



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0029471  
(43) 공개일자 2014년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 35/22 (2006.01) A61K 35/12 (2006.01)  
A61K 31/728 (2006.01) A61P 9/04 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-7031705  
(22) 출원일자(국제) 2012년05월24일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2013년11월28일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/039416  
(87) 국제공개번호 WO 2012/166539  
국제공개일자 2012년12월06일  
(30) 우선권주장  
61/491,723 2011년05월31일 미국(US)  
61/650,911 2012년05월23일 미국(US)

(71) 출원인  
코매트릭스 카디오바스큘라 인코포레이티드  
미국, 조지아 30076, 로스웰, 올드 엘리스 로드  
1100  
(72) 발명자  
매서니, 로버트, 지.  
미국, 조지아 30092, 놀크로스, 리버 바툼 드라이브  
4370  
루이스, 비이처, 켄.  
미국, 플로리다 32312, 텔러헤시, 웨이벌리 로드  
919  
(74) 대리인  
특허법인 정안

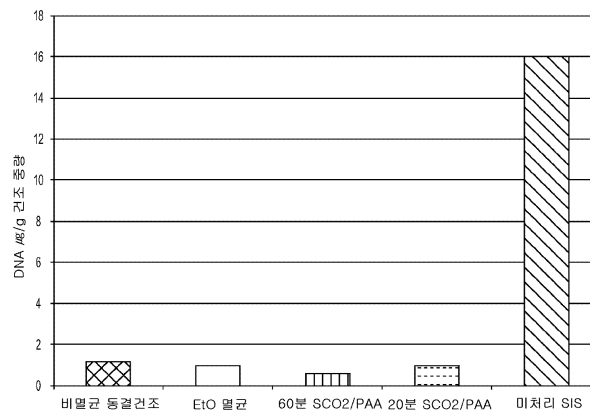
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 심부정맥을 치료하기 위한 조성물

(57) 요약

본원에서는 개체에서 심부정맥을 예방 또는 치료하기 위한 조성물 및 방법을 개시한다.

대표도



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

심부정맥을 발생할 위험이 있는 것으로 확인된 개체에서 심부정맥을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 포유동물의 세포외 기질을 포함하는 치료적 유효량의 생분해성 스핀지 조성물을 상기 개체에게 투여하는 것을 포함하되, 상기 생분해성 스핀지 조성물은 외심막 조직과 심낭 조직의 사이에 개재되어 그 조직들과 접촉하도록 투여되고 항부정맥제, 항염제, 지질 저하 약물, 세포 및 단백질 중 적어도 한 종을 추가로 포함하는 것인, 방법.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 세포가 줄기 세포인, 방법.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단백질이 히알루론산, 프로테오글리칸 및 아미노글리칸 중 적어도 한 종인, 방법.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 포유동물의 세포외 기질이 소장 점막하층, 비뇨 방광 점막하층, 위 점막하층, 간 점막하층 및 간 기저막으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 방법.

### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 포유동물의 세포외 기질이 포유동물 세포를 배양함으로써 시험관내에서 제조되는 것인, 방법.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 조성물이 합성 세포외 기질을 추가로 포함하는 것인, 방법.

### 청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 포유동물의 세포외 기질이 진피, 근막, 심낭막, 실질 조직, 및 심근 세포외 기질로 이루어진 조직들의 군에서 선택되는 것인, 방법.

### 청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 포유동물의 세포외 기질이 포유동물 조직 소스 유래의 콜라겐 지지체인, 방법.

### 청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 심부정맥이 심방 세동 또는 심실 세동인, 방법.

### 청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 개체가 심장 수술을 받은 경험이 있는, 방법.

### 청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 개체가 심근경색을 앓은 경험이 있는, 방법.

## 명세서

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2009년 2월 18일자 출원된 미국 가특허출원 제 61/153,402호의 이익을 주장하는 2010년 2월 17일자 출원된 미국 특허 출원 제 12/707,427호, 2011년 5월 31일자 출원된 미국 가특허출원 제 61/491,723 호 및

2012년 5월 23일자 출원된 미국 가특허출원 제 61/650,911호의 일부 계속 출원이고, 상기 미국 특허 출원들은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

## 배경 기술

- [0003] 심부정맥은 중요한 건강 문제를 나타낸다. 심부정맥으로는 심실 빈맥, 심실 상성 빈맥 및 심방 세동이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들 중에서, 심방 세동은 가장 흔한 심부정맥이다. 미합중국의 경우만 일백만 명 이상의 사람들이 심방 세동을 앓고 있는 것으로 추정되어 왔다. 심방 세동은 연령의 증가에 따라 더욱 흔하게 되는 경향이 있기 때문에 미합중국 및 유럽 인구의 고령화 추세에 따라 심방 세동의 발병률은 향후 수십 년에 걸쳐서 증가할 것으로 예상된다.
- [0004] 심장 수술 후의 부정맥은 질병률 및 치사율의 주요한 원인이다. 부정맥의 내성(tolerability)은 수술 전 기간 동안의 유사한 부정맥의 경우보다 수술 후 기간 동안이 더 낮다. 심근 기능부전의 가능성으로 인해 혈액동력학적 불안정성의 가능성이 더욱 높다. 심폐 우회로, 수술 동안 전도계의 손상, 및 대사성 및 전해질 이상, 특히 저칼륨혈증 및 저마그네슘혈증은 수술 후 부정맥의 발병률 증가의 원인이 된다. 또한, 향상된 교감신경 긴장에 따른 수술의 스트레스 및 근육수축 지원의 사용도 추가된 요인이다. 반흔 관련 회귀성(scar-related re-entry)으로 인해 지연된 부정맥이 나타날 수 있다.
- [0005] 심방 세동은 정상 동리듬(sinus rhythm)을 유지하고/하거나 심실 반응 속도를 감소시키기 위한 약물을 이용하여 치료될 수 있다. 구체적으로, 과거의 시도들 중 많은 것들은 약물요법, 고주파 절제, 이식가능한 기구의 사용 및 관련 접근방법으로 한정되어 왔다. 약물 요법이 몇몇 부정맥 증상을 감소시키기 위한 대중적인 경로로 남아 있지만, 전신 효과가 흔히 불충분하게 허용된다는 인식이 있어왔다. 또한, 많은 약물이 나타내는 부정맥 유발 경향은 많은 경우 사망률을 증가시킬 수 있다는 판단이 있다. 심부정맥을 치료하기 위한 더욱 효과적인 조성물 및 방법이 바람직하게 된다.
- [0006] 본 발명은 일반적으로, 심부정맥을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 멸균된 무세포성 세포외 기질 조성물 및 이러한 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 세포외 기질 조성물을 멸균과 동시에 탈세포화하는 방법 및 이러한 방법으로부터 얻어지는 것으로, 심장 수술을 받은 경험이 있거나 심근 경색을 앓은 경험이 있는 개체에서 심부정맥을 치료 또는 예방하기 위하여 사용하기 위한 멸균된 무세포성 조성물에 관한 것이다.
- [0007] 조직 조성물을 멸균하기 위한 통상적인 기법은 흔히 성장 인자와 같은 조직 조성물의 중요 성분을 손상시키고/시키거나 조직 조성물의 특성을 변화시킨다. 따라서, 이러한 통상적인 멸균 기법은 조직 조성물을 이의 예정 목적에 부적합하게 만든다. 예를 들어, 산화에틸렌은 조직 조성물을 약화시키고, 조직 조성물의 성장 인자 함량을 감소시키고 조직 조성물내의 단백질을 변성시킬 수 있는 독성이고, 돌연변이 유발성이고 발암성인 물질이다. 마찬가지로, 통상적인 증기 멸균 기법은 조직 조성물의 생체 고분자에 적합하지 않고, 감마 방사선은 조직 조성물의 건전성(integrity)의 유의한 감소를 초래한다. 조직 조성물의 특성을 변화시키지 않고 조직 조성물을 멸균하는 기법들이 알려져 있으나, 이러한 기법들 중 많은 것들, 예를 들어 항균 세척은 종종 조직 조성물을 완전히 멸균하지 못하고/하거나 조직 조성물에 잔류 독성 오염물을 남긴다.
- [0008] 게다가, 조직 조성물이 개체의 신체내로 이식을 위한 것인 경우, 그 조직 조성물은 종종 별개의 시간 소모적인 탈세포화 과정에 노출되어야 한다. 이러한 탈세포화 공정은 조직 조성물로부터 세포를 제거하여, 개체의 면역계가 이식 조직 조성물을 거부하고/하거나 유의한 염증 반응을 일으키는 가능성을 감소시키기 위한 것이다. 그러나, 통상적인 탈세포화 기법은 단지 조직 조성물의 일부만을 탈세포화하여 천연 세포가 탈세포화 공정 후 조직 조성물 내에 잔류하게 된다.
- [0009] NovaSterilis사에 양도된 미국 특허 제 7,108,832호('832 특허)는 초임계 이산화탄소의 사용을 통해 여러 물질들을 멸균하는 방법을 개시하고 있다. 그러나, 다른 알려진 멸균 방법과 마찬가지로, '832 특허에 개시된 방법을 이용하여 멸균되는 조직 조성물은 전술한 바와 같은 별개의 탈세포화 공정에 노출되어야 한다.
- [0010] 따라서, 당 업계에서는 세포외 기질 조성물과 같은 조직 조성물을 멸균 및 탈세포화하는 방법에 대한 필요성이 있다. 더욱 구체적으로, 당 업계에서는 (a) 조직 조성물의 본래의 특성을 유지하면서 조직 조성물을 멸균하고, (b) 그 조직 조성물을 탈세포화하여 그 조직 조성물이 무세포성이 되도록 하는 방법에 대한 필요성이 존재한다. 또한, 심부정맥을 치료 또는 예방하기 위한 목적의 조직 조성물의 멸균 및/또는 탈세포화 동안 조직 조성물내로 첨가제의 혼입을 강화하는 방법에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

## 발명의 내용

[0011]

### 요약

[0012]

본원에서 구체화되고 광범위하게 기재되는 바와 같은 본 발명의 목적에 따라, 본 발명은 개체 내에서 심부정맥을 치료 또는 예방하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0013]

또한, 본 발명은 심장 수술을 받은 경험이 있거나 심근 경색을 앓은 경험이 있는 개체에서 심부정맥을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 세포외 기질(ECM) 물질을 멸균 및 탈세포화하는 방법에 관한 것이다. 하나의 양상에서, 상기 방법은 선택된 ECM 조직을 수집하고, 상기 선택된 ECM 조직을 동결하고, 선택된 ECM 조직을 해동하고, ECM 물질을 분리하는 것을 포함한다. 상기 분리된 ECM 물질은 배양 및 세척된 다음, 초임계 이산화탄소에서 처리된 다음 급속 감압(rapid depressurization)에 노출된다. ECM 물질의 급속 감압 동안 또는 이후에, 얻어지는 ECM 조성물에 원하는 특성을 부여하기 위해 한 종 이상의 첨가제가 ECM 물질에 혼입될 수 있다. 급속 감압은 ECM 조성물내의 한 종 이상의 첨가제의 혼입을 강화한다. 또한, 개시된 방법을 이용하여 제조한 멸균된 무세포성의 ECM 조성물이 개시된다.

[0014]

개시된 방법 및 조성물의 추가의 이점은 하기의 설명에서 부분적으로 기재하기로 하며, 하기의 설명으로부터 부분적으로 이해되거나, 개시된 방법 및 조성물의 실시를 통해 이해될 수 있다. 개시된 방법 및 조성물의 이점은 특허청구범위에서 특허 기재되어 있는 요소 및 조합들을 통해 실현 및 달성될 수 있다. 전술한 일반적인 설명 및 하기의 상세한 설명 모두는 오로지 예시적이고 설명적인 것으로서 청구된 본 발명을 제한하지 않는 것으로 이해하여야 한다.

## 도면의 간단한 설명

[0015]

본 발명의 바람직한 실시예의 이러한 특징 및 다른 특징들은 첨부 도면을 참조한 하기의 상세한 설명에서 더욱 명백하게 된다.

도면에서,

도 1 및 도 2는 본원에 개시한 멸균 방법을 비롯한 여러 멸균 방법을 수행한 후 소장 점막하층(SIS) 조성물에 대하여 DNA 함량을 측정된 실험의 결과를 도시한다. 도 1은 멸균 후 각각의 SIS 조성물의 DNA 함량을 도시한다. 도 2는 멸균 후에 각각의 SIS 조성물로부터 제거된 DNA의 비율을 원료상태의 미처리 SIS와 비교하여 도시한다.

도 3 및 도 4는 본원에 개시한 멸균 방법을 비롯한 여러 멸균 방법을 수행한 후 소장 점막하층(SIS) 조성물에 대한 천연 성장 인자 함량을 측정된 실험의 결과를 도시한다. 도 3은 멸균 후 각각의 SIS 조성물의 bFGF 함량(시료의 건조 중량에 의해 표준화됨)을 도시한다. 도 4는 멸균 후 각각의 SIS 조성물의 활성 TGF- $\beta$  함량(시료의 건조 중량에 의해 표준화됨)을 도시한다.

도 5는 본원에 개시한 바와 같은 급속 감압 후 SIS 조성물 내로 bFGF를 혼입한 실험의 결과를 도시한다. 도 5는 급속 감압 후 각각의 SIS 조성물의 bFGF 함량(시료의 건조 중량에 의해 표준화됨)을 도시한다.

도 6은 본원에서 개시한 멸균 방법을 비롯한 여러 멸균 방법을 수행한 후 2겹(two-ply) SIS 조성물의 인장 강도를 측정된 실험의 결과를 도시한다. 도 6은 멸균 후 각각의 SIS 조성물에 대하여 측정된 인장 강도를 도시한다.

도 7은 본원에서 개시한 멸균 및 탈세포화 방법을 비롯한 여러 가지 멸균 및/또는 탈세포화 방법을 수행한 후 SIS 조성물에 대한 천연 성장 인자 함량을 측정된 실험 결과를 도시한다. 도 7은 멸균 및/또는 탈세포화 후 각각의 SIS 조성물에 대한 bFGF 효소 결합 면역분석(ELISA) 결과(시료의 건조 중량에 의해 표준화됨)를 도시한다.

도 8은 여러 방법으로 처리한 후의 SIS의 DNA 함량을 도시한다. 기선 측정치는 미처리된 것이다. 다음에, 조직을 초임계 CO<sub>2</sub>에 노출시킨 다음, 급속 감압(RDP)에 노출시켜서 DNA 및 세포 부스러기의 향상된 제거를 용이하게 했다. RDP 후, 그 조직을 멸균을 위해 과아세트산(PAA)과 함께 초임계 CO<sub>2</sub>에 위치시켰다. 비교는 산화에틸렌(ETO)을 이용하여 멸균되거나 또는 멸균되지 않은 처리된 SIS에 대한 것이다.

도 9는 여러 방법으로 처리된 후의 SIS로부터 DNA의 제거율(%)을 도시한다. 기선 측정치는 미처리된 것이다. 조직을 초임계 CO<sub>2</sub>에 노출시킨 다음 급속 감압(RDP)에 노출시켜서 DNA 및 세포 부스러기의 향상된 제거를 용이

하게 했다. RDP 후, 그 조직을 멸균을 위해 과아세트산(PAA)과 함께 초임계 CO<sub>2</sub>에 위치시켰다. 비교는 산화에틸렌(ETO)을 이용하여 멸균되거나 또는 멸균되지 않은 처리된 SIS에 대한 것이다.

도 10은 여러 방법으로 처리한 후의 SIS의 가변 활성 전환 성장 인자(TGF-beta) 함량을 도시한다. 기선 측정치는 Triton X-100 (TX-100) 단독으로 나중에 처리되는 원료상태 또는 미처리된 SIS이다. 다음에, 조직을 초임계 CO<sub>2</sub>에 노출시킨 다음 급속 감압(RDP)에 노출시켜서 DNA 및 세포 부스러기의 향상된 제거를 용이하게 했다. RDP 후, 그 조직을 멸균을 위해 과아세트산(PAA)과 함께 초임계 CO<sub>2</sub>에 위치시켰다. 비교는 산화에틸렌(ETO)을 이용하여 멸균되거나 또는 멸균되지 않은 처리된 SIS에 대한 것이다.

도 11은 여러 방법으로 처리한 후의 SIS의 가변 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF) 함량을 도시한다. 기선 측정치는 Triton X-100 (TX-100) 단독으로 나중에 처리되는 원료상태 또는 미처리된 SIS이다. 다음에, 조직을 초임계 CO<sub>2</sub>에 노출시킨 다음 급속 감압(RDP)에 노출시켜서 DNA 및 세포 부스러기의 향상된 제거를 용이하게 했다. RDP 후, 그 조직을 멸균을 위해 과아세트산(PAA)과 함께 초임계 CO<sub>2</sub>에 위치시켰다. 비교는 산화에틸렌(ETO)을 이용하여 멸균되거나 또는 멸균되지 않은 처리된 SIS에 대한 것이다.

도 12는 급속 감압 후 SIS에의 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF)의 첨가를 도시한다. 기선 측정치는 원료상태 또는 미처리된 SIS이다. 비교는 산화에틸렌(ETO)을 이용하여 멸균되거나 또는 멸균되지 않은 처리된 SIS에 대한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### 상세한 설명

본 발명은 하기의 상세한 설명, 실시예 및 특허청구범위, 및 이들의 이전 및 이후 설명을 참조하여 더욱 용이하게 이해될 수 있다. 그러나, 본 발명의 장치, 시스템 및/또는 방법을 개시 및 설명하기 전에, 개시된 특정 장치, 시스템 및/또는 방법은 변화할 수 있음은 물론 이므로 본 발명은 달리 명시하지 않는 경우 이러한 개시된 것들로 제한되지 않는다는 것을 이해하여야 한다. 또한, 본원에서 사용되는 용어는 특정 양상을 설명하기 위한 목적을 위한 것으로서, 제한되려는 것이 아님을 이해하여야 한다.

