



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2019-0065245  
 (43) 공개일자 2019년06월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 35/22* (2015.01) *A61K 47/42* (2017.01)  
*A61K 9/00* (2006.01) *A61K 9/06* (2006.01)  
*A61P 13/12* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 35/22* (2013.01)  
*A61K 47/42* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7005860
- (22) 출원일자(국제) 2016년07월29일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년02월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/044866
- (87) 국제공개번호 WO 2018/022108  
 국제공개일자 2018년02월01일

- (71) 출원인  
**자인, 디팍**  
 미국 27104 노스캐롤라이나주 윈스턴-세일럼 선 크릭 드라이브 559  
**버트람, 티모시 에이.**  
 케이만군도 케이와이1-9006 그랜드 케이만 카마나 베이 #251 마켓 스트리트 10
- (72) 발명자  
**자인, 디팍**  
 미국 27104 노스캐롤라이나주 윈스턴-세일럼 선 크릭 드라이브 559  
**버트람, 티모시 에이.**  
 케이만군도 케이와이1-9006 그랜드 케이만 카마나 베이 #251 마켓 스트리트 10
- (74) 대리인  
**양영준, 이상남**

전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 **만성 신장 질환의 치료를 위한 생체활성 신장 세포**

**(57) 요약**

본 발명은 생체활성 신장 세포 집단을 사용하여, 만성 신장 질환의 치료를 위해 천연 신장에 재생 효과를 제공하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

*A61K 9/0019* (2013.01)

*A61K 9/06* (2013.01)

*A61P 13/12* (2018.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

만성 신장 질환에 걸린 환자의 적어도 하나의 신장의 신장 피질 내로 생체활성 신장 세포 집단 (BRC)을 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 경피 주사하는 것을 포함하는, 만성 신장 질환의 치료 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 주사를 복강경 절차를 사용하여 수행하는 것인 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 경피 삽입된 가이드 캐놀러가 환자의 신장 내로 조성물을 주사하기 전에 신장 피막을 천공하는데 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 단일 주사로서 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 2회의 주사로서 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 1차 및 2차 주사가 적어도 6개월 간격으로 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 환자의 하나의 신장 내로 주사되는 것인 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 환자의 양쪽 신장 내로 주사되는 것인 방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2개의 진입점이 조성물을 환자의 신장 내로 주사하는데 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 주사가 신장의 불록한 세로축을 따라 주사되는 것인 방법.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에게  $3.0 \times 10^6$  개의 SRC/g KW<sup>est</sup>의 용량이 제공되는 것인 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 환자가 2형 당뇨병에 걸린 것으로 추가로 진단된 것인 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 만성 신장 질환의 기저 원인이 당뇨병성 신장병증인 방법.

#### 청구항 14

제1항에 있어서, 환자의 만성 신장 질환이 15 내지 60 mL/분 범위의 추정 사구체 여과율 (eGFR)에 의해 정의되

는 것인 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 만성 신장 질환에 걸린 환자가 24시간 소변 수집에서 소변 알부민-크레아티닌 비 (UACR)  $\geq 30$  mg/g 또는 소변 알부민 배설  $\geq 30$  mg/일에 의해 정의되는 미세알부민뇨를 나타내는 것인 방법.

**청구항 16**

제1항 및 제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 결과로서 환자의 신장 기능이 개선되는 것인 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 개선된 신장 기능이 추정 사구체 여과율 (eGFR)의 하락률에서의 감소에 의해 입증되는 것인 방법.

**청구항 18**

제16항에 있어서, 개선된 신장 기능이 혈청 크레아틴 (sCr)의 증가율에서의 감소에 의해 입증되는 것인 방법.

**청구항 19**

제16항에 있어서, 개선된 신장 기능이 개선된 신장 피질 두께에 의해 입증되는 것인 방법.

**청구항 20**

제16항에 있어서, 개선된 신장 기능이 표 8의 인자 중 하나 이상의 개선에 의해 입증되는 것인 방법.

**청구항 21**

제16항에 있어서, 개선된 신장 기능이 신장 영상화에 의해 결정되는 것인 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 신장 영상화 방법이 초음파, MRI, 및 신장 섬광조영술로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 23**

제1항에 있어서, 생체활성 신장 세포 집단이 저산소 배양 조건에 대한 노출 후에 획득되는 것인 방법.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 생체활성 신장 세포 집단이 확장된 신장 세포의 밀도 구배 분리 후에 획득된 선택된 신장 세포 (SRC) 집단인 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, SRC가 약 1.0419 g/mL를 초과하는 부력 밀도를 나타내는 것인 방법.

**청구항 26**

제1항 또는 제24항에 있어서, 출발 신장 세포 집단에 비교하여, BRC 또는 SRC가 더 큰 백분율의 하나 이상의 세포 집단을 함유하고, 하나 이상의 다른 세포 집단이 결여 또는 결핍된 것인 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 배양 관찰물을 이미지 라이브러리(Image Library)의 영상과 비교함으로써 세포 확장 동안 세포 형태학을 모니터링하는 것인 방법.

**청구항 28**

제26항에 있어서, 각각의 세포 계대 동안 세포 성장 동역학을 모니터링하는 것인 방법.

**청구항 29**

제26항에 있어서, 트립판 블루(Trypan Blue) 염료 배제 및 프레스토블루(PrestoBlue)의 대사에 의해 세포 카운트 및 생존성을 모니터링하는 것인 방법.

**청구항 30**

제26항에 있어서, BRC 또는 SRC가 CK18 및 GGT1의 표현형 발현을 특징으로 하는 것인 방법.

**청구항 31**

제26항에 있어서, 프레스토블루의 대사 및 VEGF 및 KIM-1의 생산이 생존성이고 기능성인 BRC 또는 SRC의 존재에 대한 마커로서 사용되는 것인 방법.

**청구항 32**

제26항에 있어서, 유전자 발현 프로파일링 또는 효소 활성의 측정에 의해 BRC 또는 SRC 기능성이 추가로 확립되는 것인 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 측정된 효소 활성이 LAP 및/또는 GGT에 대한 것인 방법.

**청구항 34**

제1항 또는 제24항에 있어서, BRC 또는 SRC가 천연의 자가 또는 동종이형 신장 샘플로부터 유래된 것인 방법.

**청구항 35**

제1항 또는 제24항에 있어서, BRC 또는 SRC가 비-자가 신장 샘플로부터 유래된 것인 방법.

**청구항 36**

제34항 또는 제35항에 있어서, 샘플이 신장 생검에 의해 수득된 것인 방법.

**청구항 37**

제1항 또는 제24항에 있어서, BRC 또는 SRC가 생체재료 내에 제형화된 것인 방법.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 생체재료가 젤라틴-기반 히드로겔을 포함하는 것인 방법.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 젤라틴이 제형 내에 약 0.5% 내지 약 1% (w/v)로 존재하는 것인 방법.

**청구항 40**

제38항에 있어서, 젤라틴이 제형 내에 약 0.8% 내지 약 0.9% (w/v)로 존재하는 것인 방법.

**청구항 41**

제37항에 있어서, 생체재료가 온도-민감성 세포-안정화 생체재료인 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 온도-민감성 세포-안정화 생체재료가

- (i) 약 8°C 이하에서 실질적으로 고체인 상태, 및
- (ii) 대략적인 주위 온도 이상에서 실질적으로 액체인 상태를 유지하는 것인 방법.

**청구항 43**

제42항에 있어서, 생체재료가 약 8℃ 및 대략적인 주위 온도 이상 사이에서 고체-에서-액체 전이 상태를 포함하는 것인 방법.

**청구항 44**

제42항에 있어서, 실질적으로 고체인 상태가 겔 상태인 방법.

**청구항 45**

제37항에 있어서, 생체활성 세포가 세포-안정화 생체재료의 부피 전반에 걸쳐 실질적으로 균일하게 분산된 것인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 발명의 분야

[0002] 본 발명은 생체활성 신장 세포 집단을 사용하여 만성 신장 질환에 걸린 대상체를 치료하는 방법, 및 선택된 신장 세포 집단을 사용하여 천연 신장에 재생 효과를 제공하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 발명의 배경

[0004] 만성 신장 질환 (CKD)은 치료적 개입 없이는 악화될 진행성 신장병증을 특징으로 한다; 궁극적으로, 환자는 말기 신장 질환 (ESRD)에 도달할 수 있다. 미국에서 유럽까지의 유병률 데이터는 일반 집단의 약 10%가 1-3기 CKD에 걸려 있음을 나타낸다 (ERA, 2009; USRDS, 2011; Jha et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. Lancet. 2013; 382:260-72). 전세계적으로, CKD 및 ESRD의 발생률 및 유병률이 증가하고 있는 한편, 치료 결과는 여전히 불량하다 (Shaw et al. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Res Clin Pract. 2010; 87:4-14). ESRD의 가장 큰 원인은 당뇨병이고 (Postma and de Zeeuw, 2009), 주로 2형 당뇨병의 발생률의 증가로 인해, CKD의 발생률이 계속 증가하고 있다 (Postma and de Zeeuw, 2009). CKD에는 고혈압 및 신장혈관 질환을 포함하는 기저 동반이환 및/또는 위험 인자로 인한 유해 결과가 종종 동반된다 (Khan et al., 2002; Stenvinkel P. Chronic kidney disease - a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease J Intern med. 2010; 268:456-67). 심각한 동반이환으로 인해, CKD 환자는 ESRD로 진행되도록 생존하는 것보다 조기에 사망할 가능성이 5-11배 더 높다 (Collins et al., 2003; Smith et al., 2004). 생존하기 위해, ESRD 환자는 신장 대체 요법 (투석 또는 이식)을 필요로 한다. 초기에 질환에 개입함으로써 CKD의 유해 결과를 예방하거나 둔화시키는 것이 CKD 관리의 1차 전략이다. 불행하게도, 질환 진행을 예방하기 위한 초기 치료 접근법은 성공적이지 않았다.

[0005] CKD는 낮은 신장 세포 증식 및 재생 프로세스의 상실을 특징으로 하기 때문에 (Messier and Leblond. Cell proliferation and migration as revealed by radiography after injection of thymidine-H3 into male rats and mice. Am J Anat. 1960; 106:247-85), 부적응 반응 및 섬유증이 CKD 진행으로 이어진다. 표준 관리 요법, 예컨대 엄격한 혈당 제어 및 레닌-안지오텐신-알도스테론 축의 차단이 당뇨병성 신장병증의 진행을 둔화시키는 한편, 이러한 요법들은 이를 저지하거나 역전시키지 않는다. 다수의 신규 치료 전략, 예컨대 항단백뇨 치료, 나트륨-글루코스 공동수송체 2의 억제제, 항섬유화제, 엔도텔린 수용체 길항제, 또는 전사 인자가 당뇨병성 신장 질환의 진행을 둔화시키거나 저지할 수 있다 (Quiroga et al. Present and future in the treatment of diabetic kidney disease. J Diabetes Res. 2015; 2015:801348). 추가적으로, 현재 조직 및 기관의 재생이 현대 의학의 기술적 역량 내에 있음에 따라 신장 세포-기반 요법이 최근 관심을 끌고 있다 (Ludlow et al. The Future of Regenerative Medicine: Urinary System. Tissue Engineering. 2012; 18:218-24).

[0006] 신장 기능의 실질적으로 지속적인 증대를 제공하고, 질환 진행을 둔화시키며, 이러한 환자 집단에서 삶의 질을 개선하는, 조직 공학 및 세포-기반 응용을 수반하는 새로운 치료 패러다임이 기술되었다. 이러한 차세대 재생 의학 기술은 단리된 신장 세포를 만성 신장 질환 (CKD)에 대한 치료 선택권으로서 제공한다. 프레스넬 (Presnell) 등의 WO/2010/056328 및 일라간 (Ilagan) 등의 PCT/US2011/036347은 단리된 생체활성 신장 세포, 및

이의 단리 및 배양 방법, 뿐만 아니라 이러한 세포 집단으로의 치료 방법을 기술한다. 이러한 생체활성 신장 세포를 수용자 신장 내로 주사하는 것은, 예를 들어 소변 농도 및 여과 기능에 의해 증명된 바와 같이, 비임상 연구에서 동물 생존 및 신장 기능을 유의하게 개선시켰다.

**발명의 내용**

**[0007] 발명의 개요**

[0008] 일반적으로 본 발명은 신장 기능의 안정화 및/또는 개선 및/또는 재생을 제공하는 생체재료 내에 제형화된 생체활성 신장 세포로 구성된 치료 조성물로 CKD 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0009] 한 측면에서, 본 발명은 만성 신장 질환에 걸린 환자의 적어도 하나의 신장의 신장 피질 내로 생체활성 신장 세포 집단 (BRC)을 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 경피 주사하는 것을 포함하는, CKD의 치료 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 주사는 복강경 절차를 사용하여 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 경피 삽입된 가이드 캐놀러가 환자의 신장 내로 조성물을 주사하기 전에 신장 피막을 천공하는데 사용된다.

[0010] 조성물은 단일 주사로서 또는 다중 주사로서 특정 기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 2회의 주사로서 투여된다. 1차 및 2차 주사는 적어도 3개월 간격, 적어도 6개월 간격 또는 적어도 12개월 간격으로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 환자의 하나의 신장 내로 주사된다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 환자의 양쪽 신장 내로 주사된다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 2개의 진입점이 조성물을 환자의 신장 내로 주사하는데 사용될 수 있다. 주사는 신장의 볼록한 세로축을 따라 주사될 수 있다. 한 실시양태에서, 환자에게  $3.0 \times 10^6$  개의 SRC/g KW<sup>est</sup>의 용량이 제공된다.

[0011] 일부 실시양태에서, CKD에 걸린 환자는 2형 당뇨병에 걸린 것으로 추가로 진단된다. CKD의 기저 원인은 이러한 환자에서의 당뇨병성 신장병증일 수 있다. 한 실시양태에서, 환자의 CKD는 15 내지 60 mL/분 범위의 추정 사구체 여과율 (eGFR)에 의해 정의된다. 또 다른 실시양태에서, CKD에 걸린 환자는 24시간 소변 수집에서 소변 알부민-크레아티닌 비 (UACR)  $\geq 30$  mg/g 또는 소변 알부민 배설  $\geq 30$  mg/일에 의해 정의되는 미세알부민뇨를 나타낸다.

[0012] 모든 실시양태에서, 치료 결과로서 환자의 신장 기능이 개선된다. 한 실시양태에서, 개선된 신장 기능은 추정 사구체 여과율 (eGFR)의 하락률에서의 감소에 의해 입증된다. 또 다른 실시양태에서, 개선된 신장 기능은 혈청 크레아틴 (sCr)의 증가율에서의 감소에 의해 입증된다. 한 다른 실시양태에서, 개선된 신장 기능은 개선된 신장 피질 두께에 의해 입증된다. 일부 추가적인 실시양태에서, 개선된 신장 기능은 표 8의 인자 중 하나 이상의 개선에 의해 입증된다. 또 다른 실시양태에서, 개선된 신장 기능은 신장 영상화에 의해 결정된다. 신장 영상화 방법은 초음파, MRI, 및 신장 섹션조영술을 포함하는 기술 중에서 선택될 수 있다.

[0013] 한 측면에서, 생체활성 신장 세포 집단은 신장 재생이 가능한 세포에 대해 풍부화된 배양 조건 하에서의 신장 조직으로부터의 신장 세포의 단리 및 확장으로부터 획득된다. 한 실시양태에서, 생체활성 신장 세포 집단은 저산소 배양 조건에 대한 노출 후에 획득된다. 또 다른 실시양태에서, 생체활성 신장 세포 집단은 확장된 신장 세포의 밀도 구배 분리 후에 획득된 선택된 신장 세포 (SRC) 집단이다. 특정 실시양태에서, SRC는 약 1.0419 g/mL를 초과하는 부력 밀도를 나타낸다. 한 실시양태에서, BRC 또는 SRC는, 출발 신장 세포 집단에 비교하여, 더 큰 백분율의 하나 이상의 세포 집단을 함유하고, 하나 이상의 다른 세포 집단이 결여 또는 결핍된다. 하나 이상의 추가적인 실시양태에서, 배양 관찰물을 이미지 라이브러리(Image Library)의 영상과 비교함으로써 세포 확장 동안 BRC 또는 SRC의 세포 형태학이 모니터링될 수 있거나, 또는 각각의 세포 계대에서 BRC 또는 SRC의 세포 성장 동역학이 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 트립판 블루(Trypan Blue) 염료 배제 및 프레스토블루(PrestoBlue)의 대사에 의해 BRC 또는 SRC 카운트 및 생존성이 모니터링될 수 있다. 다른 실시양태에서, BRC 또는 SRC는 특정 생존성 및 기능성 마커, 예를 들어 CK18 및 GGT1의 표현형 발현을 특징으로 할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, VEGF 및 KIM-1의 생산이 생존성이고 기능성인 BRC 또는 SRC의 존재에 대한 마커로서 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 생존성 및 기능성이 유전자 발현 프로파일링 또는 효소 활성의 측정에 의해 확립될 수 있다. 한 특정 실시양태에서, LAP 및/또는 GGT에 대한 효소 활성의 측정에 의해 BRC 또는 SRC가 특성화된다.

[0014] 한 실시양태에서, BRC 또는 SRC는 천연의 자가 또는 동종이형 신장 샘플로부터 유래된다. 또 다른 실시양태에서, BRC 또는 SRC는 비-자가 신장 샘플로부터 유래된다. 이러한 실시양태 중 하나 이상에서, 샘플은 신장 생검에 의해 획득될 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 측면에서, BRC 또는 SRC는 생체재료 내에 제형화된다. 한 실시양태에서, 생체재료는 젤라틴-기반 히드로겔을 포함한다. 젤라틴은 제형 내에 약 0.5% 내지 약 1% (w/v)로 존재할 있다. 특정 실시양태에서, 젤라틴은 제형 내에 약 0.8% 내지 약 0.9% (w/v)로 존재할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 생체재료는 온도-민감성 세포-안정화 생체재료이다. 한 실시양태에서, 온도-민감성 세포-안정화 생체재료는 약 8°C 이하에서 실질적으로 고체인 상태, 및 대략적인 주위 온도 이상에서 실질적으로 액체인 상태를 유지한다. 한 다른 실시양태에서, 생체재료는 약 8°C 및 대략적인 주위 온도 이상 사이에서 고체-에서-액체 전이 상태를 포함한다. 실질적으로 고체인 상태는 겔 상태일 수 있다. 모든 실시양태에서, BRC 또는 SRC는 세포-안정화 생체재료의 부피 전반에 걸쳐 실질적으로 균일하게 분산된다.

**도면의 간단한 설명**

[0016] 도면의 간단한 설명

- 도 1은 I상 연구에서 사용된 임상 프로토콜의 흐름 일정을 도시한다.
- 도 2는 전체 코호트의 NKA 주사 전 및 후의 추정 사구체 여과율을 도시한다.
- 도 3은 추정 사구체 여과율에서의 개별적인 변화를 나타낸다.
- 도 4는 환자 #2의 NKA 주사 전 및 후의 추정 사구체 여과율을 도시한다.
- 도 5는 투석이 귀속 지연된 NKA 주사 전 및 후의 신장 기능의 하락률을 도시한다.
- 도 6은 전체 코호트의 NKA 주사 전 및 후의 혈청 크레아티닌을 도시한다.
- 도 7은 NKA 주사 전 및 후의 혈청 크레아티닌의 개별적인 변화를 나타낸다.
- 도 8은 II상 개방-표지 안전성 및 효능 연구의 연구 디자인을 도시한다.
- 도 9는 깊은 위치 및 축으로 인해 세로 접근이 어려운 소형 에코발생 신장을 나타내는 세로 신장 초음파이다.
- 도 10은 외부의 18 ga 트로카르 바늘 (두꺼움) 및 내부의 25 ga 주사 바늘 (가늘)의 궤적을 나타내는 세로 신장 초음파이다. 원은 NKA 주사를 나타낸다.
- 도 11은 트로카르 및 내부 주사 바늘 및 대략적인 궤적의 가로 신장 초음파 방향을 나타낸다. 원은 NKA 주사를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0017] 발명의 상세한 설명

[0018] 이제 본 발명의 특정 실시양태가 상세하게 언급될 것이다. 본 발명이 열거된 실시양태와 관련하여 기술될 것이지만, 이들이 본 발명을 이러한 실시양태에 제한하도록 의도되지 않는다는 것이 이해될 것이다. 이와 반대로, 본 발명은 청구범위에 의해 정의되는 바와 같은 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형 및 등가물을 포괄하도록 의도된다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명의 실행에서 사용될 수 있는, 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 다수의 방법 및 물질을 인지할 것이다. 본 발명은 기술된 방법 및 물질에 결코 제한되지 않는다.

[0019] 본 개시내용 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌은 명확하게 전문이 본원에 참조로 포함된다. 포함된 문헌, 특허 및 유사 자료 중 하나 이상이 정의된 용어, 용어 용법, 기재된 기술 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 본 출원과 상이하거나 이와 상충되는 경우, 본 출원이 우선한다.

[0020] **정의**

[0021] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 문헌 [Principles of Tissue Engineering, 3rd Ed. (Edited by R Lanza, R Langer, & J Vacanti), 2007]은 관련 분야의 통상의 기술자에게 본 출원에서 사용된 용어 중 다수에 대한 일반적인 지침을 제공한다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명의 실행에서 사용될 수 있는, 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 다수의 방법 및 물질을 인지할 것이다. 실제로, 본 발명은 기술된 방법 및 물질에 결코 제한되지 않는다.

- [0022] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 경우의 "포함하다(comprise)", "포함하는(comprising)" "포함하다(include)", "포함하는(including)", 및 "포함하다(includes)"라는 단어들은 언급된 특색, 정수, 성분, 또는 단계의 존재를 상술하도록 의도되지만, 하나 이상의 다른 특색, 정수, 성분, 단계 또는 이들의 균의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.
- [0023] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "세포 집단"은 적절한 조직 공급원, 일반적으로는 포유동물로부터 직접적으로 단리에 의해 수득된 다수의 세포를 지칭한다. 예를 들어, 세포 집단은 신장 세포의 집단, 및 이의 혼합물을 포함할 수 있다. 단리된 세포 집단은 후속적으로 시험관 내에서 배양될 수 있다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명과 함께 사용하기 위한 세포 집단을 단리 및 배양하기 위한 다양한 방법, 및 세포 집단 내의 다양한 개수의 세포가 본 발명에서 사용하기에 적절하다는 것을 이해할 것이다. 세포 집단은 기관 또는 조직, 예를 들어, 신장으로부터 유래된, 분획되지 않은 비균질성 세포 집단 또는 풍부화된 균질성 세포 집단일 수 있다. 예를 들어, 비균질성 세포 집단은 조직 생검으로부터 또는 전체 기관 조직으로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, 비균질성 세포 집단은 조직 생검 또는 전체 기관 조직으로부터 확립된, 포유동물 세포의 시험관내 배양물로부터 유래될 수 있다. 분획되지 않은 비균질성 세포 집단은 비-풍부화 세포 집단으로 지칭될 수도 있다. 한 실시양태에서, 세포 집단은 생체활성 세포를 함유한다. 분획되지 않은 비균질성 세포 집단에 비교하여, 균질성 세포 집단은 동일한 세포 유형이거나, 공통적인 표현형을 공유하거나 또는 유사한 물리적 성질이 있는 세포를 더 큰 비율로 포함한다. 예를 들어, 균질성 세포 집단은 비균질성 신장 세포 집단으로부터 단리되거나, 추출되거나 또는 풍부화될 수 있다. 한 실시양태에서, 균질성 세포 집단은 비균질성 세포 현탁액의 밀도 구배 분리를 사용하여 세포 분획으로서 수득된다.
- [0024] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "생체활성"은 "생물학적 활성을 보유함", 예컨대 약리적 또는 치료적 활성을 보유함을 의미한다. 한 실시양태에서, 생체활성은 신장 기능 및/또는 신장 항상성에 대한 효과의 강화이다. 특정 실시양태에서, 생물학적 활성은, 비제한적으로, 진동; 항바이러스; 항염증; 항신생물; 면역 자극; 면역 조정; 세포 생존성 강화, 항산화, 산소 캐리어, 세포 동원, 세포 부착, 면역억제제, 혈관형성, 상처 치유 활성, 또는 이의 임의의 조합이다.
- [0025] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "생체활성 신장 세포" 또는 "BRC"는 하기 성질 중 하나 이상이 있는 신장 세포를 지칭한다: 신장 기능을 강화하는 능력, 신장 항상성에 영향을 미치는 (이를 개선하는) 능력, 및 신장 조직 또는 신장의 치유, 복구 및/또는 재생을 촉진하는 능력. 이러한 세포는 기능성 세뇨관 세포 (크레아티닌 배설 및 단백질 잔류에서의 개선을 기초로 함), 사구체 세포 (단백질 잔류에서의 개선을 기초로 함), 혈관 세포 및 피질수질 접합부의 산소-반응성 에리트로포이에틴-생산 세포를 포함할 수 있다. 생체활성 신장 세포 (BRC)는 생체활성 세포를 선택하는 방법을 사용하여 신장 조직으로부터의 신장 세포의 단리 및 확장으로부터 수득된다. 한 실시양태에서, 생체활성 신장 세포는 신장에 대한 재생 효과가 있다.
- [0026] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "선택된 신장 세포" 또는 "SRC"는 적절한 신장 조직 공급원으로부터의 생체활성 신장 세포 (상기에서 정의된 바와 같음)의 단리 및 확장으로부터 수득된 세포를 지칭하고, 여기서 SRC는 출발 신장 세포 집단에 비교하여, 더 큰 백분율의 하나 이상의 세포 집단을 함유하고, 하나 이상의 다른 세포 집단이 결여 또는 결핍된다. SRC는 특정한 생체활성 성분 또는 세포 유형에 대해 풍부화되고/되거나 특정한 불활성이거나 원치 않는 성분 또는 세포 유형이 고갈된, 신장 세포의 단리된 집단 또는 이의 혼합물로서, 신장 질환의 치료에서 사용하기 위한, 즉, 신장 기능의 안정화 및/또는 개선 및/또는 재생을 제공하는 것이다. SRC는 출발 집단에 비교하여 우수한 치료 및 재생 결과를 제공한다. 한 실시양태에서, SRC는 신장 생검을 통해 환자의 신장 피질 조직으로부터 수득되고, 확장된 신장 세포의 밀도 구배 분리에 의해 선택된다. SRC는 주로 신장 세뇨관 세포로 구성된다. 다른 실질 (혈관) 및 기질 (집합관) 세포가 단리된 제제 내에 희박하게 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 선택된 신장 세포 (SRC)는 신장에 대한 재생 효과가 있다.
- [0027] 용어 "천연 기관"은 살아 있는 대상체의 기관을 의미한다. 대상체는 건강하거나 또는 건강하지 않을 수 있다. 건강하지 않은 대상체는 이러한 특정 기관과 연관된 질환이 있을 수 있다.
- [0028] 용어 "천연 신장"은 살아 있는 대상체의 신장을 의미한다. 대상체는 건강하거나 또는 건강하지 않을 수 있다. 건강하지 않은 대상체는 신장 질환이 있을 수 있다.
- [0029] 용어 "재생 효과"는 천연 기관, 예컨대 신장에 이점을 제공하는 효과를 의미한다. 이러한 효과는, 비제한적으로, 천연 기관에 대한 손상 정도의 감소 또는 천연 기관 기능 또는 구조의 개선, 복구 또는 안정화를 포함할 수 있다. 신장 손상은 섬유증, 염증, 사구체 비대, 위축 등의 형태일 수 있고, 대상체 내의 천연 기관과 연관된

질환에 관련될 수 있다.

