 제2의 세포 집단, B4'를 포함하는 인간 신장 세포의 혼합물을 포함하는 오가노이드를 제공하며, 여기서 상기 혼합물은 밀도가 < 1.045 g/mL인 집합관 및 관형 시스템의 거대 과립 세포를 포함하는 B1 세포 집단, 또는 밀도가 > 1.091 g/mL인 저 입도 및 생존력의 잔해 및 소세포를 포함하는 B5 세포 집단을 포함하지 않는다. 어떤 구현예에서, B4' 세포 집단은 혈관 마커의 발현에 의해 특징화된다. 일 구현예에서, B4' 세포 집단은 사구체 마커의 발현에 의해 특징화되지 않는다. 어떤 구현예에서, B2는 집합관 상피 세포를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 오가노이드는 수용체-매개된 알부민을 흡수할 수 있는 세포의 혼합물을 함유하거나 이로부터 형성된다. 또 하나의 구현예에서, 세포의 혼합물은 산소-조절가능한 에리트로포이에틴(EPO)을 발현할 수 있다. 일 구현예에서, 혼합물은 고-분자량 종의 하이알루론산 (HA)의 생성을 시험관내 및 생체내 둘 다에서 생성하고/하거나 자극할 수 있는 HAS-2-발현 세포를 함유한다. 모든 구현예에서, 제 1 및 제2의 세포 집단은 신장 조직 또는 배양된 신장 세포로부터 유도될 수 있다(참고: Basu *et al.* Lipids in Health and Disease, 2011, 10:171).
- [0101] 일 구현예에서, 오가노이드는 생체내 전달시 재생적 자극을 제공할 수 있는 혼합물을 함유한다. 다른 구현예에서, 혼합물은 생체내 전달시 사구체 여과, 관형 재흡수, 소변 생성, 및/또는 내분비 기능의 쇠퇴를 감소시키거나, 이를 안정화시키거나, 또는 개선시킬 수 있다. 일 구현예에서, B4' 세포 집단은 신장 질환을 지닌 대상체로부터 유도된다.
- [0102] 일 측면에서, 본 발명은, 밀도가 1.063 g/mL 내지 1.091 g/mL인 에리트로포이에틴 (EPO)-생성 세포, 혈관형 세포, 및 사구체 세포 중의 적어도 하나를 포함하는 사람 신장 세포의 단리된, 강화된 B4' 집단을 함유하는 오가노이드를 제공한다. 일 구현예에서, B4' 세포 집단은 혈관 마커의 발현에 의해 특징화된다. 어떤 구현예에서, B4' 세포 집단은 사구체 마커의 발현에 의해 특징화되지 않는다. 발현되지 않은 사구체 마커는 포도신일 수 있다(참고: 실시예 10). 일부 구현예에서, B4' 세포 집단은 산소-조절가능한 에리트로포이에틴(EPO) 발현할 수 있다.
- [0103] 일 구현예에서, B4' 세포 집단-함유 오가노이드는, 밀도가 1.045 g/mL 내지 1.052 g/mL인 관형 세포를 포함하는 B2 세포 집단을 포함하지 않는다. 또 하나의 구현예에서, B4' 세포 집단 오가노이드는, 밀도가 < 1.045 g/mL인 집합관 및 관형 시스템의 거대 과립 세포를 포함하는 B1 세포 집단을 포함하지 않는다. 또 하나의 구현예에서, B4' 세포 집단 오가노이드는, 밀도가 > 1.091 g/mL인 저 입도 및 생존력의 잔해 및 소세포를 포함하는 B5 세포 집단을 포함하지 않는다.
- [0104] 일 구현예에서, B4' 세포 집단-함유 오가노이드는, 밀도가 1.045 g/mL 내지 1.052 g/mL인 관형 세포를 포함하는 B2 세포 집단; 밀도가 < 1.045 g/mL인 집합관 및 관형 시스템의 거대 과립 세포를 포함하는 B1 세포 집단; 및 밀도가 > 1.091 g/mL인 저 입도 및 생존력의 잔해 및 소세포를 포함하는 B5 세포 집단을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, B4' 세포 집단은 신장 질환을 지닌 대상체로부터 유도될 수 있다.
- [0105] 일 측면에서, 본 발명은, 밀도가 1.045 g/mL 내지 1.052 g/mL인 인 관형 세포의 단리된, 강화된 집단을 포함하는 제1의 세포 집단, B2, 및 에리트로포이에틴 (EPO)-생성 세포 및 혈관형 세포를 포함하지만 밀도가 약 1.063 g/mL 내지 1.091 g/mL인 사구체 세포가 감손된 제2의 세포 집단, B4'를 포함하는 인간 신장 세포의 혼합물을 포함하는 오가노이드를 제공하며, 여기서 상기 혼합물은, 밀도가 < 1.045 g/mL인 집합관 및 관형 시스템의 거대 과립 세포를 포함하는 B1 세포 집단, 또는 밀도가 > 1.091 g/mL인 저 입도 및 생존력의 잔해 및 소세포를 포함하는 B5 세포 집단을 포함하지 않는다. 어떤 구현예에서, B4' 세포 집단은 혈관 마커의 발현에 의해 특징화된다. 일 구현예에서, B4' 세포 집단은 사구체 마커의 발현에 의해 특징화되지 않는다. 어떤 구현예에서,

B2는 집합관 상피 세포를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 세포의 혼합물은 수용체-매개된 알부민 흡수할 수 있다. 또 하나의 구현예에서, 세포의 혼합물은 산소-조절가능한 에리트로포이에틴(EPO)을 발현할 수 있다. 일 구현예에서, 혼합물은 고-분자량 종의 하이알루론산(HA)을 *시험관내* 및 *생체내* 둘 다에서 생성하고/하거나 이의 생성을 자극할 수 있는 HAS-2-발현 세포를 함유한다. 모든 구현예에서 제 1 및 제2의 세포 집단은 신장 조직 또는 배양된 신장 세포로부터 유도된다.

[0106] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 세포 분획 또는 강화된 세포 집단(예를 들면, B1, B2, B3, B4(또는 B4'), 및 B5)의 조합을 포함하는 이중성 신장 세포 집단을 포함하는 오가노이드를 제공한다. 일 구현예에서, 상기 조합은, 부력 밀도가 약 1.045 g/ml 내지 약 1.091 g/ml이다. 다른 일 구현예에서, 상기 조합은, 부력 밀도가 약 1.045 g/ml 내지 약 1.099 g/ml 또는 약 1.100 g/ml이다. 또 하나의 구현예에서, 상기 조합은 밀도 구배상에서의 분리, 예를 들면 원심분리에 의해 측정된 것으로서의 부력 밀도를 가진다. 또 하나의 구현예에서, 세포 분획의 상기 조합은, B1 및/또는 B5가 감소된 B2, B3, 및 B4(또는 B4')를 함유한다. 일부 구현예에서, 세포 분획의 상기 조합은 B2, B3, B4(또는 B4'), 및 B5를 포함하나 B1이 감소되어 있다. B1 및/또는 B5가 감소되면, 상기 조합은 B2, B3, 및 B4(또는 B4') 세포 분획의 조합을 포함하는 오가노이드의 제조 전에 *시험관내*에서 후속적으로 배양될 수 있다.

[0107] 본 발명의 발명자들은, 놀랍게도 B2, B3, B4, 및 B5의 B1-감소된 조합의 *시험관내* 배양이 B5의 감소를 초래함을 발견하였다. 일 구현예에서, B5는 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5회의 계대배양 후 감소된다. 다른 일 구현예에서, 본원에 기재된 조건하에서 계대배양되는 B2, B3, B4, 및 B5 세포 분획 조합은 계대배양된 세포 집단의 약 5%, 미만 약 4%, 미만 약 3%, 미만 약 2%, 미만 약 1%, 또는 미만 약 0.5% 미만인 백분율에서 B5를 갖는 계대배양된 세포 집단을 제공한다.

[0108] 또 하나의 구현예에서, B4'는 세포 분획의 조합의 일부이다. 다른 일 구현예에서, B5의 *시험관내* 배양 감소는 저산소 조건하에 있다.

[0109] 일 구현예에서, 오가노이드는 *생체내* 전달시 재생성 자극을 제공할 수 있는 혼합물을 함유한다. 다른 구현예에서, 혼합물은 *생체내* 전달시 사구체 여과, 관형 재흡수, 소변 생성, 및/또는 내분비 기능의 쇠퇴를 감소시키거나 이를 안정화 또는 개선시킬 수 있다. 일 구현예에서, B4' 세포 집단은 신장 질환을 지닌 대사체로부터 기원한다.

[0110] 바람직한 구현예에서, 오가노이드는 B3 및/또는 B4와 조합된 B2를 함유하는 혼합물을 함유하고/하거나 이로부터 형성된다. 또 하나의 바람직한 구현예에서, 혼합물은 B3 및/또는 B4'와 조합된 B2를 포함한다. 다른 바람직한 구현예에서, 혼합물은 (i) B3 및/또는 B4와 조합된 B2; 또는 (ii) B3 및/또는 B4'와 조합된 B2로 이루어지거나 본질적으로 이루어진다.

[0111] B4' 세포 집단을 함유하는 혼합물은 비-건강한 대사체로부터 또한 수득된 B2 및/또는 B3 세포 집단을 함유할 수 있다. 비-건강한 대상체는, B4' 분획이 수득되는 동일한 대상체일 수 있다. B4' 세포 집단과는 대조적으로, 비-건강한 대상체로부터 수득된 B2 및 B3 세포 집단은 건강한 개인으로부터 유도된 개시 신장 세포 집단과 비교하여 하나 이상의 특수한 세포형에서 전형적으로 결손되지 않는다.

[0112] 문헌(참고: Presnell et al. WO/2010/056328)에 기재된 바와 같이, B2 및 B4 세포 제제는 보다 높은 분자량 종의 하이알루론산(HA)을 *시험관내* 및 *생체내* 둘 다에서 하이알루론산 합성효소-2 (HAS-2) - B2 세포 집단에서 보다 구체적으로 강화된 마커의 작용을 통해 발현할 수 있음이 밝혀졌다. 5/6 Nx 모델에서 B2를 사용한 치료는 *생체내* HAS-2 발현의 강한 발현 및 치료된 조직내에서 고-분자-량 HA의 예측된 생성과 함께 섬유증을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 주목하게는, 처리되지 않은 채 남겨진 5/6 Nx 모델은 HAS-2의 제한된 검출 및 고분자중량 HA의 거의 드문 생성과 함께 섬유증을 초래한다. 이론에 결합시키려는 의도없이, B2(및 어느 정도 B4)에 의해 주로 생성된 HA의 이러한 항-염증성 고-분자량 종은 신장 섬유증의 감소 및 신장 재생의 도움으로 세포 제제와 상승적으로 작용한다. 따라서, 본 발명은 하이알루론산을 포함하는 바이오재료와 함께 본원에 기재된 생리활성 신장 세포를 함유하는 오가노이드를 포함한다. 또한, 직접적인 생성을 통한 재생성 자극 또는 이식된 세포에 의한 생성의 자극의 바이오재료 성분의 제공이 본 발명에 의해 고려된다.

[0113] 일 측면에서, 본 발명은 필요한 대상체에서 신장 질환, 빈혈 및/또는 EPO 결핍에 사용하기 위한 EPO-생성 신장 세포의 단리된, 이중성 집단을 함유하고/하거나 이로부터 산출된 오가노이드를 제공한다. 일 구현예에서, 세포 집단은 신장 생검으로부터 유도된다. 또 하나의 구현예에서, 세포 집단은 전체의 신장 조직으로부터 유도된다. 다른 일 구현예에서, 세포 집단은 포유동물 신장 세포의 *시험관내* 배양물로부터 유도되고, 신장 생검 또는 전체

의 신장 조직으로부터 확립된다. 모든 구현예에서, 이들 집단은 본원에서 비-강화된 세포 집단으로 언급된 미분화 세포 집단이다.

[0114] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 추가로 강화되어 강화된 아집단 내의 에리트로포이에틴(EPO)-생성세포의 비율이 개시 또는 초기 세포 집단내의 에리트로포이에틴(EPO)-생성 세포의 집단과 비교하여 더 크도록 하는 에리트로포이에틴(EPO)-생성 신장 세포의 단리된 집단을 함유하고/하거나 이로부터 산출된 오가노이드를 제공한다. 일 구현예에서, 강화된 EPO-생성 세포 분획은 비강화된 초기 집단 내에 함유된 간질성 섬유아세포 및 관형 세포와 비교하여 더 큰 비율의 간질성 섬유아세포 및 더 적은 비율의 관형 세포를 함유한다. 어떤 구현예에서, 강화된 EPO-생성 세포 분획은 비강화된 초기 집단 내에 함유된 사구체 세포, 혈관형 세포 및 집합관형 세포와 비교하여 더 큰 비율의 사구체 세포 및 혈관형 세포 및 더 적은 비율의 집합관형 세포를 함유한다. 그와 같은 구현예에서, 이들 집단은 본원에서 "B4" 세포 집단으로 언급된다.

[0115] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 추가의 신장 세포 집단과 혼합된 EPO-생성 신장 세포 집단을 함유하고/하거나 이로부터 산출된 오가노이드를 제공한다. 일 구현예에서, EPO-생성 세포 집단은, EPO-생성 세포가 강화된 제1의 세포 집단, 예를 들면, B4이다. 또 하나의 구현예에서, EPO-생성 세포 집단은 EPO-생성 세포가 강화되지 않은 제1의 세포 집단, 예를 들면, B2이다. 또 하나의 구현예에서, 제1의 세포 집단은 제2의 신장 세포 집단과 혼합된다. 일부 구현예에서, 제2의 세포 집단은 관형 세포 표현형의 존재에 의해 실증될 수 있는 관형 세포가 강화되어 있다. 또 하나의 구현예에서, 관형 세포 표현형은 하나의 관형 세포 마커의 존재에 의해 명시될 수 있다. 또 하나의 구현예에서, 관형 세포 표현형은 하나 이상의 관형 세포 마커의 존재에 의해 명시될 수 있다. 관형 세포 마커는 비제한적으로, 메갈린, 쿠빌린, 하이알루론산 합성효소 2(HAS2), 비타민 D3 25-하이드록실라제 (CYP2D25), N-카드헤린(Ncad), E-카드헤린(Ecad), 아쿠아포린-1(Aqp1), 아쿠아포린-2 (Aqp2), RAB17, 멤버 RAS 종양유전자 패밀리 (Rab17), GATA 결합 단백질 3 (Gata3), FXD 도메인-함유 이온 수송 조절물질 4 (Fxyd4), 용질 담체 패밀리 9 (나트륨/수소 교환기), 멤버 4 (Slc9a4), 알데하이드 탈수소효소 3 패밀리, 멤버 B1 (Aldh3b1), 알데하이드 탈수소효소 1 패밀리, 멤버 A3 (Aldh1a3), 및 칼페인-8 (Capn8)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또 하나의 구현예에서, 제1의 세포 집단은 비제한적으로, 간질-유도된 세포, 관형 세포, 집합관-유도된 세포, 사구체-유도된 세포, 및/또는 혈액 또는 맥관구조로부터 유도된 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는 신장 세포의 몇 개의 유형 중의 적어도 하나와 혼합된다.

[0116] 본 발명의 오가노이드는 B2 및/또는 B3와의 혼합물 형태, 또는 강화된 세포 집단, 예를 들면, B2+B3+B4/B4'의 형태의 B4 또는 B4'를 함유하는 EPO-생성 신장 세포 집단을 포함하거나 이로부터 형성될 수 있다.

[0117] 일 측면에서, 오가노이드는 EPO 발현 및 산소에 대해 생물반응성이어서, 배양계의 산소 긴장에 있어서의 감소가 EPO 발현에 있어서의 유도를 초래하도록 함을 특징으로 하는 EPO-생성 신장 세포 집단을 함유하고/하거나 이로부터 산출된다. 일 구현예에서, EPO-생성 세포 집단은 EPO-생성 세포로 강화된다. 일 구현예에서, EPO 발현은, 세포 집단을 세포가 이용가능한 산소의 정상 대기(~21%) 수준에서 배양된 세포 집단과 비교한 것으로서 배양계 내에서 이용가능한 산소 수준에 있어서의 감소에 적용된 조건하에서 배양되는 경우 유도된다. 일 구현예에서, 보다 낮은 산소 조건 내에서 배양된 EPO-생성 세포는 정상 상소 조건에서 배양된 EPO-생성 세포와 비교하여 더 큰 수준의 EPO를 발현한다. 일반적으로, 이용가능한 산소(또한 일명 저산소 배양 조건)의 감소된 수준에서 세포의 배양은 이용가능한 산소(또한 일명 정상 또는 노르모식 배양 조건으로 언급됨)의 정상 대기 수준에서 세포의 배양과 비교하여 감소된다. 일 구현예에서, 저산소 세포 배양 조건은 세포를 약 1% 미만의 산소, 약 2% 미만의 산소, 약 3% 미만의 산소, 약 4% 미만의 산소, 또는 약 5% 미만의 산소에서 배양함을 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 정상 또는 노르모식 배양 조건은 세포를 약 10% 산소, 약 12% 산소, 약 13% 산소, 약 14% 산소, 약 15% 산소, 약 16% 산소, 약 17% 산소, 약 18% 산소, 약 19% 산소, 약 20% 산소, 또는 약 21% 산소에서 배양함을 포함한다.

[0118] 다른 일 구현예에서, EPO의 유도 또는 증가된 발현은 세포를 약 5% 미만의 이용가능한 산소에서 배양하고 EPO 발현 수준을 대기(약 21%) 산소에서 배양된 세포에 대해 비교함으로써 획득되고 관찰될 수 있다. 또 하나의 구현예에서, EPO의 유도는, 세포의 배양물이 대기 산소(약 21%)에서 일정 기간 동안 배양된 제1의 배양물 상 및 이용가능한 산소 수준이 감소되고 동일한 세포가 약 5% 미만의 이용가능한 산소에서 배양된 제2의 배양물 상을 포함하는 방법에 의해 EPO를 발현할 수 있는 세포의 배양물에서 획득된다. 또 하나의 구현예에서, 저산소 조건에 대해 반응성인 EPO 발현은 HIF1 α 에 의해 조절된다. 당해분야의 숙련가는, 당해 분야에 공지된 다른 산소 조작 배양 조건을 본원에 기재된 세포에 대해 사용할 수 있음을 인식할 것이다.

[0119] 일 측면에서, 오가노이드는 관류 조건에 대해 바이오-반응성(예를 들면, EPO 발현)에 의해 특징화되는 EPO-생성

포유동물 세포의 강화된 집단으로부터 형성된다. 일 구현예에서, 관류 조건은 일시적, 간헐적, 또는 연속적 유체 유동(관류)을 포함한다. 일 구현예에서, EPO 발현은, 세포가 배양된 배지를 역학력이 유동을 통해 세포로 이동되는 방식으로 간헐적으로 또는 연속적으로 순환되거나 진탕되는 경우 기계적으로-유도된다. 일 구현예에서, 일시적, 간헐적, 또는 연속적 유체 유동에 적용된 세포는, 이들이 이러한 3차원 구조를 형성하기 위한 프레임워크 및/또는 공간을 제공하는 물질 속 또는 상에서 3차원 구조로서 존재하는 방식으로 배양된다. 일 구현예에서, 세포는 다공성 비드 상에서 배양되어 유동 플랫폼, 오르비팅 플랫폼, 또는 스피너 플라스크를 사용하여 간헐적 또는 연속적 유체 유동에 적용된다. 또 하나의 구현예에서, 세포는 3차원 스캐폴딩상에서 배양되어 디바이스내로 위치함으로써 스캐폴딩은 정체성이고 유체는 스캐폴딩을 통해 또는 교차로 직접 유도한다. 당해분야의 숙련가는, 당해 분야에 공지된 다른 관류 배양 조건을 본원에 기재된 세포에 대해 사용할 수 있음을 인식할 것이다.

[0120] 불활성 세포 집단

[0121] 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 부분적으로, 생리활성 성분이 강화되고 불활성 또는 원하지 않는 성분이 감소된, 신장 세포의 이종성 집단의 어떤 소분획을 포함하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드가 개시 집단보다 우수한 치료적 및 재생 결과를 제공한다는 놀라운 발견을 기본으로 한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명에 의해 제공된 오가노이드는 B1 및/또는 B5 세포 집단이 감소된 세포성 집단을 포함한다. 예를 들면, 하기는 B1 및/또는 B5: B2, B3, 및 B4(또는 B4') 중의 2개 이상의 혼합물; B2, B3, 및 B4(또는 B4')의 강화된 세포 집단이 감소될 수 있다.

[0122] B1 세포 집단은, 부력 밀도가 약 1.045 g/m 미만인 집단의 세포가 들어있는 집합관 및 관형 시스템의 거대한, 과립 세포를 포함한다. B5 세포 집단은 저 입도 및 생존력의 및 약 1.091 g/ml보다 더 큰 부력 밀도를 갖는 잔해 및 소세포를 포함한다.

[0123] 세포 집단을 분리 및 배양하는 방법

[0124] 일 측면에서, 본 발명의 SRC+ 세포 집단 및/또는 오가노이드는 신장 조직으로부터 단리되고/되거나 배양된 세포 집단을 함유하고/하거나 이로부터 형성된다. 본원에는 신장 세포 성분, 예를 들면, 신장 질환, 빈혈, EPO 결핍, 관형 수술 결핍, 및 사구체 여과 결핍의 치료를 포함하는 치료 용도를 위한 오가노이드 내에 함유된 강화된 세포 집단을 분리하고 단리하는 방법이 제공된다. 일 구현예에서, 세포 집단은 새로 소화된, 즉, 기계적으로 또는 효소적으로 소화된, 신장 조직으로부터 또는 포유동물 신장 세포의 이종성 시험관내 배양물로부터 단리된다. 본 발명의 SRC+ 세포 집단을 포함하는 추가의 생리활성 세포 집단을 단리하는 방법이 실시예에 추가로 기재된다.