개시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있거나, 그와 함께 사용될 수 있거나, 그의 제조에 사용될 수 있거나 그의 생성물인 물질, 조성물 및 성분이 개시된다. 이들 물질 및 다른 물질이 본원에서 개시되고, 이러한 물질들의 조합, 서브세트, 상호작용, 그룹 등이 개시되는 경우, 이러한 화합물들의 여러 개별적이고 집합적인 조합 및 순열들이 명백하게 개시될 수 있는 것이 아니고 각각이 본원에서 구체적으로 예상되고 기재되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 펩티드가 개시 및 토의되고 펩티드를 비롯한 다수의 분자들에 대해 이루어질 수 있는 다수의 변경이 기재되는 경우, 펩티드의 각각 및 모든 조합 및 순열 및 가능하게 되는 변경은 달리 구체적으로 나타내지 않는 경우 구체적으로 예상된다. 따라서, 분자 A, B 및 C의 부류가 기재되는 외에도 분자 D, E 및 F의 부류 및 분자 A 내지 D의 조합의 예가 개시되는 경우에는, 각각이 개별적으로 언급되지 않더라도 각각은 개별적이고 집합적으로 예상된다. 따라서, 이러한 예에서, 조합 A 내지 E, A 내지 F, B 내지 D, B 내지 E, B 내지 F, C 내지 D, C 내지 E 및 C 내지 F의 각각이 구체적으로 예상되고 A, B 및 C, D, E 및 F, 조합 A 내지 D의 개시로부터 개시된 것으로 간주되어야 한다. 마찬가지로, 이들의 임의의 서브세트 또는 조합도 구체적으로 예상되고 개시된다. 따라서, 예를 들어, A 내지 E, B 내지 F 및 C 내지 E의 서브그룹이 구체적으로 예상되고 A, B 및 C, D, E 및 F, 조합 A 내지 D의 개시로부터 개시된 것으로 간주되어야 한다. 이러한 개념은, 개시된 조성물을 제조 및 사용하는 방법에서의 단계들을 포함하나 이에 제한되지 않는 본 출원의 모든 양상에 적용된다. 따라서, 여러 가지 추가의 단계들이 수행될 수 있는 경우, 이들 추가의 단계들은 각각 개시된 방법의 임의의 특정 실시예 또는 실시예들의 조합을 이용하여 수행될 수 있는 것으로 이해되고, 각각의 이러한 조합이 구체적으로 예상되고 본원에 개시된 것으로 간주하여야 하는 것으로 이해된다.

당업자는 본원에 기재한 방법 및 조성물의 특정 실시예에 대한 많은 등가물을 인식할 수 있거나 많지 않은 통상적인 실험을 이용하여 확인할 수 있다. 이러한 등가물은 첨부한 특허청구범위에 포함된다.

개시한 방법 및 조성물은 변화할 수 있으므로, 기재된 특정 방법, 프로토콜 및 시약으로 제한되지 않는 것으로 이해된다. 또한, 본원에 사용된 용어는 오로지 특정 실시예들을 설명하기 위한 것으로서, 특허청구범위에 의해서만 제한되는 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아님을 이해하여야 한다.

A. 정의



- [0022] 달리 정의하지 않는 경우, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 개시된 방법 및 조성물이 속하는 기술 분야의 당업자가 일반적으로 이해하고 있는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사 또는 동일한 임의의 방법 및 물질이 본 방법 및 조성물에의 실시 및 시험에서 사용될 수 있으나, 특히 유용한 방법, 장치 및 물질이 기재된다.
- [0023] 본원 및 특허청구범위에서 사용되는 단수형 "a," "an," 및 "the"은 달리 명백히 나타내지 않는 경우 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "하나의 화합물"에 대한 언급은 복수의 이러한 화합물을 포함하고, "그 화합물"에 대한 언급은 당업자에게 알려진 한 종 이상의 화합물 및 이의 등가물 등을 포함한다.
- [0024] 본원에서 사용되는 용어 "또는"은 특정 목록의 어느 하나의 멤버를 의미하고 그 목록의 멤버들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0025] 본원에서 사용되는 용어 "선택적" 및 "선택적으로"는 나중에 기재되는 경우 또는 상황이 일어나거나 일어나지 않을 수 있는 것을 의미하고 그 기재가 상기 경우 또는 상황이 일어나는 경우 및 일어나지 않는 경우를 포함한다는 것을 의미한다.
- [0026] 본원에서 범위는 "대략적인" 하나의 특정 값 내지 "대략적인" 또 다른 특정 값으로 표시될 수 있다. 이러한 범위가 표시되는 경우, 또 다른 양상은 하나의 특정 값 내지 또 다른 특정 값을 포함한다. 마찬가지로, 값들이 선행사 "약"을 이용하여 근사치로 표시되는 경우, 그 특정 값은 또 다른 양상을 구성하는 것으로 이해된다. 또한, 각각의 범위의 종점은 다른 종점에 관련하여 유의하고 다른 종점과 무관하게 유의한 것으로 이해된다. 또한, 본원에서는 다수의 값들이 기재되고, 그 각각의 값은 값 자체 외에도 "약" 특정 값으로 본원에 개시되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 값 "10"이 개시되는 경우, "약 10"이 또한 개시된다. 또한, 그 값 이하의 값이 개시되는 경우, 당업자가 적절히 이해하는 바와 같이 그 값 이상의 값 및 값들 사이의 가능한 범위가 또한 개시되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 값 "10"이 개시되는 경우, 10 이하 외에도 10 이상이 또한 개시된다. 또한, 본 출원서 전체에 걸쳐서, 데이터는 다수의 상이한 포맷으로 제공되고 이러한 데이터는 종점, 출발점, 및 그 데이터 점들의 임의의 조합에 대한 범위를 나타내는 것으로 이해된다. 예를 들어, 특정 데이터 점 "10" 및 특정 데이터 점 15가 개시되는 경우, 10 및 15 초과, 이상, 이하 및 이와 동일 값 외에도 10과 15의 사이가 개시되는 것으로 이해된다. 또한, 두 개의 특정 단위 사이의 각각의 단위가 또한 개시되는 것으로 예상된다. 예를 들어, 10 및 15가 개시되는 경우, 11, 12, 13 및 14가 또한 개시된다.
- [0027] 본 명세서의 설명 및 특허청구범위 전체에 걸쳐서, 단어 "포함한다" 및 그 단어의 어미변화, 예를 들어 "포함하는" 및 "포함한다"는 "포함하나 이에 제한되지 않는다"를 의미하고 예를 들어 다른 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하려는 것이 아니다.
- [0028] 본 명세서 전체에 걸쳐서, 여러 가지 간행물이 참조된다. 이러한 간행물들의 전체 개시내용은 본 발명이 속하는 기술 분야의 상태를 더욱 충분히 기재하기 위하여 본원에 참조로 포함된다. 또한, 개시된 참조 문헌은 그 참조문헌이 의존하는 있는 문장에 기재된 것들에 포함된 자료에 대하여 개별적이고 구체적으로 본원에 참조로 포함된다. 본원에서의 그 어느 것도 종래 발명이 본 발명의 개시내용을 앞선다는 것을 인정하는 것이 아니다. 임의의 참조문헌이 종래 기술을 구성한다는 것을 인정하는 것이 아니다. 참조문헌의 검토는 그 저자가 주장하는 것을 말하고, 본 출원인은 인용 문헌의 정확성 및 적절성에 의심하기 위한 권리를 유보한다.
- [0029] A. 방법
- [0030] 본원에서는 개체에서 심부정맥을 치료 또는 예방하는 방법을 개시한다. 그 방법은 포유동물의 세포외 기질(ECM)을 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 개체의 심장 조직에 투여하는 것을 포함한다.
- [0031] 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 천연 소스로부터 유래한 것이다. 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 포유동물 세포를 이용하여 시험관내에서 제조된다. 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 포유동물의 조직/장기로부터 직접 추출된다. 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물은 합성 ECM을 추가로 포함한다.
- [0032] 몇몇 양상에서, 상기 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 반흔 형성을 억제한다. 몇몇 양상에서, 상기 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 손상 조직의 재생을 촉진한다. 몇몇 양상에서, 상기 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 염증을 억제한다.
- [0033] "치료"는 질병, 병리학적 상태 또는 장애를 치유, 완화, 안정화 또는 예방하는 목적으로 환자를 의학적으로 관리하는 것을 의미한다. 이러한 용어는 적극적 치료, 즉 질병, 병리학적 상태 또는 장애의 개선을 위해 구체적으로 지시된 치료를 포함하고, 원인 치료, 즉 관련 질병, 병리학적 상태 및 장애의 원인의 제거를 위해 지시된

치료를 포함한다. 또한, 이러한 용어는 완화 치료, 즉 질병, 병리학적 상태 또는 장애의 치료 보다는 증상의 완화를 위한 치료, 예방적 치료, 즉 관련 질병, 병리적 상태 또는 장애의 발생을 최소화 또는 부분적으로 또는 완전히 억제하기 위한 치료, 및 지지 치료, 즉 관련 질병, 병리학적 상태 또는 장애의 개선을 위해 지시된 또 다른 특정의 요법을 보충하기 위해 이용되는 치료를 포함한다.

[0034] "예방한다" 또는 "예방하는"은 질병 또는 상태의 빈도 또는 심각성을 감소시키는 것을 의미한다. 상기 용어는 질병 또는 상태의 절대적인 저지를 필요로 하지 않는다. 오히려, 이러한 용어는 질병 발생의 가능성을 감소시키는 것을 포함한다. 따라서, 본원에서는 개체에서 심부정맥의 발생 및/또는 심각성을 감소시키는 방법으로서, 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 상기 개체의 심장에 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0035] 용어 "치료적 유효량"은 사용되는 조성물의 양이 질병 또는 장애의 하나 이상의 원인, 증상 또는 후유증을 완화하기에 충분한 양이다. 이러한 완화는 질병 또는 장애의 감소 또는 변경을 필요로 하지만 원인, 증상 또는 후유증의 제거를 반드시 필요로 하는 것은 아니다.

[0036] 본원에서 사용되는 용어 "심장 조직"은 심장의 심근막, 외심막, 심장내막 및 심낭막을 포함한다. 또한 본원에서 사용되는 상기 용어는 심장으로 이어지거나 심장으로부터 나오는 대혈관을 의미한다. 또한 본원에서 사용되는 상기 용어는 심장을 자극하는 미주 신경의 부분을 의미한다.

[0037] 따라서, 몇몇 양상에서, 상기 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을 개체의 심장에 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 양상에서, 상기 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을 개체의 심근막에 투여하는 것을 포함한다. 상기 심근막은 심실의 심근막일 수 있다. 상기 심근막은 심방의 심근막일 수 있다. 몇몇 양상에서, 상기 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을 개체의 외심막에 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 양상에서, 상기 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을 개체의 심장내막에 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 양상에서, 상기 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을 개체의 심낭막에 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 양상에서, 상기 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을 개체의 외심막과 심낭막의 사이의 공간에 투여하는 것을 포함한다.

[0038] 몇몇 양상에서, 상기 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을 개체의 대혈관에 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 양상에서, 상기 혈관은 개체의 상대정맥, 하대정맥, 폐정맥 또는 대동맥이다. 예를 들어, 상기 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을 한 종 이상의 대혈관의 외부에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 양상에서, 상기 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을 심장 순환계에 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 상기 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을 혈관 또는 심실에 투여하는 것을 포함한다.

[0039] 심장의 부교감 신경성 지배(parasympathetic innervation)는 미주신경에 의해 매개된다. 우측 미주 신경은 동심방(SA) 결절을 자극한다. 부교감 신경성 과다자극은 서맥성 부정맥에 걸리기 쉽게 한다. 좌측 미주 신경은 과다 자극시 신장이 방실(AV) 차단되도록 한다. 따라서, 몇몇 양상에서, 상기 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물을, 심장을 자극하는 개체의 미주 신경 부분에 투여하는 것을 포함한다.

[0040] 본원에서 사용되는 용어 "개체"는 투여 대상인 임의의 개체를 의미한다. 상기 개체는 척추동물, 예를 들어 포유동물일 수 있다. 따라서, 개체는 인간일 수 있다. 이러한 용어는 특정 연령이나 성별을 나타내는 것이 아니다. 따라서, 남성이건 여성이건 상관없이 성숙한 개체 및 신생 개체 외에도 태아가 포함된다. 환자는 질병 또는 장애로 고생하는 개체를 의미한다. 용어 "환자"는 인간 및 수의학적 개체를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "환자" 및 "개체" 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0041] 몇몇 양상에서, 개시된 방법의 개체는 심부정맥을 발생하는 위험이 있는 것으로 확인되어 왔다. 몇몇 양상에서, 개시된 방법의 개체는, 개심수술을 포함하나 이에 제한되지 않는 심장 수술을 받은 경험이 있는 개체이다. 몇몇 양상에서, 개시된 방법의 개체는 개심술을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다중 결합 폐수술(multiple combined heart procedure)을 받은 경험이 있는 개체이다. 몇몇 양상에서, 개시된 방법의 개체는 신장 판막 수술을 받은 경험이 있는 개체이다. 몇몇 양상에서, 개시된 방법의 개체는 연령이 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 또는 85세이다. 몇몇 양상에서, 상기 조성물은 심근 경색을 앓은 경험이 있는 개체에게 투여된다. 몇몇 양상에서, 개시된 방법의 개체는 폐기종 또는 만성 폐쇄성 폐질환을 갖는다. 몇몇 양상에서, 개시된 방법의 개체는 부정맥의 병력이 있다.

[0042] 몇몇 양상에서, 개시된 방법은 소장 점막하층(SIS)을 포함하는 패치(patch)를 심장의 심낭의 개구부(opening)에

투여하는 것을 포함하지 않는다. 몇몇 양상에서, 개시된 방법은 소장 점막하층(SIS)을 포함하는 패치를 심장의 심장의 개구부에 투여하는 것으로 구성되지 않는다. 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 SIS가 아니다. 따라서, 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물은 SIS로 구성되지 않는다. 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물은 패치가 아니다. 몇몇 양상에서, 개시된 방법은 포유동물의 ECM을 포함하는 패치 형태 조성물을 심장의 심장의 개구부에 투여하는 것을 포함하지 않는다. 몇몇 양상에서, 개시된 방법의 심장 조직은 심낭막이 아니다. 몇몇 양상에서, 개시된 방법은 상기 조성물을 심낭막에 투여하는 것을 포함하지 않는다.

[0043] 그러나, 다른 양상에서, 개시된 방법은 소장 점막하층(SIS)을 포함하는 패치를 심장의 심장의 개구부에 투여하는 것을 포함한다. 개시된 방법에서 사용되는 조성물은 성장 인자, 시토킨, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸(GAGs), 단백질, 펩티드, 핵산, 소분자, 세포 및 약학적 약물, 예를 들어 스타틴 약물, 코르티코스테로이드, 항부정맥제, 비스테로이드성 항염 약물, 기타 항염 화합물, 나노입자, 및 금속 화합물과 같은 한 종 이상의 첨가제를 포함할 수 있다. 다른 양상에서, 개시된 방법은 소장 점막하층(SIS)을 포함하는 패치를 심장의 심낭막의 개구부에 투여하는 것을 포함하지만, 추가의 단계를 추가로 포함한다.

[0044] 또한, 본원에서는 개체의 심부정맥을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 포유동물의 세포와 기질을 포함하고 항부정맥약, 지질 저하 약물, 세포, 단백질 또는 이들의 조합을 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 개체의 심장 조직에 투여하는 것을 포함하는 방법을 개시한다.

[0045] 1. 심부정맥

[0046] 심부정맥(cardiac arrhythmia 또는 dysrhythmia)은 심장에 비정상적인 전기적 활성도가 있는 상태의 거대하고 이질적인 군의 임의의 상태에 대한 용어이다. 심장박동(맥박)은 너무 빠르거나 너무 느리거나 규칙 또는 불규칙적일 수 있다.

[0047] 몇몇의 부정맥은 심정지 및 돌연사를 초래할 수 있는 생명을 위협하는 의학적 긴급상황이다. 다른 것들은 심장 박동의 비정상적인 자극(항진)을 유발할 수 있고 단순히 지리할 수 있다. 다른 것들은 생명을 위협할 수 있는 뇌졸중 또는 색전의 원인이 되는 임의의 증상과 전혀 관련이 없을 수 있다.

[0048] 용어 "동부정맥"은 호흡시에 발생하는 심박수의 약한 촉진 또는 지연의 일반적인 현상을 의미한다. 이는 일반적으로 어린이의 경우에 두드러지고 연령에 따라 적어진다. 또한 이는 깊은 흡입 및 호흡 유지 패턴을 동반하는 명상 호흡 운동 동안에 나타날 수 있다.

[0049] 각각의 심장 박동은 동결절 또는 동심방(SA) 결절이라 불리는 심장의 우측 심방의 조직의 작은 영역으로부터 전기적 자극으로 시작된다. 그 자극은 처음에는 심방을 수축시킨 다음, 심방과 심실 사이의 단순한 전기적 연결인 방실(AV) 결절을 활성화한다. 다음에, 그 자극은 심실 및 His Purkinje 섬유를 통해 확산하여 심실 심근막의 동기화된 수축을 유발한다.

[0050] 60 bpm(beats per minute) 미만의 박동수는 서맥이다. 이는 동결절로부터의 느린 신호(동서맥이라 함), 동결절의 정상 활동의 중단(동정지라 함)에 의해 유발되거나, 심방에서 심실로의 경로 상의 전기적 자극을 차단(AV 차단 또는 심장 차단이라 함)함으로써 유발될 수 있다. 심장 차단은 다양한 정도 및 심각성으로 일어난다. 이는 AV 결절의 가역적 독성화(전도를 저해하는 약물을 이용) 또는 결절에 대한 비가역적 손상을 통해 유발될 수 있다.