- [0030] 세포 집단의 맥락에서 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "혼합물"은 분획되지 않은 비균질성 세포 집단으로부터 유래된 2개 이상의 단리된 풍부화 세포 집단 표현형의 조합물을 지칭한다. 특정 실시양태에 따르면, 본 발명의 세포 집단은 신장 세포 집단이다.
- [0031] "풍부화" 세포 집단 또는 제제는 특정 세포 유형을 출발 집단 내의 그러한 세포 유형의 백분율보다 더 큰 백분율로 함유하는 출발 기관 세포 집단 (예를 들어, 분획되지 않은 비균질성 세포 집단)으로부터 유래된 세포 집단을 지칭한다. 예를 들어, 출발 신장 세포 집단이 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 등의 관심 세포 집단에 대해 풍부화될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포 집단", "세포 제제" 및 "세포 표현형"은 상호교환가능하게 사용된다.
- [0032] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "저산소" 배양 조건은 세포가 대기 산소 수준 (약 21%)에서 배양되는 표준 배양 조건에 비교하여 배양 시스템 내의 이용가능한 산소 수준이 감소되는 것에 세포가 적용되는 배양 조건을 지칭한다. 비-저산소 조건은 본원에서 정상 또는 정상산소 배양 조건으로 지칭된다.
- [0033] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "산소-조정가능"은 세포가 이용가능한 산소의 양을 기초로 유전자 발현을 (상향 또는 하향) 조절하는 세포의 능력을 지칭한다. "저산소-유도성"은 (예비-유도 또는 출발 산소 분압과 관계 없이) 산소 분압의 감소에 대한 반응으로의 유전자 발현의 상향조절을 지칭한다.
- [0034] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "생체재료"는 생존성 상태의 선택된 생체활성 세포를 지지하는 살아 있는 조직 내로의 도입에 적절한 천연 또는 합성 생체적합성 물질을 지칭한다. 천연 생체재료는 살아 있는 시스템에 의해 제조되거나 또는 이로부터 유래되는 물질이다. 합성 생체재료는 살아 있는 시스템에 의해 제조되지 않거나 또는 이로부터 유래되지 않는 물질이다. 본원에 개시된 생체재료는 천연 및 합성 생체적합성 물질의 조합물일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 생체재료는, 예를 들어, 중합체 매트릭스 및 스캐폴드를 포함한다. 관련 분야의 통상의 기술자는 생체재료(들)이 다양한 형태로, 예를 들어, 다공성 발포체, 겔, 액체, 비드, 고체로서 구성될 수 있고, 하나 이상의 천연 또는 합성 생체적합성 물질을 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 한 실시양태에서, 생체재료는 히드로겔이 될 수 있는 액체 형태의 용액이다.
- [0035] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "신장 질환"은 혈액을 여과하고 혈액으로부터 과량의 유체, 전해질 및 폐기물을 제거하는 기능을 수행하는 신장 능력의 상실을 초래하는 임의의 단계 또는 정도의 급성 또는 만성 신부전과 연관된 장애를 지칭한다. 신장 질환은 내분비 기능장애 예컨대 빈혈 (에리트로포이에틴-결핍증), 및 미네랄 불균형 (비타민 D 결핍증)을 또한 포함한다. 신장 질환은 신장으로부터 유래될 수 있거나, 또는 심부전, 고혈압, 당뇨병, 자가면역 질환 또는 간 질환을 포함하는 (그러나 이에 제한되지 않는) 다양한 병태에 대해 이차적일 수 있다. 신장 질환은 신장에 대한 급성 손상 후에 발달되는 만성 신부전의 병태일 수 있다. 예를 들어, 허혈 및/또는 독물에 대한 노출에 의한 신장 손상이 급성 신부전을 야기할 수 있고, 급성 신장 손상 후의 불완전한 회복이 만성 신부전의 발달에 이를 수 있다.
- [0036] 용어 "치료"는 신장 질환, 빈혈, 세뇨관 운반 결핍 또는 사구체 여과 결핍에 대한 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 조치 양쪽 모두를 지칭하고, 여기서 목표는 표적화된 장애를 역전시키거나, 방지하거나 또는 둔화시키는 (축소시키는) 것이다. 치료를 필요로 하는 대상은 이미 신장 질환, 빈혈, 세뇨관 운반 결핍 또는 사구체 여과 결핍에 걸린 대상, 뿐만 아니라 신장 질환, 빈혈, 세뇨관 운반 결핍 또는 사구체 여과 결핍에 걸릴 경향이 있는 대상, 또는 신장 질환, 빈혈, 세뇨관 운반 결핍 또는 사구체 여과 결핍이 방지되어야 하는 대상을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "치료"는 신장 기능의 안정화 및/또는 개선을 포함한다.
- [0037] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "생체내 접촉"은 풍부화 집단의 세포에 의해 분비된 생성물과 천연 기관 사이의 생체 내에서의 직접적인 접촉을 지칭한다. 예를 들어, 풍부화 집단의 신장 세포 (또는 신장 세포/신장 세포 분획을 함유하는 혼합물 또는 구축물)에 의해 분비된 생성물이 천연 신장과 생체 내에서 접촉될 수 있다. 직접적인 생체내 접촉은 성질 면에서 측분비, 내분비, 또는 근접분비일 수 있다. 분비된 생성물은 본원에 기술된 상이한 생성물들의 비균질성 집단일 수 있다.
- [0038] 용어 "구축물" 또는 "제형"은 하나 이상의 합성 또는 천연-발생 생체적합성 물질로 구성된 스캐폴드 또는 매트릭스의 표면 상에 또는 이러한 표면 내에 침착된 하나 이상의 세포 집단을 지칭한다. 하나 이상의 세포 집단은 하나 이상의 합성 또는 천연-발생 생체적합성 생체재료, 중합체, 단백질 또는 펩티드로 구성된 생체재료로 코팅될 수 있거나, 이러한 생체재료 상에 침착될 수 있거나, 이러한 생체재료 내에 매립될 수 있거나, 또는 이러한 생체재료에 부착될 수 있거나, 이러한 생체재료 내에 시당될 수 있거나, 또는 이러한 생체재료 내에 포획될 수

있다. 하나 이상의 세포 집단은 생체재료 또는 스캐폴드 또는 매트릭스와 시험관 내에서 또는 생체 내에서 조합될 수 있다. 구축물 또는 제형을 생성시키는데 사용된 하나 이상의 생체재료는 구축물의 세포 성분과 내인성 숙주 조직이 분산 및/또는 통합되는 것을 지시, 촉진 또는 허용하거나, 또는 구축물 또는 제형의 세포 성분의 생존, 이식, 내성 또는 기능적 수행을 지시, 촉진 또는 허용하도록 선택될 수 있다.

- [0039] 용어 "네오-키드니 오그먼트(Neo-Kidney Augment) (NKA)"는 젤라틴-기반 히드로겔로 구성된 생체재료 내에 제형화된 자가이고 동종성인 선택된 신장 세포 (SRC)로 구성된 주사가 가능한 제품인 생체활성 세포 제형을 지칭한다.
- [0040] 용어 "대상체"는 신장 질환의 하나 이상의 징후, 증상 또는 기타 적응증을 겪고 있거나 또는 겪은, 치료에 적격인 임의의 단일한 인간 대상체 (환자 포함)를 의미한다. 이같은 대상체는, 원인과 관계 없이, 새롭게 진단되었거나 또는 기존에 진단되었고, 현재 재현 또는 재발을 겪고 있거나, 또는 신장 질환에 대한 위협에 처해있는 대상을 비제한적으로 포함한다. 대상체는 기존에 신장 질환에 대해 치료되었을 수 있거나, 또는 그렇게 치료되지 않았을 수 있다.
- [0041] 용어 "환자"는 치료가 요망되는 임의의 단일한 동물, 더욱 바람직하게는 포유동물 (예를 들어, 개, 고양이, 말, 토끼, 동물원 동물, 소, 돼지, 양 및 비-인간 영장류와 같은 비-인간 동물을 포함함)을 지칭한다. 가장 바람직하게는, 본원에서 환자는 인간이다.
- [0042] 용어 "샘플" 또는 "환자 샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 대상체 또는 환자, 체액, 신체 조직, 세포주, 조직 배양물, 또는 기타 공급원으로부터 취득된 임의의 생물학적 샘플을 일반적으로 의미한다. 이러한 용어는 조직 생검, 예를 들어, 신장 생검을 포함한다. 이러한 용어는 배양된 세포, 예를 들어, 배양된 포유동물 신장 세포를 포함한다. 포유동물로부터 조직 생검 및 배양된 세포를 취득하는 방법은 관련 분야에 널리 공지되어 있다. 용어 "샘플"이 단독으로 사용된 경우, 이는 여전히 "생물학적 샘플" 또는 "환자 샘플"이라는 것을 의미하고, 즉, 이러한 용어들은 상호교환가능하게 사용된다.
- [0043] 용어 "테스트 샘플"은 본 발명의 방법에 의해 치료된 대상체로부터의 샘플을 지칭한다. 테스트 샘플은 혈액, 정액, 혈청, 소변, 골수, 점막, 조직 등을 비제한적으로 포함하여 포유동물 대상체 내의 다양한 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- [0044] 용어 "대조군" 또는 "대조군 샘플"은 음성 또는 양성 결과가 테스트 샘플에서의 결과를 상호관련시키는데 도움이 될 것으로 예상되는 음성 또는 양성 대조군을 지칭한다. 본 발명에 적절한 대조군은, 비제한적으로, 정상 신장 기능에 특징적인 지표를 나타내는 것으로 공지된 샘플, 신장 질환에 걸리지 않은 것으로 공지된 대상체로부터 취득된 샘플, 및 신장 질환에 걸린 것으로 공지된 대상체로부터 취득된 샘플을 포함한다. 추가적으로, 대조군은 본 발명의 방법에 의해 치료되기 전의 대상체로부터 취득된 샘플일 수 있다. 추가적인 적절한 대조군은 임의 유형 또는 단계의 신장 질환에 걸린 것으로 공지된 대상체로부터 취득된 테스트 샘플, 및 임의 유형 또는 단계의 신장 질환에 걸리지 않은 것으로 공지된 대상체로부터의 샘플일 수 있다. 대조군은 정상의 건강한 매칭 대조군일 수 있다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명에서 사용하기에 적절한 다른 대조군을 인지할 것이다.
- [0045] "재생 예후", "재생성 예후", 또는 "재생에 대해 예후적"은 본원에 기술된 세포 집단, 혼합물 또는 구축물의 투여 또는 이식의 유망한 재생성 과정 또는 결과의 예상 또는 예측을 일반적으로 지칭한다. 재생 예후에 대해, 예상 또는 예측은 하기 중 하나 이상에 의해 알려질 수 있다: 이식 또는 투여 후의 기능성 기관 (예를 들어, 신장)의 개선, 이식 또는 투여 후의 기능성 신장의 발달, 이식 또는 투여 후의 개선된 신장 기능 또는 능력의 발달, 및 이식 또는 투여 후의 천연 신장에 의한 특정 마커의 발현.
- [0046] "재생된 기관"은 본원에 기술된 바와 같은 세포 집단, 혼합물 또는 구축물의 이식 또는 투여 후의 천연 기관을 지칭한다. 재생된 기관은 천연 기관에서의 기능 또는 능력의 발달, 천연 기관에서의 기능 또는 능력의 개선, 및 천연 기관에서의 특정 마커의 발현을 비제한적으로 포함하는 다양한 지표를 특징으로 한다. 관련 분야의 통상의 기술자는 다른 지표가 재생된 기관을 특성화하는데 적절할 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0047] "재생된 신장"은 본원에 기술된 바와 같은 세포 집단, 혼합물 또는 구축물의 이식 또는 투여 후의 천연 신장을 지칭한다. 재생된 신장은 천연 신장에서의 기능 또는 능력의 발달, 천연 신장에서의 기능 또는 능력의 개선, 및 천연 신장에서의 특정 마커의 발현을 비제한적으로 포함하는 다양한 지표를 특징으로 한다. 관련 분야의 통상의 기술자는 다른 지표가 재생된 신장을 특성화하는데 적절할 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0048] 용어 "히드로겔"은 유기 중합체 (천연 또는 합성)가 공유 결합, 이온 결합 또는 수소 결합을 통해 가교되어, 물 분자를 포착하여 겔을 형성시키는 3차원 개방 격자 구조를 생성시키는 경우에 형성되는 물질을 지칭하도록 본원

에서 사용된다. 히드로겔을 형성시키는데 사용될 수 있는 물질의 예는 다당류 예컨대 알기네이트, 폴리포스파진, 및 폴리아크릴레이트 (토닉(tonic)에 의해 가교됨), 또는 블록 공중합체 예컨대 플루로닉스(Pluronic)<sup>TM</sup> 또는 테트로닉스(Tetronics)<sup>TM</sup>, 폴리에틸렌 옥시드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체 (각각 온도 또는 pH에 의해 가교됨)를 포함한다. 본원에서 사용된 히드로겔은 바람직하게는 생체분해성 젤라틴-기반 히드로겔이다.

[0049] "유해 사례"는 귀인과 관계 없이, 연구 (의약) 제품 또는 기타 프로토콜-부여 개입의 사용과 일시적으로 연관되는 임의의 불리하고 의도되지 않은 징후, 증상 또는 질환이고, AE 보고 기간 전에는 존재하지 않은 만성 신장 질환과 연관된 징후 또는 증상을 포함하여, 프로토콜-지정 AE 보고 기간 동안 나타나는 기존에 환자에서 관찰되지 않은 AE; 프로토콜에서 의무적인 개입 (예를 들어, 침습성 절차 예컨대 생검)의 결과로서 발생하는 합병증; 또는 조사자가 프로토콜-지정 AE 보고 기간 동안 중증도 또는 빈도 면에서 악화된 것으로 또는 특성 면에서 변화된 것으로 판단한 선제성 의학적 병태 (연구 중인 병태 이외의 것)를 포함한다.

[0050] 유해 사례는 하기 기준을 충족시키면 "심각한 유해 사례" (SAE)로 분류된다: 사망을 초래함 (즉, AE가 실제로 사망을 야기하거나 또는 사망에 이끔); 생명 위협 (즉, 조사자의 관점에서, AE가 환자를 즉각적인 사망 위험에 처하게 하지만, 더욱 중증인 형태로 발생했으면 사망을 야기했을 수 있는 AE는 포함하지 않음); 입원환자 입원을 필요로 하거나 연장함; 지속적이거나 유의한 장애/불능을 초래함 (즉, AE가 환자가 정상적인 삶의 기능을 수행하는 능력의 실질적인 파괴를 초래함); 연구 제품에 노출된 어머니에서 태어난 신생아/유아에서 선천적 기형/출생 결함을 초래함; 또는 조사자가 의학적 판단을 기초로 유의한 의학적 사례로 간주함 (예를 들어, 환자를 위태롭게 할 수 있거나, 또는 상기 열거된 결과들 중 하나를 방지하기 위한 의학적/수술적 개입을 필요로 할 수 있음). 심각한 부작용에 대한 기준 중 어느 것도 충족시키지 않는 모든 AE는 심각하지 않은 AE로 간주된다. 용어 "중증" 및 "심각한"은 동의어가 아니다. 중증도 (또는 강도)는 특정 AE의 등급, 예를 들어, 경도 (1등급), 중등도 (2등급) 또는 중증 (3등급) 심근 경색을 지칭한다. "심각한"은 규제적 정의이고 (상기 정의를 참조한다), 환자의 삶 또는 기능수행에 위협을 가하는 사례와 일반적으로 연관된 환자 또는 사례 결과 또는 행동 기준을 기초로 한다. 심각성 (중증도가 아님)은 스폰서로부터 적용가능한 규제 기관으로 규제 보고 의무를 정의하기 위한 지침으로서의 역할을 한다. 중증도 및 심각성은 eCRF 상에 AE 및 SAE를 기록할 때 독립적으로 평가되어야 한다

[0051] **세포 집단**

[0052] 상기 기술된 바와 같이, BRC는 신장 복원 및 재생에서 천연적으로 수반되는 재생성 신장 세포의 단리된 집단이다. 한 실시양태에서, BRC는 효소 소화에 의해 신장 조직으로부터 단리된 신장 세포로부터 획득되고, 표준 세포 배양 기술을 사용하여 확장된다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 재생성 능력이 있는 생체활성 신장 세포를 확장시키도록 디자인된다. 한 다른 실시양태에서, 세포 배양 배지는 어떠한 분화 인자도 함유하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 신장 세포의 확장된 비균질성 혼합물이 저산소 조건에서 배양되어, 재생성 능력이 있는 세포의 조성이 추가로 풍부화된다. 이론에 제한되기를 원치 않으면서, 이는 하기 현상 중 하나 이상에 기인할 수 있다: 1) 저산소 배양 기간 동안의 특정 세포 성분의 선택적 생존, 사망, 또는 증식; 2) 저산소 배양에 반응하여 세포 입도 및/또는 크기가 변경되고, 이에 의해 부력 밀도 및 밀도 구배 분리 동안의 후속적인 국소화의 변경이 실행됨; 및 3) 저산소 배양 기간에 반응하여 세포 유전자 / 단백질 발현이 변경되고, 이에 의해 단리 및 확장된 집단 내의 세포의 차별적인 특성이 초래됨.

[0053] 확장된 생체활성 신장 세포는 SRC를 획득하도록 밀도 구배 분리에 추가로 적용될 수 있다. 구체적으로, 밀도 구배 원심분리가 수확된 신장 세포 집단을 세포 부력 밀도를 기초로 분리하는데 사용된다. 한 실시양태에서, 부분적으로, 물 내의 60% 비이온성 아이오딘화 화합물 아이오딧사놀을 포함하는 옵티프렘(OPTIPREP) (액시스-셴드(Axis-Shield)) 밀도 구배 배지를 사용함으로써 SRC가 생성된다. 그러나, 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명의 세포 집단을 분리하기 위한 필요한 특색을 포함하는 임의의 밀도 구배 또는 기타 수단, 예를 들어, 관련 분야에 공지된 세포 표면 마커를 사용하는 면역학적 분리가 본 발명에 따라 사용될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 한 실시양태에서, 약 1.0419 g/mL를 초과하는 부력 밀도를 나타내는 세포 분획이 별개의 펠렛으로서 원심 분리 후에 수집된다. 또 다른 실시양태에서, 1.0419 g/mL 미만의 부력 밀도를 유지하는 세포가 배제 및 폐기된다.

[0054] 본 발명의 치료 조성물 및 이의 제형은 신장 질환의 치료에서 사용하기 위한, 즉 신장 기능 및/또는 구조의 안정화 및/또는 개선 및/또는 재생을 제공하기 위한, 특정 생체활성 성분 또는 세포 유형에 대해 풍부화되고/되거나 특정한 불활성이거나 원치 않는 성분 또는 세포 유형이 고갈된 신장 세포의 단리된 비균질성 집단 및 이의

혼합물을 함유할 수 있고, 전문이 본원에 참조로 포함된 프레스넬 등의 미국 2011-0117162 및 일라간 등의 PCT/US2011/036347에서 기준에 기술되었다. 조성물은 건강한 개체에 비교하여 세포 성분이 결여되지만 치료적 성질을 유지하는, 즉, 신장 기능의 안정화 및/또는 개선 및/또는 재생을 제공하는 단리된 신장 세포 분획을 함유할 수 있다. 본원에 기술된 세포 집단, 세포 분획, 및/또는 세포의 혼합물은 건강한 개체, 신장 질환이 있는 개체, 또는 본원에 기술된 바와 같은 대상체로부터 유래될 수 있다.

[0055] 본 발명은 그를 필요로 하는 대상체 내의 표적 기관 또는 조직에 투여될 선택된 신장 세포 집단의 치료용 조성물을 구상한다. 선택된 생체활성 신장 세포 집단은 대상체에게 투여 시 잠재적으로 치료 성질이 있는 세포 집단을 일반적으로 지칭한다. 예를 들어, 그를 필요로 하는 대상체에게 투여 시, 생체활성 신장 세포 집단이 대상체에서 신장 기능의 안정화 및/또는 개선 및/또는 복원 및/또는 재생을 제공할 수 있다. 치료적 성질은 재생 효과를 포함할 수 있다.

[0056] 한 실시양태에서, 세포의 공급원은 의도되는 표적 기관 또는 조직과 동일하다. 예를 들어, BRC 및/또는 SRC는 신장에 투여될 제형에서 사용되기 위해 신장으로부터 공급될 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 집단은 신장 생검으로부터 유래된다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단은 전체 신장 조직으로부터 유래된다. 한 다른 실시양태에서, 세포 집단은 신장 생검 또는 전체 신장 조직으로부터 확립된, 포유동물 신장 세포의 시험관내 배양물로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, BRC 및/또는 SRC는 생체활성 신장 세포의 비균질성 혼합물 또는 분획을 포함한다. BRC 및/또는 SRC는 건강한 개체로부터의 신장 세포 분획으로부터 유래될 수 있거나, 또는 그 자체가 건강한 개체로부터의 신장 세포 분획이다. 추가적으로, 본 발명은 건강한 개체의 상응하는 신장 세포 분획에 비교했을 때 특정 세포 성분이 결여될 수 있지만, 여전히 치료 성질을 유지하는, 건강하지 않은 개체로부터 수득된 신장 세포 분획을 제공한다. 본 발명은 건강한 개체에 비교하여 세포 성분이 결여된 치료적으로 활성인 세포 집단을 또한 제공하고, 한 실시양태에서, 이러한 세포 집단은 다양한 질환 상태의 자가 공급원으로부터 단리 및 확장될 수 있다.

[0057] 한 실시양태에서, SRC는 신장 생검을 통해 환자의 신장 피질 조직으로부터의 신장 세포의 단리 및 확장으로부터 수득된다. 신장 세포는 효소에 의한 소화에 의해 신장 조직으로부터 단리되고, 표준 세포 배양 기술에 의해 확장되며, 확장된 신장 세포로부터 밀도 구배 원심분리에 의해 선택된다. 이러한 실시양태에서, SRC는 재생 잠재력으로 유명한 신장 상피 세포로 주로 구성된다. 다른 실질 (혈관) 및 기질 세포가 자가 SRC 집단 내에 희박하게 존재할 수 있다.

[0058] 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명은, 부분적으로, 생체활성 성분에 대해 풍부화되고 불활성이거나 원치 않는 성분이 고갈된, 신장 세포의 비균질성 집단의 특정 하위분획이 출발 집단보다 우수한 치료 및 재생 결과를 제공한다는 놀라운 발견을 기초로 한다.

[0059] 신장 세포 단리 및 확장은 신장 상피 세포 및 기질 세포를 포함하는 신장 세포 유형의 혼합물을 제공한다. 상기 언급된 바와 같이, SRC는 확장된 신장 세포의 밀도 구배 분리에 의해 수득된다. 밀도 구배로 분리된 SRC 집단 내의 주요 세포 유형은 상피 표현형의 것이다. 확장된 신장 세포로부터 수득된 SRC의 특성이 다면적인 접근법을 사용하여 평가된다. 신장 세포 확장 프로세스 동안 세포 형태학, 성장 동역학 및 세포 생존성이 모니터링된다. 밀도 구배 및 트립판 블루 배제에 의해 SRC 부력 밀도 및 생존성이 특성화된다. 유동 세포측정법에 의해 SRC 표현형이 특성화되고, VEGF 및 KIM-1의 발현에 의해 SRC 기능이 입증된다.

[0060] SRC 표현형

[0061] 한 실시양태에서, 유동 세포측정법을 사용하여 신장 세포 마커의 발현 분석에 의해 세포 표현형이 모니터링된다. 세포의 표현형 분석은 분석되는 세포 유형에 대해 특이적인 항원 마커의 사용을 기초로 한다. 유동 세포측정법 분석은 분석되는 항원 마커를 발현하는 샘플 집단 내의 세포의 정량적 측정을 제공한다.

[0062] 다양한 마커가 신장 세포의 표현형 특성화에 유용한 것으로 문헌에서 보고되었다: (i) 사이토케라틴; (ii) 수송막 단백질 (아쿠아포린 및 큐빌린); (iii) 세포 결합 분자 (어드헤린 및 분화 클러스터 및 렉틴); 및 (iv) 대사 효소 (글루타티온 및 감마-글루타밀 트랜스펩티다제 (GGT)). (표 1) 전체 신장 소화물로부터 유래된 배양물에서 확인되는 대다수의 세포는 상피 및 내피 세포이기 때문에, 검사된 마커는 이러한 2가지 군에 대해 특이적인 단백질의 발현에 집중된다.

[0063] <표 1>

[0064] SRC 특성화를 위한 표현형 마커

항원 마커	반응성
CK8/18/19	상피 세포, 근위 및 원위 세관
CK8	상피 세포, 근위 세관
CK18	상피 세포, 근위 세관
CK19	상피 세포, 집합관, 원위 세관
CK7	상피 세포, 집합관, 원위 세관
CXCR4	상피 세포, 원위 및 근위 세관
E-카드헤린	상피 세포, 원위 세관
큐빌린	상피 세포, 근위 세관
아쿠아포린1	상피 세포, 근위 세관, 내림 가는 다리
GGT1	태아 및 성인 신장 세포, 근위 세관
아쿠아포린 2	신장 집합관 세포, 원위 세관
DBA	신장 집합관 세포, 원위 세관
CD31	신장의 내피 세포 (레트)
CD146	신장의 내피 세포 (개, 인간)

[0065]

[0066] 표 2는 선택된 마커, 범위 및 SRC 집단에서의 표현형의 평균 백분율 값, 및 이들의 선택에 대한 근거를 제공한다.

[0067] <표 2>

[0068] SRC의 표현형 분석을 위해 선택된 마커

표현형 마커	발현 범위	평균	근거	발현 수준
CK18	81.1내지 99.7% (n=87)	96.7%	상피 마커	높음
GGT1	4.5 내지 81.2% (n=63)	50.7%	기능성 세관 마커	중간

[0069]

[0070] 세포 기능

[0071] SRC는 컨디셔닝 배지의 분석을 통해 검출될 수 있는 단백질을 활발하게 분비한다. 세포가 프레스토블루를 대사하고 VEGF (혈관 내피 성장 인자) 및 KIM-1 (신장 손상 분자-1)을 분비하는 능력에 의해 세포 기능이 평가된다.