[0125] 오가노이드는 B4'를 포함하는 B4와 B2 및/또는 B3 분획 둘 다를 포함하는 세포의 증대된 분포 및 조성물을 위해 제공하는 밀도 구배 상의 분리 전에 저산소 배양 조건하에서 배양된 신장 세포의 이종성 혼합물을 함유하고/하거나 이로부터 형성될 수 있다. B2로부터 B4에서 산소-의존적 세포의 강화는 병든 및 비-병든 신장 둘 다로부터 단리된 신장 세포의 경우 관찰되었다. 이론에 결합시키려는 의도 없이, 이는 하기 현상 중의 하나 이상에 기인할 수 있다: 1) 저산소 배양 기간 동안 특수한 세포성 성분의 선택적 생존, 사망, 또는 증식; 2) 저산소 배양물에 대한 반응시 세포 입도 및/또는 크기에 있어서의 변경에 따른 부력 밀도 및 밀도 구배 분리 동안 차후의 국재화에 있어서의 변경 실행; 및 3) 저산소 배양 기간에 대한 반응시 세포 유전자/단백질 발현에 있어서의 변경에 따른 구배의 어떠한 주어진 분획내에서 세포의 차별적인 특성의 생성. 따라서, 일 구현예에서, 오가노이드는 관형 세포에 대해 강화된 세포 집단을 함유하고/하거나 이로부터 형성되며, 예를 들어, B2는 저산소증-내성이다.

[0126] 본 발명의 세포 집단을 분리하고 단리하는 예시적인 기술은 목적인 집단 내에 함유된 상이한 세포형의 차별적인 비중을 기본으로 한 밀도 구배에 있어서의 분리를 포함한다. 어떤 주어진 세포형의 비중은 세포내 입도의 정도, 물의 세포내 용적, 및 다른 인자에 의해 영향받을 수 있다. 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 세포 체제, 예를 들면, 인간, 개과, 및 설치류를 포함하나, 이에 한정되지 않는 다중 종에 걸쳐 B2 및 B4'를 포함하는 B4의 단리를 위한 최적의 구배 조건을 제공한다. 바람직한 구현예에서, 밀도 구배는 관형 세포 분획의 신규 강화된 집단, 즉, 신장 세포의 이종성 집단으로부터 유도된 B2 세포 집단을 수득하는데 사용된다. 일 구현예에서, 밀도 구배는 EPO-생성 세포 분획의 신규 강화된 집단, 즉, 신장 세포의 이종성 집단으로부터 유도된 B4 세포 집단을 수득하는데 사용된다. 다른 구현예에서, 밀도 구배는 관형 세포, 사구체 세포, 및 신장의 내피 세포의 강화된 아집단을 수득하는데 사용된다. 일 구현예에서, EPO-생성 및 관형 세포 둘 다는 적혈구 및 세포성 잔해로부터 분리된다. 일 구현예에서, EPO-생성, 사구체, 및 혈관형 세포는 다른 세포형 및 적혈구 및 세포성 잔해로부터 분리되지만, 관형 세포 및 집합관형 세포의 아집단은 다른 세포형 및 적혈구 및 세포성 잔해로부터 부수적으로 분리된다. 다른 일 구현예에서, 내분비, 사구체, 및/또는 혈관형 세포는 다른 세포형 및 적혈구 및 세포성 잔해로부터

터 분리되는 반면, 관형 세포 및 집합관형 세포의 아집단은 다른 세포형 및 적혈구 세포 및 세포성 잔해로부터 부수적으로 분리된다.

[0127] 일 측면에서, 본 발명의 오가노이드는 하기 기재된 어떤 주요 특징을 기준으로, 부분적으로는, 수 중 60% 비이온성 요오드화된 화합물 아이오딕사놀을 포함하는, OPTIPREP[®](제조원: Axis-Shield) 밀도 구배 배지를 사용함으로써 산출된 세포 집단을 함유하고/하거나 이로부터 형성된다. 그러나, 당해분야의 숙련가는 어떠한 밀도 구배 또는 다른 수단, 예를 들면, 본 발명의 세포 집단을 분리하기 위한 필요한 특징을 포함하는, 당해 분야에 공지된 세포 표면 마커를 사용한 면역학적 분리를 본 발명에 따라 사용할 수 있음을 인식할 것이다. 밀도 구배 (크기 및 입도)를 통한 세포성 아집단을 분리하는데 기여하는 동일한 세포성 특징이 유세포측정(전방 스캐터 = 유세포 측정을 통한 크기의 반사, 및 측방 스캐터 = 입도의 반사)을 통한 세포성 아집단을 분리하는데 활용될 수 있음은 당해 분야의 숙련가에 의해 또한 인식될 수 있다. 중요하게는, 밀도 구배 배지는 목적인 특수 세포에 대해 저독성이어야 한다. 밀도 구배 배지는 목적인 특수 세포에 대해 저독성이어야 하지만, 본 발명은 목적인 세포의 선택 가공에 역할을 담당하는 구배 배지의 사용을 고려한다. 이론에 결합시킬 의도없이, 아이오딕사놀을 포함하는 구배에 의해 회수된 본 발명의 세포 집단은, 로딩과 회수 단계 사이에 세포의 주목할 만한 손실이 존재하므로, 아이오딕사놀-내성이며, 이는 구배 조건하에서 아이오딕사놀에 대한 노출이 어떤 세포의 제거를 초래함을 제안한다. 아이오딕사놀 구배 후 특수 밴드내에 나타나는 세포는 아이오딕사놀 및/또는 밀도 구배 노출의 어떠한 유해한 효과에 대해 내성이다. 따라서, 본원에 기재된 오가노이드에 대한 세포 집단의 분리 및/또는 선택시 경도 내지 중간 정도 신장세포독소인 추가의 조영제가 또한 고려된다. 또한, 밀도 구배 배지는 또한 인간 혈장 내의 단백질에 결합하지 않아야 하며 목적인 세포의 주요 기능에 부적적으로 영향을 미치지 않아야 한다.

[0128] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 형광성 활성화된 세포 분급(FACS)을 사용하여 신장 세포형이 강화되고/되거나 감손된 세포 집단을 함유하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드를 제공한다. 일 구현예에서, 신장 세포형은 BD FACSria[™] 또는 등가물을 사용하여 강화시키고/시키거나 감손시킬 수 있다.

[0129] 또 하나의 측면에서, 오가노이드는 자기성 세포 분급을 사용하여 신장 세포형이 강화되고/되거나 이로부터 형성된 세포집단을 함유하고/하거나 이로부터 형성된다. 일 구현예에서, 신장 세포형은 Miltenyi autoMACS[®] 시스템 또는 등가물을 사용하여 강화시키고/시키거나 감손시킬 수 있다.

[0130] 또 하나의 측면에서, 오가노이드는 3차원 배양에 적용된 신장 세포 집단을 포함하고/하거나 이로부터 형성될 수 있다. 일 측면에서, 세포 집단을 배양하는 방법은 연속적인 관류를 통한다. 일 구현예에서, 3차원 배양 및 연속적 관류를 통해 배양된 세포 집단은 정적으로 배양된 세포 집단과 비교하는 경우 더 큰 세포성 및 상호연관성을 입증한다. 또 하나의 구현예에서, 3차원 배양 및 연속적 관류를 통해 배양된 세포 집단은 이러한 세포 집단의 정적 배양과 비교하는 경우 EPO의 더 큰 발현뿐만 아니라 신장 소관-연합 유전자, 예컨대 e-카드헤린의 증대된 발현을 입증한다. 또 하나의 구현예에서, 연속적 관류를 통해 배양된 세포 집단은 정적으로 배양된 세포 집단과 비교하는 경우, 더 큰 수준의 글루코오스 및 글루타민 소비를 입증한다.

[0131] 본원에 기재된 바와 같이, 낮은 또는 저산소 산소 조건이 본 발명의 오가노이드에 대한 세포 집단을 제조하는 방법에서 사용될 수 있다. 그러나, 세포 집단을 제조하는 방법은 낮은 산소 조건화의 단계없이 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 노르록식 조건이 사용될 수 있다.

[0132] 당해 분야의 숙련가는, 당해 분야에 공지된 분리 및 배양의 다른 방법을 본원에 기재된 세포에 대해 사용할 수 있음을 인식할 것이다.

[0133] 바이오재료

[0134] 문헌(참고: Bertram et al. 미국 공개 출원 20070276507)에 기재된 바와 같이, 폴리머 매트릭스 또는 스캐폴드는 어떤 수의 바람직한 입체배치로 형상화되어 어떤 수의 전체 시스템, 기하학 또는 공간 제한도 만족시킬 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 매트릭스 또는 스캐폴드는 3차원일 수 있고 장기 또는 조직 구조의 치수 및 형상에 맞도록 형상화될 수 있다. 예를 들면, 신장 질환, 빈혈, EPO 결핍, 관형 수송 결핍, 또는 사구체 여과 결핍을 치료하기 위한 폴리머 스캐폴드의 사용시, 3차원 (3-D) 매트릭스가 사용될 수 있다. 다양한 상이하게 형상화된 3-D 스캐폴드도 사용될 수 있다. 자연적으로, 폴리머 매트릭스는 상이한 크기 및 형상으로 형상화되어 상이한 크기의 환자에게 맞도록 된다. 폴리머 매트릭스는 또한 환자의 특수 요구도를 수용하기 위해 다른 방식으로 형상화될 수 있다. 또 하나의 구현예에서, 폴리머 매트릭스 또는 스캐폴드는 생체적합성, 다공성 폴리머 스캐폴드일 수 있다. 스캐폴드는 개방-세포 폴리락트산(OPLA[®]), 셀룰로오스 에테르, 셀룰로오스, 셀룰로오스 에스

테르, 플루오르화된 폴리에틸렌, 페놀성, 폴리-4-메틸펜텐, 폴리아크릴로니트릴, 폴리아미드, 폴리아미드이미드, 폴리아크릴레이트, 폴리벤족사졸, 폴리카보네이트, 폴리시아노아릴에테르, 폴리에스테르, 폴리에스테르카보네이트, 폴리에테르, 폴리에테르에테르케톤, 폴리에테르이미드, 폴리에테르케톤, 폴리에테르설폰, 폴리에틸렌, 폴리플로오로올레핀, 폴리이미드, 폴리올레핀, 폴리옥사디아졸, 폴리페닐렌 옥사이드, 폴리페닐렌 설파이드, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리설파이드, 폴리설폰, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리티오에테르, 폴리트리아졸, 폴리우레탄, 폴리비닐, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 재생된 셀룰로오스, 실리콘, 요소-포름알데하이드, 콜라겐, 라미닌, 파이브로넥틴, 글리코사미노글리칸, 실크, 엘라스틴, 알기네이트, 하이알루론산, 아가로스, 또는 공중합체 또는 이의 물리적 배합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 합성 또는 천연 발생 물질로부터 형성될 수 있다. 스캐폴딩 입체배치는 액체 하이드로겔 서스펜션으로부터 연결의 다공성 스캐폴드 내지 경질의, 형상-유지 다공성 스캐폴드의 범위일 수 있다.

[0135] 스캐폴드는 희석제, 세포 담체, 마이크로-비드, 물질 단편, PGA, PLGA, PLLA, OPLA, 전기방사(electrospun) 나노섬유, 및 PGA, PLGA, PLLA, OPLA, 전기방사 나노섬유를 포함하나 이에 한정되지 않는 합성 조성물의 포움을 포함하나, 이에 한정되지 않는 바이오재료의 어떠한 물질로 구성될 수 있다.

[0136] 하이드로겔은 다양한 폴리머 물질로부터 형성될 수 있으며 다양한 생물의학적 적용에 유용하다. 하이드로겔은 친수성 폴리머의 3차원 네트워크로서 물리적으로 기재될 수 있다. 하이드로겔의 유형에 따라서, 이들은 다양한 백분율의 물을 함유하지만, 물 내에 전적으로 용해되지 않는다. 이의 고 수분 함량에도 불구하고, 하이드로겔은 친수성 잔기의 존재로 인하여 액체의 큰 용적에 추가로 결합할 수 있다. 하이드로겔은 이의 젤라틴성 구조를 변화시키지 않으면서 광범위하게 팽윤한다. 하이드로겔의 기본 물리적 특징은 사용된 폴리머의 특성 및 생성물의 추가의 특수 장비에 따라 특이적으로 변형될 수 있다.

[0137] 바람직하게는, 하이드로겔은 폴리머, 생물학적으로 유도된 물질, 합성으로 유도된 물질 또는 이들의 조합으로부터 제조되며, 이는 생물학적으로 불활성이고 포유동물 조직과 생리적으로 양립가능하다. 하이드로겔 물질은 바람직하게는 염증성 반응을 유도하지 않는다. 하이드로겔을 형성하는데 사용될 수 있는 다른 물질의 예는 (a) 변형된 알기네이트, (b) 1가 양이온에 대한 노출에 의해 겔화되는 다당류(예를 들면, 젤라틴 겔 및 카라기난), (c) 매우 점성인 액체이고 요변성(thixotropic)이며 구조의 느린 변화에 의해 시간에 따라 겔을 형성하는 다당류(예를 들면, 하이알루론산), 및 (d) 폴리머 하이드로겔 전구체(예를 들면, 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체 및 단백질)를 포함한다. 미국 특허 제6,224,893 B1호는 본 발명에 따른 하이드로겔을 제조하는데 적합한, 다양한 폴리머, 및 이러한 폴리머의 화학적 특성의 상세한 설명을 제공한다.

[0138] 스캐폴딩 또는 바이오재료 특성은, 세포가 스캐폴딩 또는 바이오재료 물질에 부착하여 이와 상호작용할 수 있도록 하고/하거나 세포가 갉힐 수 있는 가공성 공간을 제공할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 다공성 스캐폴드 또는 바이오재료는 다공성 스캐폴드로서 구성된 바이오재료 상에서(예를 들면, 세포의 부착에 의해) 및/또는 스캐폴드의 기공내에서(예를 들면, 세포의 포획에 의해) 세포의 하나 이상의 집단 또는 혼합물의 부가 또는 침착을 허용한다. 또 하나의 구현예에서, 스캐폴드 또는 바이오재료는, 세포:세포 및/또는 세포:바이오재료가 스캐폴드내에서 상호작용하여 본원에 기재된 바와 같은 작제물을 형성하도록 하거나 촉진한다.

[0139] 일 구현예에서, 본 발명에 따라 사용된 바이오재료는, 분자 크기가 5.1 kDa 내지 $>2 \times 10^6$ kDa 범위인 HA 분자를 함유하는, 하이드로겔 형태의 하이알루론산 (HA)으로 구성된다. 또 하나의 구현예에서, 본 발명에 따라 사용된 바이오재료는, 크기가 5.1 kDa 내지 $>2 \times 10^6$ kDa 범위인 HA 분자를 또한 함유하는, 다공성 포움 형태의 하이알루론산으로 구성된다. 또 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 바이오재료는, 개방-세포 구조 및 공극 크기가 약 50 마이크론 내지 약 300 마이크론인 폴리-락트산(PLA)-계 폼으로 구성된다. 또 하나의 구현예에서, 특수한 세포 집단, 우선적으로 B2 뿐만 아니라 B4는 특히 신장 이식 후, 하이알루론산 합성효소-2 (HAS-2)를 통해 고분자량 하이알루론산의 합성을 직접적으로 제공하고/하거나 촉진한다.

[0140] 본원에 기재된 바이오재료는 또한 어떤 외부 조건, 예를 들면, 시험관내 또는 생체내에 대해 반응하도록 설계되거나 조정될 수 있다. 일 구현예에서, 바이오재료는 온도-민감성(예를 들면, 시험관내 또는 생체내)이다. 또 하나의 구현예에서, 바이오재료는 효소 분해(예를 들면, 시험관내 또는 생체내)에 대한 노출에 대해 반응하도록 조정된다. 외부 조건에 대한 바이오재료의 반응은 본원에 기재된 바와 같이 미세하게 조절될 수 있다. 기재된 오가노이드의 온도 민감성은 오가노이드 내의 바이오재료의 백분율을 조절함으로써 변화시킬 수 있다. 대안적으로, 바이오재료는 화학적으로 가교결합되어 효소 분해에 대해 더 큰 내성을 제공한다. 예를 들면, 카보디이미드 가교결합제는 젤라틴 비드에 화학적으로 가교결합하도록 사용됨으로써 내인성 효소에 대한 감소된 감수성을 제

공할 수 있다.

[0141] 일 측면에서, 외부에 대한 바이오재료가 의한 반응은 바이오재료의 구조적 완전성의 손실에 관한 것이다. 온도-민감성 및 효소 분해에 대한 내성이 상기 제공되지만, 물질 완전성의 손실이 상이한 바이오재료에서 발생할 수 있는 다른 기전이 존재한다. 이들 기전은 열역학적(예를 들면, 상 전이, 예컨대 용융, 확산(예를 들면, 바이오재료로부터 주변 조직으로의 이온성 가교결합체의 확산)), 화학적, 효소에 의한, pH(예를 들면, pH-민감성 리포솜), 초음파, 및 광불안정한 (광 침투)를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바이오재료가 구조적 완전성을 손실하는 정확한 기전은 변할 것이지만 전형적으로 당해 기전은 이식 또는 이식-후 시기에 개시된다.

[0142] 당해 분야의 숙련가들은, 당해 분야에 공지된 합성 또는 천연-발생 물질의 다른 유형을 사용하여 본원에 기재된 바와 같은 스캐폴드를 형성할 수 있음을 인식할 것이다.

[0143] 일 측면에서, 본 발명은 상기-참고된 스캐폴드 또는 바이오재료로부터 제조된 본원에 기재된 바와 같은 작제물을 제공한다.

[0144] **작제물**

[0145] 일 측면에서, 본 발명은 필요한 대상체에서 신장 질환, 빈혈, 또는 EPO 결핍을 치료하기 위한 본원에 기재된 세포 집단 중의 하나 이상을 갖는 이식가능한 작제물을 함유하는 오가노이드를 제공한다. 일 구현예에서, 작제물은 스캐폴드의 표면 위에 부착 및/또는 포획에 의해 침착되거나 갇힌 하나 이상의 합성 또는 천연 발생 바이오재료 및 본원에 기재된 하나 이상의 세포 집단 또는 혼합물로 구성된 바이오재료 또는 바이오재료, 스캐폴드 또는 매트릭스로 제조된다. 어떤 구현예에서, 작제물은 바이오재료 및 바이오재료 성분(들)로 코팅되거나, 위에 침착되거나, 속에 침착되거나, 이에 부착되거나, 속에 포획되거나, 속에 갇히거나, 씨딩되거나, 이와 결합된, 본원에 기재된 하나 이상의 세포 집단 또는 혼합물로 제조된다. 강화된 세포 집단 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 본원에 기재된 세포 집단의 어느 것도 매트릭스와 함께 사용되어 작제물을 형성할 수 있다.

[0146] 또 하나의 구현예에서, 작제물의 침착된 세포 집단 또는 세포성 성분은, 산소-조절가능한 EPO-생성 세포가 강화된 제1의 신장 세포 집단이다. 또 하나의 구현예에서, 제1의 신장 세포 집단은 산소-조절가능한 EPO-생성 세포 외에 사구체 및 혈관형 세포를 함유한다. 일 구현예에서, 제1의 신장 세포 집단은 B4' 세포 집단이다. 하나의 다른 구현예에서, 작제물의 침착된 세포 집단 또는 세포성 성분(들)은 제1의 강화된 신장 세포 집단 및 제2의 신장 세포 집단 둘 다를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2의 세포 집단은 산소-조절가능한 EPO 생성 세포이다. 또 하나의 구현예에서, 제2의 세포 집단은 신장 관형 세포로 강화된다. 또 하나의 구현예에서, 제2의 세포 집단은 신장 관형 세포로 강화되며 집합관 상피 세포를 함유한다. 다른 구현예에서, 신장 관형 세포는 메갈린, 쿠빌린, 하이알루론산 합성효소 2(HAS2), 비타민 D3 25-하이드록실라제 (CYP2D25), N-카드헤린 (Ncad), E-카드헤린 (Ecad), 아쿠아포린-1 (Aqp1), 아쿠아포린-2 (Aqp2), RAB17, 멤버 RAS 종양유전자 패밀리 (Rab17), GATA 결합 단백질 3 (Gata3), FXRD 도메인-함유 이온 수송 조절물질 4 (Fxyd4), 용질 담체 패밀리 9 (나트륨/수소 교환기), 멤버 4 (Slc9a4), 알데하이드 탈수소효소 3 패밀리, 멤버 B1 (Aldh3b1), 알데하이드 탈수소효소 1 패밀리, 멤버 A3 (Aldh1a3), 및 칼페인-8 (Capn8)을 포함하나, 이에 한정되지 않는 하나 이상의 관형 세포 마커의 발현에 의해 특징화된다.

[0147] 일 구현예에서, 바이오재료 또는 스캐폴드 상에 침착되거나 이와 조합하여 본 발명의 작제물을 형성하는 세포 집단은 다양한 공급원, 예컨대 자가조직 공급원으로부터 유도된다. 비-자가조직 공급원, 예컨대, 동종이계, 또는 동계의(자가-autogeneic) 또는 동계) 공급원을 포함하나 이에 한정되지 않는 비-자가조직 공급원도 또한 사용하기에 적합하다.