[0051] 100 bpm 보다 빠른 심박수는 빈맥증이다. 빈맥은 항진을 초래할 수 있지만, 빈맥이 반드시 부정맥인 것은 아니다. 증가된 심박수는 물리적 운동 또는 감정적인 스트레스에 대한 정상적인 반응이다. 이는 동결절에 대한 교감신경계의 영향에 의해 매개되고, 동빈맥으로 불린다. 심장에서 교감 신경계 활동을 증가시키는 다른 것들로는 카페인 또는 암피타민과 같은 섭취 또는 주입된 물질, 및 갑상선 과다활성(갑상선 기능 항진증)이 있다. 심박수는 교감신경섬유사 약물(sympathomimetic drug)을 이용하여 증가시킬 수 있다.

[0052] 동빈맥이 아닌 빈맥은 일반적으로 다음 세 개의 기작중 하나에 의해 시작될 수 있는 비정상적인 자극으로부터 초래된다: 자동성, 회귀성, 또는 유발된 활동.

[0053] 자동성은 심장 근육섬유가 자극을 스스로 소멸하는 것을 의미한다. 심장내의 이러한 세포는 모두 작용 전위를 개시하는 능력이 있지만, 이러한 세포들 중 일부는 심장 박동을 정상적으로 유발하도록 디자인된다. 이러한 세포는 심장의 전도계에서 확인되고 SA 결절, AV 결절, 히스속 푸르키네 섬유 다발(Bundle of His and Purkinje fibers)을 포함한다. SA 결절은 심장의 나머지 부분보다 더욱 높은 자동성을 가지므로 심박수를 설정하고 각각의 심장 박동을 개시하는 방실내의 단일의 특수한 위치이다. SA 결절을 기다리지 않고 자극을 개시하는 심장의



임의의 부분은 이소성 병소라 불리고 병리학적 현상으로 정의된다. 이는 단일의 조기 박동이거나, 이소성 병소가 SA 결절보다 더욱 자주 개시되는 경우, 이는 지속적인 비정상적인 리듬을 생성할 수 있다. 자동성을 증가시키는 조건으로는 교감신경계 자극 및 저산소증이 있다. 최종의 심장 리듬은 최초 신호가 시작되는 곳에 의존한다. 이것이 SA 결절인 경우, 그 리듬은 정상적이지만 급속하고, 이소성 병소인 경우, 많은 유형의 부정맥이 초래될 수 있다.

- [0054] 회귀성 부정맥은 전기적 자극이 심장의 한 말단에서 다른 말단으로 이동한 다음 멈추기보다는, 심장 내의 빈틈이 없는(tight) 원에서 되풀이하여 이동하는 때 발생한다. 모든 심장 세포는 모든 방향으로 충격을 전달할 수 있지만, 이를 단시간 동안 한변밖에는 수행할 수 없다. 정상적으로, 작용 전위 자극은 각각의 세포가 한번 반응하도록 충분히 빠르게 심장을 통해 확산한다. 그러나, 몇몇 영역에서 전도가 비정상적으로 느린 경우, 그 자극의 일부는 늦게 도달하게 되고 새로운 자극으로서 처리될 수 있다. 타이밍에 따라, 이는 지속적인 비정상적 회로 리듬을 생성할 수 있다. 회귀성 회로는 심방 조동, 대부분의 상심실성 빈맥 및 위험한 심실성 빈맥의 원인이 된다. 심장의 전체 방이 다수의 미세 회귀성 회로에 관여하여 무질서한 전기적 자극에 의해 흔들리는 경우, 이는 세동 상태에 있다고 말한다.
- [0055] 세동은 하나 또는 두 개의 심방(심방 세동) 또는 하나 또는 두 개의 심실(심실 세동)에 영향을 미칠 수 있다. 치료하지 않는 경우, 심실 세동(VF 또는 V-fib)은 수 분내에 사망으로 이어질 수 있다.
- [0056] 개개의 심장 세포의 이온 채널의 수준에서의 문제가 전기적 활성의 비정상적인 전파를 초래하고 지속적인 비정상 리듬으로 이어질 수 있는 때 유발 박동(triggered beat)이 일어난다. 유발 박동은 비교적 드물지만, 부정맥 약물의 작용에 의해 초래될 수 있다.
- [0057] 부정맥은 속도(생리학적, 빈맥, 서맥) 또는 기작(자동성, 회귀성, 세동)에 따라 분류될 수 있다.
- [0058] 또한, 기원 부위에 따라 부정맥을 분류하는 것이 적절하다. 예를 들어, 심방 부정맥으로는 조기 심방 수축(PACs), 유주성 심방 조율 박동(wandering atrial pacemaker), 다소성 심방 빈맥, 심방 조동 및 심방 세동(Afib)이 있다. 방실 접합부 부정맥으로는 상심실성 빈맥(SVT), AV 결절 회귀성 빈맥(발작성 상심실성 빈맥(PSVT)의 가장 일반적인 원인), 접합부 율동, 및 심실 조기 수축이 있다. 방실 부정맥으로는 AV 회귀성 빈맥(회귀성 회로가 AV 결절 이외에 장소에서 심방과 심실 사이를 교차하는 때 발생)이 있다.
- [0059] 심실 빈맥으로는 조기 심실 수축(PVC) (때때로 심실 여분 박동(VEBs)이라함), 가속성 심실 고유 율동, 단형 심실 빈맥, 다형 심실 빈맥, 및 심실 세동이 있다.
- [0060] 심장 차단(AV 차단으로도 알려짐, 서맥의 가장 일반적인 원인)으로는 1도 심장 차단(표면 ECG 상의 길이가 200 msec 초과인 PR 간격), 2도 심장 차단(유형 1 및 2), 및 3도 심장 차단(완전 심장 차단으로도 알려짐)이 있다.
- [0061] 심부정맥은 흔히 청진기를 이용한 신장박동의 청진을 통해서 또는 말초 맥박을 감지함으로써 검출될 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 특정의 부정맥을 진단할 수 없으나 심박수의 일반적인 지표로 제공하고 심박수가 규칙적인지 불규칙적인지를 제공할 수 있다. 심장의 전기적 자극이 모두 청진 또는 촉진가능한 박동을 생성하는 것은 아니고, 많은 심장 부정맥의 경우, 조기 또는 비정상적인 박동은 효과적인 펌핑 작용을 생성하지 못하고 "스킵프"(skipped) 박동으로서 나타난다.
- [0062] 심장 율동의 평가를 위한 가장 간단한 진단 시험법은 심전도검사(ECG 또는 EKG으로 약기함)이다. Holter 모니터는 하루 동안 간략하고 예상치못하게 발생하는 부정맥을 검출하기 위해 24 시간 동안 기록되는 EKG이다.
- [0063] 부정맥 돌연사 증후군(SADS)은 부정맥에 의한 심정지로 인한 돌연사를 설명하기 위해 사용되는 용어이다. 흔히, 개체는 돌연사 전에 증상이 없다. 미합중국에서 돌연사의 가장 일반적인 원인은 관상 동맥 질환이다. 약 300,000 명이 미국에서 매년 이러한 원인으로 돌연사하고 있다. SADS는, 예를 들어 젊은 사람에게 영향을 미칠 수 있는 많은 유전적 상태 및 심장병에 의해 유발될 수도 있다.
- [0064] 어린이의 경우, 예를 들어, 바이러스성 심근염, 긴 Q-T 증후군, Brugada 증후군, 카테콜라민 유발 다형성 심실 빈맥, 비후성 심근증, 및 정맥 유발성 우심실 이형증이 SADS를 유발할 수 있다.
- [0065] 몇몇 양상에서, 심부정맥은 심방 세동 또는 심실 세동이다.
- [0066] 1. 투여
- [0067] 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 시트, 플러그, 라미네이트, 위브(weave), 고분자 기질, 다수의 가닥, 스펀지, 또는 하나 이상의 스트립과 같은 형태의 패치(patch)이다. 본원에서 사용되는 용어 "스펀지"는 ECM의 섬유를

포함하는 탄성이 있고, 흡수성이 있는 다공성 조성물일 수 있다. 하나의 양상에서, 섬유는 교락(interlacing)될 수 있다. 스펀지는 개시된 추가의 작용물질(즉, 첨가제)중 하나 이상을 심장 조직에 전달하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 심장 수술 동안 개체의 심장 조직과 직접 접촉할 수 있다. 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물은 심장의 심낭(pericardial sac)의 개구부에 투여된다. 몇몇 양상에서, 상기 조성물은 심낭의 개구부와 중첩된다. 따라서, 상기 포유동물의 ECM을 포함하는 조성물은 심장 수술 동안 또는 이후에 심낭막의 수술 개구부에 투여될 수 있다. 또 다른 양상에서, 포유동물의 ECM은 대혈관, 예를 들어 대동맥, 폐동맥, 폐정맥, 상대정맥 및 하대정맥과 같은 심장 구조와 접촉할 수 있다. 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM 조성물, 예를 들어 스펀지는 외심막과 심낭의 내벽 사이에 개재되거나 그와 접촉할 수 있다.

[0068] 포유동물의 ECM이 시트, 플러그, 라미네이트, 워브(weave), 고분자 기질, 다수의 가닥, 스펀지, 또는 하나 이상의 스트립과 같은 고체 형태인 경우, 그 조성물은 당 업계에서 입수가능한 표준 수단을 이용하여 심장 조직에 부착될 수 있다. 예를 들어, ECM 물질을 포함하는 조성물은 봉합사, 피브린 접착제와 같은 생분해성 접착제, 단섬유(staple) 등을 이용하여 심장 조직에 부착될 수 있다.

[0069] 포유동물의 ECM을 포함하는 개시된 조성물 및 화합물은 임의의 적당한 방식으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 비경구(예, 근육내 주사), 국소 등으로 투여될 수 있다. 따라서, 몇몇 양상에서, ECM 물질을 포함하는 조성물은 주사가능한 것이다. 개시된 조성물은 통상의 수단을 이용하여 심장 조직에 주입될 수 있다. 예를 들어, ECM을 포함하는 조성물은 주사기 또는 심장 또는 관상동맥 카테터를 통해 신장 조직에 전달될 수 있다. 심장 카테터 삽입술은 심장의 방 또는 혈관 내로의 카테터의 삽입이다. 이는 진단 및/또는 중재 목적을 위해 수행될 수 있다. 관상동맥 카테터 삽입술은 이러한 기법의 서브셋으로서, 관상동맥 카테터 삽입을 포함한다.

[0070] 따라서, 예시적인 양상에서, 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 심장의 심근막에 주입될 수 있다. 몇몇 양상에서, 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 심장의 외심막에 주입될 수 있다. 몇몇 양상에서, 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 심장의 심장내막에 주입될 수 있다. 몇몇 양상에서, 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 심장의 심낭막에 주입될 수 있다. 몇몇 양상에서, 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 심장의 층들의 사이, 예를 들어 심낭막과 외심막의 사이, 외심막과 심근막의 사이 및 심근막과 심장내막의 사이에 주입될 수 있다.

[0071] 몇몇 양상에서, 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 개체의 심방 또는 심실 중격에 투여될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 양상에서, 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 심실 중격 결손부에 투여될 수 있다. 심실 중격 결손부(VSD)는 심장의 좌심실과 우심실을 나누는 벽인 심실 중격내의 결손부이다. 심실 중격은 하근육막 및 상막 부분으로 이루어지고 전도성 심근세포에 의해 광범위하게 자극된다. 방실 결절에 근접한 막 부분은 성인 및 청소년에서 가장 일반적으로 확인된다. 선천성 VSDs는 집합적으로 가장 일반적인 선천성 심장 결손이다.

[0072] 몇몇 양상에서, 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 심방 중격 결손(ASD)에 투여될 수 있다. ASD는 심방간 중격을 통한 좌심방과 우심방 사이의 혈액 흐름을 가능하게 하는 선천성 심장 결손의 형태이다. 심방간 중격은 우심방과 좌심방을 나누는 조직이다. 이러한 중격이 없거나 결손이 있는 경우, 혈액은 심장의 좌측에서 심장의 우측으로 또는 그 반대로 이동하는 것이 가능하다. 심방간 소통 방향에 상관 없이, 이는 동맥 및 정맥 혈액의 혼합을 초래한다. 동맥 혈액과 정맥 혈액의 혼합은 임상적으로는 중요하지 않더라도 혈액동력학적으로 중요하거나 중요하지 않을 수 있다. 이러한 혈액 혼합물은 "섀트(shunt)"로 알려진 것을 초래하거나 초래하지 않을 수 있다. 존재할 수 있는 섀트의 양은 혈액동력학적 중요성을 나타낸다(하기 Pathophysiology 참조). "우측에서 좌측으로의 섀트"는 더욱 위험한 시나리오를 나타낸다(하기 Pathophysiology 참조).

[0073] 포유동물의 ECM은 에어로졸 형태일 수 있다. 따라서, 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 개체의 심장 조직에 분무될 수 있다.

[0074] 포유동물의 ECM은 미립자 형태일 수 있다. 미립자 형태의 포유동물 ECM은 에멀션 조성물을 주입, 건조 미립자, 액체 조성물 또는 반고체 조성물의 분무, 적층, 패키징, 살포(dusting), 페인팅 또는 다른 유사한 도포 형태를 통해서 투여될 수 있다.

[0075] 몇몇 양상에서, 상기 조성물은 심장의 외심막 표면에 투여된다. 따라서, 몇몇 양상에서, 상기 조성물은 심장의 외심막 표면에 주입, 분무 또는 부착된다.

[0076] 필요한 조성물의 정확한 양은 개체의 종, 연령, 체중 및 일반 건강상태 및 치료되는 장애의 심각성에 따라 개체마다 상이할 수 있다. 따라서, 모든 조성물마다 정확한 양을 특징하는 것은 가능하지 않다. 그러나, 본원의

개시내용을 고려하여 단지 통상적인 실험을 통해 당업자는 적절한 양을 결정할 수 있다. 따라서, 조성물을 투여하기 위한 효과적인 투여량 및 스케줄은 실험적으로 결정될 수 있고, 이러한 결정은 당 업계의 기술 내에 있다. 조성물의 투여를 위한 투여량 범위는 증상 및 장애가 영향을 받는 원하는 효과를 생성하기에 충분히 많은 범위이다. 그 투여량은 원하지 않는 교차 반응, 과민성 반응 등과 같은 부작용을 유발하도록 많지는 않아야 한다. 일반적으로, 그 투여량은 환자의 연령, 상태, 성별 및 질병 정도, 투여 경로, 다른 약물이 처방에 포함되는지의 여부에 따라 변화할 수 있고 당업자에 의해 결정될 수 있다. 투여량은 다양할 수 있고 하루에 1회 이상 하루 또는 수일간 투여될 수 있다. 소정 부류의 제약 생성물의 투여를 위한 안내서는 문헌에서 확인할 수 있다.

[0077] 심부정맥을 치료, 억제 또는 예방하기 위한 개시된 조성물의 투여 후, 그 방법의 효능은 당 업자에게 잘 알려진 여러 가지 방법을 통해 평가될 수 있다. 예를 들어, 당 업자는 본원에서 개시한 조성물이 개체의 심부정맥을 치료하는데 효과적인지를 심전도 검사를 통해 이해할 수 있다.

[0078] 본원에 개시한 조성물은 심부정맥의 위험이 있는 개체에게 예방적으로 투여될 수 있다. 또한, 개시된 조성물 및 방법은 예를 들어 심부정맥을 예방 또는 치료하기 위한 신약 후보를 분리 및 시험하기 위한 도구로 사용될 수 있다. 또한, 개시된 조성물은 연구 도구로 여러 가지 방법으로 사용될 수 있다. 다른 사용이 개시되고, 개시로부터 명백하고/하거나 당 업자에 의해 이해될 수 있다.

[0079] 1. 복합 요법

[0080] 본원에 개시한 방법은 개체를 통상적인 항부정맥 요법으로 처리하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상이한 작용 기작을 갖는 많은 부류의 항부정맥 약물 및 이러한 부류에 속하는 많은 개개의 상이한 약물들이 있다. 따라서, 상기 방법은 한 종 이상의 항부정맥 약물을 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0081] 몇몇 부정맥, 예를 들어 심방 세동은 심장 내에서 혈액 응고를 유발하고 색전 및 뇌졸중의 위험을 증가시킨다. 헤파린 및 와파린과 같은 항응고 약물, 및 아스피린과 같은 항혈소판 약물은 응고의 위험을 감소시킬 수 있다. 따라서, 상기 방법은 개체에게 항응고제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0082] 또한, 부정맥은 가슴벽의 외부에 또는 이식 전극 또는 수술을 통해 심장 내부에 심장을 가로질러 충격을 인가함으로써 전기적으로 치료될 수 있다. 약리학적으로 또는 심박에 동기화되는 충격의 인가를 통해 심장율동전환이 달성될 수 있다. 이는 상심실성 빈맥의 치료에 사용된다. 선택적인 심장율동전환에서, 개체는 과정 동안 일반적으로 진정되거나 가볍게 마취된다. 예를 들어, 심방 조동이 심장율동전환에 의해 치료될 수 있다. 따라서, 상기 방법은 개체를 심장율동전환을 이용하여 처리하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0083] 동기화된 심장율동전환에서, ECG상의 QRS 복합체의 R 파에 해당하는 심장 주기에서 최적의 순간에 예정된 수의 밀리초에 걸쳐서 선택된 양의 전류의 패드 또는 패들을 통해 반전 충격(reversion shock)이 전달된다. R 파에 대하여 충격을 타이밍하면, 위험이 큰 기간 동안 심장에 충격이 전달되어 심실 세동이 유발될 수 있는 것이 방지된다.