[0072] 표 3은 신장 세포 및 SRC 배양물로부터의 컨디셔닝 배지 내에 존재하는 VEGF 및 KIM-1 양을 제시한다. 신장 세포는 전면성장에 가깝도록 배양되었다. 신장 세포 배양물에 대한 철야 노출로부터의 컨디셔닝 배지가 VEGF 및 KIM-1에 대해 테스트되었다.

[0073] <표 3>

[0074] 인간 신장 세포 및 SRC에 의한 VEGF 및 KIM-1 생산

컨디셔닝 배지	VEGF		KIM-1	
	ng/mL	ng/백만개의 세포	ng/mL	ng/ 백만개의 세포
신장 세포 배양물 (n=15)	0.50 내지 2.42	2.98 내지 14.6	0.20 내지 3.41	1.14 내지 15.2
SRC (n=14)	0.80 내지 3.85	4.83 내지 23.07	0.32 내지 2.10	1.93 내지 12.59

[0075]

- [0076] SRC 효소 활성
- [0077] 신장 근위 세관에서 발견되는 2개의 특이적 효소인 GGT ( $\gamma$ -글루타밀 트랜스펩티다제) 및 LAP (류신 아미노펩티다제)의 활성을 측정함으로써 제형화 전의 SRC의 세포 기능을 또한 평가할 수 있다.
- [0078] 선택된 신장 세포 조성물이 본원에서 기술되지만, 본 발명은 다양한 다른 활성 작용제를 함유하는 조성물을 구상한다. 다른 적절한 활성 작용제는, 비제한적으로, 세포 응집물, 무세포 생체재료, 생체활성 세포로부터의 분비 생성물, 대형 및 소형 분자 치료제, 뿐만 아니라 이들의 조합물을 포함한다. 예를 들어, 한가지 유형의 생체활성 세포가 치료용 분자 또는 또 다른 유형의 생체활성 세포의 존재 또는 부재 하에 생체재료-기반 마이크로 캐리어와 조합될 수 있고, 미부착 세포가 무세포 입자와 조합될 수 있다.
- [0079] **생체재료**
- [0080] 다양한 생체재료가 활성 작용제와 조합되어 본 발명의 치료 제형을 제공할 수 있다. 생체재료는 임의의 적절한 형상 (예를 들어, 비드) 또는 형태 (예를 들어, 액체, 겔 등)일 수 있다. 중합체 매트릭스 형태의 적절한 생체재료가 버트램(Bertram) 등의 미국 출원 공개 20070276507 (전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기술되어 있다. 한 실시양태에서, 중합체성 매트릭스는 개방-셀 폴리락트산 (OPLA®), 셀룰로스 에테르, 셀룰로스, 셀룰로스 에스테르, 플루오린화 폴리에틸렌, 페놀계, 폴리-4-메틸펜텐, 폴리아크릴니트릴, 폴리아미드, 폴리아미드이미드, 폴리아크릴레이트, 폴리벤조옥사졸, 폴리카르보네이트, 폴리아노아릴에테르, 폴리에스테르, 폴리에스테르카르보네이트, 폴리에테르, 폴리에테르에테르케톤, 폴리에테르이미드, 폴리에테르케톤, 폴리에테르술폰, 폴리에틸렌, 폴리플루오로올레핀, 폴리이미드, 폴리올레핀, 폴리옥사디아졸, 폴리페닐렌 옥시드, 폴리페닐렌 술폰, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리술폰, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리티오에테르, 폴리트리아졸, 폴리우레탄, 폴리비닐, 폴리비닐리덴 플루오리드, 재생 셀룰로스, 실리콘, 우레아-포름알데히드, 콜라겐, 젤라틴, 알기네이트, 라미닌, 피브로넥틴, 실크, 엘라스틴, 알기네이트, 히알루론산, 아가로오스, 또는 이들의 공중합체 또는 물리적 블렌드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 합성 또는 천연-발생 물질로부터 형성된 생체적합성 물질일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 생체재료는 히드로겔이다.
- [0081] 히드로겔은 다양한 중합체성 물질로부터 형성될 수 있고, 다양한 생물학적 용도에 유용하다. 히드로겔은 물리적으로 친수성 중합체의 3차원 네트워크로서 기술될 수 있다. 히드로겔의 유형에 따라, 이는 다양한 백분율의 물을 함유하지만, 모두 물에 용해되지 않는다. 높은 수함량에도 불구하고, 히드로겔은 친수성 잔기의 존재로 인해 큰 부피의 액체와 추가적으로 결합할 수 있다. 히드로겔은 이의 젤라틴성 구조를 변화시키지 않으면서 광대하게 팽창된다. 사용된 중합체의 성질 및 생성물의 추가적인 특정 설비에 따라 히드로겔의 기본적인 물리적 특색이 특이적으로 변형될 수 있다.
- [0082] 히드로겔 물질은 바람직하게는 염증 반응을 유도하지 않는다. 히드로겔을 형성시키는데 사용될 수 있는 다른 물질의 예는 (a) 변형 알기네이트, (b) 1가 양이온에 대한 노출에 의해 겔화되는 다당류 (예를 들어 젤란 검 및 카라기난), (c) 매우 점성인 액체이거나 틱소트로픽(thixotropic)이고 느린 구조 발달에 의해 경시적으로 겔을 형성하는 다당류 (예를 들어, 히알루론산), (d) 젤라틴 또는 콜라겐, 및 (e) 중합체성 히드로겔 전구체 (예를 들어, 폴리에틸렌 옥시드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체 및 단백질)를 포함한다. 미국 특허 번호 6,224,893 B1이 다양한 중합체의 상세한 설명, 및 이같은 중합체의 화학적 성질을 제공하고, 이는 본 발명에 따라 히드로겔을 제조하는데 적절하다.
- [0083] 특정 실시양태에서, 본 발명의 생체재료를 제형화하는데 사용된 히드로겔은 젤라틴을 기초로 한다. 젤라틴은 중간엽 조직 세포의 매트릭스 (ECM)의 주요 성분인 콜라겐으로부터 유래된, 비-독성이고, 생체분해성이며 수용성인 단백질이다. 젤라틴은 세포 부착, 증식 및 줄기 세포 분화를 촉진하는, 아르기닌-글리신-아스파르트산 (RGD) 서열을 포함하는 정보 신호를 유지한다. 젤라틴의 특징적인 성질은 상한 임계 용액 온도(Upper Critical Solution Temperature) 거동 (UCST)을 나타낸다는 것이다. 40°C의 특정 온도 역치를 초과하면, 가요성의 무작위 단일 코일의 형성에 의해 젤라틴이 물에 용해될 수 있다. 냉각 시, 수소 결합 형성 및 반테르발스 상호작용이 발생하여, 삼중 나선의 형성을 초래한다. 이러한 콜라겐-유사 삼중 나선이 접합 구역으로서 작용하고, 따라서 슬-겔 전이를 촉발한다. 젤라틴은 제약 및 의학 용도에서 널리 사용된다.
- [0084] 한 실시양태에서, 본원에서 주사가능한 세포 조성물은 돼지 젤라틴을 기초로 하고, 이는 돼지 피부로부터 공급될 수 있고, 예를 들어, 니타 젤라틴 엔에이 인크(Nitta Gelatin NA Inc) (미국 노스 캐롤라이나) 또는 젤리타 유에스에이 인크.(Gelita USA Inc.) (미국 아이오와)로부터 시판된다. 젤라틴이, 예를 들어, 둘베코 포스페이트-완충 염수 (DPBS)에 용해되어 열-반응성 히드로겔을 형성할 수 있고, 이는 상이한 온도에서 겔화 및 액체

화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 젤라틴-기반 히드로겔은 실온 (22-28℃) 이상에서 액체이고, 냉장 온도 (2-8℃)로 냉각될 때 겔화된다.

[0085] 관련 분야의 통상의 기술자는 관련 분야에 공지된 다른 유형의 합성 또는 천연-발생 물질이 본원에 기술된 바와 같은 스캐폴드를 형성하는데 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0086] 온도-민감성 생체재료

[0087] 본원에 기술된 생체재료는, 예를 들어, 시험관내 또는 생체 내에서, 특정한 외부 조건에 반응하도록 디자인되거나 개조될 수도 있다. 한 실시양태에서, 생체재료는 (예를 들어, 시험관내 또는 생체 내에서) 온도-민감성이다. 또 다른 실시양태에서, 생체재료는 (예를 들어, 시험관내 또는 생체 내에서) 효소 분해에 대한 노출에 반응하도록 개조된다. 외부 조건에 대한 생체재료의 반응은 본원에 기술된 바와 같이 미세 조정될 수 있다. 기술된 제형의 온도 민감성은 제형 내의 생체재료의 백분율을 조절함으로써 변할 수 있다. 예를 들어, 용액 내의 젤라틴의 백분율을 조절하여 최종 제형 (예를 들어, 액체, 겔, 비드 등) 내의 젤라틴의 온도 민감성을 조정할 수 있다. 한 실시양태에서, 젤라틴 용액은 PBS, DMEM, 또는 또 다른 적절한 용매 내에서 제공될 수 있다. 대안적으로, 생체재료가 화학적으로 가교되어 효소에 의한 분해에 대한 더 큰 저항성을 제공할 수 있다. 예를 들어, 카르보디이미드 가교제가 젤라틴 비드를 화학적으로 가교시킴으로써 내인성 효소에 대한 감수성 감소를 제공하는데 사용될 수 있다.

[0088] 한 측면에서, 본원에 기술된 제형에는 대상체에게 투여될 활성 작용제, 예컨대 생체활성 신장 세포에 대한 유리한 환경을 생성시키는 성질이 있는 생체재료가 혼입된다. 한 실시양태에서, 제형은 활성 작용제가 생체재료와 함께 제형화되는 시간부터 대상체에게 투여하는 시점까지 유리한 환경을 제공하는 제1 생체재료를 함유한다. 한 다른 실시양태에서, 유리한 환경은 대상체에게 투여하기 전에 유체 내의 세포 (본원에 기술된 바와 같음)에 대비하여 생체활성 세포가 실질적으로 고체인 상태로 현탁되어 있는 것에 관련된다. 또 다른 실시양태에서, 제1 생체재료는 온도-민감성 생체재료이다. 온도-민감성 생체재료는 (i) 약 8℃ 이하에서 실질적으로 고체인 상태, 및 (ii) 주위 온도 이상에서 실질적으로 액체인 상태일 수 있다. 한 실시양태에서, 주위 온도는 대략적으로 실온이다.

[0089] 한 실시양태에서, 생체재료는 온도에 따라 적어도 2개의 상이한 상 또는 상태를 유지할 수 있는 온도-민감성 생체재료이다. 이러한 생체재료는 제1 온도에서의 제1 상태, 제2 온도에서의 제2 상태, 및/또는 제3 온도에서의 제3 상태를 유지할 수 있다. 제1, 제2 또는 제3 상태는 실질적으로 고체이거나, 실질적으로 액체이거나, 또는 실질적으로 반고체 또는 반액체인 상태일 수 있다. 한 실시양태에서, 생체재료는 제1 온도에서의 제1 상태 및 제2 온도에서의 제2 상태가 있고, 여기서 제1 온도는 제2 온도보다 더 낮다.

[0090] 온도-민감성 생체재료는 용액 형태, 비드 형태, 또는 본원에 기술되고/되거나 관련 분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 적절한 형태로 제공될 수 있다. 본원에 기술된 세포 집단 및 제제는 온도-민감성 생체재료로 코팅되거나, 이에 침착되거나, 이에 매립되거나, 이에 부착되거나, 이에 시딩되거나, 이에 현탁되거나, 또는 이에 포착될 수 있다. 대안적으로, 온도-민감성 생체재료는 어떠한 세포도 없이, 예를 들어, 스페이서 비드의 형태로 제공될 수 있다.

[0091] 또 다른 측면에서, 제형은 제형화하는 시간부터 대상체에게 투여한 후의 시점까지 유리한 환경을 제공하는 제2 생체재료와 조합된 생체활성 세포를 함유한다. 한 실시양태에서, 제2 생체재료가 제공하는 유리한 환경은 대상체에게 투여하는 시점까지, 그리고 투여 후의 기간 동안 구조적 통합성을 유지하는 생체재료 내의 세포를 투여하는 장점에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이식 후의 제2 생체재료의 구조적 통합성은 수분, 수시간, 수일 또는 수주이다. 한 실시양태에서, 구조적 통합성은 1개월 미만, 1주 미만, 1일 미만, 또는 1시간 미만이다. 상대적으로 단기간의 구조적 통합성은 혼입된 요소와 제형이 배치되는 조직 또는 기관의 상호작용에 방해 또는 장벽이 되지 않으면서 제어된 취급, 배치 또는 분산으로 활성 작용제 및 생체재료를 조직 또는 기관 내의 표적 장소에 전달할 수 있는 제형을 제공한다.

[0092] 또 다른 실시양태에서, 제2 생체재료는 제1 생체재료와 민감성이 상이한 온도-민감성 생체재료이다. 제2 생체재료는 (i) 대략적으로 주위 온도 이하에서 실질적으로 고체인 상태, 및 (ii) 약 37℃ 이상에서 실질적으로 액체인 상태일 수 있다. 한 실시양태에서, 주위 온도는 대략적으로 실온이다.

[0093] 한 실시양태에서, 제2 생체재료는 가교 비드이다. 가교 비드는 본원에 기술된 바와 같이 가교 정도에 따라 생체내 체류 시간이 미세하게 조정가능하다. 또 다른 실시양태에서, 가교 비드는 생체활성 세포를 포함하고, 본원에 기술된 바와 같은 효소 분해에 대해 저항성이다. 본 발명의 제형은 활성 작용제, 예를 들어, 생체활성 세

포와 조합된 제2 생체재료의 존재 또는 부재 하에 활성 작용제, 예를 들어, 생체활성 세포와 조합된 제1 생체재료를 포함할 수 있다. 제형이 제2 생체재료를 포함하는 경우, 이는 온도 민감성 비드 및/또는 가교 비드일 수 있다.

[0094] 또 다른 측면에서, 본 발명은 약 수분, 수시간 또는 수일의 기간에 걸쳐 분해되는 생체재료를 함유하는 제형을 제공한다. 이는 이식 후 수일, 수주 또는 수개월에 걸쳐 천천히 분해되는 고체 물질의 이식에 초점을 맞추는 대형 작업에 대조적이다. 한 실시양태에서, 생체재료는 하기 특성 중 하나 이상이 있을 수 있다: 생체적합성, 생체분해성/생체흡수성, 대상체 내로의 이식 전 및 동안의 실질적으로 고체인 상태, 이식 후의 구조적 통합성 (실질적으로 고체인 상태)의 상실, 및 세포 생존성을 지지하기 위한 세포적합성 환경. 생체재료가 이식 동안 이식 입자의 간격을 유지시키는 능력은 천연 조직의 내성장을 강화한다. 생체재료는 고체 제형의 이식을 또한 촉진한다. 생체재료는 본원에 기술된 제형의 국소화를 제공하는데, 고체 단위의 삽입이 전달된 물질이 이식 동안 조직 내에 분산되는 것을 방지하는 것을 돕기 때문이다. 세포-기반 제형의 경우, 고체 생체재료는 유체 내에 현탁된 세포에 비교하여 고정 의존적 세포의 안정성 및 생존성을 또한 개선한다. 그러나, 단기간의 구조적 통합성은 이식 이후에, 전달된 세포/물질의 조직 내성장 또는 이와 숙주 조직의 통합에 대한 생체재료가 유의한 장벽을 제공하지 않는다는 것을 의미한다.

[0095] 한 측면에서, 본 발명은 실질적으로 고체인 형태로 이식되고, 그 후 신체 내로 이식된 후 액화/용융되거나 또는 다른 방식으로 구조적 통합성을 상실하는 생체재료를 함유하는 제형을 제공한다. 이는 액체로서 주사될 수 있고, 그 후 신체 내에서 고체화되는 물질의 사용에 초점을 맞추는 상당한 작업에 대조적이다.

[0096] **생체활성 세포 제형**

[0097] 본원에 기술된 생체활성 세포 제형은 그를 필요로 하는 대상체에서의 신장 질환의 치료를 위한 본원에 기술된 생체활성 신장 세포가 있는 상기 언급된 생체재료로부터 제조된 이식가능한 구축물을 함유한다. 한 실시양태에서, 구축물은 생체적합성 물질 또는 생체재료, 하나 이상의 합성 또는 천연-발생 생체적합성 물질로 구성된 스캐폴드 또는 매트릭스, 및 부착 및/또는 포착에 의해 스캐폴드의 표면 상에 침착되거나 또는 표면 내에 매립된 하나 이상의 세포 집단 또는 세포 혼합물로 구성된다. 특정 실시양태에서, 구축물은 생체재료, 및 이러한 생체재료 성분(들)로 코팅되거나, 이의 상부에 침착되거나, 이의 내부에 침착되거나, 이에 부착되거나, 이에 포착되거나, 이에 매립되거나, 이에 시딩되거나 또는 이와 조합된 본원에 기술된 하나 이상의 세포 집단 또는 세포 혼합물로 구성된다. 풍부화 세포 집단 또는 이의 혼합물을 포함하여 본원에 기술된 세포 집단 중 임의의 것이 매트릭스와 조합되어 구축물을 형성하는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 생체활성 세포 제형은 생체적합성 물질 또는 생체재료 및 본원에 기술된 SRC 집단으로 구성된다.

[0098] **네오-키드니 오그먼트 기술 및 조성**

[0099] 한 실시양태에서, 생체활성 세포 제형은 생체재료 (젤라틴-기반 히드로겔) 내에 제형화된, 자가이고 동종성인 선택된 신장 세포 (SRC)로 구성된 주사가 가능한 제품인 네오-키드니 오그먼트 (NKA)이다. 한 측면에서, 자기의 동종성 SRC는 신장 생검을 통한 환자의 신장 피질 조직으로부터의 신장 세포의 단리 및 확장, 및 확장된 신장 세포로부터의 밀도 구배 원심분리에 의한 선별로부터 획득된다. SRC는 재생 잠재력으로 유명한 신장 상피 세포로 주로 구성된다 (Humphreys et al. (2008) Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. Cell Stem Cell. 2(3):284-91). 다른 실질 (혈관) 및 기질 (집합관) 세포가 자가 SRC 집단 내에 희박하게 존재할 수 있다. 수용자 신장 내로 SRC를 주사하면 비임상 연구에서 동물 생존, 소변 농도 및 여과 기능의 유의한 개선이 초래되었다. 그러나, SRC는 저장 수명 및 안정성이 제한된다. 젤라틴-기반 히드로겔 생체재료 내의 SRC의 제형은 세포의 안정성 강화를 제공하고, 따라서 제품 저장 수명을 연장하며, 임상 용도를 위한 신장 피질 내로의 NKA의 수송 및 전달 동안 NKA의 안정성 개선을 제공한다.

[0100] 또 다른 측면에서, NKA는 먼저 표준 임상 관리 신장 생검 절차를 사용하여 공여자/수용자로부터 신장 피질 조직을 획득함으로써 제작된다. 효소 소화에 의해 신장 세포를 신장 조직으로부터 단리하고, 표준 세포 배양 기술을 사용하여 확장시킨다. 세포 배양 배지는 1차 신장 세포를 확장시키도록 디자인되고, 어떠한 분화 인자도 함유하지 않는다. 수확된 신장 세포를 밀도 구배 분리에 적용하여 SRC를 획득한다.

[0101] **온도-민감성 제형**

[0102] 본 발명의 한 측면은 본원에 기술된 바와 같이 외부 조건에 반응하도록 디자인 또는 개조된 생체재료로 제조된 제형을 추가로 제공한다. 결과적으로, 구축물 내의 생체활성 세포 집단과 생체재료의 조합물의 성질이 외부 조건에 따라 변화될 것이다. 예를 들어, 세포 집단과 온도-민감성 생체재료의 조합물이 온도에 따라 변한다. 한

실시양태에서, 구축물은 생체활성 신장 세포 집단, 및 약 8°C 이하에서 실질적으로 고체 상태이고, 대략적으로 주위 온도 이상에서 실질적으로 액체 상태인 생체재료를 함유하고, 여기서 세포 집단은 약 8°C 이하에서 생체재료 내에 현탁된다.

[0103] 그러나, 세포 집단은 대략적으로 주위 온도 이상에서 생체재료의 부피 전반에 걸쳐 실질적으로 자유롭게 이동한다. 더 낮은 온도에서 세포 집단이 실질적으로 고체인 상에 현탁되는 것은 유체 내의 세포에 비교하여 세포, 예컨대 고정-의존적 세포에 안정성 장점을 제공한다. 또한, 세포가 실질적으로 고체인 상태로 현탁되는 것은 하기 이점 중 하나 이상을 제공한다: i) 세포 침강을 방지함, ii) 세포가 현탁 상태로 생체재료에 계속 고정되게 허용함; iii) 세포가 생체재료의 부피 전반에 걸쳐 계속 더욱 균일하게 분산되게 허용함; iv) 세포 응집물의 형성을 방지함; 및 v) 제형의 저장 및 운송 동안 세포에 더 양호한 보호를 제공함. 대상체에게 투여할 때까지 이같은 특색을 유지할 수 있는 제형이 유리한데, 적어도 이는 제형 내의 세포의 전반적인 건강이 더 양호할 것이고, 더 균일하고 일관적인 투여량의 세포가 투여될 것이기 때문이다.

[0104] 바람직한 실시양태에서, SRC를 NKA 내로 제형화하는데 사용된 젤라틴-기반 히드로겔 생체재료는 완충제에 용해되어 열-반응성 히드로겔을 형성하는 돼지 젤라틴이다. 이러한 히드로겔은 실온에서는 유체이지만, 냉장 온도 (2-8°C)로 냉각되는 경우 겔화된다. SRC이 이러한 히드로겔과 함께 제형화되어 NKA가 수득된다. 냉각에 의해 NKA가 겔화되고, 냉장 온도 (2-8°C) 하에 병원으로 운송된다. NKA는 저장 수명이 3일이다. 임상 현장에서, 제품이 실온으로 가온된 후 환자의 신장 내로 주사된다. 경피 또는 복강경 절차를 통한 NKA 전달에 적절한 바늘 및 주사기를 사용하여 신장 피질 내로 NKA가 이식된다.

[0105] 제작 공정

[0106] 특정 실시양태에서, 생체활성 세포 제형에 대한 제작 공정은 환자 생검부터 제품 이식까지 약 4주 내에 제품을 전달하도록 디자인된다. 고유의 환자-대-환자 조직 가변성이 제품을 고정된 이식 일정으로 전달하는데 난제를 나타낸다. 확장된 신장 세포는 세포 확장에서의 이러한 환자-의존적 변동을 수용하기 위해 세포 확장 동안 관례적으로 냉동보존된다. 냉동보존된 신장 세포는, 필요하다면, 또 다른 치료가 요구되는 경우 (예를 들어, 환자 질병으로 인한 지연, 예측되지 않은 공정 이벤트 등)에, 그리고 재이식을 위해 다중 용량을 제작하기 위해 지속적인 세포 공급원을 제공한다.

[0107] 생체활성 세포 제형이 생체재료 (젤라틴-기반 히드로겔) 내에 제형화된 자가의 동종성 세포로 구성된 실시양태의 경우, 최종 조성은 젤라틴 용액 + 돌베코 포스페이트 완충 염수 (DPBS) 내의 약  $20 \times 10^6$  개의 세포/mL 내지 약  $200 \times 10^6$  개의 세포/mL일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제품 mL 당 세포의 개수는 약  $20 \times 10^6$  개의 세포/mL, 약  $40 \times 10^6$  개의 세포/mL, 약  $60 \times 10^6$  개의 세포/mL, 약  $100 \times 10^6$  개의 세포/mL, 약  $120 \times 10^6$  개의 세포/mL, 약  $140 \times 10^6$  개의 세포/mL, 약  $160 \times 10^6$  개의 세포/mL, 약  $180 \times 10^6$  개의 세포/mL, 또는 약  $200 \times 10^6$  개의 세포/mL이다. 일부 실시양태에서, 젤라틴은 용액 내에 약 0.5%, 약 0.55%, 약 0.6%, 약 0.65%, 약 0.7%, 약 0.75%, 약 0.8%, 약 0.85%, 약 0.9%, 약 0.95% 또는 약 1%, (w/v)로 존재한다. 한 예에서, 생체재료는 DPBS 내의 0.88% (w/v) 젤라틴 용액이다.

[0108] 바람직한 실시양태에서, NKA는 무균성 1회용 10 mL 주사기 내에서 제시된다. 최종 부피는  $100 \times 10^6$  개의 SRC/mL의 NKA 농도 및  $3.0 \times 10^6$  개의 SRC/g 신장 중량 (MRI로 추정됨)의 표적 용량으로부터 계산된다. 투여량은 환자 신장의 중량을 기초로 주사 시점에 외과외에 의해 결정될 수도 있다.

[0109] NKA를 개발하기 위한 이러한 접근법은 활성 생물학적 성분인 SRC의 광범위한 과학적 평가를 기초로 하였다 (Bruce et al. (2011) Exposure of Cultured Human Renal Cells Induces Mediators of cell migration and attachment and facilitates the repair of tubular cell monolayers in vitro. Experimental Biology, Washington, DC; Ilagan et al. (2010a) Exosomes derived from primary renal cells contain microRNAs that can potentially drive therapeutically-relevant outcomes in models of chronic kidney disease. TERMIS Conference, Orlando, FL; Ilagan et al. (2010b) Secreted Factors from Bioactive Kidney Cells Attenuate NF-kappa-B. TERMIS Conference, Orlando, FL; Ilagan et al. (2009) Characterization of primary adult canine renal cells (CRC) in a three-dimensional (3D) culture system permissive for ex vivo nephrogenesis. KIDSTEM Conference, Liverpool, England, UK; Kelley et al. (2012) A Population of Selected Renal Cells Augments Renal Function and Extends Survival in the ZSF1 model of Progressive Diabetic Nephropathy. Cell Transplant 22(6), 1023-1039; Kelley et al. (2011) Intra-renal

Transplantation of Bioactive Renal Cells Preserves Renal Functions and Extends Survival in the ZSF1 model of Progressive Diabetic Nephropathy. ADA Conference, San Diego, CA; Kelley et al. (2010a) A tubular cell-enriched subpopulation of primary renal cells improves survival and augments kidney function in a rodent model of chronic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol. 299(5), F1026-1039; Kelley et al. (2010b) Bioactive Renal Cells Augment Kidney Function In a Rodent Model Of Chronic Kidney Disease. ISCT Conference, Philadelphia, PA; Kelley et al. (2008) Enhanced renal cell function in dynamic 3D culture system. KIDSTEM Conference, Liverpool, England, UK; Kelley et al. (2010c) Bioactive Renal Cells Augment Renal Function in the ZSF1 model of Diabetic Nephropathy. TERMIS Conference, Orlando, FL; Presnell et al. (2010) Isolation, Characterization, and Expansion (ICE) methods for Defined Primary Renal Cell Populations from Rodent, Canine, and Human Normal and Diseased Kidneys. Tissue Engineering Part C Methods. 17(3):261-273; Presnell et al. (2009) Isolation and characterization of bioresponsive renal cells from human and large mammal with chronic renal failure. Experimental Biology, New Orleans, LA; Wallace et al. (2010) Quantitative Ex Vivo Characterization of Human Renal Cell Population Dynamics via High-Content Image-Based Analysis (HCA). ISCT Conference, Philadelphia, PA; Yamaleyeva et al. (2010) Primary Human Kidney Cell Cultures Containing Erythropoietin-Producing Cells Improve Renal Injury. TERMIS Conference, Orlando, FL.) SRC는 신장 복원 및 재생에서 천연적으로 수반되는 자가의 동종성 세포 집단이다. 일련의 비임상 약리학, 생리학 및 기계론적 생물학 연구에서, SRC의 특성이 규정되었고, 신장 구조 및 기능을 증대시킴으로써 CKD 진행을 지연시키는 능력이 입증되었다 (프레스넬 등의 WO/2010/056328 및 일라간 등의 PCT/US2011/036347).