[0148] 당해분야의 숙련가는, 세포 집단과 바이오재료를 부착시키거나 또는 달리 조합하여 작제물을 형성하는 몇 개의 적합한 방법이 존재함을 인식할 것이다.

[0149] 일 측면에서, 본 발명의 작제물은 본원에 기재된 사용 방법에서 사용하기에 적합하다. 일 구현예에서, 작제물은 어떠한 병인의 신장 질환, 빈혈, 또는 어떠한 병인의 EPO 결핍에 대한 치료가 필요한 대상체에게 투여하기에 적합하다. 다른 구현예에서, 작제물은 적혈구 항상성의 개선 또는 복원이 필요한 대상체에게 투여하기에 적합하다. 또 하나의 구현예에서, 작제물은 개선된 신장 기능이 필요한 대상체에게 투여하기에 적합하다.

[0150] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 a) 하나 이상의 생체적합성 합성 폴리머 또는 천연-발생 단백질 또는 펩타이드를 포함하는 바이오재료; 및 b) 바이오재료로 코팅되거나, 이 위에 또는 속에 침착되고/되거나, 이 속에 포획되고/되거나, 이 속에 현탁되고/되거나, 이 속에 갇히고/갇히거나 달리는 이와 합해진, 밀도가 1.045 g/mL 내지 1.052 g/mL인 인 관형 세포의 단리된, 강화된 집단을 포함하는 제1의 세포 집단, B2 및 에리트로포이에틴

(EPO)-생성 세포 및 혈관형 세포를 포함하나 밀도가 1.063 g/mL 내지 1.091 g/mL인 사구체 세포가 감소된 제2의 세포 집단, B4'를 포함하는, 신장 질환을 지닌 대상체로부터 유도된 포유동물 신장 세포의 혼합물을 포함하는, 개선된 신장 기능이 필요한 대상체내로 이식하기 위한 작제물을 제공한다. 어떤 구현예에서, 혼합물은, 밀도가 < 1.045 g/ml인 집합관 및 관형 시스템의 거대 과립 세포를 포함하는 B1 세포 집단, 또는 밀도가 > 1.091 g/ml인 저 입도 및 생존력의 잔해 및 소세포를 포함하는 B5 세포 집단을 포함하지 않는다.

[0151] 일 구현예에서, 작제물은 혈관 마커의 발현에 의해 특징화되는 B4' 세포 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, B4' 세포 집단은 사구체 마커의 발현에 의해 특징화되지 않는다. 어떤 구현예에서, 혼합물은 산소-조절가능한 에리트로포이에틴 (EPO)을 발현할 수 있다. 모든 구현예에서, 혼합물은 포유동물 신장 조직 또는 배양된 신장 세포로부터 유도될 수 있다.

[0152] 일 구현예에서, 작제물은 혼합물의 포획 및/또는 부착에 적합한 3차원 (3-D) 다공성 바이오재료로 구성된 바이오재료를 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 작제물은 포유동물 세포를 포매하거나, 부착하거나, 현탁하거나, 코팅하는데 적합한 액체 또는 반-액체 겔로서 구성된 바이오재료를 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 작제물은 하이드로겔 형태의 하이알루론산(HA)의 고-분자량 종으로 주로 구성된 바이오재료를 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 작제물은 다공성 포움 형태의 하이알루론산의 고-분자량 종으로 주로 구성된 바이오재료를 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 작제물은, 기공이 약 50 마이크론 내지 약 300 마이크론인 폴리-락트산-계 포움으로 구성된 바이오재료를 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 작제물은, 개선된 신장 기능이 필요한 상기 대상체에게 자가조직된 신장 샘플로부터 유도될 수 있는 하나 이상의 세포 집단을 포함한다. 어떤 구현예에서, 샘플은 신장 생검이다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 신장 질환을 지닌다. 또 다른 구현예에서, 세포 집단은 비-자가조직 신장 샘플로부터 유도된다. 일 구현예에서, 작제물은 적혈구 항상성을 제공한다.

[0153] **사용 방법**

[0154] 일 측면에서, 본 발명은 SRC+ 세포 집단 및/또는 본원에 기재된 신장 세포 집단 및 신장 세포의 혼합물을 함유하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드를 사용하여 필요로 하는 대상체에서 신장 질환, 빈혈, 또는 EPO 결핍을 치료하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 방법은 상기 대상체에게 EPO-생성 세포가 강화된 제1의 신장 세포 집단을 포함하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드(들)를 투여함을 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 제1의 세포 집단에는 EPO-생성 세포, 사구체 세포, 및 혈관형 세포가 강화되어 있다. 또 하나의 구현예에서, 오가노이드(들)은 하나 이상의 추가의 신장 세포 집단을 추가로 포함하고/하거나 이로부터 형성될 수 있다. 일 구현예에서, 추가의 세포 집단은 EPO-생성 세포가 강화되지 않은 제2의 세포 집단이다. 또 하나의 구현예에서, 추가의 세포 집단은 EPO-생성 세포, 사구체 세포, 또는 혈관형 세포가 강화되지 않은 제2의 세포 집단이다. 또 하나의 구현예에서, 오가노이드(들)은 또한 바이오재료 내에 침착되거나, 이 위에 침착되거나, 이 속에 포매되거나, 이로 코팅되거나, 이 속에 갇혀서 본원에 기재된 바와 같은 본원에 기재된 질환 또는 장애 치료용의 이식가능한 작제물을 형성하는 신장 세포의 신장 세포 집단 또는 혼합물을 포함하고/하거나 이로부터 형성된다. 일 구현예에서, 오가노이드는 단독으로 또는 다른 세포 또는 바이오재료, 예를 들면, 하이드로겔, 다공성 스캐폴드, 또는 천연 또는 합성 펩타이드 또는 단백질과 병용하여 사용되어 급성 또는 만성 질환 상태의 재생을 자극한다.

[0155] 또 하나의 측면에서, 본 발명의 방법에 의한 대상체내에서 신장 질환, 빈혈, 또는 EPO 결핍의 효과적인 치료는 적혈구생성 및/또는 신장 기능의 다양한 표지자를 통해 관찰될 수 있다. 일 구현예에서, 적혈구 항상성의 표지자는 적혈구용적률 (HCT), 헤모글로빈 (HB), 평균 혈구 헤모글로빈 (MCH), 적혈구 수(RBC), 망상적혈구 수, 망상적혈구 %, 평균 혈구 용적(MCV), 및 적혈구 세포 분포 폭(RDW)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다른 일 구현예에서, 신장 기능의 표지자는 혈청 알부민, 알부민 대 글로불린 비(A/G 비), 혈청 인, 혈청 나트륨, 신장 크기(초음파에 의해 측정가능), 혈청 칼슘, 인:칼슘 비, 혈청 칼륨, 단백뇨, 소변 크레아티닌, 혈청 크레아티닌, 혈액 질소 요소 (BUN), 콜레스테롤 수준, 트리글리세라이드 수준 및 사구체 여과율(GFR)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 더욱이, 일반적인 건강 및 웰빙의 몇 개의 표지자는 중량 증가 또는 손실, 생존, 혈압(평균 전신 혈압, 심장확장 혈압, 또는 수축 혈압), 및 물리적 내구 성능을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0156] 또 하나의 구현예에서, SRC+ 세포 집단 또는 생리활성 신장 세포 오가노이드를 사용한 효과적인 치료는 신장 기능의 하나 이상의 표지자의 안정화에 의해 입증된다. 신장 기능의 안정화는 본 발명의 방법으로 치료되지 않은 대상체에서 동일한 표지자와 비교하여 본 발명의 방법으로 치료된 대상체에서 표지자에 있어서의 변화의 관찰로 실증된다. 대안적으로, 신장 기능의 안정화는 치료 전에 동일한 피검자에서 동일한 표지자와 비교하여 본 발명의 방법으로 치료된 대상체에서 표지자에 있어서의 변화의 관찰에 의해 실증될 수 있다. 제1의 표지자에 있어서의 변화는 값에 있어 증가 또는 감소일 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명에 의해 제공된 치료는 대상체에서 혈

액 요소 질소(BUN) 수준의 안정화를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 대상체에서 관측된 BUN 수준은 본 발명의 방법으로 치료되지 않은 유사한 질환 상태를 지닌 대상체와 비교하여 더 낮다. 다른 일 구현예에서, 치료는 대상체에서 혈청 크레아티닌 수준의 안정화를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 대상체에서 관측된 혈청 크레아티닌 수준은 본 발명의 방법으로 치료되지 않은 유사한 질환 상태를 지닌 대상체와 비교하여 더 낮다. 또 하나의 구현예에서, 치료는 대상체에서 적혈구용적률(HCT) 수준의 안정화를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 대상체에서 관측된 HCT 수준은 본 발명의 방법으로 치료되지 않은 유사한 질환 상태를 지닌 대상체와 비교하여 더 높다. 또 하나의 구현예에서, 치료는 대상체에서 적혈구(RBC) 수준의 안정화를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 대상체에서 관측된 RBC 수준은 본 발명의 방법으로 치료되지 않은 유사한 질환 상태를 지닌 대상체와 비교하여 더 높다. 당해분야의 숙련가는, 본원에 기재되거나 당해 분야에 공지된 하나 이상의 추가의 표지자가 상기 대상체에서 신장 질환의 효과적인 치료를 측정하기 위해 결정될 수 있음을 인식할 것이다.

[0157] **방법 및 투여 경로**

[0158] 본 발명의 SRC+ 세포 집단 및/또는 생리활성 세포 오가노이드는 단독으로 또는 다른 생리활성 성분과 병용하여 투여될 수 있다. SRC+ 세포 집단 및/또는 오가노이드는 고형 장치의 내부로 편입된 조직 가공 성분을 주사 또는 이식하여 조직을 재생시키기에 적합하다.

[0159] 일 측면에서, 본 발명은 필요한 대상체에게 본원에 기재된 생리활성 세포 오가노이드(들)를 제공하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 생리활성 세포의 공급원은 자가조직 또는 동종이계, 동계(자가(autogeneic) 또는 동계(isogeneic)), 및 어떠한 이들의 조합일 수 있다. 공급원이 자가조직이 아닌 예에서, 상기 방법은 면역억제제의 투여를 포함할 수 있다. 적합한 면역억제제 약물은 아자티오프린, 사이클로포스파마이드, 미노리빈, 사이클로스포린, 타크롤리무스 수화물, 클로르암부실, 로벤자리트 디나트륨, 아우라노핀, 알프로스타틸, 구스페리무스 하이드로클로라이드, 바이오신소르브, 무로모맵, 알레파셉트, 펜토스타틴, 다클리주맵, 시플리무스, 마이코페놀레이트 모페틸, 레플로노마이드, 바실릭시맵, 도르나제 α, 빈다리드, 클라드리빈, 피메크롤리무스, 일로데카킨, 세텔리주맵, 에팔리주맵, 에버롤리무스, 아니스페리무스, 가빌리모마브, 파랄리모마브, 클로파라빈, 라파마이신, 시플리주맵, 사이레이토, LDP-03, CD4, SR-43551, SK&F-106615, IDEC-114, IDEC-131, FTY-720, TSK-204, LF-080299, A-86281, A-802715, GVH-313, HMR-1279, ZD-7349, IPL-423323, CBP-1011, MT-1345, CNI-1493, CBP-2011, J-695, LJP-920, L-732531, ABX-RB2, AP-1903, IDPS, BMS-205820, BMS-224818, CTLA4-1g, ER-49890, ER-38925, ISAtx-247, RDP-58, PNU-156804, LJP-1082, TMC-95A, TV-4710, PTR-262-MG, 및 AGI-1096(참고: 미국 특허 제7,563,822호)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 당해 분야의 숙련가는 다른 적합한 면역억제제 약물을 인식할 것이다.

[0160] 본 발명의 상기 대상체의 치료 방법은 본원에 기재된 SRC+ 세포 집단 및/또는 오가노이드의 전달을 포함한다. 일 구현예에서, 의도된 이점의 부위에 대한 세포의 직접적인 투여가 바람직하다.

[0161] 대상체에게 오가노이드를 투여하기 위한 다양한 수단은 본 명세서의 측면에서, 당해분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 그와 같은 방법은 실질-내(intra-parenchymal) 주사, 관절낭-하(sub-capsular) 배치, 경-요도(trans-urethra) 카테터화, 및 신장 동맥-내 카테터화를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0162] 세포는 대상체내로 주사 또는 이식에 의한 도입을 촉진시키는 전달 장치 또는 비히클내로 삽입시킬 수 있다. 어떤 구현예에서, 전달 비히클은 천연 물질을 포함할 수 있다. 어떤 다른 구현예에서, 전달 비히클은 합성 물질을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 전달 비히클은 기관 작제물을 모사하거나 적절하게 맞는 구조를 제공한다. 다른 구현예에서, 전달 비히클은 천연적으로 유체-유사성이다. 이러한 전달 장치는 수령 대상체의 신체내로 세포 및 유체를 주사하기 위한 튜브, 예를 들면, 카테터를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 튜브는 바늘, 예를 들면, 주사기를 추가로 가지며, 이를 통해 본 발명의 세포가 상기 대상체내로 원하는 위치에 도입된다. 일부 구현예에서, 포유동물 신장-유도된 세포 집단은 카테터(여기서 용어 "카테터"는 혈관내로 물질을 전달하기 위한 다양한 튜브-유사 시스템 중 어떤 것도 포함하는 것으로 의도된다)를 통해 혈관내로 투여하기 위해 제형화된다. 대안적으로, 세포는 식물, 예컨대 식물, 편직, 편조, 메쉬, 및 부직포, 천공된 필름, 스펀지 및 폼, 및 비드, 예컨대 고체 또는 다공성 비드, 극미립자, 나노입자 등(예를 들면, 컬티스퍼(Cultispher)-S 젤라틴 비드 - 제조원: Sigma)을 포함하나, 이에 한정되지 않는 바이오재료 또는 스케폴드내로 또는 상으로 삽입될 수 있다. 세포는 다양한 상이한 형태로 전달하기 위해 제조될 수 있다. 예를 들면, 세포를 용액 또는 겔 내에 현탁시킬 수 있다. 세포는, 본 발명의 세포가 생존가능하게 남아있는 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 혼합시킬 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 염수, 수성 완충 용액, 용매 및/또는 분산매를 포함한다. 이러한 담체 및 희석제는 당해분야에 공지되어 있다. 용액은 바람직하게는 멸균성 및 유체이고, 흔히 등장성일 것이

다. 바람직하게는, 용액은 제조 조건하에서 안정하고, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로산 등의 사용을 통해 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균류의 오염 작용에 대해 보관 및 보존된다. 당해분야의 숙련가는, 본 발명의 세포 집단 및 이들의 혼합물에 사용된 전달 비히클이 상기-언급된 특성의 조합을 포함할 수 있음을 인식할 것이다.

[0163] 단리된 신장 세포 집단(들), 예를 들면, 단독 또는 B4' 및/또는 B3와 혼합된 B2 세포 집단을 함유하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드의 투여 방식은 실질-내 주사, 관절낭-하 배치, 또는 신장 동맥을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 따라 사용될 추가의 투여 방식은 직접적인 개복술, 직접적인 복강경검사법, 경복부, 또는 피부를 통한 단일 또는 다중 주사를 포함한다. 본 발명에 따라 사용될 여전히 추가의 투여 방식은 예를 들면, 역행성 및 요관신우 주입을 포함한다. 수술적 투여 수단은 1-단계 절차 예컨대, 신부분절제술 및 작제물 이식, 신부분절제술, 부분 파이엘렉토미(partial pyelectomy), 장막 ± 복막을 사용한 혈관화, 다초점 생검바늘 트랙, 원추 또는 피라미드, 실린더, 및 신장 극점-유사 재배치뿐만 아니라, 예를 들면, 이식용 오가노이드-내부 생물반응기를 포함하는 2-단계 절차를 포함한다. 일 구현예에서, 세포의 혼합물을 함유하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드는 동일한 경로를 통해 동시에 전달된다. 또 하나의 구현예에서, 각각의 오가노이드는 본원에 기재된 방법 중 하나 이상에 의해 동시에 또는 일시적으로 조절된 방식으로, 특수한 위치에 또는 특수한 방법론을 통해 별도로 전달된다.

[0164] 인간에서 적절한 세포 또는 오가노이드 이식 투여량은 오가노이드의 활성, 예를 들면 EPO 생성과 관련된 현존하는 정보로부터 결정되거나, 전임상 연구에서 수행된 투여 연구로부터 외삽될 수 있다. 시험관내 배양물 및 생체내 동물 실험으로부터, 오가노이드의 양은 이식된 물질의 적절한 투여량을 계산하는데 있어서 정량화되어 사용될 수 있다. 추가로, 환자는, 추가의 이식이 이루어질 수 있거나 이식된 물질이 상응하게 감소되는 지를 측정하기 위해 모니터링될 수 있다.

[0165] 선택된 세포의 매트릭스 성분, 예컨대 당해 분야에 공지된 콜라겐 또는 하이알루론산, 성장 인자, 및/또는 VEGF, PDGF, TGF β , FGF, IGF를 포함하나 이에 한정되지 않는 사이토킨, 혈소판이 풍부한 혈장 및 약물중 하나 이상의 유형을 포함하는, 하나 이상의 다른 성분을 본 발명의 세포 집단 및 이의 혼합물을 함유하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드에 가할 수 있다.

[0166] 당해 분야의 숙련가는, 본원에 기재된 오가노이드에 적합한 다양한 투여 방법을 인식할 것이다.

[0167] 제조 물품 및 키트

[0168] 본 발명은 본 발명의 폴리머 매트릭스 및 스캐폴드 및 관련된 물질, 및/또는 세포 배양 배지 및 사용 설명서를 포함하는 키트를 추가로 포함한다. 사용 설명서는 예를 들면, 본 발명의 SRC+ 세포 집단 또는 오가노이드의 형성시 세포의 배양 및/또는 SRC+ 세포 집단 또는 오가노이드의 투여를 위한 지시사항을 함유할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 스캐폴드 및 설명서를 포함하는 키트를 제공한다. 또 하나의 구현예에서, 상기 키트는 마커 발현의 검출을 위한 제제, 제제의 사용을 위한 시약, 및 사용 설명서를 포함한다. 당해 키트는 대상체에서 원상태 신장의 재생성 예측에 이어 본원에 기재된 오가노이드(들)의 이식 또는 투여를 결정한 목적으로 사용될 수 있다. 상기 키트는 또한 본원에 기재된 오가노이드(들)의 생물학적 치료 효능을 측정하는데 사용될 수 있다.

[0169] 본 발명의 또 하나의 구현예는 필요한 대상체의 치료에 유용한 생리활성 세포를 함유하고/하거나 이로부터 형성된 오가노이드를 함유하는 제조 물품이다. 제조 물품은 용기 및 용기 상에 또는 이와 연관된 라벨 또는 포장내 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 상기 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 상기 용기는 상태를 치료하는데 효과적인 조성물을 담으며 멸균된 접근 포트(예를 들면, 용기는 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 스톱퍼를 지닌 용액 백 또는 바이알일 수 있다)를 가질 수 있다. 표지 또는 포장내 삽입물은, 오가노이드가 특정한 상태를 치료하는데 사용됨을 나타낸다. 표지 또는 포장내 삽입물은 오가노이드를 환자에게 투여하기 위한 설명서를 추가로 포함할 것이다. 본원에 기재된 조합 요법을 포함하는 제조 물품 및 키트가 또한 고려된다. 포장내 삽입물은 이러한 치료 제품의 사용에 관한 징후, 용법, 투여량, 투여, 사용금지사항 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는 치료 제품의 상업적 패키지에 관례상 포함된 설명서를 말한다. 일 구현예에서, 포장내 삽입물은, 오가노이드(들)이 질환 또는 장애, 예컨대, 예를 들면, 신장 질환 또는 장애를 치료하는데 사용됨을 나타낸다. 이는 또한 상업적 및 사용자 관점으로부터 바람직한 다른 물질, 예컨대 다른 버퍼, 희석제, 필터, 바늘, 및 주사기를 추가로 포함할 수 있다. 다양한 목적, 예를 들면, 재생 결과의 평가에 유용한 키트가 또한 제공된다. 본원에 기재된 바와 같은 소변-유도된 소포 및/또는 그것의 성분, 예를 들면, 핵산(예컨대 miRNA), 소포, 엑소좀 등을 위한 검출 제제를 함유하

는 키트가 제공될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 검출 제제는 핵산 프라이머 및 프로브뿐만 아니라 원하는 표적의 시험관내 검출을 위한 항체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 제조 물품을 사용하므로, 키트는 용기 및 용기 상에 또는 이와 연관된 라벨 또는 포장내 삽입물을 포함한다. 용기는 적어도 하나의 검출제를 포함하는 조성물을 담는다. 예를 들면, 희석제 및 버퍼 또는 대조군 검출 제제를 함유하는 추가의 용기가 포함될 수 있다. 표지 또는 포장내 삽입물은 조성물의 설명 뿐만 아니라, 의도된 시험관내, 예후, 또는 진단 용도를 위한 설명서도 제공할 수 있다.

[0170] 하기 실시예는 단지 설명하기 위해 제공된 것이고, 본 발명의 범위를 어떤 식으로든 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0171] 실시예

[0172] 실시예 1 - 선택된 신장 세포 + (SRC+) 세포 집단의 단리: 신장 생검으로부터 내피 세포의 단리

[0173] 하기 방법은 내피 세포 단리 후 이전에 적응된 콜라게나제/디스파제 소화 프로토콜^{2, 3, 5}을 사용한 효소에 의한 소화의 예를 제공한다. 상기 방법은 병든 ZSF1 랫트 신장 및 투석시 고혈압 인간 ESRD 환자로부터 수득된 신장 생검에 적용된다.