[0084] 제세동(defibrillation)은 심장 주기에 동기화되지 않는다는 점에서 심장율동전환과 다르다. 이는 심실 세동의 무질서한 율동의 경우에 요구되고 맥박이 없는 심실 빈맥에 사용된다. 흔히, 심장율동전환보다 더욱 많은 전기가 제세동에 요구된다. 심실 세동이 있는 대부분의 개체는 자각이 없기 때문에, 진정은 일반적으로 요구되지 않는다. 따라서, 상기 방법은 개체를 제세동 처리하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0085] 제세동 또는 심장율동전환은 이식가능한 심장율동전환기-제세동기(ICD)에 의해 달성될 수 있다. 따라서, 상기 방법은 개체에 ICD를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0086] 또한, 부정맥의 전기적 치료는 심박 조율을 포함한다. 매우 느린 심박 또는 서맥(예를 들어 약물 과도 투여 또는 심근 경색에 의한)의 반전 원인의 경우 일시적인 심박조율이 필요할 수 있다. 서맥이 회복되는 것으로 예상되지 않는 경우 영구 심박조율기가 사용될 수 있다. 따라서, 상기 방법은 개체에게 심박조율기를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0087] 몇몇 양상에서, 심장내로부터의 전기적 활동을 추적하기 위하여 미세한 프로브가 혈관을 통해 삽입될 수 있다. 이는 비정상적인 전도 부위가 매우 정확하게 위치할 수 있도록 한 다음, 열, 콜드, 전기 또는 레이저 프로브에 의해 파괴될 수 있도록 한다.

[0088] A. 조성물

- [0089] 포유동물 ECM의 패치는 신체가 심장 조직을 재구성 및 회복시키는데 필요한 세포를 동원하는 동안 기계적인 지지체(mechanical scaffold)로 작용하는 것으로 확인되었다. 본원에서는 심부정맥을 추가로 치료 및/또는 예방하기 위한 포유동물 ECM의 놀라운 능력을 개시한다. 따라서, 본원에서는 개체에서 심부정맥을 치료 또는 예방하기 위한 방법에서 사용하기 위한 포유동물 ECM을 포함하는 조성물을 개시한다. 개시한 조성물은 천연 또는 합성일 수 있다. 그 조성물은 탈세포화될 수 있거나 줄기세포와 같은 세포를 포함할 수 있다.
- [0090] 포유동물 ECM을 포함하는 본원에 개시한 조성물은 예를 들어 패치, 에멀션, 주사 용액, 겔, 유체, 페이스트, 분말, 가닥, 스펀지, 스트립, 스프레이, 증기, 에어로졸, 크림, 또는 코팅의 형태일 수 있다. 상기 조성물은 예를 들어 세포, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 기타 생물학적 부분을 비롯한 한 종 이상의 추가의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 조성물이 패치인 경우, 이는 시트, 라미네이트, 워브, 고분자 기질, 다수의 가닥, 스펀지, 하나 이상의 스트립, 또는 이들의 조합에서 선택된 형태일 수 있다.
- [0091] 포유동물 ECM을 포함하는 본원에 개시된 조성물은 Badylak의 미국특허 제 5,275,826호, Spievack의 미국특허 6,579,538호 및 Griffey의 미국특허 제 6,933,326호에 기재된 바와 같이 미립자화 및 유체화될 수 있다. 유체화 및 에멀션화된 조성물(액체 또는 반고체 형태)은 특정 농도, 예를 들어, 약 0.001 mg/ml 초과와 기질 농도로 존재할 수 있다. 세포와 기질 조성물의 이러한 액체 및 반고체 성분의 농도는 약 0.001 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 범위일 수 있다. 또한, 그 농도는 예를 들어 하기 세트의 농도와 같은 더욱 구체적인 농도에서 확인할 수 있다: 약 5 mg/ml 내지 약 150 mg/ml, 약 10 mg/ml 내지 약 125 mg/ml, 약 25 mg/ml 내지 약 100 mg/ml, 약 20 mg/ml 내지 약 75 mg/ml, 약 25 mg/ml 내지 약 60 mg/ml, 약 30 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 약 35 mg/ml 내지 약 45 mg/ml, 및 약 40 mg/ml 내지 약 42 mg/ml. 이러한 농도 범위 세트는 예시적인 것으로서, 전부 기재한 것은 아니다. 이러한 구체적으로 나열된 범위들 중 임의의 범위 내의 임의의 값이 상기 조성물의 액체, 에멀션, 겔, 페이스트, 또는 다른 반고체 성분의 농도에 합당하고 유용한 값인 것으로 예상된다.
- [0092] 1. 포유동물의 세포와 기질
- [0093] 세포와 기질 물질은 신체 내에서 연결 조직을 회복하기 위한 천연 지지체로 작용할 수 있다. 동물 연구 결과, 본래의 세포와 기질 물질이 재구성되고 숙주 세포로 대체되는 것으로 확인되었다. 포유동물의 ECM은 혈관, 비뇨 방광, 경뇌막, 복막, 건 및 인대를 비롯한 다양한 동물 조직의 구조적 재구성을 유도하는 이종이식 조직 이식편으로 성공적으로 사용되어온 흡수성 생체재료이다. 포유동물 ECM 물질의 예로는 소장 점막하층(SIS), 비뇨 방광 점막하층(UBS), 위 점막하층(SS), 또는 간기저막(LBM)이 있다.
- [0094] 상기 재구성 과정(remodeling process)은 급속 혈관 신생, 및 새로운 세포와 기질의 광범위한 침착을 지지하는 중간엽 및 상피 세포의 풍부한 축적을 포함한다. 예를 들어, SIS 세포와 기질의 비콜라겐 부분은 히알루론산, 헤파린, 더마탄 및 콘드로이틴 설페이트와 같은 여러 가지 당단백질 외에도, FGF-2 및 TGF- $\beta$  성장 인자로 구성된다.
- [0095] 처리 후, 포유동물의 ECM은 성장 및 분화 인자로 작용하는 내인성 단백질들 중 많은 것을 보유할 수 있다. 이러한 인자는 포유동물 ECM에 세포를 거주시키기 위한 국소환경을 자극하여 그 세포를 포유동물 ECM이 대체하는 본래 조직으로 분화시킬 수 있다.
- [0096] 포유동물 ECM은 다음과 같은 3개의 군으로 구성되는 중합된 "구조적" 단백질의 지지체 기질이다: 콜라겐, 당단백질, 및 프로테오글리칸(도처에 걸쳐서 글리코사미노글리칸을 가짐). 이들 분자는 실제적으로 중합되어, 세포 및 이에 근접하게 위치하는 기능적 단백질(세포 상에 또는 구조적 단백질에 결합됨)과 동적으로 상호접촉 상태로 존재하는 단백질의 지지체(scaffold) 또는 기질(matrix)을 형성한다. 따라서, 포유동물의 ECM은 이의 기질 지지체 내에서, 구조적 단백질 및 줄기 세포와 같은 이동 및 동원되는 세포와 상호작용하는 "기능적" 단백질도 포함한다. 또한, 기질의 기능적 단백질은, 그의 성분들을 재건 및 유지하는 기질 지지체의 생존 및 유지 동안 단백질 발현 세포와 상호작용한다. 몇몇 단백질은 전체 기질 내에서 단백질의 구성 및 배치에 따라 구조적이고 기능적인 단백질일 수 있다.
- [0097] 예를 들어, 심장 조직의 ECM은 콜라겐 타입 I (대부분), III, IV, V 및 VI로 구성되는데, 이들 콜라겐 타입들은 합쳐서 기질의 건조 중량의 92%를 차지한다. 또한, 심장 조직의 ECM은 콘드로이틴 설페이트 A 및 B, 헤파린, 헤파린 및 히알루론산을 포함하는 글리코사미노글리칸(GAGs)으로 구성된다. 피브로넥틴 및 엔탁틴(entactin)과 같은 당단백질, 데코린 및 펠리칸(perlecan)과 같은 프로테오글리칸, 및 전환 성장 인자 베타(TGF- $\beta$ ), 섬유아세포 성장 인자(FGF-2) 및 혈관 내피 성장 인자(VEGF)와 같은 성장 인자는 심근막 재생 기질의 활성화에 중요한 역할을 한다. 또한, 그 기질의 정밀한 화학적 구조는 예를 들어 어느 콜라겐 형태가 기질에서 압도적인 지를 비



못한, 그의 기능에 역할을 하는 것으로 보인다. 따라서, 임의의 조직 재생 과정의 결과는 그 재생 과정의 기초를 형성하는 기질 지지체의 구조적 및 기능적 성분들에 의해 결정될 수 있다.

[0098] ECM에서 세포 부착 기능을 촉진하는 것은 세포 부착 분자(CAMs)이다. CAMs은 내생적으로 얻어질 수 있거나 조성물의 추가 성분으로서 첨가될 수 있다. CAMs은 세포의 세포골격 성분에 연결된 통과막의 표면에 머무르는 당단백질이다. 특정 CAMs으로는 칼슘 의존성인 카테히드린이 있고, 30 종류 이상이 알려져 있다. 또한, CAMs으로 작용하는 것은 이들이 머무르는 세포의 세포골격을 세포외 기질에 연결하거나 인테그린 단백질 상의 알파 및 베타 막통과 서브유닛에 연결하는 단백질인 인테그린이다. 세포이동, 배아발생, 지혈 및 창상 치유는 그 기질 내의 인테그린에 의해 촉진된다. 신데칸은 세포 이동 및 분화를 개시하기 위한 리간드와 결합하는 프로테오글리칸이다. 면역글로불린은 임의의 필수적인 면역 및 염증 반응을 제공한다. 셀렉틴은 세포간 상호작용을 촉진한다.

[0099] i. 천연 소스 및 제조

[0100] 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 천연 소스로부터 유도된다. 천연 세포외 기질 지지체 및 이를 형성하는 단백질은 이미 천연 환경, 즉 포유동물의 세포외 기질에서 확인될 수 있다. 이러한 물질은 포유동물에서 조직 이식 과정에서 사용을 위해 제조될 수 있다.

[0101] 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 포유동물의 조직/장기로부터 추출된다. 예를 들어, 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 기저막(또는 이행상피층), 고유층(tunica propria), 점막하층(tunica submucosa), 근육층(tunica muscularis), 장막(tunica serosa), 또는 포유동물 조직 소스 유래의 이들의 조합을 포함한다. 따라서, 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 포유동물 조직 소스 유래의 기저막(또는 이행 상피층)을 포함한다. 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 포유동물 조직 소스 유래의 고유층(subjacent tunica propria)을 포함한다. 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 포유동물 조직 소스 유래의 점막하층을 포함한다. 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 포유동물 조직 소스 유래의 근육층을 포함한다. 몇몇 양상에서, 포유동물의 ECM은 포유동물 조직 소스 유래의 장막을 포함한다.

[0102] 예를 들어, 소장 점막하층(SIS)은 미국특허 제 5,275,826호에 기재되어 있고, 비뇨 방광 점막하층(UBS)은 미국특허 제 5,554,389호에 기재되어 있고, 위 점막하층(SS)은 미국특허 제 6,099,567호에 기재되어 있고, 간 기저막(LBM)은 미국특허 제 6,379,710호에 기재되어 있고, 상기 특허들은 이들 천연 세포외 기질의 제조 및 사용 방법에 대하여 본원에 참조로 포함된다.

[0103] 따라서, 몇몇 양상에서, 개시된 조성물 및 방법의 포유동물 ECM은 소장 점막하층(SIS)이다. 몇몇 양상에서, 개시된 조성물 및 방법의 포유동물 ECM은 비뇨방광 점막하층(UBS)이다. 몇몇 양상에서, 개시된 조성물 및 방법의 포유동물 ECM은 위 점막하층(SS)이다. 몇몇 양상에서, 개시된 조성물 및 방법의 포유동물 ECM은 간 기저막(LBM)이다.

[0104] 몇몇 양상에서, 개시된 조성물 및 방법의 포유동물 ECM은 진피 유래이다. 예를 들어, LifeCell Corporation사에 의해 제조된 AlloDerm®은 결합 조직 기질의 정상 생화학적 특성 및 분자 구조를 유의하게 변화시키지 않고 상피 및 진피 내의 세포를 제거하도록 설정된 처리 기법을 이용하여 정상 인간 세포로부터 제조되는 무세포성 조직 기질이다. 얻어지는 생성물은 정상 조직 기질 성분의 분해나 손실이 없이 보관 기간을 연장시키고 운반을 용이하게 하는 동결 건조된 형태이다. AlloDerm®은 정상 연결 조직에서 존재하는 데코린, 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 니도젠(nidogen), 성장 인자 및 다른 생화학적 단백질을 보유할 수 있다. 게다가, AlloDerm®은 혈관 채널의 기저막 및 출발 상피 조직의 엘라스틴 및 콜라겐 섬유의 구조를 함유할 수 있다.

[0105] 몇몇 양상에서, 개시된 조성물 및 방법의 포유동물 ECM은 근막 유래이다. 몇몇 양상에서, 개시된 조성물 및 방법의 포유동물 ECM은 실질 조직(parenchymal tissue) 유래이다. 몇몇 양상에서, 개시된 조성물 및 방법의 포유동물 ECM은 심낭막 유래이다. 몇몇 양상에서, 개시된 조성물 및 방법의 포유동물 ECM은 심근 세포외 기질 유래이다. 몇몇 양상에서, 개시된 조성물 및 방법의 포유동물 ECM은, 예를 들어 세제를 이용한 관상 동맥 관류를 통해 제조한 탈세포화된 심장 조직 유래이다(Ott, HC 등, Nat Med. 2008 Feb;14(2):213-21).

[0106] 몇몇 양상에서, 개시된 조성물 및 방법의 포유동물 ECM은 포유동물 조직 또는 장기 소스로부터 유래한 콜라겐 지지체를 포함한다. 몇몇 양상에서, 포유동물 소스 유래의 콜라겐 지지체는 포유동물 조직 소스의 기저막을 포함할 수 있다.

[0107] 몇몇 양상에서, 포유동물 ECM은 시험관내에서 제조된다. 예를 들어, 포유동물 ECM은 포유동물 세포의 배양으로부터 제조될 수 있다. 포유동물 ECM은 포유동물 조직/장기로부터 추출한 단백질로부터 제조될 수 있다. 예를



들어, 몇몇 양상에서, 포유동물 ECM은 포유동물 조직 또는 장기 소스로부터 추출한 콜라겐으로부터 합성한 인공 콜라겐 지지체를 포함한다. 포유동물 소스 유래의 콜라겐은 기질 함유 조직으로부터 얻을 수 있고 기질 조성물을 형성하기 위해 사용될 수 있다. 세포의 기질은 Matrigel™으로 시판되는 제품의 경우와 같이 세포 배양액으로부터 합성될 수 있다. 또한, 진피 세포의 기질 물질, 피하 세포의 기질 물질, 대장 세포의 기질 물질, 태반 세포의 기질 물질, 망 세포의 기질 물질, 심장 세포의 기질 물질, 및 폐 세포의 기질 물질이 SIS, SS, LBM 및 UBS 물질에 대하여 본원에 기재한 바와 마찬가지로 사용, 유도 및 보존될 수 있다. 개시된 조성물 및 방법에 따라 사용하기 위한 기저막의 다른 장기 조직 소스로는 비장, 림프절, 타액선, 전립선, 췌장 및 다른 분비선이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 세포의 기질을 갖는 포유동물의 임의의 조직이 세포의 기질 성분을 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0108] 콜라겐 기질은 여러 상업적으로 입수가능한 콜라겐 기질로부터 선택될 수 있거나 넓은 종류의 천연 콜라겐 소스로부터 제조될 수 있다. 개시된 조성물 및 방법에 따라 사용하기 위한 콜라겐 기질은 그들의 천연 구조 및 천연 농도가 고도로 보존된 콜라겐, 당단백질, 프로테오글리칸 및 글리코사미노글리칸을 포함할 수 있다. 콜라겐은 당 업계에서 입수가능하고 표준인 동물 소스, 식물 소스 또는 합성 소스로부터 얻을 수 있다.

[0109] 천연 지지체(scaffold)가 사용되는 조성물에서 지지체 물질의 비율은 높을 수 있는데, 그 천연 지지체에서 세포의 기질 단백질의 천연 비율이 일반적으로 세포의 기질 물질의 90 건조중량%를 초과하기 때문이다. 따라서, 조성물의 지지체 성분은 일반적으로 그 조성물의 건조 중량의 50%를 초과한다. 상기 지지체(scaffold)는 전체 조성물의 중량의 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 82% 초과, 84% 초과, 86% 초과, 88% 초과, 90% 초과, 92% 초과, 94% 초과, 96% 초과 및 98% 초과일 수 있다.

[0110] 천연 세포의 기질은 심부정맥을 치료하기 위한 그들의 생물학적 활성이 가능하면 크게 유지되도록 하면서 제조될 수 있다. 유지될 수 있는 핵심 기능으로는 세포 부착의 조절 또는 개시, 세포 이동, 세포 분화, 세포 증식, 세포사(세포자멸사), 신생혈관형성의 촉진, 단백질 분해 활성, 효소 활성, 세포 이동성, 단백질 및 세포 조정, 전사 활성화, 번역의 제공, 몇몇 생물학적 활성의 억제, 예를 들어 응고의 억제, 줄기 세포 유인, 및 화학 주성이 있다. 예를 들어, 물질 분석을 이용하여, 물질 조성에 존재하는 분자를 확인할 수 있다. 또한, 식물 또는 조성물이 세포 부착할 수 있도록 하기 위하여 시험관내 세포 부착 시험을 실시할 수 있다.

[0111] 포유동물 ECM을 포함하는 개시된 조성물은 비면역원성이 되도록 하기 위하여 탈세포화될 수 있다. 몇몇 양상에서, 탈세포화 과정은, 부수적으로 추출된 단백질을 세포로 교체하거나, 심부정맥을 치료 또는 예방하는데 관여하는 단백질을 생성 또는 운반하는 외인성 세포를 세포 추출 후 기질 조성물에 첨가함으로써 핵심 단백질 기능들 중 몇몇이 유지되도록 하면서 실시된다.

[0112] 세포의 기질 조성물에 단백질을 첨가할 때, 그 단백질은 조성물에 단순히 첨가되거나, 각각의 단백질이 기질 내의 분자에 공유 결합될 수 있다. 그 공유 결합을 달성하기 위해 표준 단백질-분자 결합 과정이 사용될 수 있다.