- [0110] 세포의 총개수가 제형에 대해 선택될 수 있고, 적합한 투여량에 도달하도록 제형의 부피가 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제형은 단일 투여량 또는 단일 투여량 + 추가적인 투여량인 대상체에 대한 세포의 투여량을 함유할 수 있다. 다른 실시양태에서, 투여량은 본원에 기술된 바와 같은 구축물에 의해 제공될 수 있다. 본원에 기술된 생체활성 신장 세포 집단 또는 신장 세포 집단의 혼합물의 치료적 유효량은 대상체가 안전하게 수용하는 최대 세포 개수에서 신장 질환의 치료, 예를 들어, 안정화, 하락률 감소, 또는 하나 이상의 신장 기능의 개선에 필요한 최소 세포 개수까지의 범위일 수 있다.
- [0111] 치료적 유효량의 본원에 기술된 생체활성 신장 세포 집단 또는 이의 혼합물이 제약상 허용되는 담체 또는 부형제 내에 현탁될 수도 있다. 이같은 담체는 기본 배양 배지 + 1% 혈청 알부민, 염수, 완충 염수, 텍스트로스, 물, 폴라젠, 알기네이트, 히알루론산, 피브린 글루(glue), 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐알콜, 카르복시메틸셀룰로스 및 이들의 조합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 제형은 투여 양식에 적합하여야 한다.
- [0112] 생체활성 신장 세포 제제(들), 또는 이의 혼합물, 또는 조성물은 인간에게 투여하기 위해 개조된 제약 조성물로서 일상적인 절차에 따라 제형화된다. 전형적으로, 정맥내 투여, 동맥내 투여 또는 신장 피막 내에서의 투여를 위한 조성물은, 예를 들어, 무균성의 등장성 수성 완충제 내의 용액이다. 필요한 경우, 조성물은 주사 부위에서의 임의의 통증을 호전시키기 위한 국소 마취제를 또한 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분들은 따로따로 또는 함께 혼합되어 단위 투여량 형태로, 예를 들어, 밀봉 용기 예컨대 활성 작용제의 양을 지시하는 앰플 내의 냉동보존 농축물로서 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되어야 하는 경우, 이는 무균성 제약 등급 물 또는 염수를 함유하는 주입병에 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있도록 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플이 제공될 수 있다.
- [0113] 제약상 허용되는 담체는, 부분적으로, 투여되는 특정 조성물에 의해, 뿐만 아니라 조성물을 투여하는데 사용되는 특정 방법에 의해 결정된다. 따라서, 제약 조성물의 광범위한 적절한 제형이 있다 (예를 들어, 본원에 전문이 참조로 포함된 문헌 [Alfonso R Gennaro (ed), Remington: The Science and Practice of Pharmacy (기존의 [Remington's Pharmaceutical Sciences 20th ed.]), Lippincott, Williams & Wilkins, 2003]을 참조한다). 일반적으로 제약 조성물은 무균성으로서 제형화되고, 실질적으로 등장성이며, 미국 식품의약청의 모든 우수 의약품 제조 기준(Good Manufacturing Practice) (GMP) 규정을 완전히 준수한다.
- [0114] 세포 생존성 작용제
- [0115] 한 측면에서, 생체활성 세포 제형은 세포 생존성 작용제를 또한 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 생존성 작용제는 항산화제, 산소 운반체, 면역조정 인자, 세포 동원 인자, 세포 부착 인자, 항염증제, 혈관형성 인자, 상처 치유 인자, 및 생체활성 세포로부터 분비된 생성물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0116] 항산화제는 다른 분자의 산화를 억제하는 능력을 특징으로 한다. 항산화제는, 비제한적으로, 6-히드록시-

2,5,7,8-테트라메틸크로만-2-카르복실산 (트롤록스(Trolox)®), 카로티노이드, 플라보노이드, 이소플라본, 유비퀴논, 글루타티온, 리포산, 수퍼옥시드 디스뮤타제, 아스코르브산, 비타민 E, 비타민 A, 혼합형 카로티노이드 (예를 들어, 베타 카로틴, 알파 카로틴, 감마 카로틴, 루테인, 라이코펜, 파이토펜, 파이토플루엔, 및 아스타잔틴), 셀레늄, 코엔자임 Q10, 인돌-3-카르비놀, 프로안토시아니딘, 레스베라트롤, 퀘르세틴, 카테킨, 살리실산, 쿠르쿠민, 빌리루빈, 옥살산, 파이트산, 리포산, 바닐산, 폴리페놀, 페룰산, 테아플라빈, 및 이들의 유도체 중 하나 이상을 포함한다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명에서 사용하기 위한 다른 적절한 항산화제를 인지할 것이다.

[0117] 산소 운반체는 산호를 운반 및 방출하는 능력을 특징으로 하는 작용제이다. 이는, 비제한적으로, 퍼플루오로카본 및 퍼플루오로카본을 함유하는 약제를 포함한다. 적절한 퍼플루오로카본-기반 산소 운반체는, 비제한적으로, 퍼플루오로옥틸 브로마이드 (C8F17Br); 퍼플루오로디코로탄 (C8F16C12); 퍼플루오로데실 브로마이드; 퍼플루오브론; 퍼플루오로데칼린; 퍼플루오르트리포필아민; 퍼플루오로메틸시클로피페리딘; 플루오솔 (Fluosol)® (퍼플루오로데칼린 & 퍼플루오르트리포필아민); 퍼프트란(Perftoran)® (퍼플루오로데칼린 & 퍼플루오로메틸시클로피페리딘); 옥시젠트(Oxygent)® (퍼플루오로데실 브로마이드 & 퍼플루오브론); 옥시사이트 (Oxycyte)™ (퍼플루오로 (tert-부틸시클로헥산))를 포함한다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명에서 사용하기 위한 다른 적절한 퍼플루오로카본-기반 산소 운반체를 인지할 것이다.

[0118] 면역조정 인자는, 비제한적으로, 오스테오펜틴, FAS 리간드 인자, 인터루킨, 형질전환 성장 인자 베타, 혈청 유래 성장 인자, 클러스테린, 트랜스페린, 작용 시 조절되고 정상 T-세포에서 발현되는 분비 단백질 (RANTES), 플라스미노겐 활성화제 억제제 - 1 (Pai-1), 종양 괴사 인자 알파 (TNF-알파), 인터루킨 6 (IL-6), 알파-1 마이크로글로불린, 및 베타-2-마이크로글로불린을 포함한다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명에서 사용하기 위한 다른 적절한 면역조정 인자를 인지할 것이다.

[0119] 항염증제 또는 면역억제제 (하기 기술됨) 또한 제형의 일부일 수 있다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명에서 사용하기 위한 다른 적절한 항산화제를 인지할 것이다.

[0120] 세포 동원 인자는, 비제한적으로 단백질 화학주성 단백질 1 (MCP-1), 및 CXCL-1을 포함한다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명에서 사용하기 위한 다른 적절한 세포 동원 인자를 인지할 것이다.

[0121] 세포 부착 인자는, 비제한적으로, 피브로넥틴, 프로콜라겐, 콜라겐, ICAM-1, 결합 조직 성장 인자, 라미닌, 프로테오글리칸, 특이적 세포 부착 펩티드 에컨대 RGD 및 YSIGN을 포함한다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명에서 사용하기 위한 다른 적절한 세포 부착 인자를 인지할 것이다.

[0122] 혈관형성 인자는, 비제한적으로, 매트릭스 메탈로프로테아제 1 (MMP1), 매트릭스 메탈로프로테아제 2 (MMP2), 혈관 내피 성장 인자 F (VEGF), 매트릭스 메탈로프로테아제 9 (MMP-9), 조직 억제제 또는 메탈로프로테아제 - 1 (TIMP-1) 혈관 내피 성장 인자 F (VEGF), 안지오펜이에틴-2 (ANG-2)를 포함한다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명에서 사용하기 위한 다른 적절한 혈관형성 인자를 인지할 것이다.

[0123] 상처 치유 인자는, 비제한적으로, 각질세포 성장 인자 1 (KGF-1), 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA), 칼빈딘, 클러스테린, 시스타틴 C, 트레포일 인자 3을 포함한다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명에서 사용하기 위한 다른 적절한 상처 치유 인자를 인지할 것이다.

[0124] 본원에 기술된 생체활성 세포로부터의 분비 생성물 또한 세포 생존성 작용제로서 생체활성 세포 제형에 첨가될 수 있다

[0125] 관련 분야의 통상의 기술자는 세포 집단을 생체재료에 침착시키거나 이들을 다른 방식으로 조합하여 구축물을 형성시키는 여러 적절한 방법을 이해할 것이다.

[0126] **사용 방법**

[0127] 한 측면에서, 본 발명의 구축물 및 제형은 본원에 기술된 사용 방법에서 사용하는데 적절하다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제형은 질환 치료를 위해 투여된다. 예를 들어, 생체활성 세포는 본원에 기술된 제형의 일부로서 천연 기관에 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 생체활성 세포는 투여 대상인 천연 기관으로부터 또는 표적 천연 기관이 아닌 공급원으로부터 공급될 수 있다.

[0128] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 생체활성 신장 세포 집단을 함유하는 제형으로 그를 필요로 하는 대상체에서 신장 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 치료 제형은 선택된 신장 세포 집단 또는 이의 혼합물을 함유한다. 모든 실시양태에서, 제형은 개선된 신장 기능을 필요로 하는 대상체

에게 투여하는데 적절하다.

- [0129] 또 다른 측면에서, 본 발명의 방법에 의한 대상체에서의 신장 질환의 효과적인 치료는 신장 기능의 다양한 지표를 통해 관찰될 수 있다. 한 실시양태에서, 신장 기능의 지표는, 비제한적으로, 혈청 알부민, 알부민 대 글로불린 비 (A/G 비), 혈청 인, 혈청 나트륨, 신장 크기 (초음파로 측정가능함), 혈청 칼슘, 인:칼슘 비, 혈청 칼륨, 단백뇨, 소변 크레아티닌, 혈청 크레아티닌, 혈액 질소 요소 (BUN), 콜레스테롤 수준, 트리글리세리드 수준 및 사구체 여과율 (GFR)을 포함한다. 또한, 일반적인 건강 및 안녕의 여러 지표는, 비제한적으로, 체중 증가 또는 감소, 생존, 혈압 (평균 전신 혈압, 확장기 혈압 또는 수축기 혈압), 및 신체 지구력 성능을 포함한다.
- [0130] 또 다른 측면에서, 신장 기능의 하나 이상의 지표의 안정화에 의해 생체활성 신장 세포 제형으로의 효과적인 치료가 증명된다. 신장 기능의 안정화는 본 발명의 방법으로 치료된 대상체에서의 지표의 변화를 본 발명의 방법으로 치료되지 않은 대상체에서의 동일한 지표에 비교하여 관찰함으로써 입증된다. 대안적으로, 신장 기능의 안정화는 본 발명의 방법으로 치료된 대상체에서의 지표의 변화를 치료 전의 동일한 대상체에서의 동일한 지표에 비교하여 관찰함으로써 입증될 수 있다. 제1 지표의 변화는 값의 증가 또는 감소일 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명이 제공하는 치료는 대상체에서의 혈액 요소 질소 (BUN) 수준의 안정화를 포함할 수 있고, 여기서 대상체에서 관찰된 BUN 수준은 본 발명의 방법으로 치료되지 않은 유사한 질환 상태의 대상체에 비교하여 더 낮다. 한 다른 실시양태에서, 치료는 대상체에서의 혈청 크레아티닌 수준의 안정화를 포함할 수 있고, 여기서 대상체에서 관찰된 혈청 크레아티닌 수준은 본 발명의 방법으로 치료되지 않은 유사한 질환 상태의 대상체에 비교하여 더 낮다. 한 실시양태에서, 신장 기능의 상기 지표 중 하나 이상의 안정화는 선택된 신장 세포 제형으로의 치료의 결과이다.
- [0131] 관련 분야의 통상의 기술자는 본원에서 기술되거나 또는 관련 분야에 공지된 하나 이상의 추가적인 지표가 대상체에서의 신장 질환의 효과적인 치료를 결정하기 위해 측정될 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0132] 또 다른 측면에서, 신장 기능의 하나 이상의 지표의 개선에 의해 생체활성 신장 세포 제형의 효과적인 치료가 증명된다. 한 실시양태에서, 생체활성 신장 세포 집단은 개선된 수준의 혈청 혈액 요소 질소 (BUN)를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 생체활성 신장 세포 집단은 혈청 내의 단백질의 개선된 잔류를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 생체활성 신장 세포 집단은 개선된 수준의 혈청 콜레스테롤 및/또는 트리글리세리드를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 생체활성 신장 세포 집단은 개선된 수준의 비타민 D를 제공한다. 한 실시양태에서, 생체활성 신장 세포 집단은 풍부화되지 않은 세포 집단에 비교하여 개선된 인:칼슘 비를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 생체활성 신장 세포 집단은 풍부화되지 않은 세포 집단에 비교하여 개선된 수준의 헤모글로빈을 제공한다. 추가 실시양태에서, 생체활성 신장 세포 집단은 풍부화되지 않은 세포 집단에 비교하여 개선된 수준의 혈청 크레아티닌을 제공한다. 한 실시양태에서, 신장 기능의 상기 지표 중 하나 이상의 개선은 선택된 신장 세포 제형으로의 치료의 결과이다.
- [0133] 또 다른 측면에서, 본 발명은 천연 신장의 재생을 필요로 하는 대상체에서 천연 신장을 재생하는 방법에서 사용하기 위한 제형을 제공한다. 한 실시양태에서, 이러한 방법은 본원에 기술된 생체활성 세포 집단, 혼합물 또는 구축물을 대상체에 투여 또는 이식하는 단계를 포함한다. 재생된 천연 신장은 천연 신장에서의 기능 또는 능력의 발달, 천연 신장에서의 기능 또는 능력의 개선, 및 천연 신장에서의 특정 마커의 발현을 비제한적으로 포함하는 다수의 지표에 의해 특성화될 수 있다. 한 실시양태에서, 발달 또는 개선된 기능 또는 능력은 상기 기술된 신장 기능의 다양한 지표를 기초로 관찰될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 재생된 신장은 하나 이상의 줄기 세포 마커의 차별적인 발현을 특징으로 한다. 줄기 세포 마커는 하기 중 하나 이상일 수 있다: SRY (성별 결정 영역 Y)-박스 2 (Sox2); 미분화 배아 세포 전사 인자 (UTF1); 마우스로부터의 결절 상동체 (NODAL); 프로미닌(Prominin) 1 (PROM1) 또는 CD133 (CD133); CD24; 및 이들의 임의의 조합물 (본원에 전문이 참조로 포함된 일라간 등의 PCT/US2011/036347을 참조한다). 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 마커(들)의 발현이 대조군에 비교하여 상향-조절된다.
- [0134] 분비 생성물
- [0135] 또 다른 실시양태에서, 세포 자체에 의해 및/또는 세포로부터 분비되는 생성물에 의해 효과가 제공될 수 있다. 재생 효과는 하기 중 하나 이상에 의해 특성화될 수 있다: 상피-중간엽 이행의 감소 (이는 TGF- $\beta$  신호전달의 약화를 통해서일 수 있다); 신장 섬유증의 감소; 신장 염증의 감소; 천연 신장에서의 줄기 세포 마커의 차별적인 발현; 이식된 세포 및/또는 천연 세포가 신장 손상, 예를 들어, 세뇨관 손상의 부위로 이동하는 것, 이식된 세포가 신장 손상, 예를 들어, 세뇨관 손상의 부위에서 생착되는 것; 신장 기능의 하나 이상의 지표 (상기 기술된 바와 같음)의 안정화; 적혈구 항상성의 복구 (본원에서 기술된 바와 같음); 및 이의 임의의 조합.

[0136] 조직 생검에 대한 대안으로서, 치료를 받고 있는 대상체에서의 재생성 결과를 채액, 예를 들어, 소변의 검사로부터 평가할 수 있다. 대상체에서 유래된 소변 공급원으로부터 수득된 미세세포가 본 발명의 세포 집단으로의 치료에 의해 영향을 받은 신장 세포 집단으로부터 궁극적으로 유래되는 특이적인 단백질 및 miRNA를 비제한적으로 포함하는 특정 성분을 함유한다는 것이 발견되었다. 이러한 성분들은 줄기 세포 복제 및 분화, 아팍토시스, 염증 및 면역조절에서 수반되는 인자를 포함할 수 있다. 미세세포-연관 miRNA/단백질 발현 패턴의 시간적 분석은 본 발명의 세포 집단, 혼합물 또는 구축물이 제공된 대상체의 신장 내에서의 재생성 결과의 지속적인 모니터링을 허용한다.

[0137] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 신장 질환 (KD) 환자가 치료 제형으로의 처치에 반응성인지 여부를 평가하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 치료제로 처치된 KD 환자로부터 수득된 테스트 샘플 내의 소포 또는 이의 관강내 내용물의 양을 대조군 샘플 내의 소포의 양에 비교하여 또는 이에 대해 상대적으로 결정 또는 검출하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 대조군 샘플 내의 소포 또는 이의 관강내 내용물의 양에 비교하여 더 높거나 또는 더 낮은 양의 테스트 샘플 내의 소포 또는 이의 관강내 내용물은 처치된 환자의 치료제로의 처치에 대한 반응성을 지시한다.

[0138] 이러한 신장-유래 소포 및/또는 신장 유래 세포의 관강내 내용물은 대상체의 소변 내로 박리될 수도 있고, 재생성 결과 또는 치료 효능을 지시하는 바이오마커에 대해 분석될 수 있다. 비-침습성 예후 방법은 본원에 기술된 세포 집단, 혼합물 또는 구축물의 투여 또는 이식 전 및/또는 후에 대상체로부터 소변 샘플을 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 원치 않는 잔해물을 제거하기 위한 원심 분리를 비제한적으로 포함하는 표준 기술을 사용하여 소포 및 기타 분비 생성물을 소변 샘플로부터 분리할 수 있다 (각각 전문이 본원에 참조로 포함된, 문헌 [Zhou et al. 2008. Kidney Int. 74(5):613-621]; 스코그(Skog) 등의 미국 특허 출원 공개 번호 20110053157).

[0139] **투여 방법 및 경로**

[0140] 본 발명의 생체활성 세포 제형은 단독으로 또는 다른 생체활성 성분과 조합되어 투여될 수 있다. 제형은 혼입된 조직 조작 요소를 고휘 기관의 내부에 주사 또는 이식하여 조직을 재생시키는데 적절하다. 추가적으로, 제형은 조직 조작 요소를 중공 기관의 벽에 주사 또는 이식하여 조직을 재생시키는데 사용된다.

[0141] 한 측면에서, 본 발명은 그를 필요로 하는 대상체에게 본원에 기술된 생체활성 세포 제형을 제공하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 생체활성 세포의 공급원은 자가 또는 동종이형, 동계 (자가유전자형 또는 동형유전자형), 및 이의 임의의 조합일 수 있다. 공급원이 자가가 아닌 경우, 이러한 방법은 면역억제제의 투여를 포함할 수 있다. (예를 들어 미국 특허 번호 7,563,822를 참조한다).

[0142] 본 발명의 치료 방법은 본원에 기술된 생체활성 세포 제형의 전달을 수반한다. 한 실시양태에서, 의도되는 이점의 부위로 세포를 직접 투여하는 것이 바람직하다. 그를 필요로 하는 대상체는 하나 이상의 풍부화 신장 세포 집단, 및/또는 이를 함유하는 혼합물 또는 구축물로부터 분비된 생성물이 함께 있는 본원에 기술된 생체활성 세포 제형과 천연 신장의 생체내 접촉에 의해 치료될 수도 있다. 생체내 접촉 단계는 천연 신장에 재생 효과를 제공한다.

[0143] 선택된 신장 세포의 조성물을 대상체에게 투여하기 위한 다양한 수단은, 본 명세서의 관점에서, 관련 분야의 통상의 기술자에게 명확할 것이다. 이같은 방법은 대상체 내의 표적 부위 내로 세포를 주사하는 것을 포함한다.

[0144] **전달 비히클**

[0145] 대상체 내로의 주사 또는 이식에 의한 도입을 촉진하는 전달 장치 또는 비히클 내로 세포 및/또는 분비 생성물이 삽입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 전달 비히클은 천연 물질을 포함할 수 있다. 특정한 다른 실시양태에서, 전달 비히클은 합성 물질을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 전달 비히클은 기관의 구조를 모방하거나 또는 이에 적합하게 맞는 구조물을 제공한다. 다른 실시양태에서, 전달 비히클은 성질 면에서 유체와 유사하다. 이같은 전달 장치는 세포 및 유체를 수용자 대상체의 신체 내로 주사하기 위한 튜브, 예를 들어, 카테터를 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 튜브에는 추가적으로 바늘, 예를 들어, 주사기가 있고, 이를 통해 본 발명의 세포가 원하는 위치에서 대상체 내로 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유동물 신장-유래 세포 집단이 카테터를 통한 혈관 내로의 투여용으로 제형화된다 (용어 "카테터"는 물질을 혈관에 전달하기 위한 다양한 튜브-유사 시스템 중 임의의 것을 포함하도록 의도된다). 대안적으로, 세포는 방직물, 예컨대 직물, 니트, 브레이드, 메쉬, 및 부직포, 천공 필름, 스폰지 및 발포체, 및 비드, 예컨대 고체 또는 다공성 비드, 마이크로입자, 나노입자 등 (예를 들어, 컬티스피어(Cultispher)-S 젤라틴 비드 - 시그마(Sigma))을 포함하지만 이에 제한되지 않는 생체재료 또는 스케폴드 내에 또는 이의 상부에 삽입될 수 있다. 다양한 상이한 형태의 전달

용으로 세포가 제조될 수 있다. 예를 들어, 용액 또는 겔에 세포가 현탁될 수 있다. 본 발명의 세포가 여전히 생존성인 제약상 허용되는 담체 또는 희석제와 세포가 혼합될 수 있다. 제약상 허용되는 담체 및 희석제는 염수, 수성 완충제 용액, 용매 및/또는 분산 매질을 포함한다. 이같은 담체 및 희석제의 사용은 관련 분야에 널리 공지되어 있다. 용액은 바람직하게는 무균성이고 유체이며, 종종 등장성일 것이다. 바람직하게는, 용액은 제작 및 보관 조건 하에 안정적이고, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등을 사용하는 것을 통해, 미생물 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존된다. 관련 분야의 통상의 기술자는 본 발명의 세포 집단 및 이의 혼합물의 전달에 사용되는 전달 비히클이 상기 언급된 특징들의 조합을 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0146] 투여 양식

[0147] 제형의 투여 양식은 전신, 신장내 (예를 들어, 실질), 정맥내 또는 동맥내 주사, 및 의도되는 활성 부위의 조직 내로 직접적으로 주사하는 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따라 사용될 추가적인 투여 양식은 직접적인 개복술, 직접적인 복강경검사, 경복막 또는 경피의 단일 또는 다중 주사(들)를 포함한다. 본 발명에 따라 사용될 또 다른 추가적인 투여 양식은, 예를 들어, 역행 및 요관신우 주입을 포함한다. 외과적 투여 수단은 부분적 신장절제 및 구축물 이식, 부분적 신장절제, 부분적 신우절제, 그물막 ± 복막으로의 혈관화, 다 병소 생검 바늘 경로, 원뿔 또는 피라미드형 내지 실린더형, 및 신장극-유사 교체와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 1-단계 절차, 뿐만 아니라 재이식을 위한 기관모양-내부 바이오리액터를 예를 들어 포함하는 2-단계 절차를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 혼합물을 함유하는 제형들은 동일한 시간에 동일한 경로를 통해 전달된다. 또 다른 실시양태에서, 제어된 혼합물을 포함하는 각각의 세포 조성물이, 동시에 또는 시간-제어 방식으로, 본원에 기술된 방법 중 하나 이상에 의해, 따로따로 특정 장소에 또는 특정 방법을 통해 전달된다. 한 실시양태에서, 선택된 신장 세포는 신장의 신장 피질 내로 경피 주사된다. 또 다른 실시양태에서, 조성물을 신장 내로 주사하기 전에 신장 피막을 천공시키기 위해 가이드 캐놀러가 경피로 삽입되어 사용된다.

[0148] 제형화된 BRC 또는 SRC 집단의 주사에 대해 신장을 평가하기 위해 복강경 또는 경피 기술을 사용할 수 있다. 복강경 수술 기술의 사용은 신장의 직접적인 가시화를 허용하여, 임의의 출혈 또는 기타 유해 사례가 주사 동안 검출될 수 있고, 즉각적으로 다루질 수 있다. 신장에 대한 경피 접근법을 사용하는 것은, 주로 신장내 종괴를 제거하기 위해, 십년에 걸쳐 사용되어 왔다. 이러한 절차는 전극 또는 저온 바늘을 신장 내의 소정의 종괴 내로 삽입하고, (전형적으로) 10 내지 20분 동안 계속 접촉시키는 동안 병변이 제거된다. 치료 제형의 주사를 위해, 경피 기구 조작은 더 크거나 더 복잡하지 않고, 이러한 접근법은 무수술 (복부 천공 상처 및 가스 팽창을 방지함) 및 최소 고정 시간의 안전성 장점을 제공한다. 또한, 유의한 출혈의 임의의 가능성을 추가로 감소시키도록, 접근 경로가 지혈성 생체분해성 재료를 제자리에 남겨둘 수 있다.

[0149] 주사에 의한 전달의 한 실시양태에 따르면, 치료용 생체활성 세포 제형은 신장 피질 내로 주사된다. 치료 제형을 신장 피질 내에 가능한 한 넓게 분포시키는 것이 중요하고, 이는, 예를 들어, 치료 제형이 실현가능한 한 넓게 분포되어 신장 피질 내에 침착되는 것을 허용하는 각도로 신장 피질에 진입시킴으로서 달성될 수 있다. 이는 개별적인 환자의 특성에 따라, 축방향 전산화 단층촬영 (CT)으로 또는 초음파 가이드를 사용하여 세로 또는 가로 접근법으로 신장을 영상화하는 것을 필요로 할 수 있다. 이상적으로는, 주사 바늘/캐놀러를 점진적으로 인출함에 따라 주사는 다중 침착을 수반할 것이다. 전체 부피의 치료 제형이 단일 또는 다중 진입점에서 침착될 것이다. 한 실시양태에서, 2개까지의 진입점이 전체 부피의 치료 제형을 신장 내로 침착시키는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 주사는 하나 이상의 진입점, 예를 들어 1개 또는 2개의 진입점을 사용하여 단일 신장에 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 주사는 각각의 신장 내에서 하나 이상의 진입점, 예를 들어 1개 또는 2개의 진입점을 사용하여 양쪽 신장 내로 이루어진다.