[0174] 내피 세포 (EC), 혈관 및 림프 기원:

[0175] 상기 기재된 바와 같이, 신장 세포 단리를 위한 표준 작동 절차를 사용하여 소화된 신장(들)을 100 μ m 스테리플립(Steriflip) 필터(제조사: Millipore)를 통해 여과한다. 잔여 세포 현탁액을 5% FBS를 함유하는 DMEM로 중화한 다음 300xg에서 5분 동안 원심분리하여 세척한다. 100 μ m 필터를 통해 회수한 세포 펠렛을 완전 보강된 EGM-2 성장 배지(제조사: Lonza) 내에 재-현탁시키고 파이프록틴 코팅된 디쉬 위에 25K/cm²의 세포 밀도로 플레이팅한다. 배양물을 매 3일마다 공급한다. EC 배양물이 80-90% 융합성인 경우, 이들을 트립신화 및 카운트한다. 트립신화된 세포를 CD31(PECAM) 일차 항체로 표지하고 밀테니(Miltenyi) 항-CD31 마이크로비드를 사용하여 양성적으로 선택한다. CD31⁺ 분급한 세포를 세척하고, 카운트하며, 플레이팅하고 10K/cm²의 밀도로 완전히 보강된 EGM-2 배지 내에 씨딩한다. 내피 세포 형태학은 24 시간 후 명백해지며 이들 세포는 다중 계대배양을 통해 팽창될 수 있다. 혈관 및/또는 림프 조성물은 계통-특이적 항체(예를 들면, VEGF3-모세 혈관; LYVE1- 림프)을 사용하여 분석할 수 있으며; 특수한 내피 아집단은 동일한 세포 표면 표현형검사 마커를 사용하여, 밀테니 마이크로-비드 선택 방법으로 추가로 선택/분급할 수 있다.

[0176] 팽창 및 정제 후, NKA SRC의 내피 세포 성분을 부력 밀도 분획화 (<2%)를 통해 관측된 바와 같은 천연 빈도보다 더 큰 백분율(>30%)로 강화할 수 있다. 일 구현예에서, NKA의 활성 생물학적 성분 또는 조성물을 조절하기 위해, 정제된 EC를 이식 전에 부력 밀도 구배 분획화(예를 들면, 60% B2-B4 + 40% EC)로부터 이전에 기재된 B2 및/또는 B2-B3-B4 분획을 사용하여 선택된 빈도로 조합할 수 있다.

[0177] 자기성 마이크로-비드를 사용한 내피 세포 분급:

[0178] EGM2 배지 중 파이프록틴 코팅된 플라스크로부터 수거된 세포를 마우스 항-인간 CD31 일차 항체를 사용하여 보충물이 들어있지 않은 EGM2 배지 내에서 0.4 μ g/백만 개의 세포/100 μ l의 농도로 20분 동안 4°C에서 염색한다. 20분 후, 세포를 세척하고 보충물이 없고 200ml의 염소 항-마우스 IgG1이 들어있는 12ml의 EGM2 배지 내에 재-현탁시킨다. 밀테니 마이크로비드를 가하고 추가의 20분 동안 광으로부터 보호된 4°C에서 인큐베이팅한다. 20분 후 세포를 원심분리(5분 @ 300xg)를 통해 2회 세척하고 12ml [1천만 개의 세포/ml] 내에 재-현탁시키고 밀테니 자가-MACS 기기(민감성 방식 프로그램에서 이중 양성 선택)을 사용하여 정제한다.

[0179] 도 1에 기재된 실시예에서, 내피 세포를 일차 ZSF1 세포로부터 선택하였다 (CD31+ 선택). 당해 공정으로부터 회수된 360만 개의 세포를 카운트하고 2개의 T175 파이프록틴 코팅된 플라스크 위에 10K/cm²의 농도에서 하위-배양하였다. 세포를 4일 동안 21% O₂에서 배양하고 85% 밀집도로 수거하였다. 당해 선택 및 배양 기간 후, 세포를 카운트하고 9.5 백만 개의 세포를 회수하였다. FACS에 의해 표현형 분석을 위해 수집된 샘플은 CD31에 대해 ~ 90% 양성이었다(도 1E, 우측 FACS 패널).

[0180] 인간 CKD 내피 세포 단리, 특성규명 및 팽창

[0181] 인간 신장 세포 배양:

[0182] 인간 신장 세포(참고: 공여체 정보에 대해 하기 표 1)을 상기 기재된 바와 같이 인간 신장 1차 세포 효소적 단

리 및 배양물의 표준 공정 절차를 사용하여 분리하였다. 간단히, 세포를 $25\text{K}/\text{cm}^2$ 에서 표준 KGM이 들어있는 T/C 처리된 플라스크 또는 EGM2이 완전히 보강된 배지가 들어있는 파이프록틴 코팅된 플라스크 내에서 단리 및 배양하였다. 세포를 3일 동안 21% 산소 환경 내에서 성장시킨 후 배지를 교환하고 배양물을 2% 산소 환경에 O/N 노출을 위해 이동시켰다. 4일 후 세포를 영상화하여 배양물 형태학을 분석하였다(도 2A). 이후에, 이들을 표준 방법(참고: HK027 배치 기록물)을 사용하여 수거하고 카운트하였다. 샘플을 수집하고 염색하여 CD31^+ 내피 세포의 백분율을 측정하였다(도 2). 내피 세포는 마우스 항-인간 CD31 일차 항체(제조원: BD biosciences) 및 자기성 마이크로비드(제조원: Miltenyi)를 사용하여 분급하였다. 이후에, CD31^+ 세포를 파이프록틴 코팅된 플라스크상에 $10\text{K}/\text{cm}^2$ 의 밀도로 재-플레이팅한 후 추가로 4일 동안 배양하였다(도 2, 세포 배양 형태학). 이후에, 세포를 카운트하고 샘플을 수집하여 양성 내피 세포의 백분율을 마우스 항-인간 CD31 일차 및 FACS 분석을 사용하여 측정하였다(도 3).

표 1

표 1. 인간 신장 공여체 정보:

샘플 ID	사망 원인	BUN	sCrea	HCT	HB	주요 특징
HK027	ICH	72	11.1	42.8	14	20년동안 HTN, ESRD 2007년부터 투석중.

결론적으로, 파이프록틴 상에서 병든 ZSF1 세포의 초기 배양물은 9% CD31^+ 배양물(TC-처리된 것로부터 <2%)을 수득하였다. p1에서, 파이프록틴 상에서 하위-배양된 9%의 CD31^+ 분획은 p0으로부터 p1까지 거의 3배 팽창된 ~ 90% CD31^+ 세포를 수득하였다. T/C 처리되거나 파이프록틴 코팅된 플라스크에서 인간 CKD 세포의 초기 배양물은 CD31^+ 양성 세포의 대략 동일한 백분율(2.7%와 비교하여 2.1%)을 수득하였다. 나타난 바와 같이, 양성으로 선택된 CD31^+ 양성 세포를 파이프록틴 코팅된 플라스크 상에서 완전히 보강된 EGM2 배지 내에서 하위-배양하는 것이 가능하며 CD31^+ 양성 세포의 백분율을 계대배양 1 후 13배(2.7%로부터 35.5%) 증가시켰다.

SRC+ 세포 집단의 단리: 추가의 생리활성 세포 유형의 단리의 예:

A. 신장 상피: 진행 중인 활성화는 부력 밀도 구배를 통해 분리된 분획 내에서 다양한 상피 세포 구획(벽쪽, 근위 관형, 헨레(Henle)의 루프, 원위 관형 세포)의 표시를 평가하고 있다. 더 구체적으로, 계통 추적 연구는 Six2^+ 상피 세포 집단의 직접적인 및 선택적 확인을 제공하고; 네프론 상피 구획에 대해 특이적인 마커를 사용한 Six2^+ 의 공-라벨링(참고 표 2 내지 3)은 세포 특이적 검출을 확인한다(참고: 표 4). 표 4는 근위, 원위 및 집합관형 세포형의 혼합물로서 p0 ZSF1 배양물(조합된 분획 B2-B3-B4)을 특성화하는 상피 마커의 제한된 패널을 제공한다. 표 2 내지 4에 열거된 동일한 세포 표면 검출 항체를 사용하여, 이전에 기재된 바와 같은(자기성 분급에 따른 배양 조건), 배양 선택을 통해 이들 특화된 상피 세포 구획의 강화가 고려된다.

표 2

표 2. 조직 특이적인 네프론 염색을 위한 마커 패널

	근위 세관			원위 소관			
항원	곡선(Convolut ed)	직선(Straigh t)	헨레의 루프	상승하는 두꺼운 팔다리	치밀 반점	곡선	집합관
사이토케라틴							
CK18	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
CK 7	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos-ind
기타							
E-CAD	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
N-CAD	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
아쿠아포린 1	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
아쿠아포린 2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
THP	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
렉틴							

LTA	Pos	Pos	Pos	Neg		Neg	Med-ind
DBA	Neg	Neg	Pos	Pos		Pos	Pos-ind
UEA	Neg	Neg	Neg	Neg		Neg	Pos-ind

[0188] Pos=양성, Pos-ind=세포의 선택된 집단에서 양성 세포, Med-ind = 조절성 집합관 염색 위치

표 3

[0189] 표 3. 항체 공급원

항원	동형	Manf	제품 번호	농도	표적
CK18	Ms IgG1	abCAM	Ab668	1mg/ml	세포내/넵론+
CK7	Ms IgG1	abCAM	Ab9021	1mg/ml	세포내/DT
아쿠아포린 1	Ms IgG2b	abCAM	Ab9566	0.2mg/ml	막/PT
아쿠아포린 2	rb IgG	abCAM	Ab64154	0.1mg/ml	막/CD
탬 호스폴(Tamm Horsfall) 당단백질	Rb IgG	Santa Cruz	Sc-20631	0.2mg/ml	막/DT
LTA (바이오티닐화된)	----	백터	B-1325	2mg/ml	막/PT
DBA (바이오티닐화된)	---	백터	B-1035	5mg/ml	막/DT/CD
UEA (바이오티닐화된)	---	백터	B-1065	2mg/ml	막/CD
ECAD	Ms IgG2a	BD	610182	0.25mg/ml	막/DT/CD
NCAD	Ms IgG1	BD	610921	0.25mg/ml	막/PT
동형 대조군	Ms IgG1	BD	557273	0.5mg/ml	
동형 대조군	Ms IgG2a	BD	553454	0.5mg/ml	
동형 대조군	Ms IgG2b	BD	557351	0.5mg/ml	
동형 대조군	Gt IgG	인비트로젠	02-6202	1mg/ml	
동형 대조군	Rb IgG	인비트로젠	02-6102	2mg/ml	

[0190] 2차 항체는 알렉사(Alexa) 647 분자 프로브 염소 항 마우스 IgG, 염소 항 토끼 IgG, 및 당나귀 항 염소 IgG, 스트렙타비딘 A647이었다. 염색에 이어 1ug/ml/1x10⁶ 세포를 사용한 SOP.

표 4

[0191] 표 4. 예비 ZSF1 p0 세포 특이적 검출

마커	구획	ZSF1 p0 % 양성
AQP2	집합관	42.36
DBA	원위 소관	56.93
LTA	근위/루프/IMCD	39.62
CK18	팬(Pan)-상피	68.39

[0192] **B. 사구체 유도된 세포 (벽쪽 상피 및 발세포):** 골반의 해부학적 절개는 사구체 분획의 단리를 개선시킨다. 상기 기재된, 신장 소화를 위한 표준 작동 절차를 사용하여, 세포를 단리하고 100 μm의 스테리-플립(Steri-flip) 필터(제조원: Millipore)를 통해 여과하고, 100 μm(사구체 분획 함유)보다 큰 세포 입자/무리를 추가의 20분 동안 재-소화시킨다. 소화된 분획을 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지로 중화하고 원심분리(300xg에서 5분 동안)로 세척한다. 재-현탁된 세포 펠렛을 VRADD 배지⁶ (DMEM/F12, 1 μM의 모든 트랜스 레티노산(제조원: Genzyme, 매사추세츠주 캄브리지 소재), 0.1 μm 텍사메타존(제조원: Sigma-Aldrich), 10-100nM 비타민 D (발 세포 배양을 개선시키기 위한 1,25(OH)2D3), 또는 콜라겐 제1형 코팅된 T/C 플레이트 상에서 배양된, 벽쪽 상피 친화적인 무혈청 배지, 예컨대 FBS의 부재하에 완전히 보충된 (50:50 DMEM/KSFM)) 내에서 배양한다. 세포를 25K/cm²의 밀도로 씨딩하고 세포 맹아(out-growth)가 나타날 때까지 아배양한다. 맹아 세포를 PEC 특이적인 마커(예컨대, 비제한적으로 크라운-1) 또는 조상세포 특이적인 마커(예를 들면, CD146, CD117, SOX2, Oct 4A, CD24, CD133) 또는 혈관사이 특이적인 마커(예컨대, 비제한적으로 평활근 액틴, 비멘틴, 미오카르딘, 칼빈딘) 또는 사구체 모세혈관 내피 세포(예를 들면, VEGF3 또는 CD31 또는 LIVE1)를 사용하여 계대배양 1에서 밀레니 마이크로비드에 결합된 1차 항체를 사용하여 확장 및 분급한다. 최적의 세포 수율에서 수거하고 천연 빈도보다 더 큰 B2 성분과 합

하는 경우, 보다 높은 백분율의 사구체-유도된 세포를 사구체 질환으로 고생하는 환자에게 적용시킬 수 있다.

[0193] **C. 집합관 상피:** 신장의 피질 및 수질 영역의 해부학적 절개는 골반내 또는 근처에 위치한 세포의 단리를 개선시킨다. 상기 기재된 바와 같이, 설치류, 개과 및 인간에 대한 일차 성장 세포의 단리 및 팽창 및 수거를 위한 표준 작동 절차는 집합관 상피 세포의 단리 및 확장 후 수행된다. 세포 분획 B1내 집합관의 세포가 강화된 일차 배양된 신장 세포의 하위-집단의 분획화를 위한 표준 작동 절차는 본원에서 상기 기재되어 있다. 이들 세포는 마커, 예컨대 아쿠아포린 2 및 돌리코스 바이폴로리스 응집소(DBA)를 기준으로 한 최고 백분율의 집합관 상피 세포를 함유한다. 대안적으로, 본 발명자는 벤 험프레이스(Ben Humphreys) 박사로부터 파필라/인터-수질 집합관(IMCD) 배양물 프로토콜(EGF로 보충된 REGM 배지; 미공개된 데이터)을 채택하였다. 이들 시나리오 중의 어느 것에서도, 집합관 상피가 강화된 세포 분획이 B2 성분과 함께 천연 빈도 보다 높은 빈도에서 사용될 수 있거나 이들은 표준 KGM 또는 등가물을 사용하여 확장될 수 있고 노 농도와 관련된 병든 원인론을 표적화하기 위해 사용될 수 있으며 신장 골반(예를 들면, 하이드로-신장증, 혈관-수뇨관 폐색)의 비정상 및/또는 질환에 적용될 수 있는 활성 생물학적 성분을 보다 잘 입증할 수 있다.

[0194] **실시예 2 - SRC 및 SRC+ 집단으로부터의 오가노이드의 산출 및 특성규명**

[0195] **자가-산출된 오가노이드/스페로이드 형성**

[0196] 오가노이드를 일차 신장 배양물, 팽창 및 부력 밀도 구배 원심분리 후 산출시켜 SRC(상기 기재된 바와 같은, NKA를 산출하기 위한 표준 작동 절차)를 분리하였다. 간단히, SRC를 100ml의 신장 세포 성장 배지 내에 $[1 \times 10^6]$ 세포/ml의 농도로 스피너 플라스크(제조원: Corning) 내에서 24 내지 48시간 동안 80rpm으로 설정된 자기 교반기 상에서 재-현탁시켰다(도 4). 세포 오가노이드/스페로이드는, 크기가 50 내지 125 μ M 범위인 세포의 클러스터로 이루어진다. 오가노이드 당 세포 수는 스피너 플라스크 배양 전 세포 형 및 크기를 기본으로 변할 수 있다. 오가노이드/스페로이드는 랫트 및 인간 SRC 둘 다로부터 산출되었으며 관형 상피 표현형을 발현한다(도 5).

[0197] **오가노이드 기능 및 관생성**

[0198] 튜브를 형성하는 SRC의 능력을 적용시켜 NKA의 효력을 평가할 수 있다. 당해 검정을 콜라겐 1/콜라겐 IV 젤라틴의 50:50 혼합물 내에서 3D로 배양된 SRC 오가노이드에 적용하였다. 배양된 오가노이드의 면역-형광 염색시, 수득되는 튜브는 상피 표현형을 지속적으로 발현한다(도 6).

[0199] **오가노이드 플러스**

[0200] 자가-산출된 스페로이드를 형성하는 SRC의 능력은, 다른 세포형의 조합물을 적용하는 경우 유리한 것으로 입증될 수 있다. 관생성은 혈관 또는 줄기 세포 성분의 첨가로 향상될 수 있다. 오가노이드 형성 기간 동안 SRC 집단이 들어있는 배양물 내의 선택적 세포 집단을 가함으로써, 기능 단위가 재생 결과 동안에 활성화된 주요 세포 신호전달 경로를 개요하면서 형성될 수 있다. 이러한 세포-세포 상호작용의 예는 기관생성 동안 중추적인 것으로 공지된 상피-간엽 신호전달 현상을 포함하나 이에 한정되지 않는다(참고: Basu & Ludlow 2012, *Developmental engineering the kidney-leveraging morphogenic principles for renal regeneration*, Birth Defects Research Part C 96:30-38). SRC가 표준 절차를 사용하여 산출되는 동안, 내피 세포주(HuVEC)를 오가노이드(+) 조합의 예로서 사용하였다. 8천만개의 SRC를 막 염료(Invitrogen DiL 레드 표지)로 표지하고 125ml의 스피너 플라스크 내의 100ml의 RCGM 배지 내의 상이한 색상의 막 염료(Invitrogen DiO 그린 표지)로 표지된 2천만개의 HuVEC에 80rpm으로 48시간 동안 가하였다(도 7). SRC 오가노이드 집단 단독을 또한 대조군으로서 개시하였다. 오가노이드의 형성시, 관생성 검정을 Col I/IV 3D 젤 내에서 시험관내 설정하여 잠재적 수반되는 혈관화 이 존재 및 부재하에서 튜브를 형성하는 능력을 보증하였다(도 8).

[0201] **실시예 3 - 신장 질환의 설치류 모델에서 SRC 오가노이드의 특성규명/생체분포**

[0202] ZSF1 급성 연구는 SPIO 표지된 오가노이드의 바이오-분포 및 세포 체류를 48 시간에 걸쳐 평가한다. 6마리의 40+ 주령 ZSF1 랫트에게 2.5×10^6 SPIO 로딩된 세포(PBS 중 대략 25000 자가-산출된 오가노이드를 나타냄)를 지닌 실질에 50×10^6 /ml의 농도로 좌측 꼬리 극(pole)에 주사하였다(도 9). 3마리의 동물을 이식 후 24 및 48 시간의 간격에서 수거하였다. 신장을 프루시안 블루 및 H&E 염색 방법을 사용하여 세포 체류 및 바이오-분포에 대해 MRI로 및 조직학적으로 평가하였다(도 10 및 11).