[0113] 포유동물 ECM의 소스로서 소스 조직/장기를 이용하여 출발하는 경우의 탈세포화를 위하여, 소스 조직/장기 관류 과정이 사용될 수 있다. 그 소스 조직/장기에는 탈세포화제, 예를 들어 0.1% 과아세트산이 관류되어 그 장기가 무세포성이 될 수 있다. 다음에, 그 소스 조직/장기는 부분들로 절단되고 나중에 사용하기 위해 보관(예를 들어, 수성 환경, 차갑거나, 동결 건조되거나 진공 압축된 액체 질소에서)될 수 있다. 임의의 적절한 탈세포화제가 소스 조직/장기 관류 과정에서 사용될 수 있다. 또한, 이하에서는 심장 수술을 받았거나 심근 경색을 가졌던 개체에서 심부정맥을 치료 또는 예방하기 위한 개시된 방법에서 사용하기 위한 ECM 물질을 더욱 완전히 멸균하는 동시에 탈세포화하는 방법을 개시한다.

[0114] 점막하층 조직의 경우, 추출은 기질내 성장 인자의 존재를 유지하기 위하여 중성 pH 근처(약 pH 5.5 내지 약 pH 7.5)에서 수행될 수 있다. 그렇지 않으면, 글리코사미노글리칸 성분의 존재를 유지하기 위하여 1 내지 50 °C 범위의 온도에서 산성 조건(pH 5.5 미만)이 사용될 수 있다. 이러한 수성 추출을 위한 산성 또는 염기성 조건을 조절하기 위하여, 우레아(약 2M 내지 4M의 농도), 구아니딘(약 2M 내지 약 6M의 농도, 가장 대표적으로는 약 4M), 염화나트륨, 염화마그네슘 및 비이온성 또는 이온성 계면활성제와 같은 완충액 및 카오토픽제(일반적으로 약 2M 내지 약 8M의 농도)가 선택될 수 있다. pH 7.4의 2M 우레아는 FGF-2 및 당단백질인 피브로넥틴의 추출을 제공한다. pH 7.4 완충액과 함께 4M 구아니딘을 이용하면, 전환 성장 인자 베타(TGF-β)를 갖는 분획이 얻어진다.

[0115] 기저막의 콜라겐 구조 및 세포 해리 동안의 막 구조의 분해를 최소화하기 위한 목적 때문에, 세포 해리 단계에

서 사용되는 효소 용액에서의 콜라겐 특히 효소 활성은 최소화될 수 있다. 예를 들어, 소스 조직/장기는 Triton 100과 같은 온화한 세제와 같은 칼슘 킬레이트제 또는 카오토로픽제(chaotropic agent)로 처리될 수 있다. 또한, 세포 해리 단계는 조직/장기의 효소적 처리 없이 칼슘 킬레이트제 또는 카오토로픽제를 이용하여 수행될 수 있다. 세포 해리 단계는, 약 0.05 내지 약 2 중량%, 더욱 구체적으로는 약 0.1 내지 약 1 중량% 프로테아제를 함유하고, 막 기질의 실질적인 분해 없이 기저막으로부터 세포의 방출 및 분리를 최적화하는데 효과적인 양의 카오토로픽제 및 칼슘 킬레이트제를 선택적으로 함유하는 교반된 용액에 소스 조직 슬라이스를 현탁함으로써 수행될 수 있다.

[0116] 기질로부터 모든 세포를 방출하는데 충분한 시간 동안 소스 조직/장기를 세포 해리 용액과 접촉시킨 후, 얻어지는 조직/장기 기저막은 식염수로 한번 이상 세척될 수 있고, 아래에 기재된 바와 같이 사용시까지 동결 수화된 상태 또는 부분적으로 탈수된 상태로 선택적으로 보관될 수 있다. 그 세포 해리 단계는 기저막으로부터 실질적으로 모든 세포를 방출하기 위해 세포 해리 용액을 이용한 몇 번의 처리를 필요로 한다. 그 소스 조직/장기는 그 성분인 세포를 제거하기 위해 프로테아제 용액으로 처리될 수 있고, 얻어지는 세포와 기질 물질은 임의의 잔류 효소 활성을 제거 또는 억제하기 위해 더욱더 처리된다. 예를 들어, 얻어지는 기저막은 가열되거나 한 중 이상의 프로테아제 억제제로 처리될 수 있다.

[0117] 글루타르알데히드를 이용한 탄닝(tanning), 산성 pH에서 포름알데히드 탄닝, 산화에틸렌 처리, 산화프로필렌 처리, 기체 플라스마 멸균, 감마 방사선, 및 과아세트산 멸균을 비롯한, 통상적인 멸균 기법을 이용하여 기저막 또는 다른 천연 세포와 기질 지지체가 멸균될 수 있다. 물질의 기계적 강도 및 생물학적 특성을 유의하게 약화시키지 않는 멸균 기법을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 강한 감마 방사선은 이식 물질의 강도의 상실을 유발하는 것으로 판단된다. 예시적인 멸균 기법으로는 이식편을 과아세트산에 노출시키는 것, 저용량 감마선 조사, 기체 플라스마 멸균, 및 고압/초임계 이산화탄소가 있다.

[0118] 또한, 아래에서는 개시된 ECM 조성물을 멸균 및 탈세포화하는 방법으로서, ECM 조성물의 기계적 강도 및 생물학적 특성을 유의하게 약화시키지 않는 외에도, ECM 조성물을 탈세포화하고 ECM 조성물에서의 여러 첨가제의 혼입을 강화하는데 있어서 더욱 효과적인 방법을 개시한다. 따라서, 개시된 멸균 및 탈세포화 방법은 더욱 많이 탈세포화되고 종래 알려진 ECM 조성물과 비교하여 더욱 많은 첨가제를 혼입하고 전달하는 능력이 큰 ECM 조성물을 제공한다.

[0119] ii. 합성 ECM

[0120] 또한, 개시된 방법에서 사용하기 위한 합성 ECM을 포함하는 조성물을 개시한다. 개시한 조성물에서 사용하기 위한 합성 ECM은, 천연 콜라겐처럼 많이 중합되고, 포유동물 ECM 지지체의 천연 환경을 모방하는 지지체 환경을 형성하는 합성 분자를 이용하여 형성될 수 있다. 따라서, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 섬유(Dacron®), 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE), 글루타르알데히드 가교된 심낭막, 폴리아세테이트(PLA), 폴리글리콜(PGA), 히알루론산, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리에틸렌, 니티놀 및 비등물 소스 유래의 콜라겐(예, 식물성 또는 합성 콜라겐)과 같은 물질이 합성 세포의 물질 지지체의 성분으로서 사용될 수 있다. 상기 열거된 합성 물질은 종래 기술에서 표준이고, 이를 이용하여 히드로겔 및 기질 유사 물질을 형성하는 것도 표준이다. 이들의 효과는 천연 세포와 기질을 구성하는 성분, 특히 성장 인자 및 이에 반응하는 세포와 함께 포유동물에서의 시험을 통해 예전에 개시한 바와 같이 생체내에서 시험될 수 있다.

[0121] 상기 세포와 기질 유사 물질은 이러한 물질의 제조 및 사용 방법의 개시내용에 대하여 본원에 참조로 포함되는 다음문헌[Rosso 등, Journal of Cellular Physiology 199: 174-180, 2004]에 일반적으로 기재되어 있다. 또한, 여기서는 몇몇 세포와 기질 유사 물질들이 열거되어 있다. 특히 유용한 생분해성 및/또는 생체내 흡수성 고분자로는 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 폴리디옥산 및 이들의 랜덤 및 블록 코폴리머가 있다. 특별한 고분자의 예로는 폴리 D,L-락타이드, 폴리락타이드-co-글리콜라이드(85: 15) 및 폴리락타이드-co-글리콜라이드(75:25)가 있다. 개시된 조성물 및 방법의 섬유질 기질에서 사용되는 생분해성 및/또는 생체흡수성 고분자는 약 4,000 내지 약 250,000 g/mole을 비롯한, 약 1,000 내지 약 8,000,000 g/mole의 범위의 분자량을 가질 수 있다. 상기 생분해성 및/또는 생체흡수성 섬유질 물질은 생분해성 및 생체흡수성 고분자일 수 있다. 적당한 고분자의 예들은 다음문헌[Bezawada, Rao S. 등, (1997) Poly(p-Dioxanone) and its copolymers, in Handbook of Biodegradable Polymers, A. J. Domb, J. Kost and D. M. Wiseman, editors, Hardwood Academic Publishers, The Netherlands, pp. 29-61]에서 확인할 수 있다. 상기 생분해성 및/또는 생체흡수성 고분자는 글리콜라이드, 락타이드, 디옥사논, 카프로락톤, 트리메틸렌 카보네이트, 에틸렌 글리콜 및 리신으로 이루어진 군에서 선택된 단량체를 함유할 수 있다. 상기 물질은 단량체들의 랜덤 코폴리머, 블록 코폴리머 또

는 블렌드, 이들 단량체를 함유하는 호모폴리머, 코폴리머 및/또는 헤테로폴리머일 수 있다. 상기 생분해성 및/또는 생체흡수성 고분자는 폴리글리콜라이드(PGA) 및 이의 랜덤 코폴리머인 폴리(글리콜라이드-co-락타이드)(PGA-co-PLA)와 같은 생체흡수성 및 생분해성 선형 지방족 폴리에스테르를 함유할 수 있다. FDA는 의료용 봉합사를 비롯한 의과용 용도로 이들 고분자의 사용을 승인했다. 이들 합성 생체흡수성 물질의 이점은 체액과 같은 수성 환경에서 에스테르 백본의 단순한 가수분해를 통해 분해될 수 있다는 것이다. 그 분해 생성물은 궁극적으로 이산화탄소 및 물로 대사되거나 신장을 통해 분비될 수 있다. 이러한 고분자는 신체에 흡수될 수 없는 셀룰로오스계 물질과 아주 다른 것이다.

[0122] 적당한 생체적합성 고분자의 다른 예는 에틸메타크릴레이트를 비롯한 폴리히드록시알킬 메타크릴레이트, 및 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴아미드 등과 같은 히드로겔이다. 다른 적당한 생분해성 물질은 콜라겐, 젤라틴, 알긴산, 키틴, 키토산, 피브린, 히알루론산, 텍스트란, 폴리아미노산, 폴리리신 및 이들 물질들의 코폴리머를 비롯한 생체 고분자이다. 임의의 글리코사미노글리칸(GAG) 타입 고분자가 사용될 수 있다. GAGs로는 예를 들어, 헤파린, 콘드로이틴 설페이트 A 또는 B, 및 히알루론산, 또는 이들의 합성 유사체가 있다. 상기 예들의 임의의 조합, 공중합체, 중합체 또는 블렌드가 개시된 조성물 및 방법에 따라 사용되는 것으로 예상된다. 이러한 생체 흡수성 물질은 알려진 방법을 통해 제조될 수 있다.

[0123] 임의의 소스 유래의 핵산이 고분자 생체 물질로서 이용될 수 있다. 소스로는 천연 핵산 외에도 합성된 핵산이 있다. 개시된 조성물 및 방법에서 사용하기에 적당한 핵산으로는 DNA(A, B 및 Z 구조를 포함), RNA(통합 또는 분리된 mRNA, tRNA 및 rRNA를 포함) 및 cDNA의 천연 형태 외에도, 폴리뉴클레오티드의 임의의 합성 또는 인공 형태가 있다. 개시된 조성물 및 방법에서 사용되는 핵산은 가교, 메틸화 및 캐핑과 같은 사슬간 변경, 및 공중합을 비롯한 여러 방법으로 변경될 수 있다. 게다가, 다른 유익한 분자가 핵산 사슬에 부착될 수 있다. 상기 핵산은 천연 서열 또는 인공 서열일 수 있다. 상기 핵산의 서열은 본 개시의 많은 양상에 부적절할 수 있다. 그러나, 핵산의 정보 암호화 특성으로 인한 임의의 유익한 효과를 억제하여 특정 세포 반응을 유도하거나 분자의 물리적 구조를 억제하기 위하여 특별한 서열이 사용될 수 있다. 핵산은 완성된 생체 물질에서 또는 이의 제조 동안에 여러 가지 결정 구조 형태로 사용될 수 있다. 핵산 결정 구조는 핵산과 함께 사용되는 염에 의해 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, DNA의 Na, K, Bi 및 Ca 염은 모두 상이한 침전 속도 및 상이한 결정 구조를 갖는다. 게다가, pH가 핵산의 결정 구조에 영향을 미친다.

[0124] 또한, 핵산의 물리적 특성은 다른 물리적 특성의 존재에 의해서도 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 헤파린 루프가 포함되면, 더욱 탄성인 생체 물질이 얻어질 수 있거나 특정 절단 부위가 제공될 수 있다. 제조되는 핵산 중합체 및 공중합체는 조직 인장 강도를 증가시키거나, 창상 치유를 개선하거나, 창상 치유를 촉진하거나, 조직 형성을 주형으로 사용되거나, 조직 형성을 안내하거나, 신경 성장을 촉진하거나, 조직내 맥관형성을 개선하거나, 생분해성 접착제로서 사용되거나, 기구 또는 임플란트 코팅으로 사용되거나, 조직 또는 신체 일부의 기능을 개선하는 것을 비롯한, 여러 조직 공학 용도로 사용될 수 있다. 사용되는 핵산 중합체 또는 공중합체의 종류는 고분자 생체물질의 최종 화학적 및 물리적 특성에 영향을 미칠 수 있다.

[0125] iii. 조합

[0126] 본원에 개시된 조성물은 둘 이상의 소스 유래 또는 둘 이상의 서로 다른 형태의 포유동물 ECM의 조합을 포함할 수 있다. 따라서, 개시된 조성물은 본원에 개시한 천연 및/또는 합성 포유동물 ECM들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0127] 따라서, 예를 들어, 상기 조성물은, 예를 들어 제한 없이 소장 점막하층, 간기저막, 위 점막하층, 비뇨 방광 점막하층, 태반 기저막, 췌장 기저막, 대장 점막하층, 폐 간질막, 호흡관 점막하층, 심장 세포외 기질, 진피 기질, 및 일반적으로 임의의 포유동물 태아 조직의 세포외 기질과 같은 소스에서 유래한 포유동물 ECM 조합을 포함할 수 있다. 이들 조직 소스들 중 어느 하나는 조성물에서 사용하기 위한 원하는 형태(액체, 반고체 또는 고체 형태)로 처리될 수 있는 세포외 기질을 제공할 수 있다.

[0128] 둘 이상의 소스로부터 유래한 포유동물 ECM들의 조합은 혼합된 고체, 혼합된 액체, 혼합된 현탁액, 혼합된 에멀션, 혼합된 겔, 혼합된 페이스트, 또는 혼합된 고체 미립자일 수 있다. 이러한 조성물들은 모두 둘 이상의 소스에서 유래한 세포외 기질들의 혼합물, 예를 들어 둘 이상의 세포외 기질에서 유래한 분말 또는 미립자의 혼합물, 둘 이상의 세포외 기질에서 유래한 페이스트의 혼합물, 둘 이상의 세포외 기질에서 유래한 현탁액의 혼합물, 둘 이상의 세포외 기질에서 유래한 에멀션 또는 겔의 혼합물, 및 둘 이상의 세포외 기질에서 유래한 액체의 혼합물이다.