[0150] 치료 요법

[0151] 용량 선택

[0152] 인간에서의 적합한 세포 이식 투여량은 세포 활성화에 관련된 기존의 정보로부터 결정될 수 있거나, 또는 전임상 연구에서 수행된 용량 연구로부터 외삽될 수 있다. 광범위한 용량 (주사된 신장 조직의 그램 당 3백만-1500만 개의 세포), 및 치료 후의 연장 기간 (최대 1년)을 사용하여 수행된 다중 동물 연구에서 신장 기능부진 및 질환의 상이한 모델들에서의 신장 결과에 양성적으로 영향을 미치는 NKA의 능력이 입증되었다. 시험관내 배양 및 생체내 동물 실험으로부터, 세포의 양을 정량하고, 이식 물질의 적합한 투여량을 계산하는데 사용할 수 있다. 추가적으로, 추가적인 이식이 이루어질 수 있는지 또는 이식 물질이 이에 따라 감소될 수 있는지를 결정하기 위해 환자를 모니터링할 수 있다.

[0153] 한 실시양태에서, NKA는 무균성 1회용 10 mL 주사기 내에서 제시된다. 최종 부피는  $100 \times 10^6$  개의 SRC/mL의 NKA 농도 및  $3.0 \times 10^6$  개의 SRC/g 신장 중량 (MRI로 추정됨)의 표적 용량으로부터 계산된다. 문헌에 기술된 바와 같이, 상이한 방법들에 의해 수득된 mL 단위의 신장의 부피 측정치는 신장주위 지방이 정리된 단리된 기관을 측정함으로써 수득된 그램 단위의 건조 중량 측정치의 약 92 - 97%이다. 따라서, 보수적 추정으로, NKA의 용량은  $1 \text{ g} = 1 \text{ mL}$ 의 전환을 사용하여 계산될 것이다. 이러한 비를 사용하는 것은 가장 안전한 접근법을 나타내는데, 환자가 동물 연구에서의 상응하는 용량보다 높은 용량을 받지 않을 것임을 보장하기 때문이다. 투여량은 환자의 신장 중량을 기초로 주사 시점에 외과의에 의해 결정될 것이다. 임의의 환자에 대한 최대 부피는 8.0 mL일 것이다; 즉, 임의의 대상체에 계산 중량  $\geq 259 \text{ g}$ 의 왼쪽 신장이 있으면, 이러한 대상체는 8 mL의 NKA를 받을 것이다.

[0154] 치료 횟수

[0155] 확장된 신장 세포는 세포 확장에서의 환자-의존적 변동을 수용하기 위해 세포 확장 동안 냉동보존될 수 있다. 냉동보존된 신장 세포는 재주사를 위해 다중 용량의 생체활성 세포 제형을 제작하기 위해, 그리고 또 다른 치료가 요구되는 경우 (예를 들어, 환자 질병으로 인한 지연, 예측되지 않은 공정 이벤트 등)에 지속적인 세포 공급원을 제공한다.

[0156] 한 실시양태에서, BRC 또는 SRC는 단일 치료로서 하나의 신장 내로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, BRC 또는 SRC는 단일 치료로서 양쪽 신장 내로의 주사로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, BRC 또는 SRC는 반복 또는 다중 주사로서 하나 또는 양쪽 모두의 신장 내로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 1차 및 2차 주사는 적어도 3개월 간격, 적어도 6개월 간격, 또는 적어도 1년 간격으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, BRC 또는 SRC는 2회를 초과하는 주사에 걸쳐 투여된다.

[0157] 하기 실시예는 설명적 목적으로만 제공되고, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0158] 실시예

[0159] 실시예 1 - 만성 신장 질환에 걸린 환자에서의 자가 네오-키드니 오그먼트 (NKA)의 1상 개방-표지 안전성 및 전달 최적화 연구 (TNG-CL010)

[0160] 인간에서의 최초 (FIH) 임상 시험이 스웨덴 스톡홀름의 카롤린스카 유니버시티 호스피탈 후딩에(Karolinska University Hospital Huddinge) 및 유니버시티 오브 노스 캐롤라이나(University of North Carolina)에서 시작되었다. 이러한 시험은 CKD에 걸린 환자 내로 주사된 NKA의 1상, 개방-표지, 안전성 및 주사 최적화 연구였다. NKA를 환자의 생검으로부터 수득된 SRC로부터 제작하고, 젤라틴 생체재료와 함께 제형화하였으며, 다시 환자의 왼쪽 신장 내로 주사하였다. 연구의 1차 목표는 주사 후 12개월에 걸쳐 절차 및/또는 제품 관련 유해 사례(AE)에 의해 측정된 바와 같은, 수용자 신장의 한 부위에서 주사된 NKA의 안전성 및 최적 주사를 평가하는 것이었다. 연구의 2차 목표는 실험실 평가로 측정된 바와 같은 주사 후 12개월 기간에 걸친 신장 기능의 변화를 평가하는 것이었다. 각각의 환자의 기준선 질환 진행률을 대조군으로서 사용하여, 주사 후의 질환 진행률의 유해한 변화를 모니터링하였다.

[0161] 물질 및 방법 치료 프로토콜

[0162] 환자

[0163] 스웨덴 스톡홀름의 카롤린스카 유니버시티 호스피탈의 신장외과 (n=6) 및 미국 체플힐의 유니버시티 오브 노스 캐롤라이나의 신장외과 (n=1)의 7명의 성인 2형 당뇨병 CKD 3-4기 환자가 연구에 동원되었다. 연구는 스톡홀름 및 체플힐의 지역 윤리 위원회에 의해 승인되었고, 헬싱키 선언의 법령을 준수하였다. 모든 환자는 서면 참가 동의서를 제공하였다.

[0164] 간략하게, GFR이 15-50 ml/분이고, 임상 경과가 당뇨병성 신장병증과 양립성이며, ACEi/ARB 치료가 진행중이고, 신장 크기가  $>10 \text{ cm}$ 인 (피질 두께가  $>5 \text{ mm}$ ) 성인 (53-70세) 2형 당뇨병 환자가 포함하는데 적격이었다. 적격성 기준을 만족시키고 사전 동의서에 서명한 환자가 전체 신체 검사, 심전도 및 실험실 평가 (혈액학, 혈청 화학 및 요분석)를 포함하는 스크리닝 단계에 들어갔다. 추가적으로, MRI를 수행하여 신장 부피 및 피질 두께를 평가하였다. 신장 섬광조영술을 수행하여 분할 신장 기능을 평가하였다. 적격성 환자에 표준 임상 절차에 따른 신장 생검을 진행하여 (2개의 코어), 이식용 세포를 수득하였다. 연구 프로토콜이 도 1에서 도시된

다.

[0165] 네오-키드니 오그먼트 (NKA)의 제조

[0166] 간략하게, 생검물을 4.0 유닛/mL 디스파제 (스텝 셀 테크놀로지스 인크(Stem Cell Technologies, Inc.), 캐나다 브리티시 컬럼비아주 밴쿠버) 및 300 유닛/mL 콜라게나제 IV (워싱턴 바이오케미컬(Worthington Biochemical), 미국 뉴저지주레이크우드)를 함유하는 완충제에서 효소에 의해 해리시켰다. 적혈구 및 잔해물을 15% 아이오딧사놀 (옵티프렘®, 액시스-셀드, 미국 매사추세츠주 노턴)을 통해 원심분리에 의해 제거하였다. 1차 신장 세포를 조직 배양물 처리 폴리스티렌 플레이트 (눈크(NUNC), 미국 뉴욕주 록체스터) 상에 시딩하고, 5% 소 태아 혈청 (FBS), 1X ITS (인슐린/트랜스페린/아셀렌산나트륨 배지 보충물), 및 항생제/항진균제를 함유하는, 고-글루코스 들베코 변형 이글 배지 (DMEM) : 각질세포 무혈청 배지 (KSFМ)의 1:1 혼합물인 50:50 배지에서 배양하였다 (모두 미국 캘리포니아주 칼스바드의 인비트로젠(Invitrogen)으로부터의 것임). 배양 후 세포 분리 전에, 세포 분리 효율을 개선시키도록 24시간 동안 1차 신장 세포 배양물을 대기 산소 조건 (21%)에서 더욱 생리학적으로 관련된 저산소 (2%) 환경으로 옮겼다. 2 mL 미보충 KSFМ (uKSFМ) 내의  $75 \times 10^6$  개의 세포로 제조된 1차 신장 세포 배양물의 분리를 15 mL 원뿔형 폴리프로필렌 튜브 내의 설치류용으로 특정하게 증상화된 4-단계 아이오딧사놀 (옵티프렘; uKSFМ 내의 60% w/v) 밀도 구배 (16%, 13%, 11%, 및 7%)를 통해 원심분리에 의해 수행하고, 800g로 20분 동안 실온에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 모든 밴드를 사용 전에 무균성 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 3회 세정하였다.

[0167] 밀도 구배 원심분리 단계로부터 약 1.0419 g/mL를 초과하는 부력 밀도를 나타내는 생체활성 신장 세포를 조합하는 것으로 치료적으로 생체활성인 SRC가 생산되었다. 환자 생검으로부터의 선택된 신장 세포의 제조가, 예를 들어, 문헌 [Kelley et al., Am J Physiol Renal Physiol 2010; 299: F1026-39], [Kelley et al., Cell Transplant 2013; 22:1023-39], [Bruce et al., Methods Mol Biol. 2013; 1001:53-64] 및 [Basu et al., Cell Transplant. 2011; 20:1171-901]에 또한 기술되어 있다. 세포 현탁액 (100  $\mu$ l)을 젤라틴-기반 히드로겔 생체 재료와 혼합된 10 cc 주사기 내로 로딩하여, NKA 제품을 제형화하였다.

[0168] 각각의 배양 계대에, 그리고 NKA 제형화 동안 세포 생존성을 측정한다 (트립판 블루 배제). 기존에 기술된 바와 같이 최종 NKA 제품에서 세포 표현형 및 효능의 분석을 수행하였다 (Basu and Ludlow. Regen Med 2014; 9:497-512). 모든 절차는 FDA 및 MPA QP의 지침 하에 현행 우수 의약품 제조 기준 (cGMP)에 따라 수행된다.

[0169] 이식 절차

[0170] 스웨덴 사례 (환자 # 1-6)에서, 파넨스틸(Pfannenstiel) 절개를 만들고, 손-보조 장치를 상처 내에 놓았다 (젤 포트(Gelport)©, 어플라이드 메디컬 리소시즈 코퍼레이션(Applied Medical Resources Corporation)). 무딘 수동 박리에 의해 복막 안쪽으로 이동시키면, 복막뒤 공간이 생성되었다 (Wadstroem J.. Transplantation. 2005; 80:1060-8). 왼쪽 신장의 제로타 근막의 내측-전방 부분을 개방하여 신장 주위의 지방 조직을 노출시켰고, 이는 모든 사례에서 풍부하였다. 지방 조직을 제거하여, 신장 피막, 본질적으로는 내측 및 외측 측면 모두, 뿐만 아니라 신장의 거의 모든 볼록/외측 부분을 노출시켰다. 광범위한 박리는 신장을 주사 바늘과 일직선이 되게 위치시키는 것과 주사된 물질의 임의의 관통 또는 누출이 있었는지를 가시화하는 것을 허용하였다. 왼쪽 장골와로부터, 하부 극에서 신장 피막을 천공하도록 가이드 캐놀러를 경피로 삽입하였다. 그 후 18G 바늘을 가이드 캐놀러를 통해 신장의 볼록 세로축을 따라 신장 피질 내로 삽입하였다. 2 mL의 NKA를 10-15분 기간에 걸쳐 피막의 구멍으로부터 4, 3, 2 및 1 cm에서 침착시켰다 (총 8 mL). 바늘을 5분 동안 제자리에서 유지시켜, 지혈을 촉진하였다. 임의의 절차에서 천공 구멍의 뒤쪽으로부터 수술에 의한 출혈이 보이지 않았고, 최소량의 NKA (<1mL)만 보였다. 상처는 배액되지 않았고, 연속적인 봉합사로 복벽을 닫았다. 미국 환자 (#7)는 왼쪽 신장 피질에서 로봇-보조 복강경 신장 세포 이식을 받았다. NKA 투약은 추정 신장 중량에 의해 결정되었다 (임의의 환자에 대한 최대 부피는 8 mL였고, 이러한 부피가 모든 대상체에게 제공되었다).

[0171] MR 영상화

[0172] MRI를 이식 전 (<30일) 및 3 및 6개월 후에 1.5-T MR 유닛 (지멘스 마그네톰 아에라(Siemens Magnetom Aera), 지멘스 아에게(Siemens AEG), 독일 에를랑겐)를 사용하여 수행하였다. 4 mm 두께 축 T2Haste 영상을 사용하여 신장의 상부 극의 등쪽 부분에서 피질 두께를 측정하였다. 지방 포화 없이 획득된 숨참기 2.5 mm 두께 VIBE 영상의 데이터셋을 사용하여 수동 분할에 의해 신장 부피를 정량하였다.

[0173] 신장 섬광조영술

[0174] 50MBq 99mTc-DMSA (CIS 바이오 인터내셔널(CIS bio international), 프랑스 지프 쉬르 이베트 설텍스)의 정맥 내 주사 3시간 후에 누운 자세로 신장 기능을 평가하였다. 저에너지 고해상도 콜리메이터, 256x256 매트릭스가 장착된 이중 헤드 감마 카메라 (심비아(Symbia) T16 SPECT/CT, 지멘스, 독일 에틀랑겐)를 사용한 20분의 사전 설정 시간으로의 전방 및 후방 획득. 양쪽 영상으로부터 계산된 기하 평균과 함께 전체 신장을 포함하는 관심 영역 도면을 사용하여 차별적 신장 기능을 평가하였다.

[0175] 생화학적 및 기타 분석

[0176] 고-민감도 C-반응성 단백질 (hsCRP), 크레아티닌, 시스타틴 C, 아이오핵솔 클리어런스, 헤모글로빈, 알부민, Ca, PO<sub>4</sub>, 및 알부민-크레아티닌 비 (ACR)의 분석을 스웨덴 스톡홀름의 카롤린스카 유니버시티 호스피탈 및 미국 노스캐롤라이나 채플힐의 공인 임상 실험실에서 검증된 일상적인 방법으로 수행하였다.

[0177] 통계 분석

[0178] 데이터는 평균±SEM으로 표현되었다. 통계적 유의성은 p<0.05의 수준으로 설정되었다.

[0179] **결과**

[0180] 추정 사구체 여과율 (eGFR)

[0181] NKA를 주사한 환자의 코호트는 이들의 신장 질환의 진행의 주사-전 평가를 받았고, 5-10 ml/분/1.73m<sup>2</sup>의 eGFR의 험멜간(Hemmelgarn) 중등도 군 하락과 일관되었다 (예를 들어 문헌 [Hemmelgarn et al., Kid Intern; 2006]을 참조하고, 이는 평균 eGFR의 변화율을 기초로 지역사회-거주 노인 환자를 5개의 군으로 분할하는 것을 나타낸다).

[0182] 이러한 환자 코호트로부터의 주사-전 정보는 이들의 평균 eGFR 하락이 6.1 ml/분/년이었음을 나타내었다 (도 2). NKA 투여 후, 7명의 환자 (스웨덴 연구로부터의 환자 6명 및 미국 연구로부터의 환자 1명)의 조합된 군에 대한 eGFR 하락은 -3.1 ml/분/년이었다 (도 2). 코호트에서의 eGFR에 대한 평균 주사-후 하락률은 녹색선으로 제시되고, 음영진 청색 면적은 연간 하락이 5-10 ml/분/년인 중등도로 중증인 CKD 3b/4의 지역사회-거주 노인 환자의 험멜간 군에 대한 eGFR의 범위를 나타낸다 (도 2에서 음영 면적).

[0183] 환자의 개별적인 주사-전 하락과 함께 개별적인 환자의 NKA 주사-후에 대한 eGFR 변화는 환자가 연구 중이었던 기간에 걸쳐 7명 중 6명의 환자에 eGFR의 하락률의 감소가 있었음을 입증하였다 (도 3). 각각의 환자에 대한 주사 전 및 후의 연간 eGFR 하락률이 표 4에서 제시된다.

[0184] <표 4>

[0185] 환자에 의한 추정 사구체 여과율의 변화

환자 #	eGFR 변화 (mL/분/년)	
	NKA-전	NKA-후
환자 1	-14.8	1.5
환자 2	-0.2	-1.3
환자 3	-6.7	-5.9
환자 4	-16.3	-7.5
환자 5	-3.9	-2.6
환자 6	-11.4	-5.9
환자 7	-7.7	1.4

[0186]

[0187] 요약하면, 7명 중 6명의 환자에서 NKA 주사 후 eGFR 하락률 (경사)의 감소가 있었다. NKA 코호트에 대한 주사 전 eGFR 하락률은 햄멜간의 지역사회-거주 노인 환자 연구와 일관된 6.1 ml/분/년이었다.

[0188] 환자 #2는 하락률이 주사-전 기간 동안 관찰된 것과 계속 대략적으로 동일하였다. 이러한 환자에서의 NKA 주사 전의 짧은 eGFR 샘플링 기간에 걸쳐, 그의 eGFR 측정치는 ±3 ml/분/1.73 m<sup>2</sup>의 범위에 걸쳐 변했다. 이러한 환자의 eGFR을 7명의 환자의 전체 코호트에 비교했을 때, 그의 eGFR 변화는 연구 코호트 내의 다른 이들과 유사한 주사-후 패턴을 따랐다 (도 4). 추가적으로, 이러한 환자의 혈청 크레아티닌 증가가 약화되었고, 이는 CKD 진행의 잠재적인 안정화를 시사한다 (하기의 sCr에 대한 섹션을 참조한다).

[0189] CKD 3b/4의 노인 당뇨병 투석-전 환자의 소형 코호트에서 단일 신장에 주사되었을 때의 NKA의 효과를 평가하기 위해, 준-치료적일 것으로 간주되는 NKA 용량을 사용하여 NKA의 I상 임상 시험을 수행하였다. 공격적 만성 신장 질환의 당뇨병 동물 모델에서, 동물이 양쪽 신장에서 치료되었을 때 말기 신장 질환으로부터 사망을 지연시키는 최적의 결과가 수득되었다. 안전성을 위해, NKA의 1차 임상 연구에서는, 1개의 신장에만 NKA를 주사하였고, 따라서 치료 신호가 필연적으로 예상되지 않았다. 그러나, ~1년 동안 이러한 환자 코호트에서 CKD 진행을 모니터링한 후, 이러한 코호트에 대해 예상된 신장 기능의 하락이 단일 신장 (왼쪽) 내로의 NKA의 단일 주사에 의해 변형되었다. 주사 전 및 후의 신장 기능의 하락률을 비교했을 때, NKA가 주사된 환자는 1.5년에 걸쳐 투석이 귀속 지연되었다 (도 5).

[0190] *혈청 크레아티닌 (sCr)*

[0191] 주사 전의 환자 코호트에 대한 혈청 크레아티닌 수준은 중등도 CKD의 당뇨병 환자에서 예상될 것과 일관되는 일반적인 증가를 나타냈다 (적색선). 환자 코호트에 대한 sCr의 전반적인 주사-전 증가는 >100 μmole/L/년이었다. 주사 후에, 환자 코호트의 증가는 <50 μmole/L/년이었다 (녹색선). 주사 전 및 후의 전반적인 sCr 경향이 도 6에서 제시된다. 환자의 개별적인 주사-전 하락과 함께 NKA 주사 후의 개별적인 환자 혈청 크레아티닌 변화 (녹색)가 도 7에서 제시된다. 각각의 환자에 대한 NKA 주사 전 및 후의 혈청 크레아티닌의 연간 증가율이 표 5에서 제시된다.

[0192] <표 5>

[0193] 환자에 의한 혈청 크레아티닌의 변화

환자 #	sCr 변화 (μM/L/년)	
	NKA-전	NKA-후
환자 1	153	-41
환자 2	17	-21
환자 3	214	200
환자 4	16	-39
환자 5	69	23
환자 6	216	95
환자 7	48	-40

[0194]

[0195] 요약하면, NKA 주사 후, 모든 환자에서 주사-전 기간에 관찰된 sCr 증가율에 비교하여 이들의 개별적인 sCr 증가율의 감소가 있었다. 이러한 변화는 각각의 환자에 대해 일관적이었고, NKA 주사-후 기간에 eGFR에 대해 관찰된 효과를 지지한다.

[0196] 실시예 2 - 2형 당뇨병 및 만성 신장 질환에 걸린 환자에서의 자가 네오-키드니 오그멘트 (NKA)의 II상 개방-표지 안전성 및 효능 연구 (RMCL-001)

- [0197] **치료 제품:**
- [0198] 실시예 1에 기술된 바와 같이 환자의 신장 생검으로부터 수득된 확장된 자가의 선택된 신장 세포 집단 (SRC)으로부터 NKA를 제조한다. NKA를 제작하기 위해, 각각의 등록 환자로부터의 신장 생검 조직을 노스캐롤라이나주 윈스턴 살렘의 트윈 시티 바이오 엘엘씨(Twin City Bio, LLC)로 보낼 것이고, 여기에서 신장 세포가 확장되고 SRC가 선택될 것이다. SRC가 젤라틴-기반 히드로겔에  $100 \times 10^6$  개의 세포/mL의 농도로 제형화되고, 10 mL 주사기에 포장되고, 사용을 위해 임상 장소로 운송될 것이다 (실시예 1 참조).
- [0199] **연구 목표:**
- [0200] 1차 목표: 연구의 1차 목표는 1개의 수용자 신장에 주사된 NKA의 안전성 및 효능을 평가하고, 2회의 NKA 주사가 신장 기능의 안정화를 제공하는지를 결정하는 것이다.
- [0201] • 1차 안전성 결과 척도: 최초 NKA 주사 후 12개월에 걸친 절차 및/또는 제품 관련 유해 사례 (AE).
- [0202] • 1차 효능 결과 척도: 2차 세포 주사 후 6개월에 걸친 일련의 혈청 크레아티닌 측정 및 GFR 추정
- [0203] 2차 목표: 연구의 2차 목표는 환자의 1차 NKA 주사 후 12개월 기간에 걸쳐 신장-특이적 유해 사례를 평가함으로써 NKA 투여의 안전성 및 허용성을 평가하는 것이다.
- [0204] • 2차 안전성 및 허용성 결과 척도: 1차 또는 2차 여부와 관계 없이 이러한 프로토콜 하에서의 마지막 NKA 주사 후 12개월 동안의 신장-특이적 실험실 평가.
- [0205] 탐구 목표: 연구의 탐구 목표는 최초의 NKA 주사 후 12개월 기간에 걸쳐 신장 기능에 대한 NKA의 영향을 평가하도록 디자인된다.
- [0206] • 탐구 결과 척도: 신장 질환의 진행률의 변화를 평가하기 위한 신장 구조 및 기능 (eGFR, 혈청 크레아티닌, 및 단백뇨를 포함함)의 임상 진단적 및 실험실 평가; 및 이러한 파라미터들에 대한 주사 방법의 효과.
- [0207] • 탐구적 삶의 질 결과 척도는 기준선 및 환자의 1차 NKA 주사 후 1, 3, 6, 7, 9, 12, 15, 18, 30, 및 42개월에 수득된 신장 질환 삶의 질 조사일 것이다.
- [0208] **연구 디자인:**
- [0209] 다기관, 전향적, 개방-표지, 단일군 연구. 모든 등록된 대상체는 적어도 6개월 간격의 NKA의 2회 이하의 주사로 처리될 것이다.
- [0210] **무작위화:**
- [0211] 개방-표지, 무작위화되지 않음.
- [0212] **대조군:**
- [0213] 각각의 대상체가 자기 자신의 대조군으로서의 역할을 할 것이다; 신장 기능의 최소 6개월 기간의 관찰을 포함하여야 하는 환자의 이전 병력이 신장 기능부전의 진행률의 비교물로서의 역할을 할 것이다.
- [0214] **샘플 사이즈:**
- [0215] 30명 이하의 대상체에게 NKA가 주사될 것이다. 이는 II상 안전성 및 효능 연구이기 때문에, 로버스트(robust)한 통계 분석이 수행되지 않을 것이다. 따라서, 이러한 연구에 제안된 샘플 크기는 제한된 집단에서의 안전성 결과 및 초기 효능의 확인을 허용하는, II상 연구에서의 적극적 치료군에 대해 전형적인 크기이다.
- [0216] **연구 집단:**
- [0217] eGFR이 20 내지 50 mL/분/1.73 m<sup>2</sup>인, 2형 당뇨병 및 CKD에 걸린 30 내지 70세의 남성 또는 여성 환자. 등록 환자는 환자의 개별적인 CKD 질환 진행률을 결정하기 위한 충분한 임상 이력 데이터가 있어야 한다.
- [0218] 포함 기준: 달리 언급되지 않는 한, 스크리닝 시 및 주사 전에 포함 기준이 충족되어야 한다.
- [0219] 1. 사전 동의일에 30 내지 70세인 남성 및 여성 대상체.
- [0220] 2. 2형 당뇨병 (T2DM)에 걸린 환자.