[0203] **결과**

- [0204] 오가노이드는 표적화된 전달 후 쉽게 표지되고 추적되었다. 오가노이드 처리는 관형 또는 사구체 구획내에서 관측된 형태적 변경없이 잘 용인되었다. 내피 세포(프루시안 블루에 의한 염색 양성)의 다초점 클러스터가 주사 후 24시간째에 좌측 신장의 신장 피질(관 내/관 간)에서 및 48시간 후 보다 적은 정도로 흔히 관찰되었다.
- [0205] **실시예 4 - SRC+ 및 SRC/SRC+ 유도된 오가노이드의 치료학적 효능을 입증하기 위한 생체내 연구: CKD (5/6 신절제술) 면역-절충된 설치류 연구**
- [0206] 인간-유도된 SRC+ 및 SRC/SRC+ 오가노이드를 면역-절충된 설치류(NIHRNU(누드) 랫트; 무흉선 랫트)에서 만성적 신장 질환의 5/6-신절제술 모델을 사용하여 치료학적 효능에 대하여 평가하였다. 질환 상태의 확립, 치료 개입 양식 및 치료적 반응의 임상 평가는 이전에 기재된 바와 같다(참고: *Genheimer et al., 2012. Molecular characterization of the regenerative response induced by intrarenal transplantation of selected renal cells in rodent model of chronic kidney disease. Cells Tissues Organs 196: 374-84*).
- [0207] **세포 단리 및 선택:** 인간 신장 세포를 문헌[참고: Presnell (2011)]에 기재된 바와 같이 생검으로부터 단리하고, 팽창시켰다. 세포를 아-배양하고 세포 동결보존 버퍼(80% HTS/10%DMSO/10% FBS) 내에서 (20×10^6 세포/ml/바이알)의 농도로 -80°C 까지 $-1^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 의 동결 속도의 강하를 사용하여 계대배양 2 후 동결보존한 다음 보다 긴 저장을 위하여 액체 질소 동결기로 이전하였다. 동결보존 후, 세포를 37°C 로 신속하게 해동시켜 표준 트립판 블루 배제 방법을 사용하여 회수 및 생존력을 평가하였다. 이후에 세포를 조직 배양 용기 상에 $3000 \text{ 세포}/\text{cm}^2$ 에서 씨딩하고 노르믹스 조건($21\% \text{O}_2/5\% \text{CO}_2/37^{\circ}\text{C}$) 하에 신장 세포 성장 배지 내에서 4일간 배양하였다. 4일 후 배양 배지를 변화시키고 배양물을 밤새 보다 낮은 산소 환경($2\% \text{O}_2/5\% \text{CO}_2/37^{\circ}\text{C}$) 하에서 밀도 구배 분리에 의한 세포 수거 및 SRC의 선택 전에 항온처리하였다. 인간 계대 정맥 내피 세포 (HUVEC) 배양물(Lonza 2389, CAT# CC2517)을 EGM2 완전히 보강된 배지 내에서 계대배양 3까지 동결보존 후 초기 계대배양물로부터 확장시켰다. 세포를 수거하고 생존력을 표준 트립판 블루 배제 방법을 사용하여 평가하였다.
- [0208] **오가노이드 형성:** 오가노이드 배양물을 1) 인간 SRC 및 HUVEC를 2×10^6 세포/ml의 농도로 이들 각각의 배지 내에 재현탁시키고 2) 동등 용적의 각각의 세포 제제 25ml (50×10^6 세포/ml)를 125ml 의 스피너 플라스크(제조원: Corning)내로 합하여 확립하였다. 조합된 배양물에, 25ml 의 각각의 배지를 100ml 내에서 1×10^6 세포/ml의 최종 세포 농도를 위해 플라스크에 가하였다. 플라스크를 인큐베이터 내의 자기 교반기 상에 80RPM 의 속도에서 두고 24 시간 동안 배양하였다.
- [0209] **시험품:** 오가노이드 용량을 조정하여 대략 ($2 \text{ 내지 } 5 \times 10^6$ 세포/ $50 \mu\text{l}$)가 랫트 신장당 투여되도록 하였다. 오가노이드 수를 선적 동안 어떠한 손실에 대해 카운트하기 위해 더 큰 용적의 0.5mL 의 DPBS 내에서 상기 농도로 조절하였다. 추가의 튜브를 재배치물로서 보냈다. 투여량은 FEDEX를 통해 이식 시설에 2개의 0.5mL 의 마이크로원심관 내에서 CREDO 큐브 쉬퍼(cube shipper)를 사용하여 4 내지 8°C 에서 이식 시설에 보냈다.
- [0210] **시험품 전달:** 나머지 좌측 신장을 좌측 측면 절개를 통해 평가하였다. 전달 전에, 오가노이드를 튜브의 기저를 탭핑(tapping)하거나 튀겨서(flicking) 온화하게 재현탁시켰다. 오가노이드를 18G 평활 팁(blunt tip) 바늘을 사용하여 주사기내로 흡인시켰다. 이후에 바늘을 전달용의 23G 커팅(cutting) 바늘로 교환하였다. 표적화된 전달은 $50 \mu\text{L}$ 를 신장의 피질-수질 영역내로 주사하여 수행하였다. 처리되지 않은 대조군 동물은 처리하지 않고 두었으며 과정을 겪지 않았다.
- [0211] **RKM 모델 절차:** 8 내지 12 주령(대략 200 g 평균 중량)의 수컷 NIHRNU 랫트는 하기와 같은 2 단계의 신절제술을 겪었다: 각각의 개별 동물에 대해 우측 신장을 제거하고 칭량하며, 1주 동안 회복시킨 후, 좌측 신장의 꼬리의 및 두개 극으로부터 조직을 절개하여 또한 칭량하였다. 2 내지 3주 회복 및 순응 기간을 연구 개시 전에 수행하였다. 순응 기간 후, 혈액 및 소변을 연속적인 2주 동안 수집하여 분석하였다. 차후의 샘플링을 이후 매 2주마다 수행하였다. 모든 설치류에게 상업적으로 이용가능한 사료, 및 물을 *자유로이(ad libitum)* 제공하였다.
- [0212] 동물을 신절제술 후 증가하는 소변 단백질/소변 단백질 크레아티닌(UPC)의 일부 증거를 사용하여 모니터링하고 신절제술 후 12주째에 인간 오가노이드로 처리하였다. 하기 표 5는 연구의 개요를 제공한다.

표 5

[0213]

표 5: 연구 설계

신절제술 배치	설명 (처리)	평가
동물 (59% KMR) 신절제술 후 Tx 12 주 관찰 기간 신절제술 후 204 일 Tx-후 119일	오가노이드 원형 (n=4)	매일 생존
	처리되지 않음 (n=8)	격주 · 체중 · 혈청학 및 혈액학 · 요검사 패널 검시 · 전체적인 병리학 관찰 · 계획되지 않은 사망인 경우 복부 개방하고 전체의 동물을 고정시킴

[0214]

측정: 체중(g)은 격주 기준으로 수집하였다). 혈청 생화학적 및 혈액 평가는 격주 기준으로 연구의 지속 동안 수행하였다. 요검사는 격주로 수행하였다. 연구 동물에 대한 계획된 검사에서 전체적인 관찰이 이루어졌고, 나머지 신장을 절개하여 고정시키고, 동물을 포르말린 내에 고정시켜 두었다. 모든 동물 및 조직을 필요에 따라, 수집하고, 칭량하여, 측정하고 조직학적 공정을 위해 제조하였다. 신장의 조직학적 평가에서 사용된 방법을 수행하였다. KMR은 신장 질량 감소이다.

[0215]

결과:

[0216]

인간 NKO의 효능은 무흉선 랫트에서의 신장 기능부전 모델에서 실증되었다.

[0217]

RKM 모델 개요

[0218]

무흉선 KMR 모델내 질환 진행은 이전에 기재된 신절제술 모델 및 신장 단백질 취급의 파손, 질소혈증, 고콜레스테롤혈증, 빈혈, 및 진행하는 요독증을 포함하는 CKD-관련된 후유증과 일치하였다. 달성된 질환 상태와 관련하여 NIHRNU 신절제술 모델의 결과는 질량 감소 동안 절제된 신장 조직의 양에 대해 민감성이었으며 본원에서 이용된 동물은 임상 병리학 모니터링 및 말단 조직학적 평가를 기준으로 서서히 진행하는 초기 단계 질환 상태를 입증하였다.

[0219]

생전 임상 병리학에 있어서 NKO 원형 효과

[0220]

신장 기능과 관련된 임상 병리학 척도를 처리 전에 시험하여 연구의 말기 전에 취한 척도와 쌍으로 된 방식으로 비교하였다. 이들 비교로부터, 하기 표에서 요약한 바와 같이, 처리되지 않은 대조군 동물에서 4개월 연구에 걸친 질병 진행과 일치하는 변화가 있었다. 유의적인 차이는 쌍으로 된 BUN, Hct, Hgb, RBC, WBC, sChol, sProt, sAlb, uPro, UPC, 및 spGrav에서 주목되었다. 이들 마커에서의 변화는 대표적인 초기 단계 CKD이며 급성 질소혈증, 소관 여과/농도 및 포스포테미아(phosphotemia)의 말기 단계 손실을 아직 초래하지 않은 신장 기능에 있어서의 감소의 표지자이다. NKO로 처리한 동물에서, BUN, Hct, Hgb, RBC, WBC, 및 spGrav에 있어서의 변화는 처리되지 않은 대조군 동물 결과를 기준으로 예측될 수 있는 바와 같이 유의미하지 않았다(참고: 하기 표 6).

표 6

[0221]

표 6. 처리-전 및 처리-후 처리 그룹 임상 척도

척도	그룹	0 시간		연구 말기		유의미한	쌍으로 된 t-시험 p-값
		평균	SD	평균	SD	변화	
sCre	대조군	0.48	0.07	0.51	0.21		0.598
	오가노이드	0.43	0.05	0.58	0.29		0.298
BUN	대조군	32.4	4.2	47.1	19.5	있음	0.045

	오가노이드	31.8	5.7	56.5	27.8		0.09
Hct	대조군	46.56	2.48	39.99	2.71	있음	<0.0001
	오가노이드	42.48	1.38	39.1	3.71		0.26
Hgb	대조군	14.85	0.92	12.93	0.83	있음	0.0005
	오가노이드	14.18	0.25	12.63	1.05		0.0518
RBC	대조군	8.93	0.49	7.88	0.59	있음	0.0007
	오가노이드	8.51	0.17	7.76	0.68		0.124
WBC	대조군	6.13	0.6	8.74	2.15	있음	0.016
	오가노이드	6.93	0.43	7.4	0.76		0.406
sPhos	대조군	7.28	0.88	6.38	1.1		0.15
	오가노이드	6.75	0.51	7.7	1.87		0.48
sChol	대조군	89.1	9.6	139	47.4	있음	0.01
	오가노이드	77.8	4.1	142.5	15.4	있음	0.005
sProt	대조군	5.99	0.24	5.28	0.28	있음	0.001
	오가노이드	5.83	0.26	5.38	0.1	있음	0.04
sAlb	대조군	3.15	0.11	2.64	0.23	있음	0.0003
	오가노이드	2.95	0.06	2.58	0.05	있음	0.0004
uPro	대조군	371.8	211.5	625.6	182.7	있음	0.007
	오가노이드	252	127.7	674.9	33.63	있음	0.008
UPC	대조군	4.47	2.08	11.25	3.65	있음	<0.0001
	오가노이드	4.39	0.95	11.41	0.66	있음	0.01
uCre	대조군	83.4	22.9	56.3	13.8		0.06
	오가노이드	55.75	17.86	58.3	3.5		0.87
uNa	대조군	134.38	52.63	61.13	12.88	있음	0.005
	오가노이드	110.25	34.79	50.67	6.74		0.116
uK	대조군	116	35.66	84.75	5.24		0.104
	오가노이드	79.5	22.75	87.67	8.56		0.549
uChlor	대조군	163.88	20.7	86.75	16.09	있음	0.01
	오가노이드	133.25	29.28	79.33	7.02		0.24
spGrav	대조군	1.034	0.009	1.025	0.003	있음	0.02
	오가노이드	1.027	0.009	1.026	0.005		0.73

척도	표시	CKD와의 연관성
BUN	요소 취급	줄어든 eGFR, 관형 기능이상
Hct	빈혈의 척도	줄어든 신장 기능의 조기 표지자; EPO 기능이 상
Hgb		
RBC		
WBC*	염증	CKD 진행에 대한 증가된 위험과 연관됨
spGrav	소변 농도	손상된 소변 기능의 감소된 표지자

[0222]

[0223]

여기의 WBC는, 이들 동물이 무흉선이므로 T-세포 매개된 반응을 반영하지 않을 수 있다.

[0224]

모델로부터의 신장의 조직학적 개요

[0225]

조직병리는, 대조군 동물이 말기 회생에 의해 약한, 진행성 신병증으로 진행되었음을 입증하였다.

[0226]

손상-관련된 조사결과는 중증도에 있어서 일반적으로 보통인 위축증, 팽창, 및 단백질성 캐스트(cast)와 함께 천연적으로 주로 관형이었다. 관형 호염기성 및 섬유증은 흔히 최소였으며 간질성 염증은 전형적으로 최소 또는 부재하였다. 사구체 변화는 중증도에 있어서 최소였다.

[0227]

관절 섬유증/염증은 중증도에 있어서 전형적으로 단지 최소였고 거의 없는 염증 세포 함량에 의해 특징화되었으며; 반응은 무흉선 누드 랫트에서 불완전한 면역계에 의해 줄어들었다. 광물화 및 림프구 침윤은 배치 1 동물에서 저 발생정도 및 중증도였다. 실험실 랫트에서 공통적인, 빈번한 초점 광물화가 관찰되었다.

[0228]

처리되지 않은 그룹과 NKO 처리된 그룹 사이에 유의미적인 차이는 나타나지 않았다.

표 7

척도	정상	비처리됨	NKO 처리됨
관-간질 손상	0.0 + 0.1	1.4±0.4	1.8±0.4
사구체 손상	0.0	0.8±0.3	1.2±0.5

[0229]

[0230]

생존에 있어서 NK0 효과

[0231]

모든 동물(59% KMR)은 연구 말기(Tx-후 119 일 및 신절제술 후 204일)까지 생존하였으므로, NK0 처리의 구별할 수 있는 생존 이점은 검출되지 않았다.

[0232]

EOS에서 염색 방법으로 검출된 인간 NK0의 접목

[0233]

당해 모델은 인간 생성물의 이종발생성 적용을 허용하므로, 랫트 신장내에서 사람 세포의 추적은 항체를 확인하는 인간 세포의 사용을 통해 가능하였다. RKM 랫트 신장의 배경내 인간 HLA1에 대한 염색은 처리-후 4개월째에 세포를 확인하였다(참고: 도 12). 인간 세포의 접목과 일치하는 것으로 고려된 염색의 확인은 2개의 독립된 관찰자에 의해 확인되었다. 전형적으로 1 또는 2개의 세포가 각각의 동물에 대해 염색된 4개의 단락 중 하나에서 확인되었으며 하나의 클러스터가 간질내에서 확인되지만, 소관내로 편입되었다.

[0234]

결론:

[0235]

· 오가노이드(NK0) 전달은 대조군 동물에서 신장 질환 진행과 연관된 유의미한 변화를 완화하였으며 질환 모델에 대한 동계의/자가조직 NKA 전달에 의해 영향받은 척도를 포함하였다.

[0236]

· 영향받은 척도는 질환 모델에 대한 동계의/자가조직 NKA 전달로 관찰된 것 - 빈혈의 척도(Hct, Hgb, RBC), 염증 (WBC), 뇨 농도 (spGrav) 및 가능한 질소혈증(BUN)과 일치하였다.

[0237]

· 아주 적은 수의 인간 세포가 NK0 원형을 사용한 처리 후 대략 4개월째에 검출되었다.

[0238]

· 누드 랫트(59% KMR, 평균)의 절제술은 진행성 빈혈, 단백뇨, 이상지질혈증 및 초기 단계 질소혈증의 가능한 징후에 의해 특징화된 초기 단계 및 만성적으로 점진적인 신장 기능부전의 상태를 초래하였다.

[0239]

· 모든 동물은 연구 말기까지 생존하였다.

[0240]

· 인간 오가노이드를 RKM 모델에 전달하는데 이용된 과정은 잘 용인되었다.

[0241]

실시예 5- 생물반응성 신장 세포의 단리 & 특성규명

[0242]

성체 수컷 돼지(*Sus scrofa*)에서 빈혈이 있는 특발성 점진적인 만성적 신장 질환 (CKD)의 경우에 세포성 조성물 및 특성규명의 평가를 위한 신선한 병든 신장 조직을 연령-매칭된 정상외 돼지 신장 조직과 직접적인 비교를 위해 제공하였다. 수거시기에 신장 조직의 조직학적 시험은 심각한 확산 만성적 간질 섬유증 및, 다초점 섬유증을 지닌 초승달형 사구체신염에 의해 특징화된 신장 질환을 확증하였다. 임상 화학은 질소혈증(혈액 요소 질소 및 혈청 크레아티닌의 상승), 및 약한 빈혈(적혈구용적률 및 우울해진 헤모글로빈 수준에 있어서의 약한 감소)를 실증하였다. 세포를 단리하고, 팽창시켜, 병든 및 정상 신장 조직 둘 다에 대해 특징화하였다. 문헌(참고: Presnell et al. WO/2010/056328)(본원에 그 전체가 참고로 편입됨)의 도 1에 나타난 바와 같이, 고모리(Gomori)의 트리크롬 염색은 정상외 신장 조직과 비교하여 병든 신장 조직에서 섬유증(화살표로 나타난 블루 염색)을 강조한다. 쿠블린:메갈린을 발현하고 수용체-매개된 알부민 수송할 수 있는, 기능적 관형 세포는 정상 및 병든 신장 조직 둘 다로부터 전파되었다. 에리트로포이에틴 (EPO)-발현 세포는 또한 배양물 내에 존재하였으며 다중 계대배양 및 동결/해동 사이클을 통해 유지되었다. 더욱이, 분자 분석은, 정상 및 병든 조직으로부터의 EPO-발현 세포가 시험관내 저산소 조건에 대해 EPO 및, vEGF를 포함하는, 다른 저산소증-조절된 유전자 표적과 함께 HIF1 α -유도된 유도에 대해 반응하였음을 실증하였다. 세포를 돼지 신장 조직으로부터 콜라게나제 + 디스파제를 사용한 효소에 의한 소화에 의해 단리하고 단순한 기계적 소화 및 외식편 배양물을 수행함으로써 별도의 실험에서 분리하였다. 계대배양 2에서, epo-발현 세포를 함유하는 외식편-유도된 세포 배양을 대기(21%) 및 변하는 저산소 (<5%) 배양 조건 둘 다에 적용시켜, 저산소증에 대한 노출이 EPO 유전자 발현의 상향조절되는지를 측정하였다. 설치류 배양물(참고: 실시예 3)을 사용하여 알 수 있는 바와 같이, 정상외 돼지는 EPO 유전자의 산소-의존적 발현 및 조절을 나타내었다. 놀랍게도, CKD 돼지의 요독/빈혈 상태(적혈구용적률 <34, 크레아티닌 >9.0)에도 불구하고, EPO 발현 세포는 쉽게 단리되어 조직으로부터 증식되며 EPO 유전자의 발현은 문헌(참고: Presnell et al. WO/2010/056328)(본원에 그 전체가 참고로 편입됨)의 도2에 나타난 바와 같이, 저산소증 조절

된 채로 남는다. 문헌(참고: Presnell et al. WO/2010/056328)(본원에 그 전체가 참고로 편입됨)의 도 3에 나타난 바와 같이, 증식된 배양물 내의 세포는, 소관-유사 구조내로 자가-구조화되는 능력을 실증하였다. 문헌(참고: Presnell et al. WO/2010/056328)(본원에 그 전체가 참고로 편입됨)의 도 4에 나타난 바와 같이, 배양물(계대배양 3에서) 내에서 기능적 관형 세포의 존재는 배양된 세포에 의한 FITC-접합된 알부민의 수용체-매개된 흡수를 관찰함으로써 확인되었다. 그런 점(얇은 화이트 화살표로 나타냄)은 관형 세포 특이적 수용체, 메갈린 및 쿠빌린에 의해 매개된 세포내이입된 플루오레신-접합된 알부민을 나타내며, 이는 기능적 관형 세포에 의한 단백질 재흡수를 나타낸다. 블루 염색(두꺼운 화이트 화살표로 나타냄)은 핵스트(Hoescht)-염색된 핵이다. 이와 함께, 이들 데이터는, 기능적 관형 및 내분비 세포가 CKD로 심하게 절충된 신장 조직에서 조차, 돼지 신장 조직으로부터 단리되어 증식될 수 있다. 더욱이, 이들 조사결과는, CKD의 치료용 자가조직 세포 기반 치료 제품의 진전을 뒷받침한다.

[0243] 또한, EPO-생성 세포는 정상적 성인 신장(실시예 1에서 상기 기재된 바와 같음)으로부터 효소적으로 분리되었다. 문헌(참고: Presnell et al. WO/2010/056328)(본원에 그 전체가 참고로 편입됨)의 도 5에 나타난 바와 같이, 단리 절차는 초기 조직에서보다 분리 후 보다 상대적인 EPO 발현을 산출하였다. 문헌(참고: Presnell et al. WO/2010/056328)(본원에 그 전체가 참고로 편입됨)의 도 6에 나타난 바와 같이, 인간 EPO 생성 세포를 EPO 유전자 발현이 보유된 배양물 내에서 유지시키는 것이 가능하다. 인간 세포를 예를 들면, 피브로넥틴 또는 콜라겐과 같은 일부 세포의 매트릭스로 코팅된 평면 조직-배양물 처리된 플라스틱 또는 플라스틱에서 배양/증식시켰으며, 모두는 EPO 발현을 시간에 따라 뒷받침하는 것으로 밝혀졌다.

[0244] 실시예 6- 특수한 생물반응성 신장 세포의 단리 & 강화

[0245] 신장 세포 단리: 간단히, 10개의, 2-주령 수컷 랫트 신장의 배치를 상업적 공급자(Hilltop Lab Animals Inc.)로부터 구입하여 밤새 비스판(Viaspan) 보존 배지 내에서 대략 4℃의 온도에서 이동시켰다. 본원에 기재된 모든 단계를 생물학적 안전성 캐비닛(BSC) 내에서 수행하여 멸균성을 보존하였다. 신장을 헵크스 평형 염 용액(HBSS) 내에서 3회 세척하여 비아스판 보존 배지를 세정하였다. 3번째 세척 후 나머지 신장 캡슐 및 어떠한 남아있는 기질조직도 제거하였다. 주요 칼릭스(calyx)를 또한 미세 절제술을 사용하여 제거하였다. 이후에, 신장을 멸균된 메스를 사용하여 슬러리로 곱게 다졌다. 이후에 슬러리를 50ml의 원뿔형 원심관으로 이전시키고 청량하였다. 작은 샘플을 RNA에 대해 수집하고 RNase-유리된 멸균된 1.5ml 마이크로-원심관내로 두고 액체 질소 내에서 스냅 냉동시켰다. 냉동되면, 그 다음 그것을 -80℃ 냉동고로 분석할 때까지 이전시켰다. 10개의 유년성 신장의 조직 중량은 대략 1 그램과 동일하였다. 배치의 중량을 기준으로, 소화 배지를 조정하여 1 그램의 조직당 20ml의 소화 배지를 전달하였다. 당해 절차용 소화 버퍼는 HBSS, 300단위/ml의 콜라게나제 제IV형(제조원: Worthington)과 5mM CaCl₂(제조원: Sigma) 내에 4 단위의 디스파제 1(제조원: Stem Cell Tech)를 함유하였다.