- [0129] 상기 조성물은 3 종의 포유동물 조직 소스, 4 종의 포유동물 조직 소스, 5 종의 포유동물 조직 소스, 6 종의 포유동물 조직 소스, 및 10 종 이하 또는 이상의 조직 소스로부터 제조될 수 있다. 이러한 조직 소스는 동일 포유동물(예를 들어, 동일 소, 동일 돼지, 동일 설치동물, 동일 인간 등), 동일 종의 포유동물(예를 들어, 소, 돼지, 설치동물, 인간), 또는 상이한 종의 포유동물(예를 들어, 돼지 유래의 간 기질, 소 유래의 소장 점막하층, 및 개 유래의 비뇨 방광 점막하층, 이들은 모두 조성물에서 서로 혼합됨)에서 유래할 수 있다.
- [0130] 상기 조성물은 서로 합쳐진 2종 이상의 액상 기질(상이한 조직 소스에서 유래)을 포함할 수 있다. 상기 조성물은 서로 합쳐진 두 종 이상의 에멀션 기질(상이한 조직 소스에서 유래)일 수 있다. 상기 조성물은 서로 합쳐진 두 종 이상의 미립자 기질(상이한 조직 소스에서 유래)일 수 있다. 상기 조성물은 2 종 이상의 세포외 기질의 액체 혼합물일 수 있다. 상기 조성물은 두 종 이상의 세포외 기질의 현탁액 혼합물일 수 있다.
- [0131] 예를 들어, 조성물은 시트, 미립자, 현탁액, 에멀션, 겔 또는 액체 형태의 SS, LBM 또는 UBS와 함께 시트, 미립자, 현탁액, 에멀션, 겔 또는 액체 형태의 SIS의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 시트, 미립자, 현탁액, 에멀션, 겔 또는 액체 형태의 SIS, LBM 또는 UBS와 함께 시트, 미립자, 현탁액, 에멀션, 겔 또는 액체 형태의 SS의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 시트, 미립자, 현탁액, 에멀션, 겔 또는 액체 형태의 SS, SIS 또는 UBS와 함께 시트, 미립자, 현탁액, 에멀션, 겔 또는 액체 형태의 LBM의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 시트, 미립자, 현탁액, 에멀션, 겔 또는 액체 형태의 SS, SIS 또는 LBM와 함께 시트, 미립자, 현탁액, 에멀션, 겔 또는 액체 형태의 UBS의 조합을 포함할 수 있다.
- [0132] 개시된 조성물은 한 종 이상의 소스에서 유래하지만 두 종 이상의 상이한 형태인 포유동물 ECM들의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 미립자 기질과 합쳐진 겔 기질을 포함할 수 있다. 몇몇 양상에서, 미립자 형태의 포유동물 ECM이 시트 형태의 ECM에 살포될 수 있다.
- [0133] 몇몇 양상에서, 상기 조성물은 미립자 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS와 함께 시트, 현탁액, 에멀션, 겔 또는 액체 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS의 조합을 포함할 수 있다. 몇몇 양상에서, 상기 조성물은 시트 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS와 함께 미립자, 현탁액, 에멀션, 겔 또는 액체 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS의 조합을 포함할 수 있다. 몇몇 양상에서, 상기 조성물은 에멀션 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS와 함께 미립자, 미립자, 현탁액, 겔 또는 액체 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS의 조합을 포함할 수 있다. 몇몇 양상에서, 상기 조성물은 겔 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS와 함께 미립자, 미립자, 현탁액, 에멀션 또는 액체 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS의 조합을 포함할 수 있다. 몇몇 양상에서, 상기 조성물은 액체 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS와 함께 미립자, 미립자, 현탁액, 에멀션 또는 겔 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS의 조합을 포함할 수 있다. 몇몇 양상에서, 상기 조성물은 현탁액 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS와 함께 미립자, 미립자, 액체, 에멀션 또는 겔 형태의 SIS, SS, LBM 또는 UBS의 조합을 포함할 수 있다.
- [0134] 본원에 개시한 바와 같이, 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 바람직한 점조도(consistency)를 고려하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 포유동물 ECM은 혈류내로의 소산을 방지하는데 최적인 비율로 겔과 미립자의 조합으로서 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 포유동물 ECM을 포함하는 조성물은 겔 형태의 약 40% ECM 및 건조 미립자 형태의 약 60% ECM을 포함할 수 있다. 따라서, 본원에서는 겔 형태 및 건조 미립자 형태로 포유동물 ECM을 포함하는 조성물로서, 상기 겔 형태가 조성물내 ECM의 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 50%를 차지하는 조성물을 개시한다. 따라서, 건조 미립자 형태는 조성물 내의 ECM의 약 90, 85, 80, 75, 70, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 50%를 차지한다.
- [0135] 상기 액체 또는 반고체 조성물(액체, 겔, 현탁액, 에멀션 또는 페이스트)의 농도의 선택은 중요하다. 예를 들어, 액체 형태는 매우 묽은 약 0.001 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 농도 범위로 존재할 수 있다. 또한, 상기 농도는 하기의 범위 세트와 같은 더욱 구체적인 범위로 존재할 수 있다: 약 5 mg/ml 내지 약 150 mg/ml, 약 10 mg/ml 내지 약 125 mg/ml, 약 25 mg/ml 내지 약 100 mg/ml, 약 20 mg/ml 내지 약 75 mg/ml, 약 25 mg/ml 내지 약 60 mg/ml, 약 30 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 약 35 mg/ml 내지 약 45 mg/ml, 및 약 40 mg/ml 내지 약 42 mg/ml. 이러한 세트의 농도는 예시적인 것으로서, 전부 기재한 것이 아니다. 이러한 구체적으로 열거한 범위들 중 임의의 범위내의 임의의 값이 조성물의 액체 또는 반고체 성분의 농도에 적당하고 유용한 값인 것으로 예상된다.
- [0136] 에멀션은 액체 형태보다 더욱 진하고, 기질 조성물을 신체의 특정 부분에 도포하는데 있어서 유용할 수 있는 형태를 유지할 수 있으므로, "반고체"의 특성을 나타낸다. 에멀션은 기질 조성물이 도포되는 부위에 적당한 플러그 또는 다른 형상과 같은 형상을 형성하기에 충분히 진할 수 있다. 진한 에멀션은 페이스트 형태로 부위에 페인팅 또는 도포될 수 있고, 그 에멀션의 상부에 고체 미립자가 살포될 수 있다. 상기 고체 미립자는 재구성되



어 에멀션을 형성할 수 있거나, 치료되는 개체 내의 영역에 살포될 수 있는 건조 미립자 분말의 형태로 도포될 수 있다.

[0137] 두 종 이상의 포유동물 ECM의 에멀션을 형성하는 건조 미립자 또는 재구성된 미립자는 특정 비율로 서로 혼합될 수 있다. 예를 들어, 바이알에서 50% SIS가 50% SS와 혼합될 수 있다. 다음에, 그 혼합물은 식염수와 같은 적당한 완충액에서의 수화를 통해 유체화될 수 있다. 그 수화는 포유동물 ECM 혼합물의 원하는 농도, 예를 들어 약 0.001 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 범위 내에서 달성될 수 있다. 또한, 그 농도는 하기의 농도 세트와 같은 더욱 구체적인 범위로 존재할 수 있다: 약 5 mg/ml 내지 약 150 mg/ml, 약 10 mg/ml 내지 약 125 mg/ml, 약 25 mg/ml 내지 약 100 mg/ml, 약 20 mg/ml 내지 약 75 mg/ml, 약 25 mg/ml 내지 약 60 mg/ml, 약 30 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 약 35 mg/ml 내지 약 45 mg/ml, 및 약 40 mg/ml 내지 약 42 mg/ml. 이러한 세트의 농도는 예시적인 것으로서, 전부 기재한 것이 아니다. 이러한 구체적으로 열거한 범위들 중 임의의 범위내의 임의의 값이 조성물의 액체 또는 반고체 성분의 농도에 적당하고 유용한 값인 것으로 예상된다.

[0138] 세포외 기질의 농도가 낮을수록, 조성물의 액체가 많다. 세포외 기질의 농도가 높을수록, 겔상 에멀션 또는 반고체 상태에 근접하는 조성물이 많다.

[0139] 임의의 특정 조성물에서 상이한 소스(또는 특정 소스) 유래의 둘 이상의 세포외 기질의 혼합물의 비율은 변화할 수 있다. 따라서, 예를 들어, LBM는 75%로 존재할 수 있고 SIS는 25%로 존재할 수 있다(즉, 3:1 비율). 하기와 같은 임의의 적당한 비율이 사용될 수 있다: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 등. 세포외 기질의 3 종 이상의 조직 소스가 조성물에 사용되는 경우, 그 기질들의 양들에서 동일 형태의 균형 또는 불균형이 발생할 수 있다. 예를 들어, 3 종의 소스 유래의 세포외 기질의 경우, 각각의 소스는 동일한 비율, 즉 1:1:1 (33%/33%/33%)로 존재할 수 있다. 그렇지 않으면, 불균형한 비율의 미립자가 한 종의 소스로부터 유래될 수 있는데, 예를 들어, 2:1:1 (50%/25%/25%). 마찬가지로, 모든 세 소스가 불균형한 양, 예를 들어, 50%/30%/20%로 존재할 수 있다.

[0140] 두 종 이상의 포유동물 ECM들이 개별적으로 유체화(또는 에멀션화)되고 그 유체 또는 에멀션 조성물들이 서로 혼합될 수 있다, 그렇지 않으면, 둘 이상의 포유동물 ECM들이 개별적으로 유체화 또는 에멀션화되고 개별적으로 투여될 수 있다. 또한, 둘 이상의 포유동물 ECM들이 고체 형태로 잔류하고 고체 미립자 조합 형태로의 투여를 위해 바이알에서 서로 혼합될 수 있다. 사용 직전에 건조 미립자 포유동물 ECM 혼합물의 재수화가 수행될 수 있다.

[0141] 2. 단백질

[0142] 포유동물 ECM을 포함하는 개시된 조성물은 포유동물 ECM에서 일반적으로 확인되는 것들과 같은 외인성 단백질(exogenous protein)을 추가로 포함할 수 있다. 상기 단백질은 콜라겐, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸(GAG) 사슬, 당단백질, 성장 인자, 시토킨, 세포 표면 관련 단백질, 세포 부착 분자(CAM), 항원성 성장 인자, 내피 리간드, 매트릭신(matrikine), 기질 금속단백분해효소, 카데히드린, 면역글로불린, 원섬유성 콜라겐, 비원섬유성 콜라겐, 기저막 콜라겐, 멀티플렉신(multiplexin), 작은 루신 풍부 프로테오글리칸, 데코린, 비글리칸, 피브로모듈린, 케라토칸(keratocan), 루미칸(lumican), 에피피칸(epiphykan), 헤파란 설페이트 프로테오글리칸, 펠레칸(perlecan), 아그린(agrins), 테스트칸(testican), 신데칸(syndecan), 글리피칸(glypican), 세르글리신(serglycin), 셀렉틴(selectin), 렉티칸(lectican), 어그리칸(aggrecan), 베르시칸(versican), 뉴로칸(neurocan), 브레비칸(brevican), 세포질 도메인-44(CD-44), 대식구 자극 인자, 아밀로이드 전구 단백질, 헤파린, 콘드로이틴 설페이트 B(더마탄 설페이트), 콘드로이틴 설페이트, A, 헤파란 설페이트, 히알루론산, 피브로넥틴(Fn), 테나신(tenascin), 엘라스틴, 피브릴린, 라미닌, 니도젠/엔탁신, 피볼린 I, 피볼린 II, 인테그린, 막 통과 분자, 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), 상피 성장 인자(EGF), 전환 성장 인자 알파(TGF- $\alpha$ ), 전환 성장 인자 베타(TGF- $\beta$ ), 섬유아세포 성장 인자-2(FGF-2) (염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF)라고도 함), 트롬보스폰딘, 오스테오폰, 안지오텐신 전환 효소(ACE), 또는 혈관 내피 성장 인자(VEGF)일 수 있다. 이러한 목록은 전부 열거한 것이 아니다.

[0143] 따라서, 포유동물 ECM을 포함하는 본원에 개시한 조성물은 콜라겐 I 및 III, 엘라스틴, 라미닌, CD44, 히알루난, 신데칸, bFGF, HGF, PDGF, VEGF, Fn, 테나신, 헤파린, 헤파란 설페이트, 콘드로이틴 설페이트 B, 인테그린, 데코린, TGF- $\beta$ , 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0144] 2. 세포

[0145] 몇몇 양상에서, ECM을 포함하는 본원에 개시된 조성물은 한 종 이상의 세포를 추가로 포함한다. 몇몇 양상에서, 상기 세포는 비천연, 즉 포유동물 ECM에 대하여 이질이다. 몇몇 양상에서, 상기 세포는 자가 세포이다. 몇몇



양상에서, 상기 세포는 줄기 세포이다. 줄기 세포의 비제한적인 목록은 인간 배아줄기 세포, 태아 심근세포, 근섬유아세포, 중간엽 줄기세포, 자가 이식된 확장 심근세포, 지방세포, 전능성 세포, 만능 세포, 혈액 줄기 세포, 근아세포, 성체 줄기 세포, 골수 세포, 중간엽 세포, 배아 줄기 세포, 실질 세포, 상피 세포, 내피 세포, 중피 세포, 섬유아세포, 조골세포, 연골세포, 외인성 세포, 내인성 세포, 줄기 세포, 조혈모 줄기 세포, 만능 줄기 세포, 골수 유래 전구 세포, 전구 세포, 심근 세포, 골격 세포, 태아 세포, 배아 세포, 미분화 세포, 다분화능 전구 세포, 단분화능 전구 세포, 단핵세포, 심근세포, 심장 근원세포, 골격 근원세포, 대식세포, 모세관 내피세포, 이중 세포, 동중 세포, 성체 줄기 세포, 및 출생후 줄기 세포를 포함한다.

[0146] 몇몇 양상에서, 줄기 세포는 심장 조직 세포로 분화하는 능력을 갖는다. 따라서, 몇몇 양상에서, 줄기 세포는 전분화능 세포이다. 몇몇 양상에서, 줄기 세포는 혈관모세포 또는 혈액모세포이다. 몇몇 양상에서, 줄기 세포는 근모세포이다. 줄기 세포는 줄기 세포 배양을 위한 표준 방법을 이용하여 유도 및 유지될 수 있다.

[0147] 2. 의약

[0148] 포유동물 ECM을 포함하는 본원에 개시된 조성물은 개체의 심장에 투여될 수 있는 임의의 알려지거나 새로이 확인된 물질을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 포유동물 ECM을 포함하는 본원에 개시된 조성물은 항부정맥제를 추가로 포함할 수 있다. 항부정맥제는 심장의 빠르고/거나 불규칙한 율동(심부정맥)을 억제하기 위해 사용되는 의약 그룹이다.

[0149] 1970년에 소개된 Vaughan Williams 분류법은 항부정맥제에 대한 가장 광범위하게 사용되는 분류법들 중 하나이다. 이러한 분류법은 약물을 그의 항부정맥 효과의 일차 기작을 기준으로 분류하고 있다. 항부정맥제의 Vaughan Williams 분류에는 다음과 같이 5개의 주요 부류가 있다: 부류 I의 약물은 나트륨(Na<sup>+</sup>) 채널을 방해하고; 부류 II의 약물은 항교감신경계 약물(이 부류의 대부분의 약물은 베타 차단제임); 부류 III의 약물은 칼륨(K<sup>+</sup>) 유출에 영향을 미치고; 부류 IV의 약물은 칼슘 채널 및 AV 결절에 영향을 미치고; 부류 V의 약물은 다른 기작 또는 알려지지 않은 기작을 통해 작용한다.

[0150] 부류 Ia의 약물로는 퀴니딘, 프로카인아미드, 및 디소피라미드가 있고, 부류 Ib의 약물로는 리도카인, 페니토인, 및 멕시틸(Mexiletine)이 있고, 부류 Ic의 약물로는 플레카이니드(Flecainide), 프로파페논, 및 모리시진(Moricizine)이 있고, 부류 II의 약물로는 프로프라놀롤, 이소몰롤(Esmolol), 티몰롤(Timolol), 메토프롤롤(Metoprolol) 및 아테놀롤(Atenolol)이 있다. 부류 III의 약물로는 아미오다론(Amiodarone), 소탈롤(Sotalol), 이부틸리드(Ibutilide) 및 도페틸리드(Dofetilide)가 있다. 부류 IV의 약물로는 베라파밀(Verapamil) 및 딜티아젠펜(Diltiazem)이 있다. 부류 V의 약물로는 아데노신 및 디곡신(Digoxin)이 있다.

[0151] 따라서, 포유동물 ECM을 포함하는 본원에 개시한 조성물은 퀴니딘, 프로카인아미드, 디소피라미드, 리도카인, 페니토인, 멕시틸, 플레카이니드, 프로파페논, 모리시진, 프로프라놀롤, 이소몰롤, 티몰롤, 메토프롤롤, 아테놀롤, 아미오다론, 소탈롤, 이부틸리드, 도페틸리드, 베라파밀, 딜티아젠펜, 아데노신 및 디곡신중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0152] 또한, 제공되는 조성물은 한 종 이상의 항생제(예, 아미노글리코시드, 세팔로스포린, 클로람페니콜, 클린다마이신, 에리트로마이신, 플루오로퀴놀론, 마크로라이드, 아조라이드, 메트로니다졸, 페니실린, 테트라사이클린, 트리메토프림-설파메톡사졸, 및 반코마이신)를 추가로 포함할 수 있다.

[0153] 제공되는 조성물은 한 종 이상의 스테로이드(예를 들어, 안드로안(예, 테스토스테론), 콜레스탄(예, 콜레스테롤), 콜린산(예, 콜린산), 코르티코스테로이드(예, 텍사메타손), 에스트라엔(예, 에스트라디올), 및 프로그스테론)를 추가로 포함할 수 있다.

[0154] 제공되는 조성물은 모르핀, 코데인, 헤로인, 히드로모르폰, 리보파놀, 메피리딘, 메타손, 옥시돈, 프로폭시펜, 펜타닐, 메타돈, 날록손, 부프레노핀, 부토페놀, 날부핀 및 펜타조신을 포함하나 이에 제한되지 않는 마취성 및 비마취성 진통제들 중 하나 이상의 부류를 추가로 포함할 수 있다.