- [0221] 3. 환자의 신장 질환의 기저 원인으로서는 당뇨병성 신장병증의 진단이 잘 확립되어 있는 환자.
- [0222] 4. 스크리닝 시, 20 - 50 mL/분/1.73 m<sup>2</sup> (경계 포함)의 GFR로서 정의되는 CKD에 걸린, NKA가 기존에 주사되지 않은 환자. eGFR이 15 내지 60 mL/분인, 기존에 단일 NKA 주사로 처치된 환자 또한 이러한 임상 시험에 등록할 수 있다.
- [0223] 5. 대안적인 진단으로 설명될 수 없는 미세알부민뇨. 미세알부민뇨는 24시간 소변 수집에서의 소변 알부민 배설  $\geq 30$  mg/일 또는 소변 알부민-크레아티닌 비 (UACR)  $\geq 30$  mg/g으로서 정의된다.
- [0224] 6. 생검 전에, 수축기 혈압 105 내지 140 mmHg (경계 포함) 및 확장기 혈압  $\leq 90$  mmHg.
- [0225] 7. 등록하기 적어도 8주 전에 시작된, ACEI 또는 ARB로의 진행 중이고 안정적인 치료. 주사 직전에 6주 동안 치료가 안정적이어야 한다. 안정적인 치료는 주사 직전의 6주 기간에 걸친 현재 투여량의  $\frac{1}{2}$  이상 및 현재 투여량의  $2\times$  이하로의 용량 조정으로서 정의된다; 의학적 필요성으로 인한 7일 이하의 용량 중단은 허용된다. 환자의 BP가 허용가능한 한계 내에서 안정적인 한, ACEI 또는 ARB에 허용성이 없는 환자가 포함될 수 있다.
- [0226] 8. CKD 진행률을 정의하기 위한, 적어도 3개월 간격 (스크리닝 이전) 및 이전 12개월 이내의 최소 2회의 eGFR 또는 sCr 측정. 환자는 (충분한 데이터가 이용가능하다는 것을 보장하기 위해) 메디컬 모니터(Medical Monitor)와의 협의에 따라 결정된 바와 같은 CKD 진행률의 합리적인 추정을 제공하기 위한 충분한 이력 데이터가 있어야 한다. 추가적으로, CKD 진행률은 경시적으로 일관되어야 한다. 포함 자격이 있기 위해 요구되는 진행률은 규정되지 않는다.
- [0227] 9. 절차 부근에 (즉, 생검 및 주사 양쪽 모두의 전 및 후) NSAID (아스피린 포함) 및 클로피도그렐, 프라수그렐, 또는 기타 혈소판 억제제의 사용을 자제할 의사가 있고 자제할 수 있음. 각각의 절차 전 및 후의 세척 기간은 7일이어야 한다. 각각의 절차 전 7일 및 각각의 절차 후 7일 동안 어유 및 디피리다몰의 사용을 자제할 의사가 있고 자제할 수 있음.
- [0228] 10. 연구의 모든 측면에 협조할 의사가 있고, 협조할 수 있음.
- [0229] 11. 사전 동의서 서명을 제공할 의사가 있고, 협조할 수 있음.
- [0230] 배제 기준: 하기 열거된 배제 기준 중 임의의 것을 충족시키면 환자는 등록될 수 없다. 달리 언급되지 않는 한 스크리닝 시 및 주사 전에 기준이 평가되어야 한다.
- [0231] 1. 제1형 당뇨병 (DM).
- [0232] 2. 신장 이식 이력.
- [0233] 3. 스크리닝 시 HbA1c  $> 10\%$ . 스크리닝 시점에 HbA1c가  $> 8\%$ 인 환자는 당뇨병 교육을 받아야 하고, 추가적인 당뇨병 관리를 위해 주치의와 상담하도록 권장되어야 한다.
- [0234] 4. 주사 전의 헤모글로빈 수준  $< 9$  g/dL. 헤모글로빈 수준은 절차 48시간 전에 또는 현장 표준 관행에 따라 측정되어야 한다.
- [0235] 5. 카나마이신 또는 구조적으로 유사한 아미노글리코시드 항생제에 대한 알레르기가 공지되어 있음 (이는 카나마이신이 NKA 제작 동안 사용되기 때문이다).
- [0236] 6. 스크리닝 시의 APTT, INR, 및/또는 혈소판 카운트에 의해 측정된 바와 같은 비정상적인 응고 상태.
- [0237] 7. 병적으로 비만이거나, 신장 주변에 과도한 지방이 있거나, BMI가  $> 45$ 이거나, 또는 다른 방식으로 심각한 합병증에 대한 위험이 과도한 환자를 포함하여, (주사를 수행할 외과의의 평가를 기초로) 주사 절차에 대한 양호한 후보가 아님.
- [0238] 8. 주사로부터 6주 이내의 비경구 항생제를 필요로 하는 임상적으로 유의한 감염.
- [0239] 9. 스크리닝 시 또는 기존에 행해진 경우 스크리닝으로부터 1년 이내에 MRI 또는 신장 US에 의해 평가된 바와 같이, 신장이 작거나 (평균 크기  $< 9$  cm) 또는 신장이 1개만 있는 환자.
- [0240] 10. 주사 전의 마지막 3개월에 걸친 신장 기능의 급속한 하락 또는 급성 신장 손상이 있는 환자.
- [0241] 11. 주사 전에 하기 병태 중 임의의 것이 있는 환자: 신장 종양, 다낭성 신장 질환, 신장 낭종 또는 주사 절차를 방해할 기타 해부학적 이상 (예를 들어, 주사 경로 내의 낭종), 수신증, 제안된 주사 부위 상의 피부 감염,

또는 요로 감염의 증거.

- [0242] 12. 연구 과정 동안 임신했거나, 수유 (모유 양육) 중이거나 또는 임신을 계획 중이거나, 또는 임신 가능성이 있고 고도로 효과적인 산아 제한 방법 (금욕 포함)을 사용하고 있지 않은 여성 대상체. 고도로 효과적인 산아 제한 방법은 지속적으로, 그리고 정확하게 사용되는 경우에 낮은 실패율 (즉, 연간 1 퍼센트 미만)을 초래하는 방법, 예컨대 이식물, 주사제, 복합 경구 피임약, 일부 자궁내 장치 (IUD), 금욕, 또는 정관절제술을 받은 파트너로 정의된다. 대상체는 연구 과정 전반에 걸쳐 산아 제한 방법을 계속할 의사가 있어야 한다.
- [0243] 13. 과거 3년 이내의 암 이력 (비-흑색종 피부암 및 자궁경부의 상피내암종 제외).
- [0244] 14. 2년 미만의 기대 수명.
- [0245] 15. 동물 (소, 돼지) 기원의 인간 혈액 제품 또는 물질 또는 마취제에 대한 임의의 금기 또는 공지된 아나필락시스성 또는 중증 전신 반응.
- [0246] 16. 스크리닝 방문 시에 평가된, 인간 면역결핍증 바이러스 (HIV), B형 간염 바이러스 (HBV), 또는 C형 간염 바이러스 (HCV)에 대한 양성.
- [0247] 17. 과거 3년 이내에 치료를 필요로 하는 활성 결핵 (TB)에 걸린 대상체.
- [0248] 18. 주사로부터 3개월 이내에 면역억제제가 제공되고 있는 면역손상 대상체 또는 환자 (만성 사구체신염에 대해 치료된 환자 포함). [주: 흡입된 코르티코스테로이드 및 만성 저용량 코르티코스테로이드 [ $\leq 7.5$  mg/일]는 허용되고, 간헐적 증상 (예를 들어 천식)에 대한 짧은 펄스형 코르티코스테로이드도 허용된다.]
- [0249] 19. 당뇨병이 제어되지 않았거나 (PI에 의해 대사적으로 불안정한 것으로 정의됨) 또는 무능화 심장 및/또는 폐 장애가 있는 대상체.
- [0250] 20. 조사자의 평가에서 대상체가 프로토콜을 준수하는 능력을 손상시킬, 활성 알콜 및/또는 약물 남용의 이력.
- [0251] 21. 스크리닝 시 임상적으로 유의한 간 질환 (ALT 또는 AST  $> 3.0 \times$  ULN)이 있는 환자.
- [0252] 22. 조사자의 의견에서 연구 절차의 수행을 방해할 출혈 장애가 있는 환자; 쿠마린 (예를 들어 와파린 (Warfarin)) 또는 기타 항응고제 (예를 들어, 에녹사파린 또는 직접적인 트롬빈 억제제)를 복용 중인 환자.
- [0253] 23. 연구 참여가 대상체의 최상의 이익을 위한 것이지 않다고 조사자가 간주하는 임의의 상황.
- [0254] 24. 메디컬 모니터의 사전 서면 동의를 받지 않은 주사로부터 3개월 이내의 임의의 연구 제품의 사용.
- [0255] **장소 수:**
- [0256] 10개 이하의 임상 센터가 연구에 포함될 것이다.
- [0257] **연구 기간:**
- [0258] 42개월의 총 연구 기간에 대해 18개월 NKA 주사 추적에 이어서 24개월 장기 추적.
- [0259] **연구 등록:**
- [0260] NKA 주사를 받는 30명 이하의 대상체가 연구에 등록될 것이다. 이전의 연구 프로토콜 하에 NKA의 단일 주사가 제공된 환자는 단일한 추가 주사가 제공되도록 이러한 임상 시험에서 등록될 수 있다. NKA 주사가 제공된 적이 없는 환자는 시간적으로 적어도 6개월 간격의 총 2회 이하의 NKA 주사를 위해 이러한 임상 시험에서 등록될 수 있다. 모든 생검은 단일한 신장으로부터 취해야 하고, 모든 NKA 주사는 생검된 신장 내로 제공되어야 한다. 모든 I/E 기준을 만족시키는, 스크리닝 절차를 완료한 환자가 주사 직전에 연구에 등록될 것이다. 주사 전에 모든 기준을 충족시키지 않는 환자는 스크리닝 실패로 간주될 것이다. 환자에게 주사를 놓았으면, 환자는 치료를 완료하였을 것이고, 환자가 모든 추적 방문을 완료하는 것을 보장하도록 모든 노력을 기울여야 한다. 2차 NKA 주사를 맞는 처음 3명의 환자에 대한 주사 날짜는 급성 유해 사례 및 DSMB에 의한 기타 안전성 파라미터의 평가를 허용하기 위해 최소 3주 간격만큼 교대될 것이다. 후속 2차 주사는 3주 간격 미만으로 발생하도록 계속 교대될 것이지만, 개별적인 DSMB 검토는 요구되지 않을 것이다. 추적 방문 완료 시, 환자는 장기 추적 연구를 계속할 것이다. 1차 또는 2차 주사와 관계 없이, 이러한 프로토콜 하에서의 마지막 NKA 주사 후의 총 36개월 동안 환자가 추적될 것이다.
- [0261] **시험 계획:**

- [0262] **스크리닝:** 적격성 기준을 만족시키는 대상체가 연구에 진입할 수 있다. 대상체는 주사 전의 신장 질환의 진행률의 결정을 허용하도록 신장 기능에 대한 충분한 이력 데이터가 있어야 한다 (포함 기준 8). 스크리닝 절차는 전체 신체 검사, 심전도, 및 실험실 평가 (혈액학, 혈청 화학, 및 요분석)를 포함할 것이다. 추가적으로, 현장 표준 관행을 사용하여 신장 부피를 평가하도록 MRI가 수행될 것이다.
- [0263] **생검:** 기존에 1상 시험에 등록되지 않은 환자는 주사용 세포를 획득하기 위한 신장 생검을 필요로 할 것이다. 충분한 세포가 해동 후에 입수가 가능하다면, 기존에 1상 시험에 등록된 환자로부터 획득되어 냉동 상태로 유지된 생검 검체가 이러한 프로토콜 하에 주사될 제2의 양의 NKA를 생성시키도록 사용될 것이다. 냉동된 생검 검체를 해동한 후에 획득된 세포의 개수가 불충분하면, 환자는 이러한 연구를 위해 추가적인 생검 절차가 완료되어야 할 필요가 있을 수 있다.
- [0264] **주사:** 예정된 주사일로부터 10 내지 14일 전에, 대상체는 최종 적격성 기준의 검증에 대해 진료소에 보고할 것이다. 추가적으로, 분할 신장 기능의 기준선 평가를 획득하기 위해 신장 섬광조영술 연구가 수행될 것이다. 적합한 I/E 기준을 충족시키는 대상체는 예정된 주사일 (제0일)의 아침 일찍 병원/임상 연구 유닛에 입원할 것이다. 2가지 이용가능한 옵션 중 하나를 사용하여, NKA가 생검된 신장 내로 주사될 것이다: (1) 복강경 접근법; 또는 (2) 경피 접근법. 복강경 방법은 복강경으로 관찰하면서 주사를 수행하는 동안 신장을 안정화하도록 로봇 보조를 사용할 수 있는 한편, 경피 방법은 고주파 또는 냉동 방법에 의한 신장 종괴의 제거에서 사용되는 것과 같은 표준화된 기술을 이용할 것이다. 대상체는 복강경 주사 후 최소 2박 내지 4박까지 (또는 임의의 절차- 또는 제품-관련 AE가 해소 또는 안정화되었을 때까지) 계속 입원할 것이다. 환자는 합병증이 없으면 경피 주사일과 같은 날에 퇴원할 수 있다. 양쪽 접근법 모두에 대해 준임상적 유해 효과의 결여를 검증하기 위해 제1일에 초음파 연구가 수행될 것이다.
- [0265] 용량-확인을 허용하고 효과 지속기간을 이해하기 위해, 모든 환자가 이러한 프로토콜 하에 2회의 주사를 맞는 것으로 계획될 것이 예상된다. 특정 상황 하에, 환자 또는 조사자는 2차 용량을 연기하거나 보류하기로 결정할 수 있다. 일반적으로, 신장 기능의 급속한 악화, 제어되지 않은 당뇨병의 발달 또는 제어되지 않은 고혈압의 발달을 포함하는 상황에서 임의의 부적절한 안전성 위험이 있는 것으로 보이거나, 또는 악성종양의 병발성 발달이 있는 경우, 환자는 2차 용량을 받지 않아야 한다.
- [0266] 이러한 프로토콜 하에서의 2차 주사는 상이한 환자들에서의 단일 주사가 3개월 이상의 간격으로 발생하도록 교대될 것이다. DSMB는 이러한 프로토콜 하에서의 처음 3회의 2차 주사 각각에 관한 임상 데이터를 검토할 것이고, 제2, 제3 및 제4의 2차 주사가 이루어지기 전에 스폰서와 상의할 것이다. 후속 2차 주사는 3주 이상의 간격으로 발생하도록 계속 교대될 것이지만, 개별적인 DMSB 검토는 요구되지 않을 것이다.
- [0267] 이러한 프로토콜 하에서의 1차 NKA 주사에 대해서는 교대가 요구되지 않을 것이다.
- [0268] **주사-후 추적:** 대상체는 추적 안전성 평가를 위해 주사 후 제7일, 제14일, 제28일 및 주사 2개월 후, 3개월 후 및 6개월 후에 진료소로 복귀할 것이다. 주사 6개월 후에, 치료-후 MRI 및 신장 섬광조영술 연구가 수행될 것이다. 환자가 6개월 효능 방문을 완료한 후, 이들은 2차 NKA 주사에 대해 고려될 것이다. 2차 용량을 받는 환자는 1차 주사 후에 발생한 것과 동일한 추적 방문을 따를 것이다. 1차 주사 방문 6개월 후의 환자가 2차 주사 방문 14 내지 10일 전의 환자로서의 역할을 할 것이다. 환자는 이의 2차 주사를 위해 복귀할 것이고, 추적 안전성 평가를 위해 주사 후 제7일, 제14일, 제28일 및 주사 2개월 후, 3개월 후 및 6개월 후에 진료소로 복귀할 것이다. 1차 NKA 주사 후의 6개월 및 2차 NKA 주사 후의 12개월로 사후 추적 단계에서 18개월까지 환자가 추적될 것이다. 추가적인 사후 추적 시점에 대해서는 14면의 시간 및 이벤트 일정을 참조한다.
- [0269] **장기 추적:** 18개월 초기 추적 기간 후에 24개월 동안 안전성 및 효능에 대해 환자가 추적될 것이다. 마지막 NKA 주사 후 24 및 36개월에 전화 접촉이 이루어질 것이고, 마지막 NKA 주사 후 30 및 42개월에 방문이 이루어질 것이다.
- [0270] **NKA 용량:**
- [0271] 스크리닝 동안 취해진 MRI의 결과로부터 표적/수용 신장의 신장 중량이 추정될 것이다. 전임상 연구를 지침으로서 사용하여, 이러한 연구에 대한 NKA의 용량은  $3 \times 10^6$ 개의 세포/g 추정 신장 중량 ( $g \text{ KW}^{\text{est}}$ )이다. NKA mL 당 SRC의 농도가  $100 \times 10^6$ 개의 세포/mL이기 때문에, 투약 부피는 각각의 100 g 신장에 대해 3 mL 또는 200 g 신장에 대해 6 mL일 것이다. 이러한 투약 패러다임을 기초로, 하기 용량의 NKA가 투여될 것이다 (표 6):

[0272] <표 6>

추정 신장 중량 (KW <sup>est</sup> g)		용량 부피 (mL)	전달된 SRC (세포 개수; x 10 <sup>6</sup> )
중량값 중량 (g)	중량 범위 (g)		
100	95 - 108	3	300
117	109 - 125	3.5	350
133	126 - 141	4	400
150	142 - 158	4.5	450
167	159 - 175	5	500
183	176 - 191	5.5	550
200	192 - 208	6	600
217	209 - 225	6.5	650
233	226 - 241	7	700
250	242 - 258	7.5	750
	>259	8	800

[0273]

[0274] **안전성 모니터링:**

[0275] 예측되지 않은 유해 효과가 발생할 수 있는 한편, 연구에 등록된 대상체에 대한 가장 큰 인지된 위험은 주사 절차 후의 출혈이다. 따라서, 과도한 출혈의 위험을 최소화하기 위해 예방책이 취해졌다. 출혈 위험 증가가 예측되는 비정상적인 실험실 값이 있는 환자는 연구에 적격이지 않을 것이다. 헤모글로빈/적혈구용적률이 각각의 절차 a) 전, b) 4시간 후, 및 c) 다음날 모니터링될 것이다.

[0276] **주사:**

[0277] 주사 절차 동안, 표준 현장 관행을 사용하여 헤모글로빈이 정기적으로 모니터링될 것이고 혈압이 계속 모니터링될 것이다. 복강경 주사 직후, 혈압/맥박 및 헤모글로빈을 정기적인 모니터링하면서 대상체가 8시간 동안 계속 누워있을 것이다. 대상체는 유해 사례의 관찰을 위해 복강경 주사 후 2 내지 4박 동안 병원에 남아 있을 것이다. 주사 후 제1일에, 준임상 유해 효과가 없는지를 검증하기 위해 초음파 연구가 수행될 것이다. 임상적으로 보장되면, 유해 사례가 진행 중이지 않는 것을 보장하기 위해 진료소에서 퇴원하기 전에 초음파가 수행될 수도 있다. 경피 경로를 통한 주사 후에는, 유사한 절차 (즉, 경피 절제) 후의 현장의 일반적인 관행인 경우, 환자는 같은 날에 2시간 이상의 관찰 및 모니터링 후에 퇴원할 수 있다. 수술 후 제품- 또는 절차-관련 AE가 발생하였으면, 환자는 AE가 해소되었거나, 안정화되었거나 또는 기준선으로 돌아갔을 때까지 퇴원하지 않아야 한다. 복강경 주사 후, 환자는 AE에 대해 평가하기 위해 병원에서 2 내지 4박 동안 관찰되어야 한다. 퇴원 후, 대상체는 신장 기능부전의 진행률을 포함하여 신장 기능의 변화에 대해 각각의 방문 시에 모니터링될 것이다. 신장 기능에 대해 예측적인 실험실 값이 면밀하게 모니터링될 것이다. 신장 기능에서의 유해한 변화에 반응하여 필요하다면 추가적인 영상화 연구가 수행될 수 있다.

[0278] **데이터 안전성 모니터링 위원회:**

[0279] 환자 안전성을 감독하기 위해, 특히 이것이 임의의 예상밖의 제품-관련 사례에 관련됨에 따라, 데이터 안전성 모니터링 위원회 (DSMB)가 설립될 것이다. 위원회는 프로토콜 활동과 직접적으로 관련된 전문 기술이 있는 3명의 구성원을 포함할 것이다. DSMB의 구성원은 리젠메드 (케이맨) 리미티드(RegenMed (Cayman) Ltd.) 또는 임의의 연구 센터와 다른 계약이 없을 것이고, DSMB는 독립적으로 기능할 것이다. 일반적으로, DSMB는 임상 시험에서 연구 대상체로서 등록된 환자에 대한 안전성에 관련된 측면에서 리젠메드 (케이맨) 리미티드에게 조언할 것이다. DSMB의 구체적인 활동 및 책임은 DSMB 인가서에서 상술될 것이다. DSMB의 권장사항이 연구 센터, 및 IRB/EC에 요구되는 곳, 및 규제 기관에 전달될 것이다.

[0280] **분석 방법:**

[0281] 30명 이하의 대상체에 NKA가 주사될 것이다. 이는 II상 안전성 및 초기 효능 연구이기 때문에, 공식적인 샘플 크기 계산이 수행되지 않았다. 계획된 샘플 크기는 만성 신장 질환이 있는 환자에서의 투여된 NKA 용량의 안전성 프로파일 및 잠재적 효능 양쪽 모두의 예비 특성화를 허용한다. 하위군 분석은 단일 주사가 제공된 환자와 2회의 주사가 제공된 환자, 및 복강경 주사가 제공된 환자와 경피 주사가 제공된 환자를 비교할 것이다. 안전

성 프로파일은 특정 관심 이벤트를 포함하는 유해 사례의 평가, 신장 기능 평가를 포함하는 실험실 파라미터, 영상화 결과 및 활력 징후로 주로 이루어질 것이다. 연구 흐름의 개요가 도 8에서 제시된다.

[0282] 실험실 평가

[0283] 실험실 평가가 하기 표 7에서 요약된다. 실험실 결과는 NCI CTCAE 등급화 척도를 사용하여 등급화될 것이다.

[0284] <표 7>

[0285] 실험실 평가

화학	혈액학
표준 패널	헤모글로빈 - Hb
알라닌 아미노트랜스퍼라제: ALT	적혈구용적률 - HCT
알칼리성 포스파타제: ALP	혈소판
아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제: AST	RBC 카운트
빌리루빈	WBC 카운트
크레아틴 키나제: CK	WBC 감별
감마-글루타밀 트랜스퍼라제: GGT	응고 상태
락테이트 데히드로게나제: LDH	혈성화 부분적 트롬보플라스틴 시간: APTT
신장 피분석물	INR
알부민, 혈청	
칼슘, 혈청	소변 화학
CO <sub>2</sub> , 전체	단백질 & 알부민
크레아티닌, 혈청	크레아티닌
시스타틴 -C	단백질 & 알부민:크레아티닌 비 (PCR & ACR)
C 반응성 단백질: CRP	뉴트로페이즈(NeutroPhase) II 젤라티나제-연관 리포칼린 (NGAL)
글루코스, 혈청	일상적인 요분석: UA*
인, 혈청	추가적인 선택된 피분석물
칼륨, 혈청	β <sub>2</sub> -마이크로글로불린, 혈청 & 소변
나트륨, 혈청	헤모글로빈 (Hb) A1c
BUN	(무순장) 부갑상선 호르몬; PTH
	바이러스학
지질 패널	HIV-1, HBV, HCV
콜레스테롤	
LDL	연구 (보존) 피분석물
HDL	혈청/혈장 및 소변 샘플
LDL:HDL 비	예: 섬유모세포 성장 인자 23, 펜탁신 3
트리글리세리드	임신 (소변)
* 소변 테스트 스트립 (딥스틱)을 사용하는 일상적인 UA. 알부민, 백혈구, 적혈구 또는 니트라이트가 양성이면, 현미경 분석만 수행하여야 한다.	

[0286]

[0287] eGFR: 연구 전반에 걸친 모든 대상체의 비교를 위해, CKD-EPI 식을 사용하여 GFR이 추정될 것이다. 크레아티닌을 측정하기 위한 특정 검정법이 리젠메드 (케이맨) 리미티드에 의해 정의될 것이고, 중앙 실험실에 의해 샘플이 분석될 것이다. 각각의 대상체의 이력 값에 대한 비교를 위해, 이력 데이터를 생성시키기 위해 사용된 현장 실험실에서 2차 분석을 수행하는 것이 필요할 수 있다.

[0288] 바이러스학: 환자로 부터 수집된 생검 샘플이 SRC 선택 및 NKA 제작에 사용될 것이다. 따라서, 환자가 HIV, HBV, 및 HCV를 포함하는 바이러스성 혈액-매개 병원체에 대해 테스트될 것이다.

[0289] 소변 화학: 연구 과정에 걸쳐, 소변이 2개의 상이한 기간에 걸쳐 수집될 것이다; 24시간 수집 및 스팟 소변. 스팟 소변 수집은 소변 딥스틱 (테스트 스틱) 평가용으로 사용될 것이다. 각각의 유형의 샘플의 수집을 위한 시간은 <시간 및 이벤트 일정: 실험실 평가>에서 설명된다. 단백질 및 알부민 배설의 포괄적 그림을 제공하기 위해, 총 단백질 및 알부민 양쪽 모두가 모든 샘플에서 이러한 유형의 샘플에 대해 적합한 것으로 평가되어야 한다.

[0290] 연구 (보존) 피분석물: 미래 시점의 신장 특이적 피분석물 및/또는 신장 질환의 바이오마커의 분석을 위해 추가적인 소변 및 혈청/혈장 샘플이 수집, 분취 및 보관될 것이다. 잠재적인 피분석물은 섬유모세포 성장 인자 23 (FGF23) 및 펜탁신 3 (PTX3)을 포함한다. 이러한 분석으로부터의 결과는 이러한 연구를 위한 임상 연구 보고서 (CSR)에서 입수가능하지 않거나 또는 이에 포함되지 않을 것이다.

[0291] 임신: 소변 임신 테스트가 테스트-스트립을 사용하여 현장에서 수행될 것이다. 테스트가 양성이면, 확증 테스

트가 임상 실험실에서 수행될 것이다. 현장 관행에서 테스트-스트립의 결과가 받아들여지지 않으면, 소변 샘플을 분석을 위해 중앙 실험실로 보내야 한다.

[0292] 신장 영상화

[0293] **초음파**

[0294] 초음파가 표준 현장 절차에 따라 수행될 것이고, 주사 동안, 주사 전 및 주사 후에 안전성을 평가하는데 사용될 것이다. 안전성 평가 또는 절차 동안의 기구 조작의 지침을 위해 필요하다면 다른 시간에 초음파가 수행될 수 있다. 초음파로부터 발견된 것 (예를 들어, 저항 지수, 길이 등)이 CRF에 기록될 것이다.

[0295] **자기 공명 영상화**

[0296] MR 영상화가 현장 표준 관행에 따라 수행될 것이다. 현장 시작 방문 동안, 사용 중인 MRI 설비에 의존적인 바와 같이 각각의 현장에 대해 MRI 프로세스가 정의될 것이다. 일반적으로, 1.5-T 유닛이 사용되어야 한다. 영상은 신장 부피를 결정하는데 사용될 것이고 (투약 계산을 위해), 신장 피질 두께를 측정하는데 사용될 수 있다. MRI는 조영제의 주사 없이 표준 시퀀스를 사용하여 수행될 것이다. 예를 들어, 신속한 3D 그라디언트-에코 시퀀스(gradient-echo sequence)인 VIBE를 사용하여, 22초의 획득 시간 및 2×1.4×1.2 mm의 공간 해상도로 부피 측정치가 계산될 수 있다. 환자들 사이에서 영상화 파라미터가 조정될 수 있지만, 임의의 1명의 환자에서는 사전 및 사후 영상에 대해 동일한 파라미터가 사용되어야 한다. 사용된 구체적 파라미터는 원본 문서 및 CRF에 기입된 적합한 란에 기록될 것이다.