[0246] 적절한 용적의 예비-가온된 소화 완충제를 튜브에 첨가하고, 이를 이후에 밀봉하여 37℃ 인큐베이터 내의 로커(rocker)상에 20 분 동안 두었다. 당해 제1의 소화 단계는 많은 적혈구를 제거하고 잔여 조직의 소화를 향상시킨다. 20 분 후, 튜브를 제거하고 BSC 내에 두었다. 조직이 튜브의 바닥에 침전되도록 한 후 상청액을 제거하였다. 잔여 조직을 이후에 개시 용적에 필적하는 신선한 소화 버퍼로 보충하였다. 다시 튜브를 37℃ 인큐베이터 내의 로커에 추가의 30분 동안 두었다.

[0247] 30분 후, 소화 혼합물을 70 μm의 세포 염색기(제조원: BD Falcon)을 통해 동등 용적의 중화 버퍼(DMEM w/10% FBS)내로 피펫팅하여 소화 반응을 정지시켰다. 세포 현탁액을 이후에 원심분리로 300xg에서 5분 동안 세척하였다. 원심분리 후, 펠렛을 20ml의 KFSM 배지 내에 재-현탁시키고 샘플을 세포 카운팅 및 생존력 평가를 위해 트립판 블루 배제를 사용하여 획득하였다. 세포수가 계산되면, 1 백만 개의 세포를 RNA를 위해 수집하고, PBS 내에 세척하고, 액체 질소 내에 스냅 냉동시켰다. 잔여 세포 현탁액을 KFSM 배지를 사용하여 최대 50ml가 되도록 하고 300xg에서 5분 동안 원심분리하여 다시 세척하였다. 세척 후, 세포 펠렛을 1500만 개의 세포/mL의 KFSM의 농도로 재-현탁시켰다.

[0248] 이후에, 5 밀리리터의 신장 세포 현탁액을 15ml 원뿔형 원심관(제조원: BD Falcon) 중 5ml의 30% (w/v) Optiprep[®]에 가하고 6회 반전하여 혼합하였다. 이는 15%(w/v)의 Optiprep[®]의 최종 혼합물을 형성하였다. 반전 후, 튜브를 1mL의 PBS를 사용하여 주의 깊게 층상화하였다. 튜브를 800 x g에서 15분 동안 쉬지 않고 원심분리하였다. 원심분리 후, 튜브를 제거하면 세포 밴드가 혼합 구배의 상단에 형성되었다. 적혈구, 죽은 세포, 및 일부 작은 극소량의 과립 세포, 일부 epo-생성 세포, 일부 관형 세포, 및 일부 내피 세포를 포함한 생존 세포의 작은 집단을 포함하는 펠렛이 존재하였다. 밴드를 피펫을 사용하여 주의 깊게 제거하고 또 다른 15ml의 원뿔형 튜브로 이전시켰다. 구배 배지를 흡인에 의해 제거하고 펠렛을 1ml의 KFSM 내에 재-현탁시켜 수집하였다. 밴드

세포 및 펠렛 세포를 이후에 재조합하고 적어도 3회 희석의 수집된 밴드 용적 내에 KSFM을 사용하여 재-현탁시키고 원심분리로 300xg에서 5분 동안 세척하였다. 세척 후, 세포를 20ml의 KSFM 내에 재-현탁시키고 세포 카운팅용 세포를 수집하였다. 세포수가 트립판 블루 배제를 사용하여 계산되면, 1 백만 개의 세포를 RNA 샘플을 위해 수집하고, PBS 내에서 세척하고 액체 질소 내에 스냅 냉동하였다.

[0249] 밀도 구배 분리를 사용하여 특수한 생리활성 신장 세포의 생존력 및 배양물 성능을 향상시키기 위한 예비-배양물 '세정(clean-up)': 배양용의 세포의 청결한, 생존가능 집단을 획득하기 위하여, 세포 현탁액을 "신장 세포 단리"에서 상기 기재한 바와 같이 우선 산출시켰다. 임의의 단계 및 초기 제제의 세정 수단으로서, 멸균된 등장의 버퍼 내에 현탁시킨 최대 100 백만개이하의 총 세포를 동등 용적의 실온에서 스톱 60% (w/v) 아이오딧사놀로부터 제조된 30% Optiprep[®]과 1:1로 완전 혼합하고(따라서 최종 15% w/v Optiprep 용액이 획득된다) 6회 반전하여 철저히 혼합하였다. 혼합 후, 1ml의 PBS 완충제를 혼합된 세포 현탁액이 상부에서 주의 깊게 층상화하였다. 구배 튜브를 이어서 원심분리기내로 주의 깊게 로딩시켜, 적절한 밸런스를 보증하였다. 구배 튜브를 800 xg에서 15 분 동안 25℃에서 쉬지 않고 원심분리하였다. 세정된 세포 집단(생존가능한 및 기능적 집합관, 관형, 내분비, 사구체, 및 혈관형 세포 함유)은 6% 및 8% (w/v) Optiprep[®] 사이에서 분절되었으며, 이는 1.025 - 1.045 g/mL의 밀도에 상응하였다. 다른 세포 및 잔해는 튜브의 바닥에 펠렛화되었다.

[0250] 신장 세포 배양: 조합된 세포 밴드 및 펠렛을 이후에 조직 배양 처리된 삼중 플라스크(Nunc T500) 또는 등가물 내에 30,000개 세포/cm²의 세포 농도에서 150ml의 5% (v/v)FBS, 2.5μg EGF, 25mg BPE, 1X ITS (인슐린/트랜스페린/나트륨 셀레나이트 배지 보충물)과 항생제/항진균제를 함유하는 DMEM(고 글루코오스)/KSFM의 50:50 혼합물 150ml 내에 플레이팅하였다. 세포를 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 2 내지 3일 동안 배양하여, 세포에 대해 21% 대기 산소 수준을 제공하였다. 2일 후, 배지를 교환하고 배양물을 CO₂/질소 가스 다중가스 가습된 인큐베이터(제조원: Sanyo)로 24시간 동안 제공한 2% 산소-수준 환경에 두었다. 24시간 인큐베이션 후, 세포를 60ml의 1XPBS로 세정한 후 40ml의 0.25%(w/v) 트립신/EDTA(제조원: Gibco)을 사용하여 제거하였다. 제거 후, 세포 현탁액을 10% FBS를 함유하는 동등 용적의 KSFM로 중화하였다. 이후에, 세포를 원심분리로 300xg에서 10분 동안 세척하였다. 세척 후, 세포를 20ml의 KSFM 내에 재-현탁시키고 50ml의 원뿔형 튜브로 이전시키고 샘플을 세포 카운팅을 위해 수집하였다. 생존 세포수가 트립판 블루 배제를 사용하여 측정되면, 1 백만 개의 세포를 RNA 샘플을 위해 수집하고, PBS 내에서 세척하고, 액체 질소 내에 스냅 냉동시켰다. 세포를 PBS 내에서 다시 세척하고 300xg에서 5분 동안 원심분리하여 수집하였다. 세척된 세포 펠렛을 KSFM 내에 3,750만 개의 세포/mL의 농도로 재-현탁시켰다.

[0251] 밀도 단계 구배 분리를 사용한 특수한 생리활성 신장 세포에 대한 강화: 신장 관형 세포로 주로 구성되나 다른 세포형(집합관, 사구체, 혈관, 및 내분비)의 작은 아집단을 함유하는 배양된 신장 세포를 그것의 성분 아집단 내로 다중 농도 w/v의 아이오딧사놀(제조원: Optiprep)으로부터 제조된 밀도 단계 구배를 사용하여 분리하였다. 배양물을 저산소 환경에 최대 24 시간 동안 둔 후 수거하여 구배에 적용하였다. 단계별 구배는 4개의 상이한 밀도 배지를 멸균된 15mL 원뿔형 튜브의 상단에 서로 적층시키고, 용액을 하단에 최고 밀도로 두고 적어도 농밀한 용액으로 상단에서 적층하여 산출시켰다. 세포를 단계 구배의 상단에 적용하여 원심분리하며, 이는 크기 및 입도를 기준으로 다중 밴드로 집단의 재격리를 초래하였다.

[0252] 간단히, 7, 11, 13, 및 16% Optiprep[®](60% w/v 아이오딧사놀)의 밀도를 희석제로서 KSFM 배지를 사용하여 제조하였다. 예를 들면: 50ml의 7%(w/v) Optiprep[®]의 경우, 5.83ml의 스톱 60%(w/v) 아이오딧사놀을 44.17ml의 KSFM 배지에 가하고 반전에 의해 잘 혼합하였다. 멸균된 모세혈관 튜브에 연결된 멸균된 L/S 16 타이곤(Tygon) 튜우빙으로 로딩된 연동 펌프(Master Flex L/S)를 2 ml/분의 유속으로 설정하고, 2mL의 각각의 4개의 용액을 멸균된 원뿔형 15 mL 튜브에, 16% 용액으로 개시하여 로딩한 후, 13% 용액, 11% 용액, 및 7% 용액내로 로딩하였다. 마지막으로, 7천 5 백만개의 배양된 설치류 신장 세포를 함유하는 2mL의 세포 현탁액을 단계 구배의 상부에 로딩하였다('신장 세포 배양물'에서 상기에서 기재된 바와 같이 생성된 현탁액). 중요하게는, 펌프는 구배 용액을 튜브로 전달하기 시작함에 따라, 유체가 튜브의 측면 아래로 45°의 각도로 흐르도록 하여 적절한 계면이 구배의 각각의 층 사이에 형성되도록 한다. 세포로 로딩된 단계 구배를 800xg에서 20분 동안 쉬지 않고 원심분리하였다. 원심분리 후, 튜브를 주의 깊게 제거하여 각각의 계면을 교란하였다. 5개의 뚜렷이 다른 세포 분획이 산출되었다(4 밴드 및 펠렛)(B1 - B4, + 펠렛)(참고 도 26, 좌측 원뿔형 튜브). 각각의 분획을 멸균된 일회용 벌브 피펫 또는 5ml의 피펫을 사용하여 수집하고 표현형적으로 및 기능적으로 수집하였다(참고: Presnell et al. WO/2010/056328의 실시예 10). 설치류 신장 세포 현탁액을 단리 직후 단계-구배 분획화에 적

용하는 경우, 관형 세포(및 집합관으로부터의 일부 세포 함유)가 강화된 분획이 1.062-1.088g/mL의 밀도로 분리되었다. 그에 반해서, 밀도 구배 분리를 생체외 배양 후 적용시키는 경우, 관형 세포(및 집합관으로부터의 일부 세포 함유)가 강화된 5개의 뚜렷이 다른 세포 분획이 1.051-1.062 g/mL의 밀도로 분리되었다. 유사하게, 설치류 신장 세포 현탁액을 단리 직후 단계-구배 분획화에 적용시키는 경우, epo-생성 세포, 사구체 발세포, 및 혈관형 세포("B4")가 강화된 분획이 1.025-1.035g/mL의 밀도로 분리되었다. 그에 반해서, 밀도 구배 분리를 생체외 배양 후 적용하는 경우, epo-생성 세포, 사구체 발세포, 및 혈관형 세포(및 "B4")가 강화된 분획이 1.073-1.091g/mL의 밀도로 분리되었다. 중요하게, 세포의 "B2" 및 "B4" 분획내로의 배양-후 분포는 배양물을 수거 및 단계-구배 절차(밴드 분포에 있어서 저산소증-효과에 관한 추가의 세부사항은 실시예 7에서 제공된다) 전에 저산소 배양물 환경(저산소증은 <21%(대기)로 정의된다) 산소 수준에 대한 노출 (약 1 시간의 기간 내지 약 24 시간의 기간)시킴에 의해 향상되었다.

[0253] 각각의 밴드를 3x의 KSFM 용적으로 희석시킴으로써 세척하고, 잘 혼합하여, 5분 동안 300xg에서 원심분리하였다. 펠렛을 2mL의 KSFM 내에 재-현탁시키고 생존 세포를 트립판 블루 배제 및 혈구계산기를 사용하여 카운트하였다. 1 백만 개의 세포를 RNA 샘플을 위해 수집하고, PBS 내에 세척하고, 액체 질소 내에 스냅 냉동시켰다. B2 및 B4로부터의 세포를 이식 연구를 위해 요독 및 빈혈 암컷 랫트내로 사용하여, 2-단계의 5/6 신 절제술 절차를 통해 찰스 리버(Charles River) 실험실에서 산출하였다. B4의 특성은 정량적 실시간 PCR로 확인하였으며, 이는 에리트로포이에틴 및 vEGF의 산소-조절된 발현, 사구체 마커(네프린, 포도신)의 발현, 혈관 마커(PECAM)의 발현을 포함한다. 'B2'분획의 표현형을 E-카드헤린, N-카드헤린, 및 아쿠아포린-2의 발현을 통해 확인하였다(참고: Presnell et al. WO/2010/056328의 도 49a 및 49b).

[0254] 따라서, 단계 구배 전략의 사용은 epo-생성 세포(B4)의 드문 집단 뿐만 아니라 기능적 관형 세포(B2)의 비교적 강화된 분획의 비교적 강화된 분획을 산출하기 위한 수단을 허용한다(참고: Presnell et al. WO/2010/056328의 도 50 & 51). 당해 단계 구배 전략은 또한 EPO-생성 및 관형 세포가 적혈구, 세포성 잔해, 및 다른 잠재적으로 바람직하지 않은 세포형, 예컨대 대세포 응집물 및 어떤 유형의 면역 세포로부터 분리되도록 한다.

[0255] 단계 구배 절차는 이용된 특수한 밀도와 관련하여 조율을 필요로 함으로써 세포성 성분의 우수한 분리를 제공한다. 구배를 조율하는 바람직한 접근법은 1) 연속적 밀도 구배의 수행(여기서, 구배(예를 들면 16-21% Optiprep)의 하단에서 고밀도로부터 구배(예를 들면 5 내지 10%)의 상단에서 비교적 저밀도)를 포함한다. 연속적 구배는 표준 방법(공급원: Axis Shield)에 따른 어떠한 표준 밀도 구배 용액 (피콜, 퍼콜(Percoll), 수크로오스, 아이오딕사놀)으로 제조할 수 있다. 목적한 세포를 연속 구배 상에 로딩하고 800xg에서 20분 동안 쉬지않고 원심 분리한다. 유사한 크기 및 입도의 세포는 구배시 함께 분리되는 경향이 있으므로, 구배시 상대적인 위치가 측정될 수 있고, 당해 위치에서 용액의 비중이 또한 측정될 수 있다. 따라서, 차후에, 특수한 조건 하에서 밀도 구배를 역전하는 그것의 능력을 기준으로 특정한 세포 집단의 단리에 초점을 맞춘 정의된 단계 구배가 유도될 수 있다. 그와 같은 최적화는 건강하지 않은 조직 대 건강한 조직으로부터 세포를 분리하는 경우, 또는 상이한 종으로부터 특수한 세포를 분리하는 경우 사용될 필요가 있을 수 있다. 예를 들면, 최적화는 개과 및 인간 신장 세포 배양물 둘 다에서 수행하여, 랫트에서 확인된 특이적인 B2 및 B4 아집단을 다른 종으로부터 분리할 수 있는지를 보증한다. 설치류 B2 및 B4 아집단의 단리를 위한 최적의 구배는 7%, 11%, 13%, 및 16%의 Optiprep의 (w/v)로 이루어진다. 개과 B2 및 B4 아집단의 단리를 위한 최적의 구배는 7%, 10%, 11%, 및 16% Optiprep의 (w/v)로 이루어진다. 인간 B2 및 B4 아집단의 단리를 위한 최적의 구배는 (w/v) 7%, 9%, 11%, 16%로 이루어진다. 따라서, 배양된 설치류, 개과, 및 인간 신장 세포로부터 B2 및 B4의 국제화를 위한 밀도 범위는 표 8에 제공된다.

표 8

[0256] 표 8. 종 밀도 범위.

단계 구배 밴드	종 밀도 범위 g/ml		
	설치류	개과	인간
B2	1.045-1.063g/ml	1.045-1.058g/ml	1.045-1.052g/ml
B4	1.073-1.091g/ml	1.063-1.091g/ml	1.063-1.091g/ml

[0257] 실시예 7 - 구배 전 저-산소 배양물은 밴드 분포, 조성물, 및 유전자 발현에 영향을 미친다

[0258] 원형 B2 및 B4의 분포 및 조성물에 있어서 산소 조건의 효과를 측정하기 위해, 상이한 종으로부터의 신생신장

세포 제제를 구매 단계 전에 상이한 산소 조건에 노출시켰다. 설치류 네오-신장 확대(NKA) 세포 제제(RK069)를 표준 절차를 사용하여 상기 기재한 바와 같이, 랫트 세포 단리 및 배양물 개시에 대해 확립하였다. 모든 플라스크를 2 내지 3일 동안 21%(대기) 산소 조건에서 배양하였다. 배지를 교환한 후 플라스크의 1/2을 2% 산소로 설정한 산소-조절된 인큐베이터에 재배치하는 한편, 나머지 플라스크는 21% 산소 조건에서 추가의 24 시간 동안 유지시켰다. 이후에, 세포를 상기 기재된 표준 효소에 의한 수거를 사용한 조건의 각각의 세트로부터 수거하였다. 단계 구매를 표준 절차에 따라 제조하고 "노르믹식"(21% 산소) 및 "저산소성"(2% 산소) 배양물을 별도로 수거하여 동일한 단계 구매에 나란히 적용하였다(도 27). 4개의 밴드 및 펠렛이 조건 둘 다에서 산출되는 반면, 구매 전체에서 세포의 분포는 21% 및 2% 산소-배양된 배치에서 상이하였다(표 3). 특히적으로, B2의 수율은 저산소증과 함께, B3에 있어서의 수반된 감소와 함께 증가하였다. 더욱이, B4-특이 유전자(에킨대, 에리트로포이에틴)의 발현은 저산소-배양 세포로부터 산출된 수득되는 구매에서 향상되었다(문헌 Presnell et al. WO/2010/056328의 도 73).

[0259] 개과 NKA 세포 제제(DK008)를 표준 절차를 사용하여 상기 기술된 바와 같이, 개 세포 단리 및 배양물(설치류 단리 및 배양물 절차와 유사)에 대해 확립하였다. 모든 플라스크를 4일 동안 21%(대기) 산소 조건에서 배양한 후, 플라스크의 서브셋을 저산소증(2%)에 24시간 동안 이전시키는 한편, 플라스크의 서브셋을 21%에서 유지하였다. 차후에, 각각의 세트의 플라스크를 수거하여 동일한 단계 구매에 적용하였다(도 28). 랫트 결과와 유사하게(실시예 6), 저산소-배양된 개 세포는 구매 전체에서 대기성 산소-배양된 개 세포보다 상이하게 분포하였다(표 9). 다시, B2의 수율은 구매 전 저산소 노출과 함께, B3로의 분포에 있어서 동시 감소와 함께 증가하였다.

표 9

[0260]

	랫트(RK069)		개(DK008)	
	2% O ₂	21% O ₂	2% O ₂	21% O ₂
B1	0.77%	0.24%	1.20%	0.70%
B2	88.50%	79.90%	64.80%	36.70%
B3	10.50%	19.80%	29.10%	40.20%
B4	0.23%	0.17%	4.40%	21.90%

[0261] 상기 데이터는, 저산소증에 대한 구매-전 노출이 B2의 조성 뿐만 아니라 특수한 특화된 세포(에리트로포이에틴-생성 세포, 혈관형 세포, 및 사구체 세포)의 B4내로의 분포를 향상시킴을 나타낸다. 따라서, 상기에서 기재된 바와 같은, 저산소 배양물, 그 다음 밀도-구매 분리는 종을 따라 'B2' 및 'B4' 세포 집단을 산출하는 효과적인 방법이다.

[0262] **실시예 8 - 인간 신장으로부터 관형/사구체 세포의 단리**

[0263] 관형 및 사구체 세포를 전체에 기술된 효소에 의한 단리 방법에 의해 정상 인간 신장 조직으로부터 분리하여 증식시켰다. 상기 기재된 구매 방법에 의해, 관형 세포 분획을 생체의 및 배양 후 강화시켰다. 문헌(참고: Presnell et al. WO/2010/056328)(본원에 그 전체가 참고로 편입됨)의 도 68에 나타난 바와 같이, 표현형 속성을 단리 및 전파에서 유지하였다. 표지된 알부민의 흡수를 통해 평가된 관형 세포 기능은 반복된 계대배양 및 동결보존 후 보유했다. 문헌(참고: Presnell et al. WO/2010/056328)(본원에 그 전체가 참고로 편입됨)의 도 69는, 관형-강화되고 관형-감손된 집단을 3D 역학적 배양물 내에서 배양하는 경우, 관형 마커, 카드헤린에 있어서의 현저한 증가가 관형-강화된 집단에서 발현되었음을 나타낸다. 이는, 관형 세포의 강화가, 세포를 3D 역학적 환경에서 배양하는 경우 초기 강화를 초과하여 유지될 수 있음을 확인한다. 실시예 7에서 상기 기재된 신장 세포의 동일한 배양된 집단을 유세포측정 분석에 적용하여 전방 스캐터 및 측방 스캐터를 시험하였다. 작은, 극미량의 과립 EPO-생성 세포 집단은 구별할 수 있었으며(8.15%) 흐름 세포분석기를 사용한 작은, 극미량의 과립 집단의 양성 선택을 통해 분리되었다(참고: Presnell et al. WO/2010/056328의 도 70(본원에 그 전체가 참고로 편입됨)).