[0155] 제공되는 조성물은 하기의 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는 한 종 이상의 항염제를 추가로 포함할 수 있다: 알클로페낙, 알클로메타손 디프로피오네이트, 알게스톤, 아세트나이드, 알파 아밀라제, 암시나팔, 암시나피드, 암페낙 소듐, 아미프릴로스 히드로클로라이드, 아나킨라, 아니놀락, 아니트라자펜, 아파존, 발살라지드 디소듐, 벤다작, 베녹사프로펜, 벤지다민 히드로클로라이드, 브로멜라인, 브로페라몰, 부데소나이드, 카프로펜, 시클로프로펜, 신타존, 클리프로펜, 클리베타졸 프로피오네이트, 클로베타손 부티레이트, 클로피락, 클로티타손 프로피오네이트, 코르메타손 아세테이트, 코르토독손, 데카노에이트, 디플라자코트, 델라테스트릴(Delatestryl), 데포-테스토스테론, 데소나이드, 데속시메타손, 텍사메타손 디프로피오네이트, 디클로페낙 포타슘, 디클로페낙

소듐, 디플로라손 디아세테이트, 디플루미돈 소듐, 디플루니살(diflunisal), 디플루프레드네이트(difluprednate), 디프탈론(diflalone), 디메틸 설펁사이드, 드로시노나이드(drocinonide), 엔드리손(endrysone), 인리모마브(enlimomab), 이노시캄(enolicam) 소듐, 이피리졸(epirizole), 이토돌락(etodolac), 이토펜아메이트(etofenamate), 펠비낙(felbinac), 페나몰(fenamole), 펜부펜(fenbufen), 펜클로페낙, 펜클로락, 펜도살, 페니팔론, 펜티아작, 플라잘론, 플루아자코트(fluazacort), 플루페남산, 플루이졸, 플루니졸리드 아세테이트, 플루니신(flunixin), 플루니신 메그루민(meglumine), 플루오코르틴(fluocortin) 부틸, 플루오로메톨론 아세테이트, 플루쿠아존(fluquazone), 플루비프로펜(flurbiprofen), 플루레토펜(fluretofen), 플루티카손(fluticasone) 프로피오네이트, 푸라프로펜(furaprofen), 푸로부펜(furobufen), 할시노나이드(halcinonide), 할로부타솔(halobetasol) 프로피오네이트, 할로프리돈 아세테이트, 이부페낙, 이부프로펜, 입이부프로펜 알루미늄, 이부프로펜 피코놀, 일로니답(ilonidap), 인도메타신, 인도메타신 소듐, 인도프로펜, 인독솔(indoxole), 인트라졸(intrazole), 이소플루프레돈 아세테이트, 이소세팍(isoxepac), 이속시캄(isoxicam), 케토프로펜, 로페미졸(lofemizole) 히드로클로라이드, 로목시캄(lomoxicam), 로테프레드놀 이타보네이트(loteprednol etabonate), 메클로페나메이트 소듐(meclofenamate sodium), 메클로페남산, 메클로리손(mecloresone) 디부티레이트, 메페남산, 메살아민, 메세클라존(meseclazone), 메스트롤론(mesterolone), 메탄드로스테놀론(methandrostenolone), 메테놀론(methenolone), 메테놀론 아세테이트, 메틸프레드니솔론 설펁타네이트(methylprednisolone suleptanate), 모미플루메이트(momiflumate), 나부메톤(nabumetone), 난드로론(nandrolone), 나프록센(naproxen), 나프록센 소듐, 나프록솔, 니마존, 올살라진(olsalazine) 소듐, 오르고테인(orgotein), 오르파녹신(orpanoxin), 옥사드롤란(oxandrolane), 옥사프로진(oxaprozin), 옥시펜부타존, 옥시메톨론(oxymetholone), 파라닐린(paranyline) 히드로클로라이드, 펜토산(pentosan) 폴리설펁레이트 소듐, 펜부타존(phenbutazone) 소듐 글리세레이트, 피페니돈(pirfenidone), 피록시캄, 피록시캄 신나메이트, 피록시캄 올아민, 피프로펜(pirprofen), 프레드나제이트(prednazate), 프리펠론(prifelone), 프로돌산, 프로쿠아존(proquazone), 프록사졸, 프록사졸 시트레이트, 리멕솔론(rimexolone), 로마자리트(romazarit), 살코렉스(salcolex), 살나세딘(salnacedin), 살사레이트(salsalate), 상귀나리움(sanguinarium) 클로라이드, 세클라존(seclazone), 서미탁신(sermetacin), 스타노졸롤(stanozolol), 수독시캄(sudoxicam), 설린닥(sulindac), 수프로펜(suprofen), 탈미타신(talmetacin), 탈니플루메이트(talniflumate), 탈로살레이트(talosalate), 테부펠론(tebufelone), 테니답(tenidap), 테니답 소듐, 테녹시캄(tenoxicam), 테시캄(tesicam), 테시미드(tesimide), 테스토스테론, 테스토스테론 블렌드, 테트리다민(tetrydamine), 티오피낙(tiopinac), 틱소코르톨(tixocortol) 피발레이트, 톨미틴(tolmetin), 톨미틴 소듐, 트리클로나이드(triclonide), 트리플루미데이트(triflumidate), 지도메타신(zidometacin), 및 지도메타신 소듐.

- [0156] 제공되는 조성물은 한 종 이상의 지질 저하 약물을 추가로 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "지질 저하 약물"은 콜레스테롤, 저밀도 지단백질(LDL), 초저밀도 지단백질(VLDL), 및 트리글리세리드를 포함하나 이에 제한되지 않는 여러 가지 심장 질환-관련 지질의 혈청 수준을 감소시키기 위해 개체에게 투여될 수 있는 약물을 말한다.
- [0157] 예를 들어, 지질 저하 약물은 로바스타틴, 심바스타틴, 아토르바스타틴, 플루바스타틴, 프라바스타틴, 로슈바스타틴, 세르비스타틴, 및 피타바스타틴을 포함하나 이에 제한되지 않는 스타틴일 수 있다. 지질 감소 및/또는 항염 특성을 갖는 것으로 현재까지 알려지거나 미래에 개발될 임의의 스타틴 약물이 본원에 개시된 조성물에서 사용될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0158] 제공되는 조성물은 에탄올아민(예, 디펜히드라민 카르비녹사민), 에틸레디아민(예, 트리펠렌아민 피릴아민), 알킬아민(예, 클로르페니라민, 텍스클로르페니라민, 브로프페니라민, 트리프롤리딘), 아스테미졸, 로라타부딘, 페소페나딘, 브로페니라민, 클리마스틴, 아세타미노펜, 슈도에피히드린 및 트리프롤리딘을 포함하나 이에 제한되지 않는 한 종 이상의 항히스타민제를 포함할 수 있다.
- [0159] 제공되는 조성물은 하기의 것들을 포함하나 그에 제한되지 않는 한 종 이상의 항신생물제를 추가로 포함할 수 있다: 악시비신, 아클라루비신, 아코다졸 히드로클로라이드, 아크퀸(AcrQnine), 아도젤레신(adozelesin), 알데스루킨(aldesleukin), 알트레타민(altretamine), 암보마이신(ambomycin), 아메탄트론 아세테이트(ametantrone acetate), 아미노글루테티미드(aminogluthethimide), 암사크린(amsacrine), 아나스트로졸(anastrozole); 안트라마이신(anthracycline), 아스파라기나제(asparaginase), 아스펠린(asperlin), 아자시티딘(azacitidine), 아제테파(azetepa), 아조토마이신(azotomycin), 바티마스탯(batimastat), 벤조데파(benzodepa), 비칼루타미드(bicalutamide), 비산트렌 하이드로클로라이드(bisantrene hydrochloride), 비스나피드 디메실레이트(bisnafide dimesylate), 비젤레신(bizelesin), 블레오마이신 설펁레이트(bleomycin sulfate), 브레퀴나르 나트

륨(brequinar sodium), 브로피리민(bropiramine), 부설판(busulfin), 각티노마이신(cactinomycin), 칼루스테론(calusterone), 카라세미드(caracemide), 카르베티머(carbetimer), 카르보플라틴(carboplatin), 카르무스틴(carmustine), 카루비신 하이드로클로라이드(carubicin hydrochloride), 카르젤레신(carzelesin), 세데핑골(cedefingol), 클로람부실(chlorambucil), 키롤레마이신(cirolemycin), 시스플라틴, 클라드리빈(cladribine), 크리스나톨 메실레이트(crisnatol mesylate), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 시타라빈(cytarabine), 데카르바진(dacarbazine), 닥티노마이신, 다우노루비신 하이드로클로라이드(daunorubicin

[0160] hydrochloride), 데시타빈 (decitabine), 텍소르마플라틴(dexormaplatin), 데자구아닌(dezaguanine), 데자구아닌 메실레이트(dezaguanine mesylate), 디아지쿠논, 도세탁셀, 독소루비신(doxorubicin), 독소루비신 하이드로클로라이드(doxorubicin hydrochloride), 드롤록시펜(droloxifene), 드롤록시펜 시트레이트(droloxifene

[0161] citrate), 드로모스타놀론 프로피오네이트(dromostanolone propionate), 두아조마이신(duazomycin), 에다트렉세이트(edatrexate), 에플로르니틴 하이드로클로라이드(eflornithine hydrochloride), 엘사미트루신(elsamitrucin), 엔로플라틴(enloplatin), 엔프로메이트(enpromate), 에피프로피딘(epipropidine), 에피루비신 하이드로클로라이드(epirubicin hydrochloride), 에르불로졸(erbulozole), 에소루비신 하이드로클로라이드(esorubicin hydrochloride), 에스트라무스틴(estrामustine), 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨(estrामustine phosphate sodium), 에타니다졸(etanidazole), 에티오다이징드 오일 131, 에토포시드(etoposide), 에토포시드 포스페이트 (etoposide phosphate), 에토프린(etoprine), 파드로졸 하이드로클로라이드(fadrozole hydrochloride), 파자라빈(fazarabine), 펜레티나이드(fenretinide), 플록스우리딘(floxuridine), 플루다라빈 포스페이트(fludarabine phosphate), 플루오로우라실(fluorouracil), 플루오로시타빈(flurocitabine), 포스퀴돈(fosquidone), 포스트리에신 나트륨(fostriecin sodium), 겐시타빈(gemcitabine), 겐시타빈 하이드로클로라이드(gemcitabine

[0162] hydrochloride), Gold Au 198, 하이드록시우레아(hydroxyurea); 이다루비신 하이드로클로라이드(idarubicin hydrochloride), 이포스파미드(ifosfamide), 일모포신(ilmofosine), 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2b, 인터페론 알파-n1, 인터페론 알파-n3, 인터페론 베타-1a, 인터페론 감마-1b, 이프로플라틴(iproplatin), 이리노테칸 하이드로클로라이드(irinotecan hydrochloride), 란레오티드 아세테이트(lanreotide acetate), 레트로졸(letrozole), 루프롤리드 아세테이트(leuprolide acetate), 리아로졸 하이드로클로라이드(liarozole hydrochloride), 로메트렉솔 나트륨(lometrexol sodium), 로무스틴(lomustine), 로소산트론 하이드로클로라이드(losoxantrone hydrochloride), 마소프로콜(masoprocol), 마브탄신(mavtansine); 메클로레타민 하이드로클로라이드(mechlorethamine hydrochloride), 메제스트롤 아세테이트(megestrol acetate), 멜렌제스트롤 아세테이트(melengestrol acetate), 멜팔란(melphalan), 메노가릴(menogaril), 머캅토피린(mercaptopyrine), 메토포트렉세이트(methotrexate), 메토포트렉세이트 나트륨, 메토프린(metoprine), 메투레데파(meturedopa), 미틴도미드(mitindomide), 미토카르신(mitocarcin), 미토크로민(mitocromin), 미토길린(mitogillin), 미토말신(mitomalcin), 미토마이신(mitomycin), 미토스퍼(mitosper), 미토탄(mitotane), 미톡산트론 하이드로클로라이드(mitoxantrone hydrochloride), 미코페놀산(mycophenolic acid), 노코다졸(nocodazole), 노갈라마이신(nogalamycin), 오르마플라틴(ormaplatin), 옥시수란(oxisuran), 페가스파라가아제(pegasparase), 펠리오마이신(peliomycin), 펜타무스틴(pentamustine), 페플로마이신 설페이트(peplomycin sulfate), 퍼포스파미드(perfosfamide), 피포브로만(pipobroman), 피포설파판(piposulfan), 피록산트론 하이드로클로라이드(piroxantrone hydrochloride), 플리카마이신(plicamycin), 플로메스탄(plomestane), 프로피머 나트륨(porfimer sodium), 프로피로마이신(porfiromycin), 프레드니무스틴(prednimustine), 프로카르바진 하이드로클로라이드(procarbazine hydrochloride), 푸로마이신(puromycin), 푸로마이신 하이드로클로라이드(puromycin hydrochloride), 피라조퓨린(pyrazofurin), 리보프린(ribofrine), 로글레티미드(rogletimide), 사핑골(safingol), 사핑골 하이드로클로라이드(safingol hydrochloride), 세무스틴(semustine), 심트라젠(simtrazene), 스파르포세이트 나트륨(sparfosate sodium), 스파르소마이신(sparsomycin), 스파이로게르마늄 하이드로클로라이드(spirogermanium hydrochloride), 스파이로무스틴(spiromustine), 스파이로플라틴(spiroplatin), 스트렙토니그린(streptonigrin); 스트렙토조신(streptozocin), 염화스트론튬 Sr89, 술로페누르(sulofenur), 탈리소마이신(talisomycin), 탁산, 탁소이드, 테코갈란 나트륨(tecogalan sodium), 테가퓨르(tegafur), 텔록산트론 하이드로클로라이드(teloxantrone hydrochloride), 테모포르핀(temoporfin), 테니포시드(teniposide), 테록시론(teroxirone), 테스트락톤(testolactone), 티아미프린(thiamiprine), 티오구아닌(thioguanine), 티오테파(thiotepa), 티아조퓨린(tiazofurin), 티라파자민(tirapazamine), 토레미펜 시트레이트(toremifene citrate), 트레스톨론 아세테이트(trestolone acetate), 트리시리빈 포스페이트(triciribine phosphate); 트리메트렉세이트(trimetrexate), 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트(trimetrexate glucuronate),

트립토텐린(triptorelin), 투블로졸 하이드로클로라이드(tubulozole hydrochloride), 우라실 머스타드(uracil mustard), 우레데파(uredepa), 바프레오티드(vapreotide), 베르테포핀(verteporfin), 빈블라스틴 설페이트, 빈크리스틴 설페이트(vincristine sulfate), 빈데신(vindesine), 빈데신 설페이트, 비네피딘 설페이트(vinepidine sulfate), 빈글리시네이트 설페이트(vinglycinate sulfate), 빈루로신 설페이트(vinleurosine sulfate), 비노렐빈 타르트레이트(vinorelbine tartrate), 빈로시딘 설페이트(vinrosidine sulfate), 빈졸리딘 설페이트(vinzolidine sulfate), 보로졸(vorozole), 제니플라틴(zeniplatin), 지노스타틴(zinostatin), 및 조루비신 하이드로클로라이드(zorubicin hydrochloride).

[0163] 본원에서 제공되는 조성물은 겐시타빈(gemcitabine), 5-플루오로우라실, 펜톡시필린(pentoxifylline) 및 비노렐빈(vinorelbine)을 포함하나 이에 제한되지 않는 한 종 이상의 방사선민감제(radiosensitizer)를 추가로 포함할 수 다.

[0164] 2. 담체

[0165] 개시된 포유동물 ECM은 ECM의 투여, 전달 또는 다른 양상 또는 이의 사용을 촉진하기 위하여 담체 및 다른 조성물과 병합, 접합 또는 결합될 수 있다. 편의를 위하여, 이러한 조성물은 본원에서는 담체(carrier)라고 기재한다. 담체는 예를 들어, 소분자, 약학적 약물, 지방산. 검출가능한 마커, 접합 태그(conjugating tag), 나노입자 또는 효소일 수 있다.

[0166] 개시된 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 치료적으로 사용될 수 있다. "약학적으로 허용가능한"은 생물학적으로 또는 다른 상태로 바람직하지 않은 것이 아닌 물질을 의미하는 것으로서, 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기하거나, 이것이 함유되는 약학적 조성물의 다른 성분들 중 임의의 것과 해로운 방식으로 상호작용함이 없이 조성물과 함께 개체에 투여될 수 있는 물질을 의미한다. 상기 담체는 당업자에게 알려진 바와 같이, 유효 성분의 임의의 분해(degradation)를 최소화하고 임의의 부작용을 최소화하도록 선택될 수 있음은 물론이다.

[0167] 적당한 담체 및 이들의 제형은 다음 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995]에 기재되어 있다. 일반적으로, 적절한 양의 약학적으로 허용가능한 염이 제제가 등장성이 되도록 하기 위하여 제제에서 사용될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예로는 링거(Ringer)액 및 텍스트로스 용액이 있으나 이에 제한되지 않는다. 그 용액의 pH는 바람직하게는 약 5 내지 약 8, 더욱 바람직하게는 약 7 내지 약 7.5 이다. 또한, 담체는, 조성물을 함유하는 고체 소수성 고분자의 반투과성 기질(필름과 같은 성형품), 리포솜 또는 마이크로입자와 같은 지속 방출 제제를 포함한다. 특정 담체가 예를 들어 투여 경로 및 투여 조성물의 농도에 따라 더욱 바람직할 수 있다는 것은 당업자에게 명백하게 된다.

[0168] 약학적 담체는 당업자에게 잘 알려져 있다. 일반적으로 이들은 대부분 멸균수, 식염수, 및 생리학적 pH의 완충 용액과 같은 용액을 비롯한, 인간에게 약물의 투여를 위한 표준 담체이다.

[0169] 약학적 조성물은 선택된 분자 외에도 담체, 증점제, 희석제, 완충제, 보존제, 계면활성제 등을 포함할 수 있다. 또한, 약학적 조성물은 항균제, 항염제, 마취제 등과 같은 한 종 이상의 유효 성분을 포함할 수 있다.

[0170] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균 비수성 용액, 현탁액 및 에멀션을 포함할 수 있다. 비수성 용매의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 및 에틸 올레이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르가 있다. 수성 담체로는 물, 알콜성/수성 용액, 식염수 및 완충 매질을 포함하는 에멀션 및 현탁액이 있다. 비경구 담체로는 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화 링거 또는 고정 오일이 있다. 정맥내 담체로는 유체 및 영양 보충제, 전해질 보충제(예, 링거 텍스트로스에 기반한 것들) 등이 있다. 예를 들어, 항균제, 산화방지제, 킬레이트제 및 불활성 기체 등과 같은 보존제 및 기타 첨가제가 존재할 수도 있다.

[0171] 국소 투여용 제제로는 연고, 로션, 크림, 젤, 드롭제, 좌약, 스프레이, 액체 및 분말을 들 수 있다. 통상적인 약학적 담체, 수성, 분말 또는 오일상 기체, 증점제 등이 필요하거나 바람직할 수 있다.

[0172] 경구 투여를 위한 조성물로는 분말 또는 그레놀, 물 또는 비수성 매질 내의 현탁액 또는 용액, 캡슐, 세세이(sachet), 또는 정제가 있다. 증점제, 향미제, 희석제, 유효제, 분산 보조제 등이 바람직할 수 있다.

[0173] 상기 조성물들 중 몇몇은 염산, 브롬산, 과염소산, 질산, 티오시안산, 황산, 및 인산과 같은 무기산, 및 포름산, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 옥살산, 말론산, 숙신산, 말레산 및 푸마르산과



같은 유기산과의 반응, 또는 수산화나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨과 같은 무기 염기, 및 모노-, 디-, 트리알킬 및 아릴 아민 및 치환된 에탄올아민과 같은 유기 염기와의 반응을 통해 형성된 약학적으로 허용가능한 산 또는 염기 부가염의 형태로 투여될 수 있다.