[0297] **신장 섬광조영술**

[0298] 신장 섬광조영술이 상대적인 신장 기능을 측정하는데 장기간 동안 사용되었다. 역사적으로, 이러한 방법은 상이한 방사성의약품들 예컨대 테크네튬-99m으로 표지된 디메르캅토숙신산 (99mTc-DMSA), 디에틸렌트리아민 펜타아세트산 (99mTc-DTPA), 메르캅토아세틸트리글리신 (99mTc-MAG3), 에틸렌디시스테인 (99mTc-EC), 및 131-J로 표지된 오르토아이오도히푸레이트 (131J-OIH)로 수행되었다. 이들 중에서, 정적 신장 작용제인 99mTc-DMSA가 상대적 신장 기능을 측정하기 위한 가장 신뢰할 수 있는 방법으로 간주되고, 본 연구를 위한 바람직한 작용제이다.

[0299] 99mTc-DMSA를 사용하는 신장 섬광조영술이 여러 유형의 신장 질환 후의 신장 기능의 평가를 위한 바람직한 방법으로서 옹호되고 있다. 이의 흡수는 효과적인 신장 혈장 흐름, 사구체 여과율 및 크레아티닌 클리어런스와 상호관련된다. 따라서 그의 정량적 측정치는 상대적 신장 기능의 양호한 지수이다. 기존의 연구는 99mTc-DMSA 흡수가 정상 신장과 질환에 걸린 신장을 구별한다는 것을 나타냈다. 상이한 작용제가 현장에서 일상적으로 사용되는 경우, 현장 시작 방문에서 방법이 검토되어야 한다.

[0300] 현장은 이의 표준 현장 절차를 사용해야 한다. 예시적인 절차의 개요는 하기와 같다:

- [0301] ● 환자는 50 MBq 99mTc-DMSA의 정맥내 주사를 맞아야 하고, 주사 3시간 후에 영상화가 수행된다.
- [0302] ● 환자는 누운 자세로 놓일 것이고, 15분의 사전 설정 시간, 256×256 매트릭스로의 후방 영상의 획득이 초고 해상도 콜리메이터로 수행될 것이다.
- [0303] ● 관심 영역 도면을 사용하여 차별적 신장 기능이 계산될 것이다.

[0304] 주: 현장 표준 관행이 99mTc-DMSA 이외의 표지 작용제를 사용하는 것이면, 현장은 리젠메드 (케이맨) 엘티티의 스태프와 현장 시작 전에 절차를 논의하여야 한다. 절차가 프로토콜에 열거된 절차와 충분히 등가인 것으로 간주되면, 현장은 이의 표준 절차를 사용하도록 허용될 것이다. 이러한 경우에, 리젠메드 (케이맨) 리미티드 프로젝트 리더가 절차에 서명할 것이고, 현장의 규제 바인더에 사본이 보관될 것이다.

[0305] 수술 절차

[0306] **생검**

[0307] 현장 표준 관행에 의해 지시되는 바와 같은 초음파 또는 CT 가이드 방법을 사용하여 무균성 조건 하에 왼쪽/오른쪽 신장으로부터 생검이 수집되어야 한다. 표준 절차와의 유일한 차이는 2개의 조직 코어를 수집하는 것과 16 게이지 바늘을 사용하는 것일 수 있다. SRC 선택 및 NKA 제작을 위해 충분한 피질 조직이 수집되는 것을 보장하도록 2개의 생검 신장 조직 코어가 요구된다. 마찬가지로, NKA 제작을 위해 충분한 피질 물질이 수집되는

것을 보장하도록 16 게이지 생검 바늘이 사용되어야 한다. 현장 표준 관행이 15 게이지 생검 바늘을 사용하는 것을 지시하면, 메디컬 모니터와의 협의 후에 15 게이지 바늘이 사용될 수 있다. 임의의 경우에, 가능한 한 많은 피질 조직이 수집되어야 한다. 현장에서 이용가능한 경우, 충분한 피질 물질이 획득되는 것을 보장하도록 생검 코어의 병상 검사가 수행될 수 있다.

[0308] 생검 조직이 주사가 가능한 제품인 NKA를 제작하는데 사용될 것임을 기억하는 것이 중요하다. 따라서, 현장은 세포 확장 및 선택 동안의 오염 위험을 최소화하도록 무균성 조건을 사용하여 조직 코어가 수확되어야 한다는 것을 생검을 수집하는 개인이 인지하는 것을 보장하여야 한다. 미생물 바이오버든(bioburden)이 있는 제품은 주사용으로 발매될 수 없어서, 수집 동안의 조직 코어의 오염은 리젠메드(케이맨) 리미티드가 NKA 제품을 이러한 환자용으로 제작하는 능력을 상당히 위태롭게 할 수 있다.

[0309] 주사 절차 후의 상처 관리 및 통증 관리에 대한 지침이 연구 참고 매뉴얼(Study Reference Manual)에서 제공될 것이다. 중요하게, 신독성 잠재력이 있는 가능한 약제를 피하도록, 생검 후에 환자에게 투여되는 통증 약제가 주의하여 선택되어야 한다. 주사 부근의 전문 환자 관리는 잠재적인 출혈 이벤트를 최소화하는데 초점을 둘 것이다. 헤모글로빈, 혈압, 총 혈뇨, 복부/옆구리 통증, 및 옆구리 반상출혈을 모니터링하면서 대상체가 4시간 동안 계속 누워있을 것이다. 추가적으로, 현장 표준 관행에 따라 환자가 생검일에 퇴원할 수 있다. PI의 의견으로 대상체를 생검 후의 유의한 유해 효과에 대한 위험 증가에 처하게 할 생검 후의 유의한 유해 사례를 대상체가 경험하면, 대상체에게 NKA를 주사하지 않을 것이지만, 대상체를 사례(들)가 해소될 때까지 추적한 후, 연구에서 중지시킬 것이다.

[0310] **주사**

[0311] 무균성 주사기 내의 NKA가 리젠메드(케이맨) 리미티드로부터 현장으로 보내질 것이다. 현장에서 받았으면, NKA는 수술실로 이송될 때까지 운송 컨테이너에서 보관되어야 한다. NKA는 환자 내로 주사하기 직전에 최소 30분, 최대 120분 동안 26.5±1.5°C로 평형화되어야 한다. 리젠메드(케이맨) 리미티드가 연구 참조 매뉴얼에서 평형화에 대한 설명을 제공할 것이다.

[0312] 환자에게 (1) 경피적이고 최소-침습적인 영상-가이드 직접적-바늘 접근법, 또는 (2) 개 연구에서 NKA를 전달하는데 사용된 것과 유사하고 인간에서의 스웨덴 연구에서 이미 6회 이상 사용된 복강경 기술을 사용하여 NKA가 주사될 것이다. 양쪽 경우에서의 목표는 NKA가 실현가능한 한 넓게 분포되어 신장 피질 내에 침착되는 것을 허용하는 각도로 접근하는 것이다. 이는 개별적인 환자의 특성에 따라 세로 또는 가로 접근법에서 신장을 영상화하는 것을 필요로 할 수 있다. 이상적으로는, 주사 바늘/캐뉼러를 점진적으로 인출함에 따라 주사는 다중 침착을 수반할 것이다. 주사될 부피는 MRI로부터 추정된 바와 같은 신장의 중량에 의해 결정되고, 최대 8 mL 이하다. 8 mL 주사의 경우, 각각 8 내지 4개의 증분으로 1 내지 2 mL가 침착될 것으로 예상된다. 2개까지의 진입점이 전체 부피의 NKA를 신장 내로 침착시키는데 사용될 수 있다 (신장 당 2개의 진입점이 모든 동물 연구에서 일상적으로 사용되었다). NKA는 2 mL/분보다 빠르지 않은 속도로 천천히 투여되어, NKA의 생존성을 보장하여야 한다. 가능하다면, 스폰서가 주사 절차를 볼 것이고, 교육/훈련 도구로서 사용하기 위해 실제 신장 주사가 비디오로 녹화될 것이다. 수술 전에, 현장은 신장에 접근하는데 사용될 구체적인 절차적 접근법을 문서화하여야 한다.

[0313] 경피 절차:

[0314] 절차 전에, 수술의는 하기를 포함하여 환자를 평가할 것이다:

[0315] a. 일반적으로 절차의 실현가능성을 결정하기 위한, 신체 평가;

[0316] b. 응고 패널, INR, 혈소판, 헤모글로빈, 적혈구용적률, 및 기타 관련 실험실 연구 (지시된 바와 같음)를 포함한 출혈 파라미터의 평가;

[0317] c. 접근 경로, 신장 깊이, 및 피질-수질 접합부의 출현을 결정하기 위한, 초음파, MRI, 및/또는 CT를 포함한 이용가능한 영상화 연구의 검토. 잠재적인 NKA 세포 침착 부위의 지도화가 수행될 것이다.

[0318] d. 기도 평가, 병력, 알레르기 및 약제로부터의 ASA 등급 결정.

[0319] e. 절차, 이의 위험 및 가능한 합병증, 진정을 논의하고, 질문에 대답하며, 문서화된 사전 동의서를 획득하기 위한 환자 및 가족/부양자의 인터뷰.

[0320] 절차 기술: 구체적으로, 동축 기술이 이용될 것이다 (하기에 상술됨).

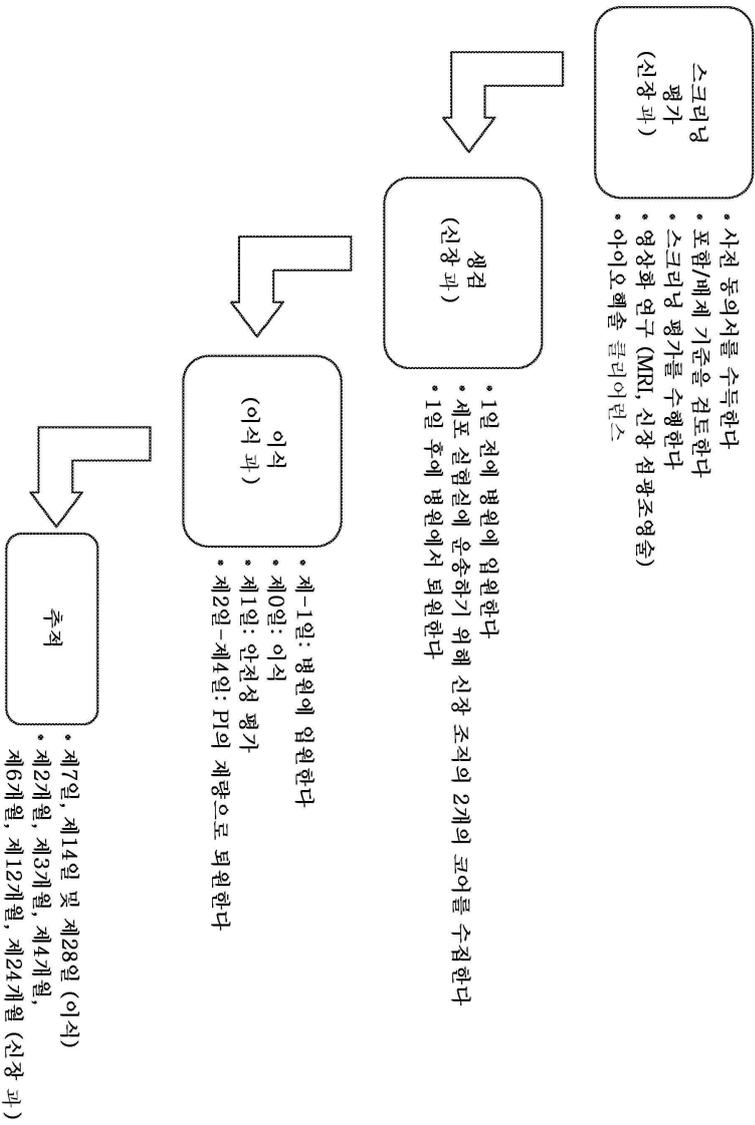
- [0321] 영상 가이드: 조작자는 어떤 신장이 생김되었는지를 결정할 것이고, 세로, 가로, 또는 양쪽 모두의 기준 평면을 통해 이러한 신장에 대한 접근법을 계획을 계획할 것이다. 절차 동안의 영상화 선택권은 초음파 단독 또는 초음파 + 보조 CT를 포함하고, 조작자는 컬러 도플러, 측정 능력, 프로브 주파수 및 전반적인 디자인을 포함하여 적합한 기능성을 확인 및 문서화할 것이다.
- [0322] 절차 전에, 비정상적인 응고 값이 수정될 것이다. 현장에서의 일반적인 관행에 따라 예방적 항생제가 정맥 내로 제공될 것이다. 인접 내장, 신장 위치, 신장 낭종의 존재를 평가하고, 초음파와 함께 피질-수질 접합부를 결정하기 위해, 필요하다면 초기 CT 스캔이 주문될 수 있다. 절차 동안, 중등도의 얇은 진정이 사용될 것이고, 환자 모니터링이 계속될 것이다.
- [0323] 세포와 상용성인 바늘 (캐놀러)을 통해 신장 피질 내로의 주사에 대해 NKA가 표적화된다. 신장 피막의 투과를 통해 NKA를 도입하고 신장 피질의 다중 부위 내로 침착시키는 것이 의도된다. 먼저, 신장 피질 내로 약 1 cm 삽입된 (그러나 신장 내로 더 전진되지는 않은) 15-20 게이지 액세스 트로카르/캐놀러를 사용하여 신장 피막에 구멍이 뚫릴 것이다. NKA는 끝부분이 무딘 내부 바늘 또는 가요성 캐놀러 (18-26 게이지, 액세스 캐놀러용으로 적절함)에 부착될 주사기 내에 함유된다. 1상 임상 연구에서, NKA는 18G 바늘을 통해 전달되었다. 제안된 II 상 연구는 18 게이지 이하의 바늘 (18-26 게이지)을 NKA 주사에 사용할 것이다. 바늘이 액세스 캐놀러 내부를 관통하여 신장 내로 전진될 것이고, 이로부터 NKA가 투여될 것이다. NKA 주사는 1-2 ml/분의 속도일 것이다. 각각의 1-2분 주사 후, 내부 바늘이 피질 내에서 바늘 코스를 따라 제2 주사 부위로 뒤로 당겨지고, 바늘 끝부분이 액세스 캐놀러의 말단에 있거나 또는 전체 세포 부피가 주사되었을 때까지 그렇게 된다. 이러한 절차는 NKA의 복강경 (기준에 I 상 연구에서 사용됨) 및 경피 주사 양쪽 모두에 대해 사용될 수 있다. NKA의 경피 주사의 경우, 액세스 캐놀러/트로카르 및 바늘의 배치가 직접적인 실시간 영상 가이드를 사용하여 수행될 것이다. 세포 침착물의 미세기포 발자국을 가시화하도록 초음파 영상 가이드로 NKA 주사가 모니터링될 것이다.
- [0324] 중앙 또는 말초 신장 혈관 내로, 신장의 수질 부분 내로, 또는 신장 피질을 통해 복막뒤 연조직 내로 세포가 일출되는 것의 영상화 증거, 또는 활성 출혈의 증거가 있으면 NKA 주사가 중단될 것이다. 이러한 지점에서, 바늘이 인출된다. 동일한 바늘 트랙을 따라, 또는 신장 내의 상이한 위치 내의 새로운 부위에서 NKA가 계속 주사되면, 추가적인 신장 주사 부위가 선택될 수 있다.
- [0325] NKA 주사 완료 후, 내부 바늘이 인출될 것이고, 외부 캐놀러는 트랙 색전술을 위해 원위치에 남을 것이다. 외부 캐놀러 (트로카르)의 제거 동안, 신장 출혈을 방지하도록 신장 피질 구멍 및 복막후강을 통한 바늘 트랙의 부위가 흡수가능한 젤라틴 입자/거즈 (예를 들어 젤폼(Gelfoam) [파이자(Pfizer)]) 또는 피브린 실란트 (sealant) (예를 들어 티셀(Tisseel) [박스터(Baxter)]) 또는 다른 적절한 작용제로 색전될 것이다.
- [0326] 절차 완료 시, 천공 부위 세포 주사 및 임의의 혈종 또는 출혈을 평가하기 위해 비-조영 CT 스캔 또는 초음파 + 컬러 도플러 평가가 수행될 것이다. 절차 후 2 내지 3시간 동안, 간호되는 회복실 환경에서의 평가 및 활력 징후 모니터링으로 관찰될 것이다. 모든 지표가 정상이면, 그 후 환자가 퇴원할 수 있다. 퇴원 24시간 후 추적 전화 통화가 수행될 것이고, 프로토콜에 따라 진료소에서의 추적이 계속될 것이다.
- [0327] 최소-침습성 복강경 절차:
- [0328] 제2 방법을 사용하여, 환자가 전신 마취 하에 있는 동안 로봇- 또는 손-보조 복강경 접근법을 사용하여 신장에 접근할 것이다. (문헌 [Wadstrom et al., 2011a 및 2011b]에 기술된 바와 같은 HARS, 또는 표준 로봇-보조 방법을 사용하는 것이 현장에서 선택될 수 있다). 로봇- 또는 손-보조 접근법을 사용하는 것은 외과위가 신장을 주사를 위한 최적의 위치에 놓게 허용한다. 또한 이는 출혈이 발생하는 경우 외과위가 이를 가시화하고 정지시키게 허용한다. 표준 현장 수술 관행을 사용하여 수술 동안 혈압이 계속 모니터링될 것이다.
- [0329] 신장에 접근하였으면, NKA가 신장 피질 내로 침착되게 허용하는 각도로 NKA가 주사될 것이다. 캐놀러는 캐놀러가 신장으로부터 뒤로 당겨질 때 NKA의 다중 침착을 허용하는 깊이로 삽입되어야 한다. 진입점은 신장의 정중선에서 벗어나야 하고, 신장 피질 내로의 NKA 침착을 최대화하는 각도여야 한다.
- [0330] 주사 직후에, 환자는 감독 하에 수술 후 수술 회복실에서 회복될 것이다. 환자는 모든 활력 징후가 안정적일 때까지 그의/그녀의 병실로 보내지지 않을 것이다. 전반적으로, 혈압 및 맥박을 모니터링하면서 환자가 적어도 8 시간 동안 침상에서 유지될 것이다. 환자는 수술 후 문제를 다루는데 이용되는 숙련된 간병인 팀에 의해 24시간 동안 면밀하게 모니터링되어야 한다. 통증, 열, 혈압/헤모글로빈의 극적 감소, 또는 임의의 다른 임상 징후/증상이 잠재적 유해 반응/사례를 나타내면, 추가 신체 검사 (잠재적으로, x선 또는 초음파 검사를 포함함)가 진단 목적을 위해 자유롭게, 그리고 신속하게 수행되어야 한다.

- [0331] 표준 안전성 척도에 더하여, 헤모글로빈이 사전, 4시간 후, 및 그 후 주사 후에 입원한 동안 매일 모니터링될 것이다. 환자는 수술 후 2 내지 4박 동안 병원에 남아있을 것이다. 절차- 및/또는 제품-관련 AE가 해소되었거나, 안정화되었거나 또는 기준선으로 돌아갔을 때까지 환자는 퇴원하지 않을 것이다.
- [0332] 주사의 절차-후 평가:
- [0333] 양쪽 절차로, 침착 동안 NKA가 신장으로부터 누출되면, 누출된 양을 추정하고 CRF에 기록하여야 한다. 추가 누출을 방지하기 위해, 주사 속도가 느려질 수 있다. 이러한 프로토콜의 일부로서, 주사 속도 및 주사 각도를 포함하는 (그러나 이에 제한되지 않는) 주사 파라미터가 최적화를 위해 조정될 수 있다.
- [0334] **실시예 3 - 중재적 방사선학을 위한 NKA 주사 프로토콜**
- [0335] **임상 평가:**
- [0336] 절차 전의 임상 평가를 위해, 적합한 신장 가시화, 신장 축, 및 신장 크기, 신장 종괴/낭종/신우주위낭, 신장 피질 두께 및 피부 표면으로부터의 신장의 깊이를 확실히 하는 것이 권장된다.
- [0337] **NKA 전달**
- [0338] 세포 현탁액: 절차-전 MRI 부피측정 3D 평가에 의해 부피가 결정된다.
- [0339] 바늘 크기 및 배치: 탐침이 있는 18 게이지 (ga) × 15 cm 길이의 다이아몬드 끝부분 바늘 (쿡(Cook), 인디애나 주 블루밍턴)이 초음파 (US)/ 전산화 단층촬영 (CT) 스캔 가이드로 삽입되고, 바늘 끝부분이 신장 실질 내로 피막 아래로 5-10 mm 전진된다. 25 ga × 21 cm 길이의 내부 바늘 (IMD, 유타주 헨츠빌)이 외부 바늘을 통해 트로카르 바늘의 끝부분에 대해 약 4-5 cm 원위인 피막하 신장 실질 내로 또는 끝부분이 먼 신장 피질하 조직의 더욱 원위인 부분에 도달할 때까지 전진된다. 가능한 한 새로운 피질하 피막으로 바늘을 전진시키지만, 피막 천공은 피한다.
- [0340] 바늘 배치는 외측/내측 피질 윤곽과 마주칠 수 있고, 피질/피막하 위치에서의 세포 전달 깊이를 줄이거나 또는 늘릴 수 있다. 횡단면을 통한 이상적인 전달 부위는 중앙 내지 하부 극 위치에 있을 것이다. 적합한 배치를 보장하도록 US 가이드로 바늘 전진이 행해지고, 필요하다면 축상 CT 영상화로 확증된다.
- [0341] 초기 및 최종 바늘 배치가 US/CT 영상화로 확증되고, 기록된다. 하부 극에서 바늘 진입 부위까지의 거리가 측정 및 기록된다. (도 9-11 참조)
- [0342] NKA 세포 주사: 세포 용액은 10 ml 주사기 내의 미리 정해진 부피 (최소 8.5 ml)로 예비 연구 약학과 함께 연구 코디네이터에 의해 전달될 것이다. 무균성이면, 주사기가 IR 조작자에게 전달될 수 있다. 무균성이 아니면, NKA를 제조 주사기로부터 무균성 주사기로 옮긴다. 주사 유연성을 허용하기 위해 커넥터 튜브가 주사기와 25 ga 바늘 허브 사이에 삽입된다.
- [0343] 25 ga 바늘을 원래의 팁 위치로부터 1 cm 인출하고, 줄기 세포 주사를 시작하여, 신장 피질 조직 내로의 슬러리의 에코발생성 분산에 대해 관찰하는 US 가이드 하에 분 당 1-2 ml의 세포 슬러리의 속도로 2 ml 이하의 세포 용액을 주사한다. 주사 속도를 모니터링하기 위해 타이머가 권장된다. 그 후, 주사를 정지하고, 바늘을 1 cm 더 인출하고, 2 ml 이하의 세포 용액의 2차 주사가 이어진다. 이를 세포 용액의 8 ml 이하의 총 4회 이하의 주사에 대해 반복한다. 신장 실질이 4 cm 주사 길이를 수용하지 못하면, 신장 크기가 허용하는 길이 및 상응하는 부피에서 주사가 정지된다. 바늘 구멍 당 8 ml 초과를 주사하지 않는다. 바늘 주사의 결말에서, 소형 (2-4 mm 직경 × 10 mm 길이) 겔폼 (젤라틴 스폰지, 파이자) 플러그를 18-19 ga 바늘 내로 놓은 후 바늘을 인출한다.
- [0344] 피질 내로의 바늘 관통, 장애물 또는 기타 제약으로 인해 주사 부피가 제한되어, 주사되는 총 세포 용액 부피가 신장 크기를 기초로 요구되는 주사 부피보다 적으면, NKA 전달을 계속하거나 완결하기 위해 제2 신장 천공이 필요할 것이다. 바늘 인출 및 트로카르 바늘의 안정적인 위치의 주의깊은 관찰은 보조자가 US 영상화를 관리하고 트로카르 바늘을 안정화시키는 것을 필요로 할 수 있다. 초기 바늘 배치로 불완전한 전달이 획득되면, 제2 또는 제3 주사 부위가 선택될 것이다.
- [0345] US/CT 가이드 하에, 2차 천공이 18 게이지 트로카르 바늘로 제1 전달 부위보다 적어도 2 cm 상위 또는 하위인 제2 위치 내로 이루어진다. 주사 부위는 동일한 신장 가장자리 또는 반대측을 따라 있을 수 있다. 바늘 배치, US/CT 바늘 팁 확증, 및 주사 방법이 유사한 방식으로 반복된다.
- [0346] 더 작은 신장을 위한 대안적인 방법: 신장 크기 및 깊이가 15 cm 미만이면, 더 짧은 18 ga 트로카르 바늘 및 25

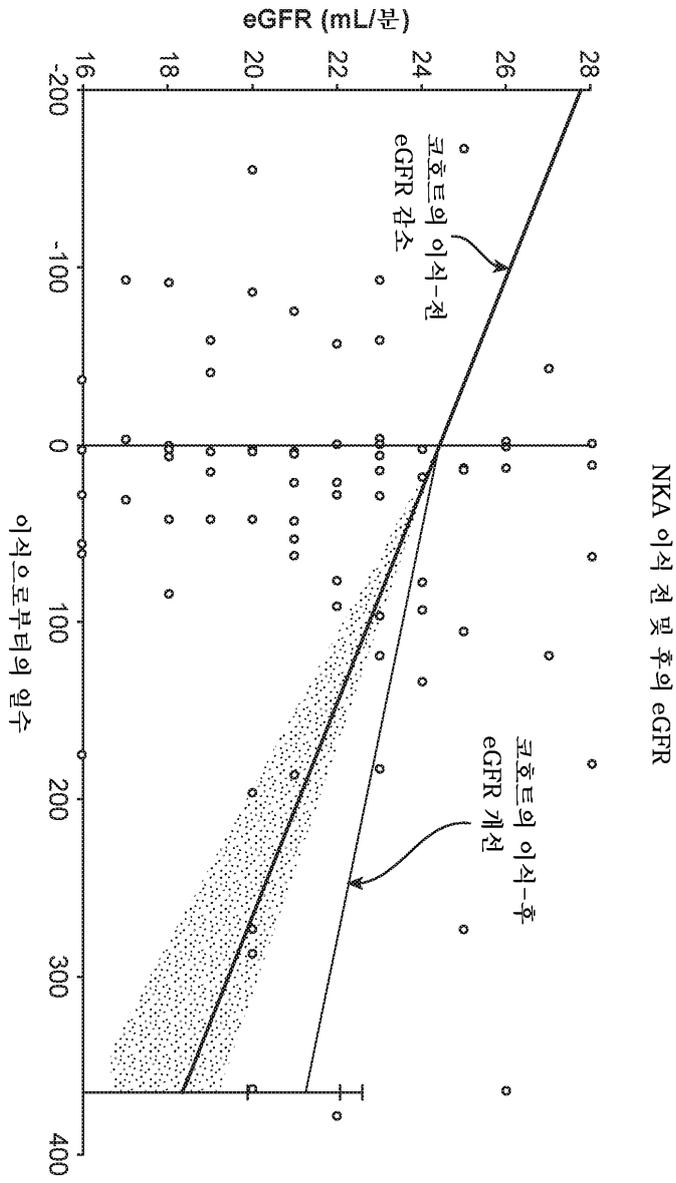
ga 내부 주사 바늘이 이용될 수 있다. 신장 깊이가 18 ga × 10 cm 바늘을 허용하면, 더 짧지만 더 큰 게이지의 내부 바늘 조합이 허용가능하다. 예를 들어, 22-25 ga 바늘 크기가 세포 주사에 허용가능하다. 바늘 팁이 이의 가장 먼 위치에 놓인 후, 1 cm 가깝게 인출되고, 세포 주사가 시작된다.