[0264] **실시예 9 - 자가면역 사구체신염 환자 샘플로부터 단리된 신장 세포의 미분획화 혼합물의 특성규명**

[0265] 신장 세포의 미분획화 혼합물을 상기에서 기재된 바와 같이, 자가면역 사구체신염 환자 샘플로부터 단리하였다. 신장 조직으로부터 단리되어 확장된 신장 세포의 특수한 아집단의 비편향된 유전자형 조성물을 측정하기 위해, 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR) 분석(참고: Brunskill et al., *supra* 2008)을 이용하여 세포 소분획 중에서 차별적인 세포-형-특수한 및 경로-특수한 유전자 발현 패턴을 확인하였다. 문헌(참고: Ilagan et al.

PCT/US2011/036347)의 표 6.1에 나타난 바와 같이, HK20는 자가면역 사구체신염 환자 샘플이다. 문헌(참고: Ilagan et al. PCT/US2011/036347)의 표 6.2에 나타난 바와 같이, HK20로부터 산출된 세포는 qRT-PCR에 의해 측정된 것으로서 사구체 세포를 결여하고 있다.

실시예 11-형광성 활성화된 세포 분류(FACS)를 사용한 생존가능 신장 세포형의 강화/감손

하나 이상의 단리된 신장 세포를 강화하고/하거나 하나 이상의 특수한 신장 세포형을 단리된 일차 신장 조직으로부터 형광성 활성화된 세포 분류(FACS)를 사용하여 감손시킬 수 있다.

시약: 70% 에탄올; 세척 완충제(PBS); 50:50 신장 세포 배지(50% DMEM 고 글루코오스): 50% 케라틴생성세포-SFM; 트립판 블루 0.4%; 신장 세포 집단 예컨대 신장 내피 세포에 대한 CD31 및 신장 사구체 세포에 대한 네프린을 표적화하기 위한 일차 항체. 매칭된 동형 특수한 형광성 2차 항체; 염색 버퍼(PBS 중 0.05% BSA).

절차: 생물학적 안전성 캐비닛(BSC)을 세정하기 위한 표준 절차에 따라서, 일차 단리 또는 배양 세포로부터의 신장 세포의 단일 세포 현탁액을 T500 T/C 처리된 플라스크로부터 수득하여 신장 세포 배지에 재현탁시키고 병상에 두었다. 세포수 및 생존력을 이후에 트립판 블루 배제 방법을 사용하여 측정하였다. 예를 들면, 이중성 집단으로부터의 사구체 세포 또는 내피 세포의 신장 세포 강화/감손, 생존력이 적어도 70%인 10 내지 50×10^6 개의 생존 세포를 수득한다. 신장 세포의 이중성 집단을 이후에 표적 세포형에 대해 특수한 일차 항체로 $1\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ 의 염색 버퍼/ 1×10^6 세포(필요한 경우 역가)의 개시 농도에서 염색한다. 표적 항체는, 예컨대 CD31 PE(신장 내피 세포에 대해 특이적인)과 같이 접합될 수 있거나, 예컨대 네프린(신장 사구체 세포에 대해 특이적인)과 같이 비-접합될 수 있다.

이후에, 세포를 30분 동안 광으로부터 보호된 병상에서 또는 4°C에서 염색한다. 30분의 인큐베이션 후, 세포를 원심분리로 300xg에서 5분 동안 원심분리하여 세척한다. 이후에 펠렛을 접합된 동형 특수한 2차 항체가 요구되는지에 따라 PBS 또는 염색 버퍼 내에서 재현탁시킨다. 세포를 형광색소 접합된 일차 항체로 표지하는 경우, 세포를 10×10^7 세포당 2ml의 PBS 내에 재현탁시키고 FACS 아리아 또는 등가의 세포 정렬기에 대해 진행하였다. 세포가 형광색소 접합된 항체로 표지되는 않은 경우, 세포를 동형 특수한 형광색소 접합된 2차 항체를 사용하여 $1\mu\text{g}/0.1\text{ml}/1 \times 10^6$ 세포의 개시 농도에서 표지한다.

이후에, 세포를 30분 동안 광으로부터 보호된 병상 또는 4°C에서 염색한다. 30분의 인큐베이션 후, 세포를 원심분리에 의해 300xg에서 5분 동안 세척한다. 원심분리 후, 펠렛을 PBS 내에 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 농도의 PBS에서 재현탁시킨 후 $12 \times 75\text{mm}$ 당 4ml를 멸균된 튜브로 이전시킨다.

FAC 아리아를 제조자의 설명서(제조원: BD FACs 아리아 사용자 매뉴얼)에 따라 생존 세포 멸균 분급을 위해 제조한다. 샘플 튜브를 FAC Aria 내로 로딩하고 PMT 전압을 취득이 개시된 후 조절한다. 게이트를 신장 특수한 세포 유형을 특수 파장을 사용하는 형광성 세기를 사용하여 선택하기 위해 끌어당긴다. 또 하나의 게이트를 음성 집단을 선택하기 위해 끌어당긴다. 원하는 게이트가 양성 표적 집단 및 음성 집단을 봉쇄하기 위해 끌어당겨지면, 세포를 제조자의 설명서를 사용하여 분급한다.

양성 표적 집단을 하나의 15ml들이 원뿔형 튜브 내에 수집하고 다른 음성 집단을 1ml의 신장 세포 배지가 충전된 또 하나의 15 ml들이 원뿔형 튜브 내에 수집한다. 수집 후, 각각의 튜브로부터의 샘플을 유세포측정으로 분석하여 순도를 측정한다.

수집된 세포를 원심분리에 의해 300xg에서 5분 동안 세척하고, 펠렛을 신장 세포 배지 내에서 추가의 분석 및 실험과정을 위해 재현탁시킨다.

실시예 12 - 자기성 세포 분급을 사용한 신장 세포형의 강화/감손

하나 이상의 단리된 신장 세포를 강화시키고/시키거나 하나 이상의 특수한 신장 세포형은 단리된 일차 신장 조직으로부터 감손될 수 있다.

시약: 70% 에탄올, 세척 완충제(PBS), 50:50 신장 세포 배지(50% DMEM 고 글루코오스): 50% 케라틴생성세포-SFM, 트립판 블루 0.4%, 작동 완충제(PBS, 2mM EDTA, 0.5% BSA), 세정 버퍼(PBS, 2mM EDTA), 세정 용액(70% v/v 에탄올), 밀테니 FCR 차단 시약, IgG 동형에 대해 특수한 밀테니 마이크로비드, 표적 항체, 예컨대 CD31(PECAM) 또는 네프린, 또는 2차 항체.

절차: 생물학적 안전성 캐비닛(BSC)의 세정을 위한 표준 절차 후, 일차 단리 또는 배양물로부터의 신장 세포의

단일 세포 현탁액을 수득하고 신장 세포 배지 내에 재현탁시킨다. 세포수 및 생존력을 트립판 블루 배제 방법을 사용하여 측정한다. 이중성 집단으로부터, 예를 들면, 사구체 세포 또는 내피 세포의 신장 세포 강화/감손을 위해, 생존력이 적어도 70%인 적어도 10×10^6 내지 최대 4×10^9 생존 세포가 수득된다.

[0279] 강화/감손 접근법을 위한 가장 우수한 분리는 목적인 표적 세포를 기준으로 측정한다. 10% 미만의 표적 빈도의 강화를 위해, 예를 들면, 네프린 항체, 밀테니 autoMACS, 또는 등가물, 기기 프로그램 POSSELDs(민감성 모드에 있어서 이중 양성 선택)를 사용한 사구체 세포를 사용한다. 10%보다 더 큰 표적 빈도의 감손을 위해, 밀테니 autoMACS, 또는 등가물, 기기 프로그램 DEPLETES(민감성 모드에 있어서 감손)를 사용한다.

[0280] 생존 세포는 표적 특이적 일차 항체, 예를 들면, 사구체 세포의 경우 네프린 rb 다클론성 항체를 사용하여, 15ml의 원뿔형 원심관 내에 $1 \mu\text{g}/10 \times 10^6$ 세포/0.1ml의 PBS와 0.05% BSA를 가한 후, 4°C에서 15분 동안 인큐베이션함으로써 표지한다.

[0281] 표지 후, 세포를 세척하여 10×10^7 세포당 1 내지 2ml의 버퍼를 가한 후 300xg에서 5분 동안 원심분리함으로써 미결합된 일차 항체를 제거한다. 세척 후, 0.05% BSA가 들어있는 $1 \mu\text{g}/10 \times 10^6$ /0.1ml의 PBS에서 동형 특수한 2차 항체, 예컨대 닭 항-토끼 PE를 가한 후 4°C에서 15분 동안 인큐베이션한다.

[0282] 인큐베이션 후, 세포를 세척하여 10×10^7 세포당 1 내지 2ml의 버퍼를 가한 후 300xg에서 5분 동안 원심분리함으로써 미결합된 2차 항체를 제거하였다. 상청액을 제거하고, 세포 펠렛을 10×10^7 의 총 세포당 $60 \mu\text{l}$ 의 버퍼 내에 재현탁한 후 10×10^7 개의 총 세포당 $20 \mu\text{l}$ 의 FCR 차단 시약을 첨가한 후, 이를 잘 혼합한다.

[0283] $20 \mu\text{l}$ 의 직접적인 MACS 마이크로비드(예컨대 항-PE 마이크로비드)를 가한 후 15분 동안 4°C에서 인큐베이션한다.

[0284] 인큐베이션 후, 세포를 10-20x의 라벨링 용적의 버퍼를 가하고 세포 현탁액을 300xg에서 5분 동안 원심분리하고 세포 펠렛을 10×10^8 세포당 $500 \mu\text{l}$ -2ml의 버퍼 내에 재현탁하여 세척한다.

[0285] 제조자의 설명서에 따라서, autoMACS 시스템을 세팅하고 자기성 세포 분리를 위해 autoMACS를 사용하여 프라이밍(priming)한다. 신규의 멸균된 수집관을 유출구 포트하에 둔다. autoMACS 세포 분리 프로그램을 선택한다. 선택을 위해 POSSELDs 프로그램을 선택한다. 감손을 위해 DEPLETES 프로그램을 선택한다.

[0286] 표지된 세포를 흡수 포트에서 삽입한 후 프로그램을 개시한다.

[0287] 세포 선택 또는 감손 후, 샘플을 수집하여 사용할 때까지 빙상에 둔다. 감손된 또는 선택된 샘플의 순도는 유세포측정으로 확인한다.

[0288] **실시예 13 - 정상 및 만성적으로-병든 신장 조직으로부터 분리할 수 있고 증식시킬 수 있는 치료학적 잠재력을 지닌 세포**

[0289] 본 연구의 목적은 고 함량 분석(HCA)을 통해 인간 NKA 세포의 기능적 특성규명을 측정하는 것이다. 고-함량 이미징(HCI)은 수많은 샘플을 따라 2개 이상의 형광성 프로브(다중화)를 사용하여 다중 하위-세포 현상의 동시의 이미징화를 제공한다. 고-함량 분석(HCA)은 고-함량 이미징에서 포획된 다중 세포성 파라미터의 동시의 정량적 측정을 제공한다. 간단히 말해서, 미분획화(UNFX) 배양물을 산출하고(참조: Aboushwareb *et al.*, *supra* 2008) 및 진단된 만성적 신장 질환 (CKD)을 지닌 5명의 인간 신장 및 3명의 비-CKD 인간 신장으로부터의 취한 코어 생검으로부터 표준 생검 절차를 사용하여 독립적으로 유지시킨다. UNFX의 생체외 (2) 계대배양 후, 세포를 수거하여 밀도 구배 방법(실시예 2에 나타난 바와 같음)에 적용하여 소분획 B2, B3, 및/또는 B4를 포함하는, 소분획을 산출한다.

[0290] 인간 신장 조직을 문헌(참고: Ilagan *et al.* PCT/US2011/036347)의 표 10.1에 요약한 바와 같이 비-CKD 및 CKD 인간 공여체로부터 입수하였다. 문헌(참고: Ilagan *et al.* PCT/US2011/036347)의 도 4는 HK17 및 HK19 샘플의 조직병리적 특징을 나타낸다. 생체의 배양물을 모든 비-CKD(3/3) 및 CKD(5/5) 신장으로부터 획득하였다. 목적인 영역(ROI)을 정의하는 인간 NKA 세포에서 알부민 수송의 고 성분 분석(HCA)은 문헌(참고: Ilagan *et al.* PCT/US2011/036347)의 도 5(인간 NKA 세포에서 알부민 수송의 HCA)에 나타낸다. 비-CKD 및 CKD 신장으로부터 유도된 NKA 세포에서 알부민 수송의 정량적 비교를 문헌(참고: Ilagan *et al.* PCT/US2011/036347)의 도 6에 나타낸다.

- [0291] 문헌(참고: Ilagan et al. PCT/US2011/036347)의 도 6에 나타낸 바와 같이, 알부민 수송은 CKD-유도된 NKA 배양물에서 절충되지 않는다. 관형-강화된 B2과 관형 세포-감손된 B4 소분획 사이의 마커 발현의 비교 분석은 문헌(참조: Ilagan et al. PCT/US2011/036347)의 도 7 (CK8/18/19)에 나타낸다.
- [0292] 관형-강화된 B2과 관형 세포-감손된 B4 소분획 사이의 알부민 수송의 비교 기능적 분석은 문헌(참조: Ilagan et al. PCT/US2011/036347)의 도 8에 나타낸다. 소분획 B2는 근위 세관형 세포내에 강화되므로 증가된 알부민-수송 기능을 나타낸다.
- [0293] 알부민 흡수: 24-웰, 콜라겐 IV 플레이트(BD Biocoat™)에서 합치성으로 성장된 세포의 배양 배지를 18 내지 24 시간 동안 1X 항진균성/항생제 및 2mM 글루타민을 함유하는, 페놀 레드가 없는, 무혈청, 저-글루코코스 DMEM(pr-/s-/lg DMEM)로 대체하였다. 검정 직전에, 세포를 세척하고 30분 동안 pr-/s-/lg DMEM + 10mM HEPES, 2mM 글루타민, 1.8mM CaCl₂, 및 1mM MgCl₂로 인큐베이션하였다. 세포를 25μg/mL 로다민-접합된 소 알부민(제조원: Invitrogen)으로 30분 동안 노출시키고, 냉각된 PBS로 세척하여 세포내이입을 중지시키고 25μg/mL 웨스트 핵 염료를 함유하는 2% 파라포름알데하이드로 즉시 고정시켰다. 억제 실험을 위해, 1μM의 수용체-연관된 단백질(RAP)(참조: Ray Biotech, Inc., Norcross GA)을 알부민 부가 10분 전에 가하였다. 현미경적 이미징 및 분석을 BD Pathway™ 855 고-함량 바이오영상기 (High-Content BioImager) (제조원: Becton Dickinson)을 사용하여 수행하였다[참고: Kelley et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2010 Nov; 299(5):F1026-39. Epub Sep 8, 2010].
- [0294] 결론적으로, HCA는 세포성 수준 데이터를 취득하며 다른 검정, 즉, 유전자 또는 단백질 발현에 의해 검출불가능한 집단 동력학을 나타낼 수 있다. 알부민 수송(HCA-AT) 기능을 측정하기 위한 정량화가능한 생체외 HCA 검정을 이용하여 인간 NKA 원형의 성분으로서 인간 신장 관형 세포를 특성화할 수 있다. HCA-AT는 세포성 기능의 비교 평가를 가능하도록 하였으며, 알부민 수송-반응성 세포가 인간 CKD 신장으로부터 유도된 NKA 배양물에서 유지되었음을 나타낸다. NKA 배양물, B2 및 B4의 특수한 소분획은 표현형 및 기능에 있어서 뚜렷하였으며, B2는 증대된 알부민 수송 활성을 지닌 관형 세포-강화된 분획을 나타냄이 밝혀졌다. 인간 CKD로부터의 B2 세포 아집단은, 생체내 효능이 입증된(상기에 보여진 바와 같이) 설치류 B2 세포와 표현형적으로 및 기능적으로 비슷하다.

[0295] 참고 문헌

1. Kelley, R. *et al.* Intra-renal Transplantation of Bioactive Renal Cells Preserves Renal Functions and Extends Survival in the ZSFI model of Progressive Diabetic Nephropathy. 2011 American Diabetes Association (ADA) Conference. (2011).
2. Kelley, R. *et al.* Tubular cell-enriched subpopulation of primary renal cells improves survival and augments kidney function in rodent model of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* **299**, F1026-1039.
3. Presnell, S.C. *et al.* (2011) Isolation, Characterization, and Expansion Methods for Defined Primary Renal Cell Populations from Rodent, Canine, and Human Normal and Diseased Kidneys. *Tissue Eng Part C Methods* **17**:261-273.
4. Humphreys, B.D. *et al.* Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9226-9231.
5. Aboushwareb, T. *et al.* Erythropoietin producing cells for potential cell therapy. *World J Urol* **26**, 295-300 (2008).
6. Takano, Y. *et al.* Recovery and maintenance of nephrin expression in cultured podocytes and identification of HGF as a repressor of nephrin. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F1573-1582 (2007).
7. Basu, J. *et al.* Expansion of the human adipose-derived stromal vascular cell fraction yields a population of smooth muscle-like cells with markedly distinct phenotypic and functional properties relative to mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* **17**, 843-860.

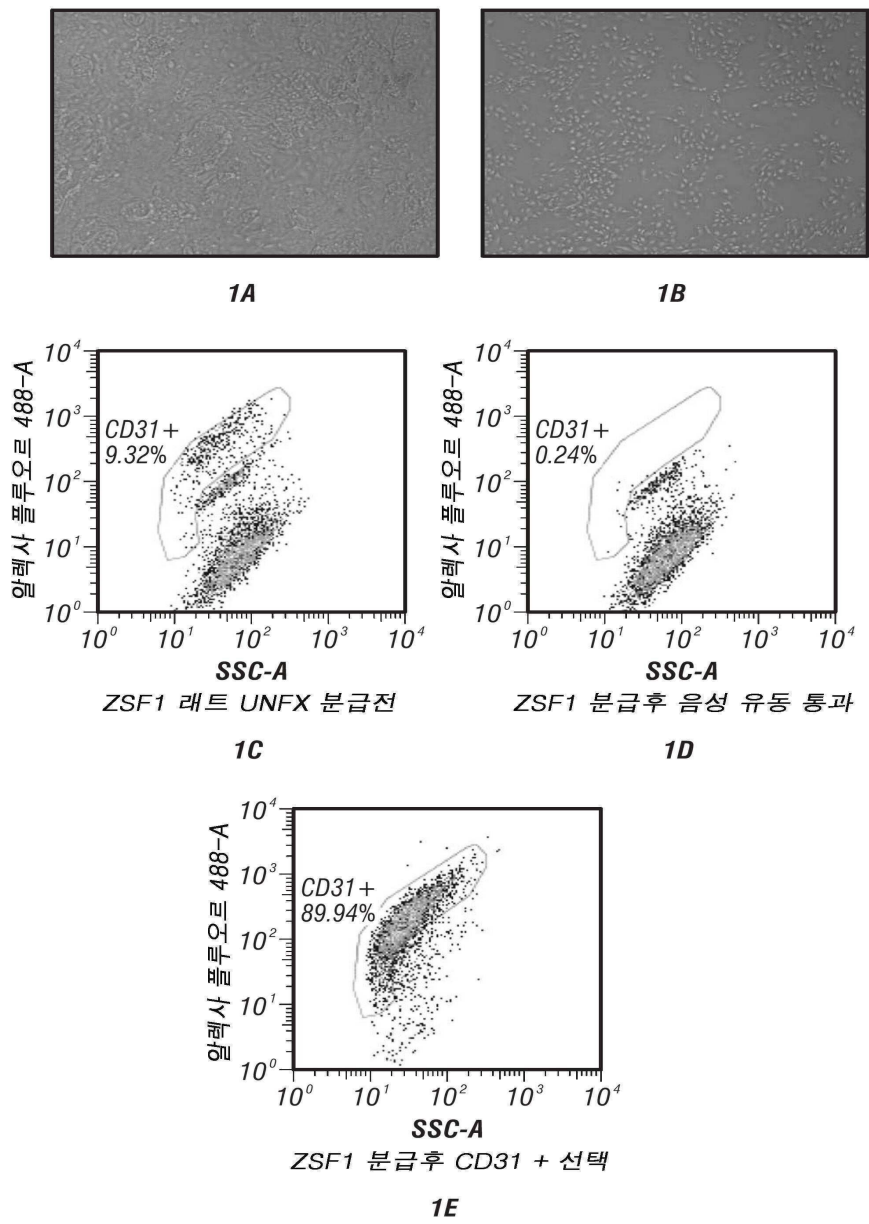
[0296]

8. Basu, J. *et al.* Organ specific regenerative markers in peri-organ adipose: kidney. *Lipids Health Dis* **10**, 171.
9. Xinaris C, *et al.* *In vivo* maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. *J Am Soc Nephrol* **23**,1-12. (2012).
10. Buzhor *et al.* *Kidney Spheroids Recapitulate Tubular Organoids Leading to Enhanced Tubulogenic Potency of Human Kidney-Derived Cells* Tissue Engineering Part A, (2011).
11. Brown, SA *et al.*, Impaired renal autoregulatory ability in dogs with reduced renal mass. *J Am Soc Nephrol*. **5**:1768-74 (1995).
12. Robertson, J.L. *et al.*, Long-term renal responses to high dietary protein in dogs with 75% nephrectomy. *Kidney Int.* **29**:511-9 (1986).
13. Urie, B.K. *et al.*, Evaluation of clinical status, renal function, and hematopoietic variables after unilateral nephrectomy in canine kidney donors. *J Am Vet Med Assoc*. **230**:1653-6 (2007).