- [0347] 종피: 신장 낭종을 피한다. 필요하다면, 다른 접근 부위가 이용가능하지 않은 경우 낭종 내로 세포가 주사 및 수집되는 것을 피하기 위해 신장 낭종(들)을 흡인한다. 고형 종피를 피하고, MRI 또는 CT 영상화 및 가능한 생검을 포함하기 위해 고형 신장 종피 정밀검사를 시작한다. NKA 제조와 주사 사이에 지연이 있고 새로운 종피가 나타나지 않는 한, 고형 종피는 주사 전에 배제되어야 한다.
- [0348] 주사 속도 시간: US 관찰 하의 분 당 1-2 밀리미터의 세포 용액.
- [0349] 조영제 부재 하의 CT 스캔: 국소화 격자가 주사될 신장 위에 놓이면서 하부 간에서 신장까지의 5 mm 두께 축방향 슬라이스 및 진단 품질 mA의 CT 스캔. 후방 또는 후방-측면 접근법을 선택하여, 중간 내지 하부 극 영역 내의 다른 구조를 피한다. 필요하다면 환자는 엎드리거나 누운 자세를 취한다.
- [0350] 진정: 중등도의 얇은 진정. ASA 4,5, 기도 곤란, 환자 요청, 자세를 취할 수 없음, 심장/폐/간 동반이환 또는 기타 마취 위험 증가 상황을 포함하도록 특정 상황의 경우 진신 마취.
- [0351] CT 또는 US 가이드: 접근 각도를 다룰 수 있다면 세로 방향으로부터 또는 CT 또는 US 안내에 의해 후방 또는 측면으로부터 또는 최장 가로축을 따라 바늘이 배치된다. 바늘이 인출될 때의 미세기포 트랙을 확인하기 위해 세포 전달을 US로 관찰한다. 신장 내로의 전달의 길이 및 속도가 주사되는 세포 슬러리의 양을 결정할 것이다.
- [0352] 신장 및 인접 기관에 대한 주사 부위 합병증인 출혈을 평가하기 위해 인출 후에 최종 CT 및 US를 행한다.

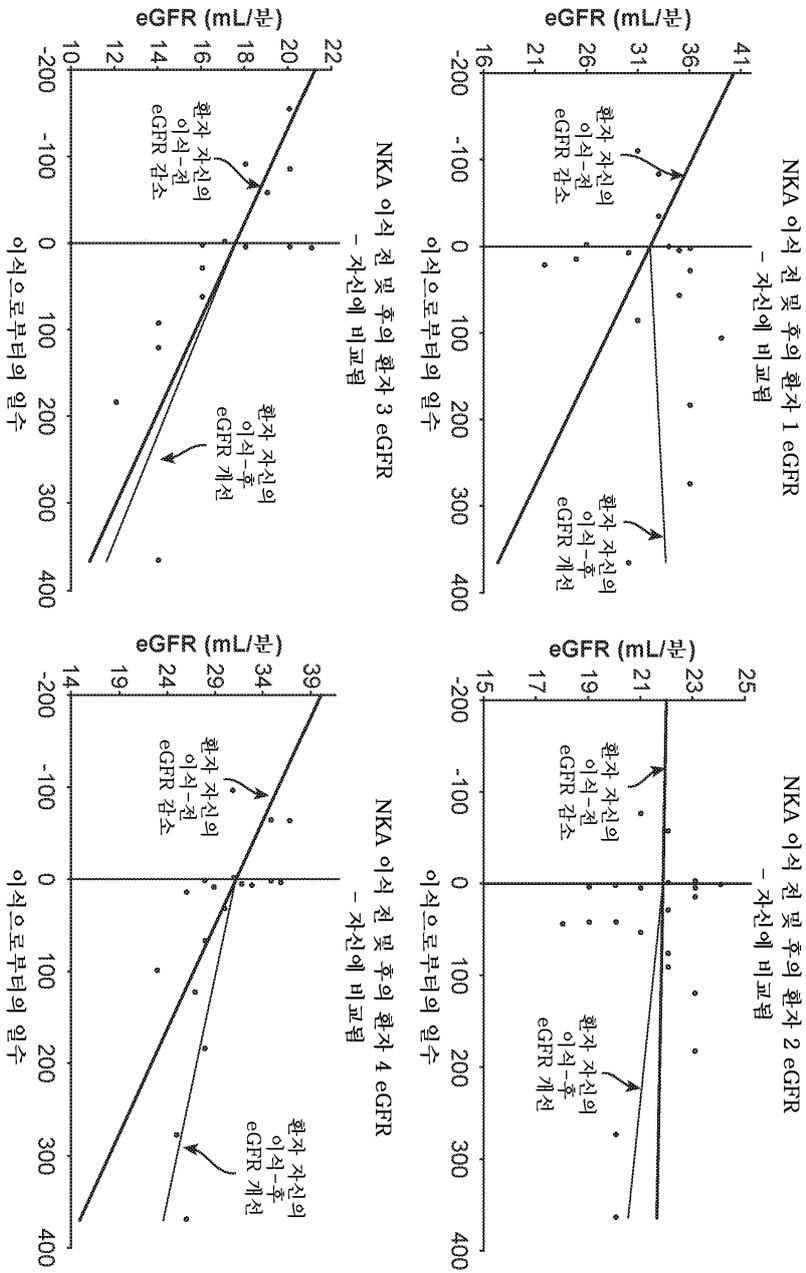
도면  
도면1



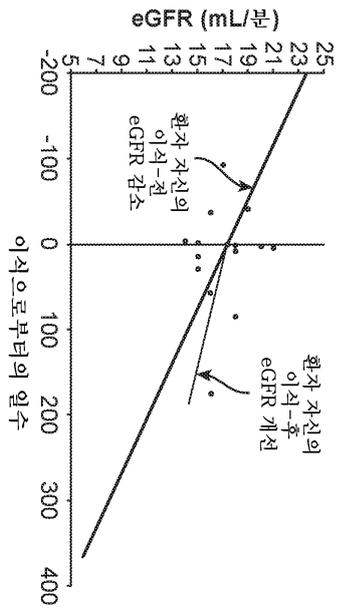
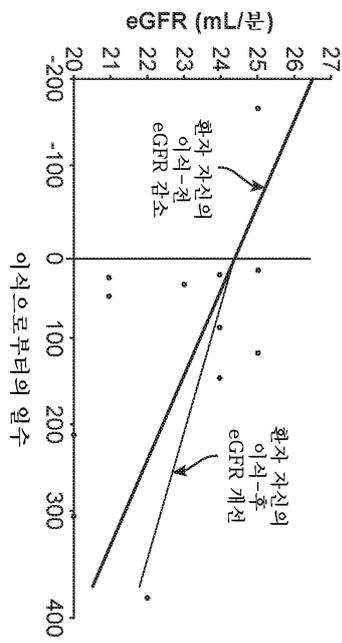
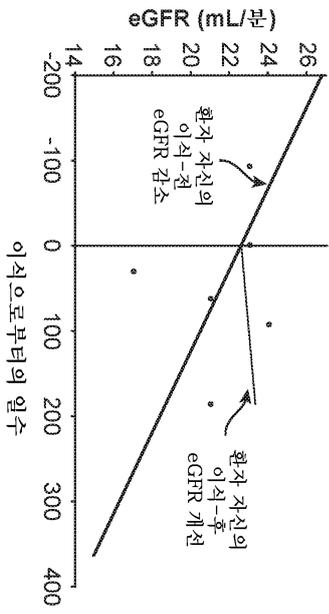
도면2



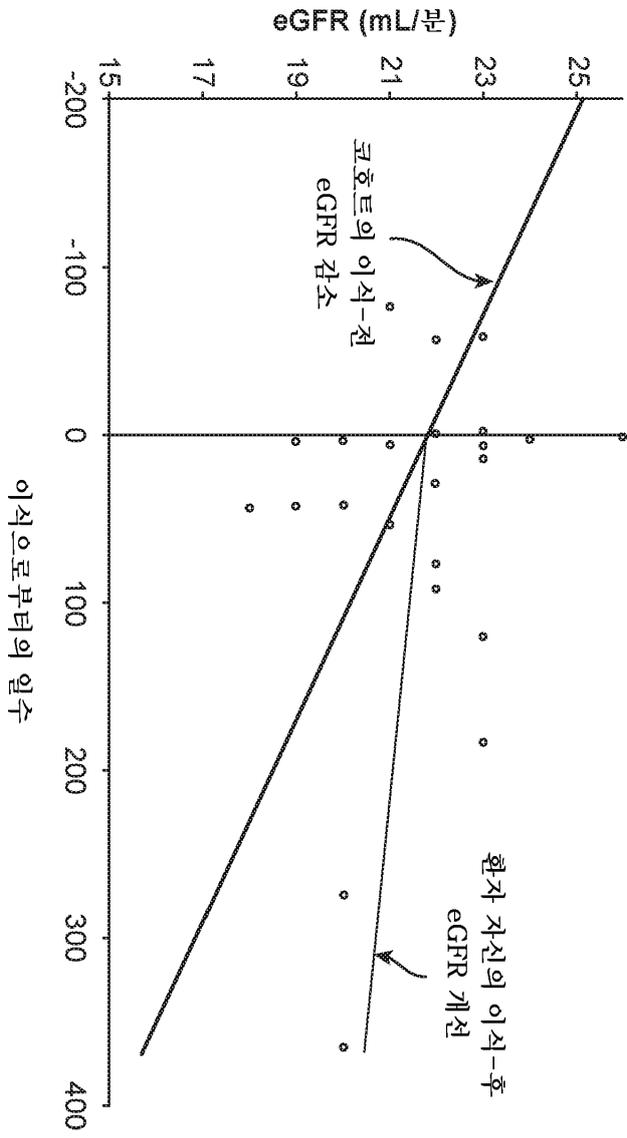
도면3i



도면3ii

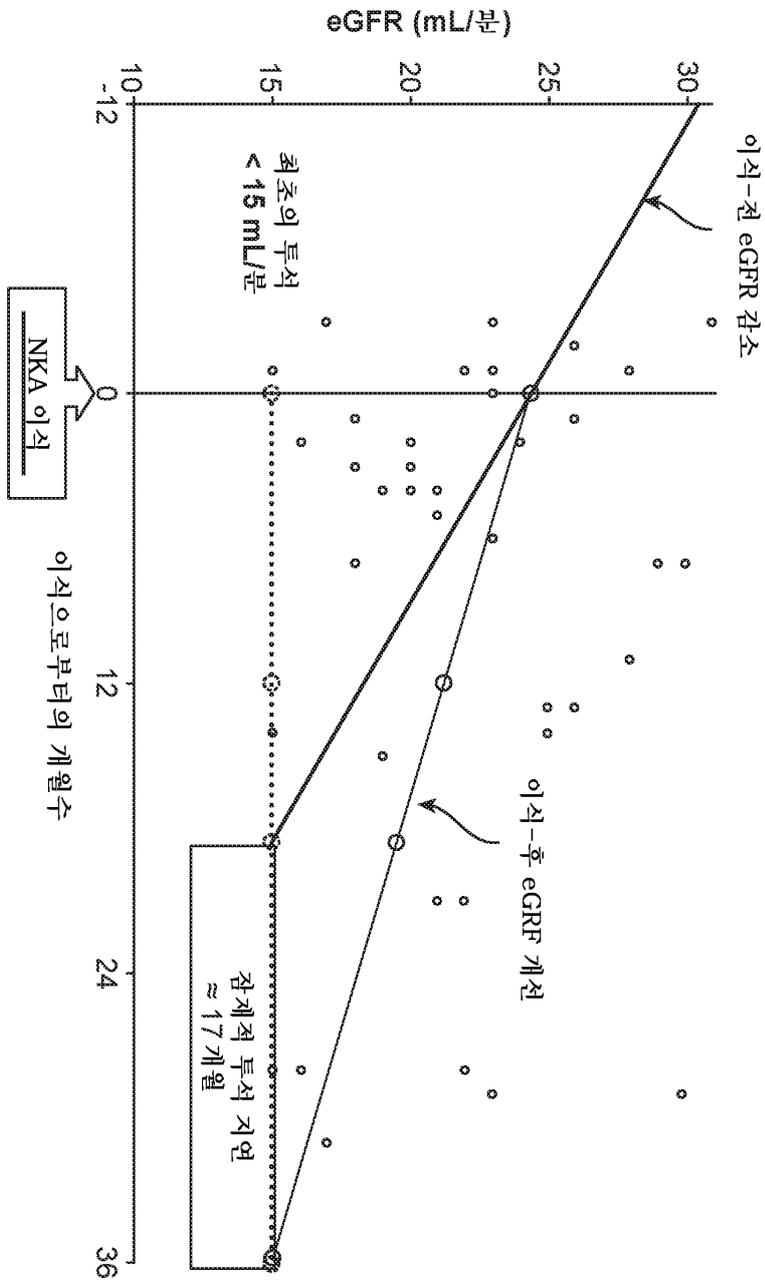


도면4

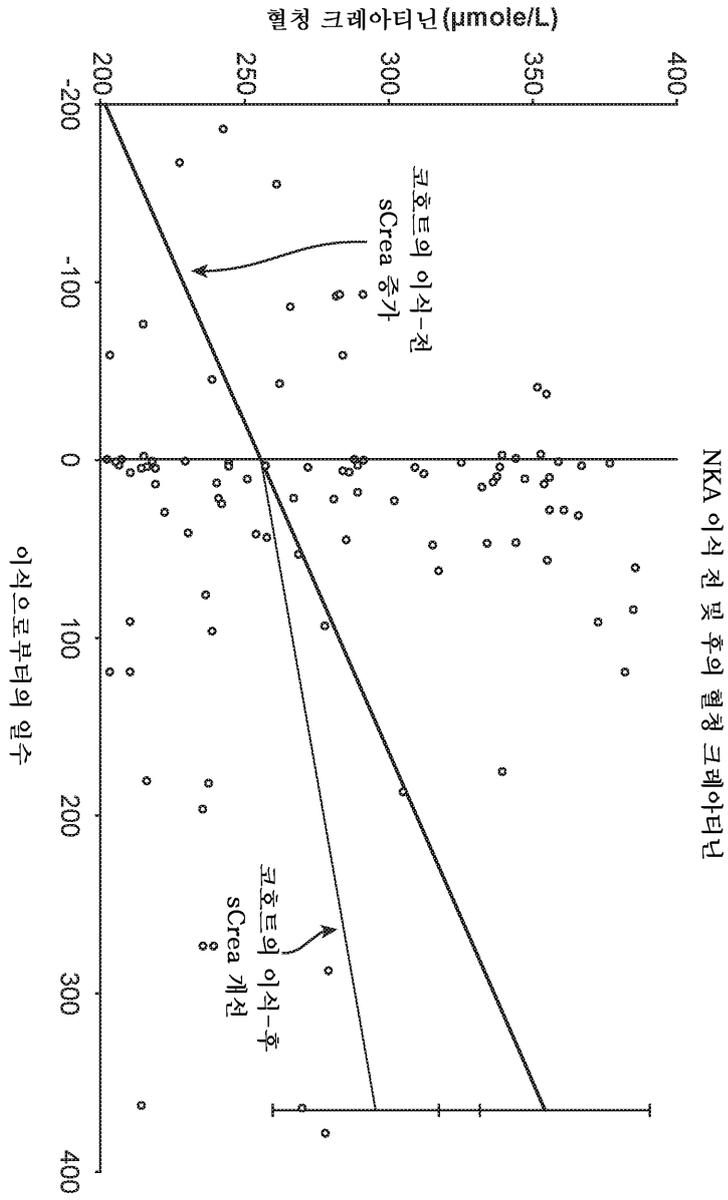


NKA 이식 전 및 후의 환자 2 eGFR  
- 코호트에 비교됨

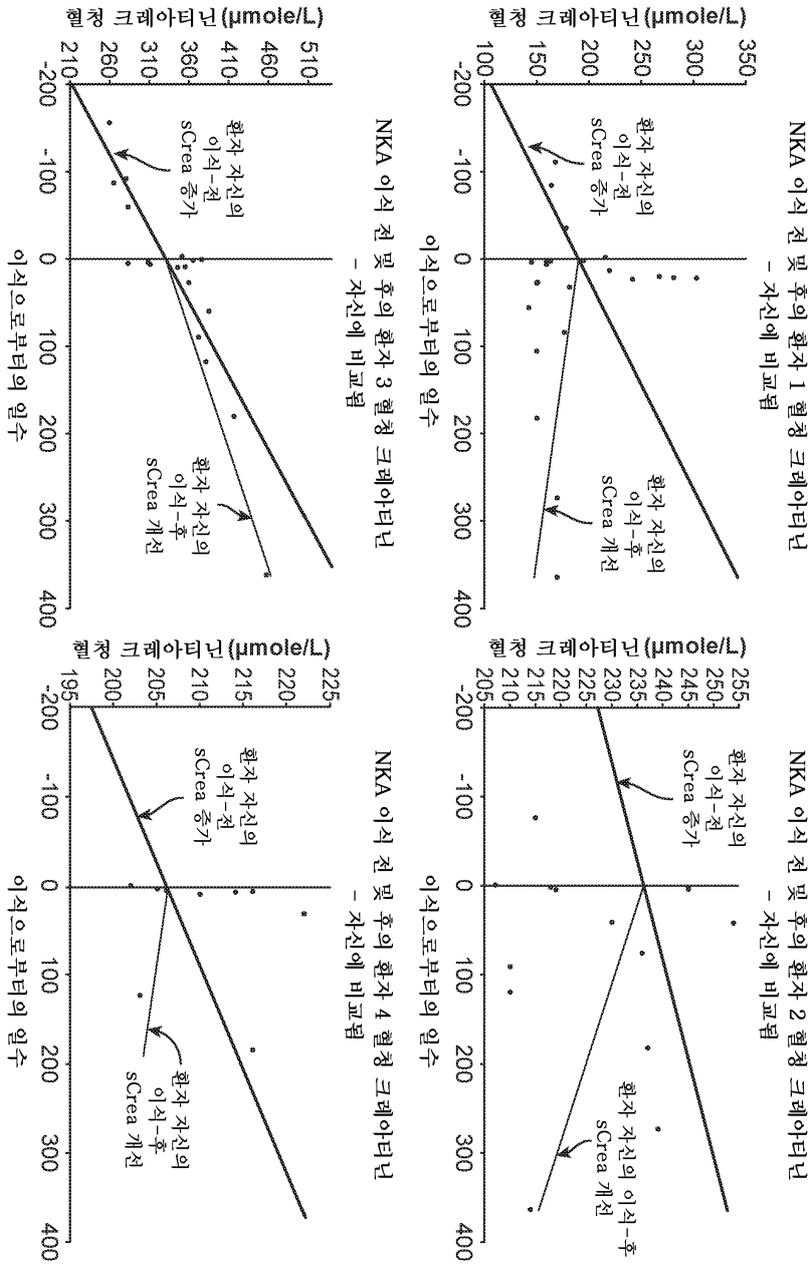
도면5



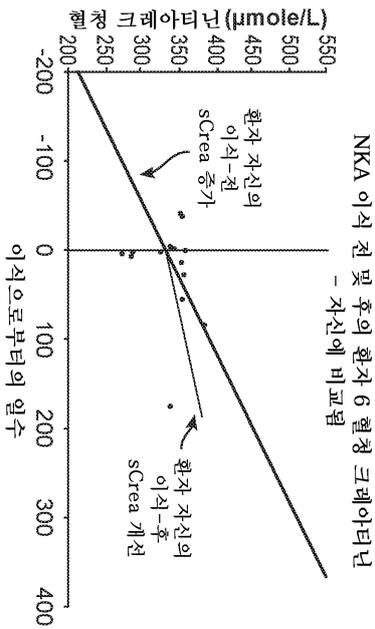
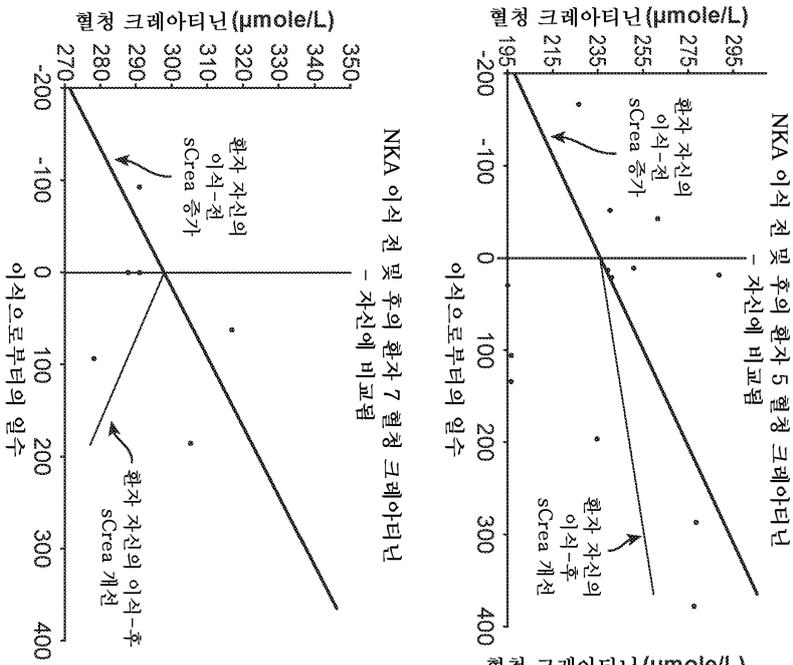
도면6



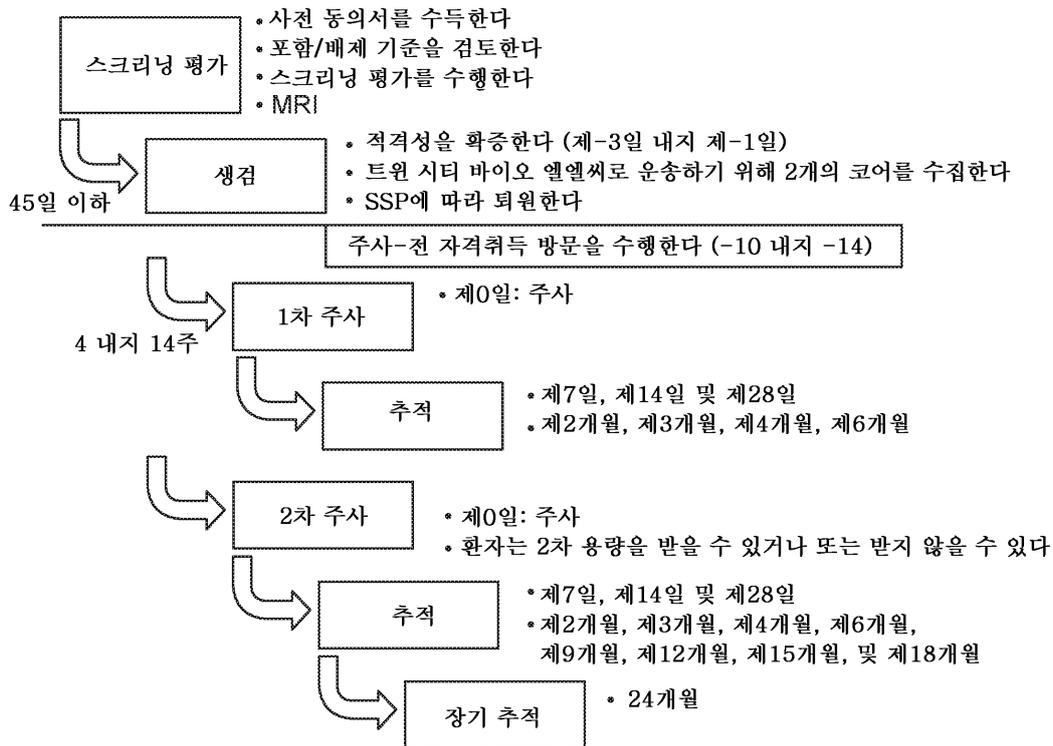
도면7i



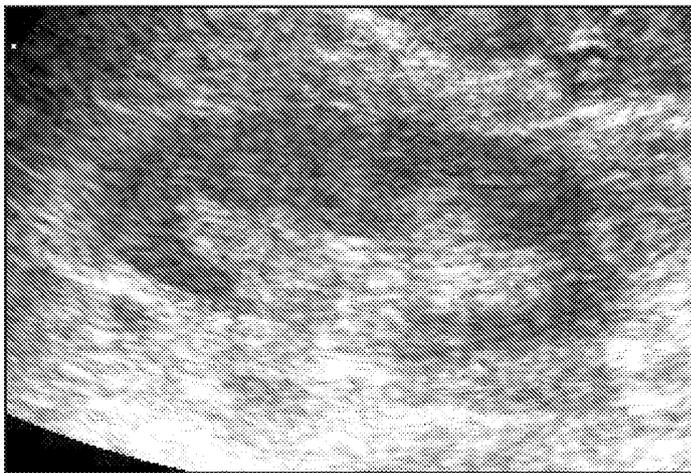
도면7ii



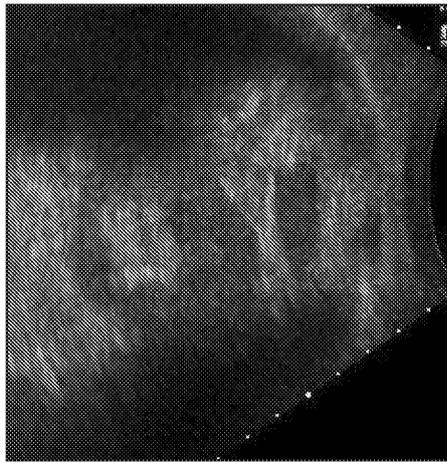
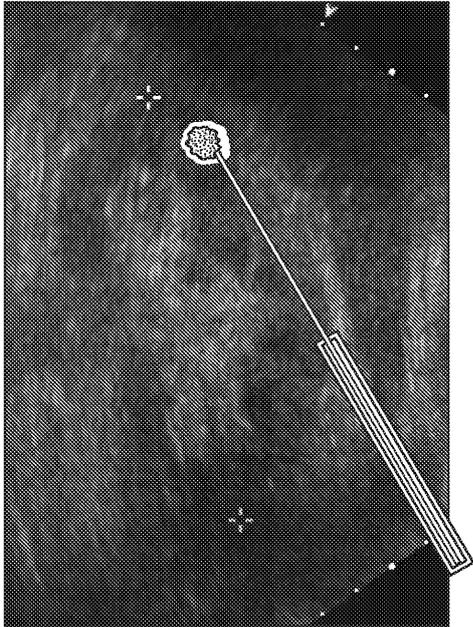
도면8



도면9



도면10



가르

도면11