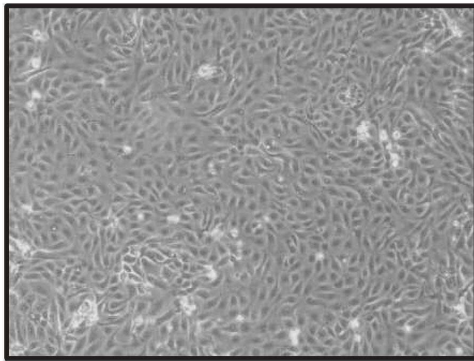
[0297]

도면

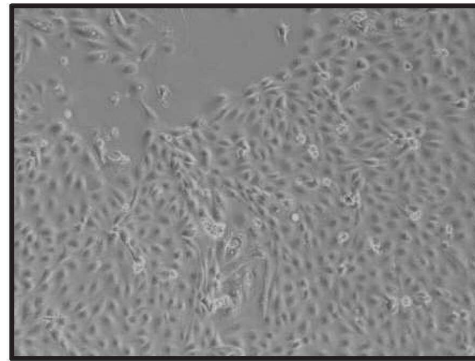
도면1



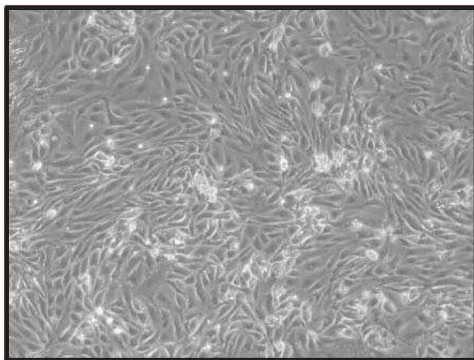
도면2



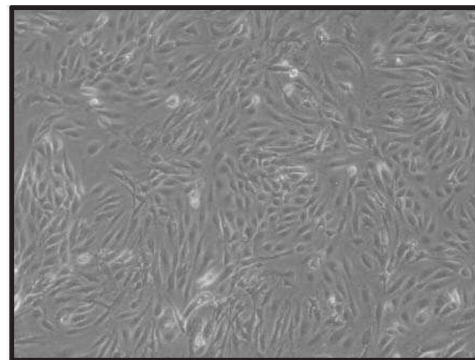
2A



2B

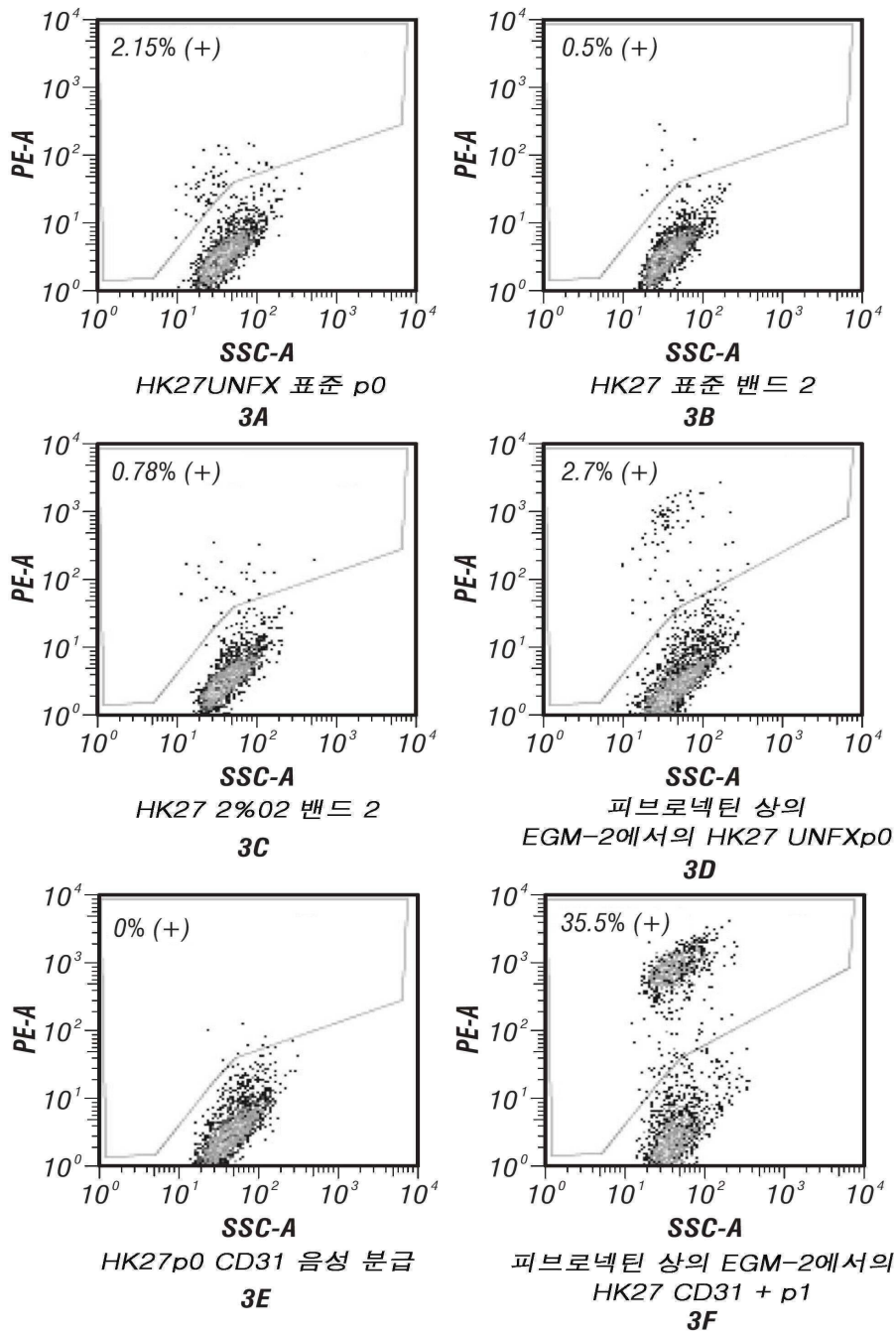


2C

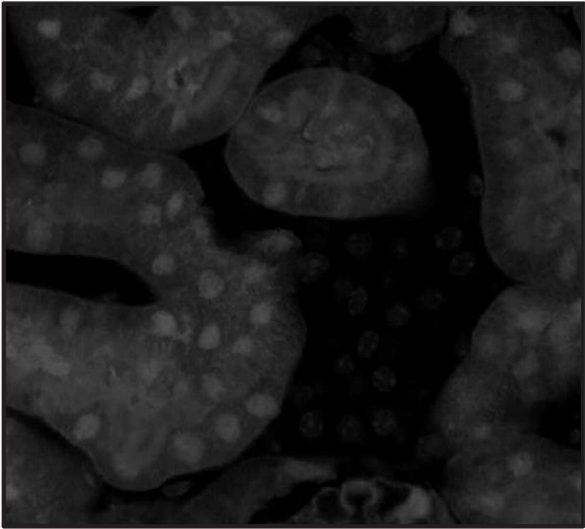


2D

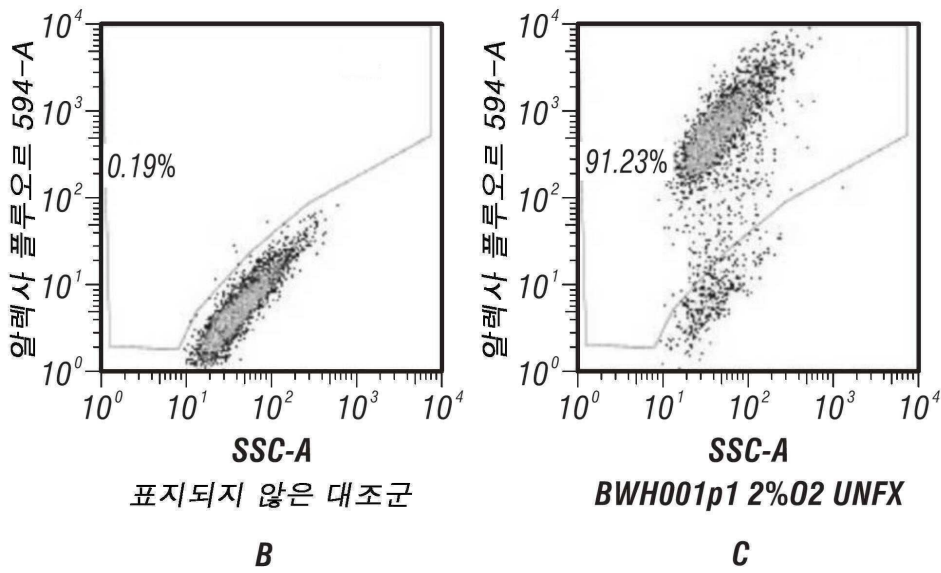
도면3a



도면3b



A



도면4

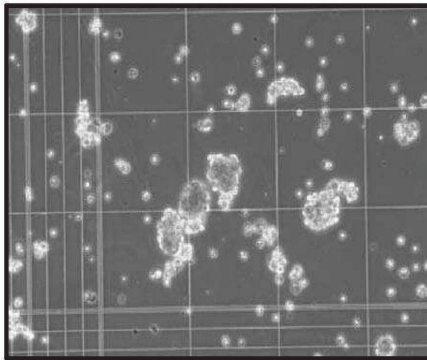


4A

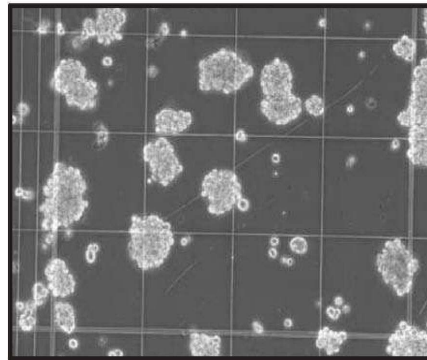


4B

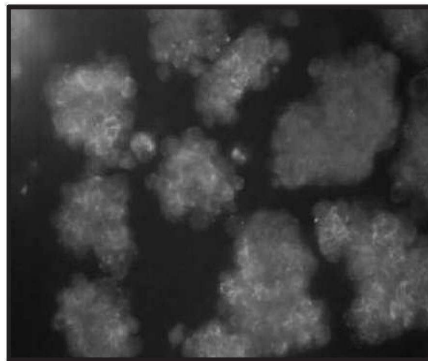
도면5



5A

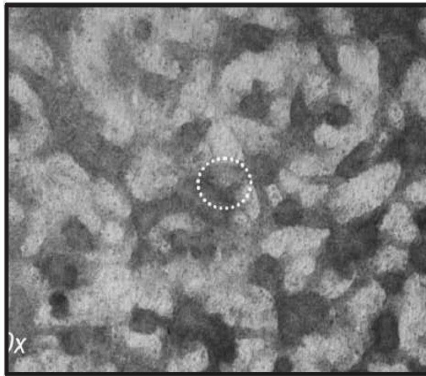


5B

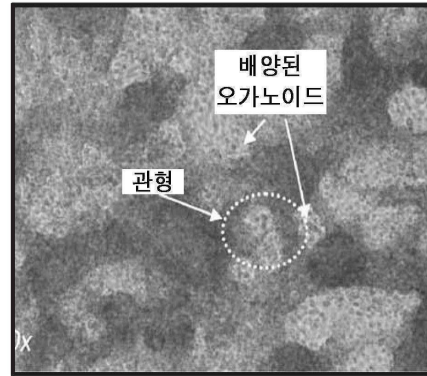


5C

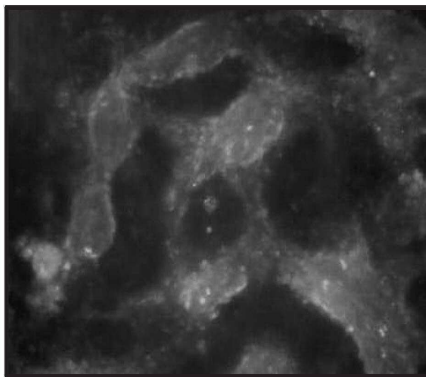
도면6



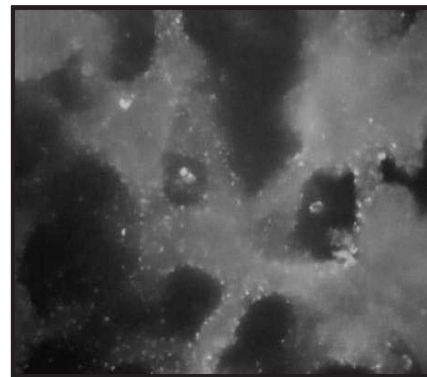
6A



6B

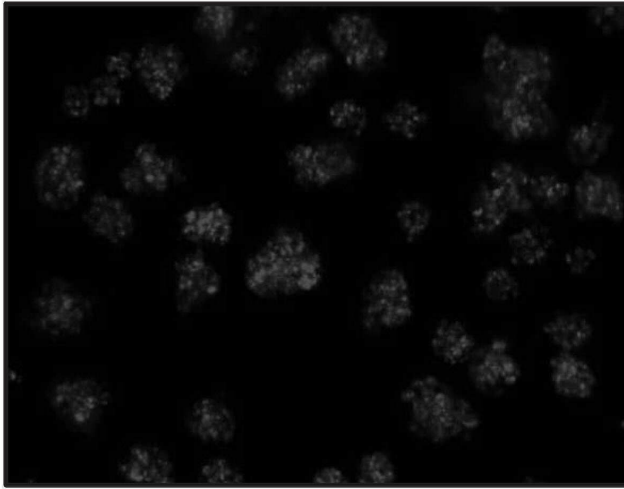


6C

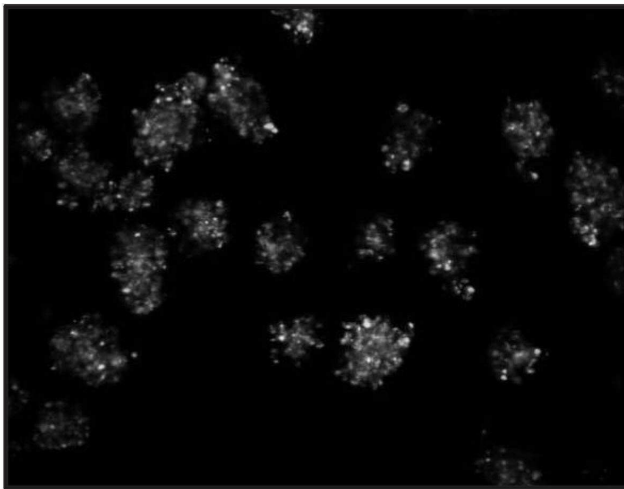


6D

도면7

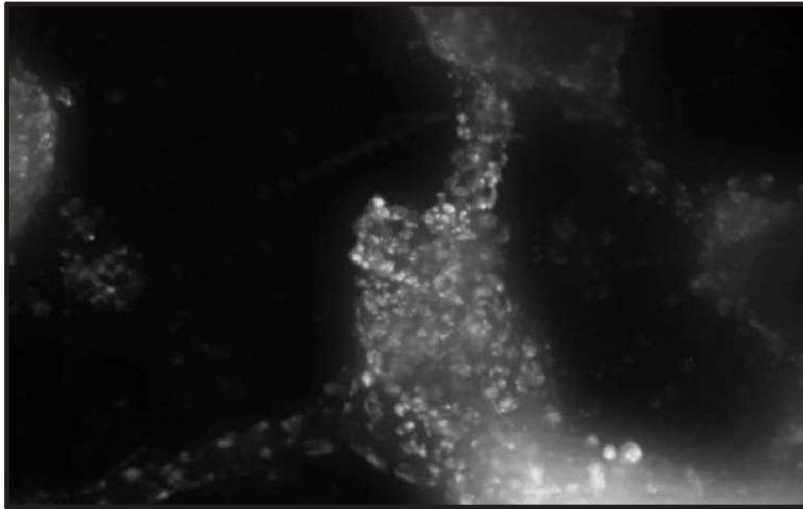


7A



7B

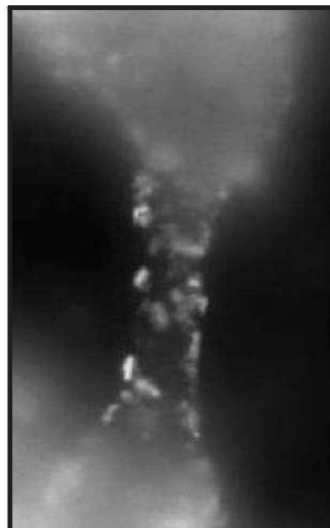
도면8



8A

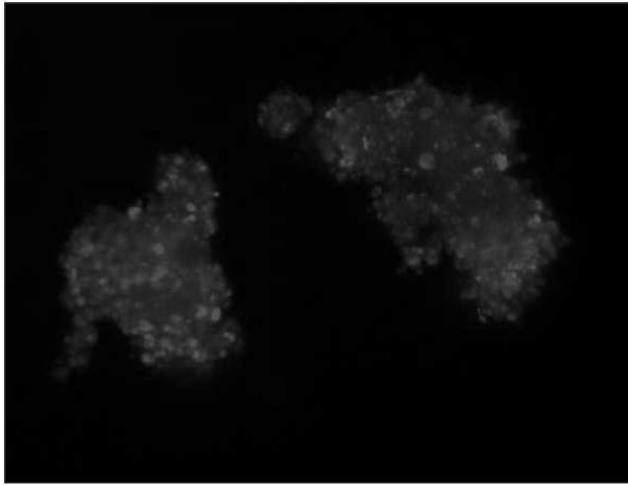


8B

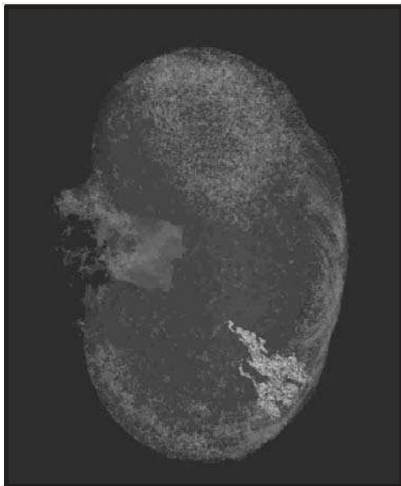


8C

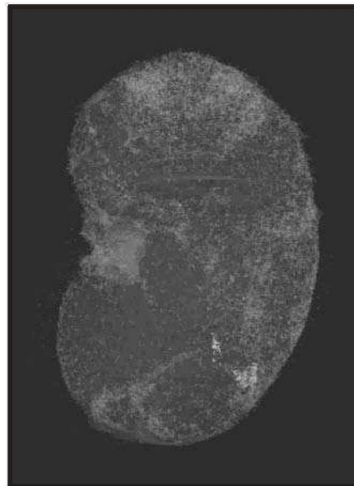
도면9



도면10

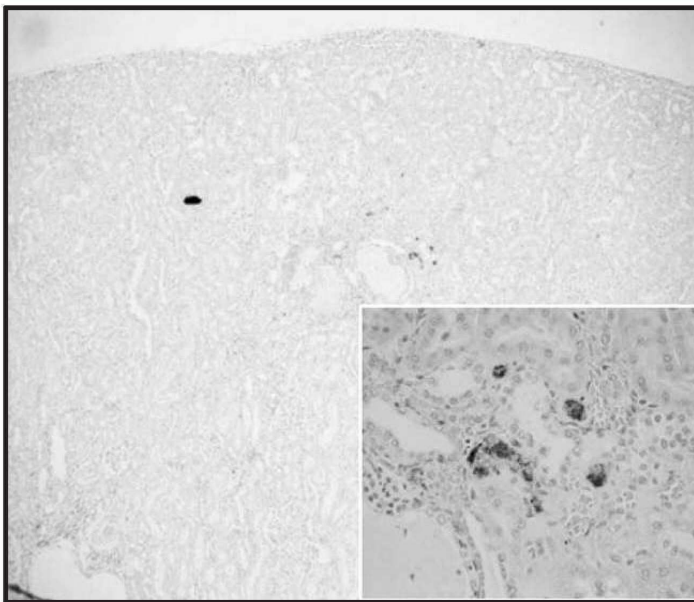
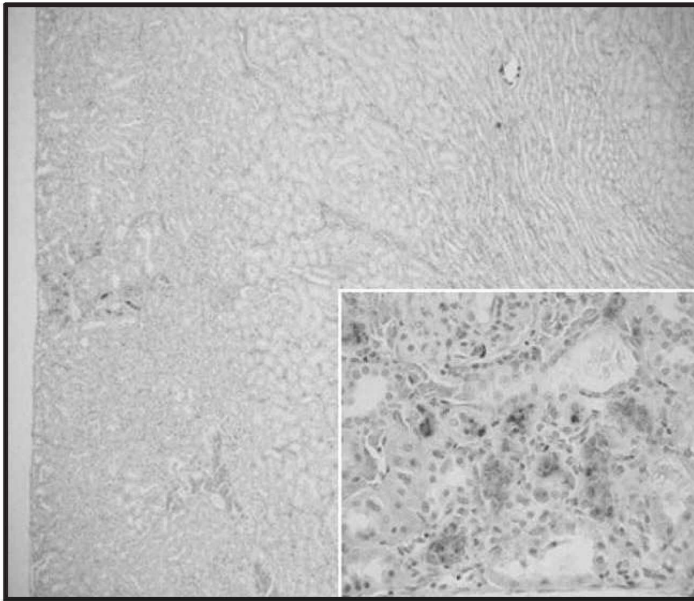


10A



10B

도면11



도면12