[0174] D. 조성물의 제조 방법

[0175] 본원에 개시된 조성물 및 개시된 방법을 수행하는데 필요한 조성물은 달리 구체적으로 언급하지 않는 경우 특정의 시약 또는 화합물에 대하여 당업계에 알려진 임의의 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,275,826호, 미국특허 제 5,554,389호, 미국특허 제 6,099,567호 및 미국특허 제 6,379,710호는 각각 소장 점막하층(SIS), 비노 방광 점막하층(UBS), 위 점막하층(SS) 및 간 기저막(LBM)을 포함하는 조성물을 제조하는 방법에 대하여 참조로 본원에 개시된다.

[0176] E. 조성물을 멸균하는 방법

[0177] 달리 특별히 언급하지 않는 경우, 본원에서 기재한 임의의 방법 또는 양상은 그의 단계들이 특정 순서로 수행되어야 하는 것으로 결코 해석되지 않는다. 따라서, 방법 청구항이 특허청구범위 또는 설명에서 그 단계들이 특정 순서로 제한되는 것으로 기재하지 않는 경우, 순서가 추측된다는 것은 결코 아니다. 이는 단계들의 배열 또는 작동 흐름에 대한 논리의 문제, 문법적인 구성 또는 구두법으로부터 유래한 평범한 의미, 또는 본 명세서에서 기재한 양상들의 수 및 형태를 비롯하여, 해석을 위한 임의의 가능한 비표현 기준(non-express basis)에 적용된다.

[0178] 본원에서 사용되는 것으로 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 80%가 되도록 적어도 80% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 설명하기 위해 사용되는 것이다. 본원에 기재된 몇몇의 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 90%가 되도록 적어도 90% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 본원에 기재된 다른 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 95%가 되도록 적어도 95% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 본원에 기재된 다른 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 96%가 되도록 적어도 96% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 본원에 기재된 여전히 다른 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 97%가 되도록 적어도 97% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 본원에 기재된 추가의 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 98%가 되도록 적어도 98% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 본원에 기재된 여전히 추가의 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 99%가 되도록 적어도 99% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "무세포성"은 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 및 이들 값들의 사이에 속하는 임의의 비율의 수준으로 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다.

[0179] 본원에서 사용되는 용어 "첨가제"는 개시된 ECM 물질에 선택적으로 혼입되어 본원에 개시된 멸균 무세포성 ECM 조성물에 예정 특성을 부여할 수 있는 물질을 말한다. 이러한 첨가제로는 예를 들어 제한 없이, 성장 인자, 시토킨, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸(GAGs), 단백질, 펩티드, 핵산, 소분자, 세포 및 약학적 약물, 예를 들어 스타틴 약물, 코르티코스테로이드, 항부정맥제, 비스테로이드성 항염 약물, 기타 항염 화합물, 나노입자, 및 금속 화합물을 들 수 있다.

[0180] 본원에서 사용되는 용어 "동시에"는 상황들이 동시 및/또는 겹쳐서 일어나는 것 외에도, 상황들이 서로를 전후하여 약 30분 이내에 순차적으로 일어나는 것을 말한다. 따라서, 첫 번째 상황이 일어나는 경우, 두 번째 상황이 첫 번째 상황과 동시에 일어나거나 첫 번째 상황 전 또는 후에 30 분 이내에 일어난다고 말할 수 있다. 예를 들어, 첫 번째 방법 단계가 수행되는 경우, 그 첫 번째 방법 단계 후 5분 후에 수행된 두 번째 방법 단계는 첫 번째 방법 단계와 "동시에" 수행된다고 말할 수 있다. 마찬가지로, 두 번째 방법 단계가 세 번째 방법 단계 전 10 분 전에 수행된 경우, 그 두 번째 방법 단계는 세 번째 방법 단계와 "동시에" 수행된다고 말할 수 있다.

[0181] 본 원에서 사용되는 용어 "에멀션"은 제 1 ECM 물질이 제 2 ECM 물질에 분산되어 있으면서 제 1 ECM 물질이 제 2 ECM 물질과 혼화될 수 없는 혼합물을 말한다. 본원에서 기재된 용어 "에멀션"은 수중유형 에멀션 또는 유중수형 에멀션을 말한다.

[0182] 본원에서 사용되는 용어 "현탁액"은, 예를 들어 제한 없이 미립자상 ECM과 같은 고체 ECM 물질이, 예를 들어 제



한 없이 ECM 겔 또는 ECM 액체와 같은 유체 ECM 물질에 분산(현탁)되어 있는 혼합물을 말한다.

[0183] 본원에서 사용되는 용어 "초임계"는 그의 임계 온도 및 임계 압력 이상에서 유지되는 경우의 물질의 유체 상태를 말한다. 물질이 그의 임계 온도 및 임계 압력 이상에서 유지되는 경우, 이는 일반적으로 기체 및 액체 모두의 기능적 특성을 채택하고 초임계 유체로서 작용한다고 말한다. 따라서, 예를 들어, 이산화탄소가 그의 임계 온도(31.1 °C) 및 그의 임계 압력(1,071 psi) 이상에서 유지되는 경우, 이는 초임계 이산화탄소 유체로서 거동하고, 예를 들어, 액체의 밀도를 가지면서 기체의 팽창 특성을 나타낼 수 있다.

[0184] 본원에서는 무세포성 세포의 기질(ECM) 조성물 및 이러한 조성물의 제조 방법을 개시한다. 본원에 기재한 바와 같이, 개시된 세포의 기질 조성물은 분리된 ECM 물질을 멸균하는 동시에 탈세포화 함으로써 형성된다. 더욱 구체적으로, 개시된 방법은 조직 조성물의 본래의 특성이 유지되고 ECM 물질이 멸균 및 무세포성이 되도록, 분리된 ECM 물질의 원하는 멸균 및 탈세포화를 동시에 달성한다.

[0185] 본원에 더욱 기재하는 바와 같이, 개시된 방법은 ECM 물질의 급속 감압을 이용하여 ECM 물질을 탈세포화 한다. ECM 물질의 이러한 급속 감압은 예전에 알려진 방법에서 적용되는 감압 속도 보다 유의하게 높은 감압 속도로 일어난다. 본원에 기재한 바와 같이 ECM 물질을 감압하는 외에도, ECM 물질의 급속 감압을 이용하여 ECM 물질에의 원하는 멸균제 및 첨가제의 혼입을 강화할 수도 있다.

#### [0186] ECM 조성물

[0187] 예시적인 양상에서, 멸균된 무세포성 ECM 조성물은, 예를 들어 제한 없이 점막층 및 성분, 점막하층 및 성분, 근육층 및 성분, 및/또는 기저막층 및 성분을 비롯한 임의의 알려진 ECM 성분 또는 물질을 포함할 수 있다. 개시된 멸균 무세포성 ECM 조성물은, 예를 들어 제한 없이 위조직(예, 위 점막하층(SS)), 소장조직(예, 소장 점막하층(SIS)), 대장 조직, 방광 조직(예, 비뇨 방광 점막하층(UBS)), 간조직(예, 간기저막(LBM)), 심장 조직(예, 심낭막), 폐조직, 신장 조직, 췌장 조직, 전립선 조직, 중피 조직, 태아 조직, 태반, 수뇨관, 정맥, 동맥, 발생하는 치아의 뿌리 주변의 조직, 및 성장하는 뼈 주변의 조직을 비롯한, 임의의 포유동물 조직 소스로부터 얻은 ECM 물질을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 멸균 무세포성 ECM 조성물은, 예를 들어 제한 없이 인간, 소, 돼지, 개, 양, 고양이, 말, 설치류를 비롯한 한 종 이상의 포유동물의 ECM 성분 또는 물질로부터 얻은 ECM 물질을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, 개시된 멸균 무세포성 ECM 조성물은, 예를 들어 제한 없이 둘 이상의 소, 둘 이상의 돼지, 둘 이상의 개, 또는 둘 이상의 양과 같은 동일 포유동물 종의 둘 이상으로부터 유래한 ECM 성분 또는 물질을 포함하는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 멸균 무세포성 ECM 조성물은 둘 이상의 상이한 포유동물 종, 예를 들어 제한 없이, 돼지와 소, 돼지와 개, 돼지와 양, 또는 소와 양으로부터 유래한 ECM 성분 또는 물질을 포함하는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 멸균 무세포성 ECM 조성물은 제 1 포유동물 유래의 예를 들어 제한 없이 SIS와 제 1 조직 소스로부터 얻은 ECM 성분 또는 물질 외에도, 제 2 포유동물 유래의 예를 들어 제한 없이 SS와 같은 제 2 조직 소스로부터 얻은 ECM 성분 또는 물질을 포함할 수 있는 것으로 예상된다.

[0188] 여러 가지 양상에서, 개시된 멸균 무세포성 ECM 조성물은, 예를 들어 제한 없이 실질적으로 평평한 시트, 원통형 튜브, 실질적으로 구형인 구조, 또는 다층 적층 구조와 같은 임의의 적당한 형상으로 제조될 수 있다. 또한, 개시된 멸균 무세포성 ECM 조성물은, 예를 들어 제한 없이 고체, 액체, 겔, 미립자, 에멀션 또는 현탁액 형태를 비롯한 임의의 적당한 형태로 제조될 수 있는 것으로 예상된다. 하나의 예시적인 양상에서, 개시된 멸균 무세포성 ECM 조성물은 액체, 미립자, 에멀션, 현탁액 및/또는 ECM 물질의 내층을 감싸는 고체 ECM 물질의 외층을 포함할 수 있는 것으로 예상된다.

[0189] 또 다른 예시적인 양상에서, 개시된 멸균 무세포성 ECM 조성물은 ECM 겔 내에 현탁되어 ECM 현탁액을 형성하는 한 종 이상의 미립자상 ECM 물질을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 개시된 ECM 현탁액 내의 미립자는 약 5  $\mu\text{m}$  내지 약 300  $\mu\text{m}$ 의 직경 및 약 90  $\mu\text{m}$  내지 약 100  $\mu\text{m}$ 의 평균 직경을 가질 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 ECM 현탁액 내의 겔의 비율은 약 5% 내지 약 50%이고, 개시된 ECM 현탁액 내의 미립자의 비율은 약 50% 초과 내지 약 95%의 범위일 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, 개시된 ECM 현탁액 내의 겔의 비율은 약 10%일 수 있고, 개시된 ECM 현탁액 내의 미립자의 비율은 약 90%일 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 ECM 현탁액 내의 겔의 비율은 약 15%일 수 있고, 개시된 ECM 현탁액 내의 미립자의 비율은 약 85%일 수 있는 것으로 예상된다. 더욱 바람직하게, 개시된 ECM 현탁액 내의 겔의 비율은 약 20% 내지 약 30%의 범위일 수 있고, 개시된 ECM 현탁액 내의 미립자의 비율은 약 70% 내지 약 80%의 범위일 수 있다. 따라서, 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 현탁액 내의 겔의 비율은 약 20%일 수 있고, 개시된 ECM 현탁액 내의 미립자의 비율은 약 80%일 수 있다. 또 다른 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 현탁액 내의 겔의 비율은 약 25%일 수 있고, 개시된

ECM 현탁액 내의 미립자의 비율은 약 75%일 수 있다. 추가의 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 현탁액 내의 겔의 비율은 약 30%일 수 있고, 개시된 ECM 현탁액 내의 미립자의 비율은 약 70%일 수 있다. 상기 비율은 특정의 시작점 값 및 종점값을 말하지만, 개시된 ECM 현탁액은 상기 개시된 범위들 중 임의의 범위에 속하는 겔 비율 및 미립자 비율로 형성될 수 있는 것으로 예상된다.

[0190] 추가의 양상에서, 개시된 ECM 현탁액은 멸균 및 탈세포화된 ECM을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 현탁액의 ECM 겔은 가수분해된 ECM일 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상들에서, 개시된 ECM 현탁액의 ECM 겔은 약 50% 초과, 바람직하게는 약 70%, 가장 바람직하게는 약 90% 초과하여 가수분해되는 ECM을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 하나의 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 현탁액의 ECM 겔은 약 100% 가수분해되는 ECM을 포함할 수 있다. 또한, 상기 현탁액의 ECM 겔은 당단백질, 예를 들어 제한 없이, 피브로넥틴 및 라미난; 글리코사미노글리칸, 예를 들어, 헤파란, 히알루론산, 및 황산 콘드로이틴; 및 성장 인자 중 적어도 하나를 포함함으로써, 천연 세포 성분에 추가의 생체내이용물을 제공할 수 있다. 상기 현탁액의 ECM 성분은 개체 내에서 개시된 ECM 현탁액의 이식 후 세포 성장 및 줄기 세포 유인(attraction)을 촉진하는 구조적 및 생화학적 미세환경을 제공할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 ECM 현탁액의 ECM 겔은 개체의 세포가 그 자신의 ECM을 생성하기 시작할 때까지 원하는 생화학적 환경을 보존하는 벌킹제(bulking agent)로 작용할 수 있는 것으로 예상된다.

[0191] 또한, ECM 겔에 의해 보존되는 원하는 생화학적 환경은 천연 조직 내의 생화학적 환경에 실질적으로 해당할 수 있는 것으로 판단된다. 따라서, 개시된 ECM 현탁액의 ECM 겔은 개체 내의 표적 부위의 탄성률과 실질적으로 동일한 탄성률을 가질 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 현탁액의 ECM 겔의 탄성률은 약 5 kPa 내지 약 50 kPa, 더욱 바람직하게는 약 10 kPa 내지 약 15 kPa의 범위일 수 있다.

[0192] 하나의 비제한적인 예시적 양상에서, 개시된 ECM 현탁액이 개체의 심장 상의 또는 심장 내의 표적 부위에의 주사를 위한 것인 경우, 개시된 ECM 현탁액의 ECM 겔의 탄성률은 심장 근육의 탄성률인 약 11.5 kPa일 수 있는 것으로 예상된다. 본원에서 사용되는 용어 "심장 상의 또는 심장 내의"는 예를 들어 심낭, 외심막, 심근, 심장내막, 심실, 심방, 대동맥, 폐동맥, 폐정맥, 대정맥 등의 상부 또는 내부의 위치를 말한다. 또 다른 양상에서, 개시된 ECM 현탁액은 개체의 심장 상에 또는 내부의 표적 부위에 주사되어, 급성 심근 경색 및/또는 만성 관상 심장 질환 후에 발생하는 좌심실벽의 음성 재형성(left ventricular wall negative remodeling)을 치료적으로 예방하거나 반전시킬 수 있는 것으로 예상된다. 본원에서 사용되는 용어 "음성 재형성"은 심근 손상에 반응하여 일어나는 심장내의 해롭고/거나 바람직하지 못한 변화를 말한다. 이러한 바람직하지 못한 변화로는 예를 들어 제한 없이, 근육 세포의 변화, 근육 세포 손실, 세포외 기질 분해, 세포외 기질 대치 섬유화, 좌심실 구조의 변화, 증가된 벽 응력(후부하), 후부하 부조화(afterload mismatch), 일시적인 심막내하 저관류(episodic subendocardial hypoperfusion), 증가된 산소 이용, 지속된 혈액학적 과부하(sustained hemodynamic overloading), 및 보상 기작의 활성화의 악화 등이 있다. 또한, 개시된 ECM 현탁액은 개체의 심장 상에 또는 내부의 표적 부위에 주사되어 심부전을 치료적으로 치료할 수 있는 것으로 예상된다.

[0193] 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 현탁액은 예를 들어 제한 없이, 심낭, 외심막, 심근, 심장내막, 심실, 심방, 대동맥 등의 상부 또는 내부와 같은 개체의 심장의 상부 또는 내부의 표적 부위에 주사될 수 있는 것으로 예상된다. 선택적으로, 하나의 양상에서, 개시된 ECM 현탁액은 격자형 패턴으로 주사될 수 있다. 이러한 양상에서, 개시된 ECM 현탁액은 간격들 두고 실질적으로 평행한 라인들의 제 1 열(series) 및 상기 제 1 열에 대하여 실질적으로 평행하여 격자형 패턴을 한정하는 것으로 간격들 두고 실질적으로 평행한 라인들의 제 2 열의 형태로 주사될 수 있는 것으로 예상된다.

[0194] 또 다른 측면에서, 개시된 ECM 현탁액은 개체의 심장 상부 또는 내부의 표적 부위에 도포되어 약 0.1 mm 내지 약 10 mm, 더욱 바람직하게는 약 1 mm 내지 약 5 mm, 가장 바람직하게는 약 2 mm 내지 약 4 mm 범위의 두께를 갖는 개시된 ECM 현탁액의 막을 형성할 수 있는 것으로 예상된다. 하나의 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 현탁액은 개체의 심장 상부 또는 내부의 표적 부위에 도포되어 약 3 mm의 두께를 갖는 ECM 현탁액의 막을 형성할 수 있는 것으로 예상된다.

[0195] 추가의 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 현탁액은 개체의 심장의 심근 또는 반흔 조직 내부에 위치한 표적 부위에 주사될 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 개시된 ECM 현탁액은 심낭의 외측 표면을 기준으로 원하는 깊이로 개체의 심장 내의 심근 또는 반흔 조직에 주사될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 ECM 현탁액이 주사되는 원하는 깊이는 약 0.5 mm 내지 약 5 mm, 더욱 바람직하게는 약 1 mm 내지 약 3 mm, 가장 바람직하게는 약 1.5 mm 내지 2.5 mm의 범위일 수 있는 것으로 예상된다. 하나의 예시적인 양상에서, 개시된 ECM

현탁액이 주사되는 원하는 깊이는 약 2 mm일 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 개시된 ECM 현탁액이 주사되는 원하는 깊이는 심근층과 외심막 사이의 접합부에 근접한 위치에 해당할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 ECM 현탁액이 주사되는 원하는 깊이는 허혈성 및/또는 염증성 및/또는 손상된 심장 조직에 근접한 위치에 해당할 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 현탁액이 주사되는 원하는 깊이는 회저성 및/또는 경색된 심근에 근접한 위치에 해당할 수 있는 것으로 예상된다.

[0196] 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 현탁액이 심근 경색의 발생 후 개체의 심장의 심근 및/또는 하나 이상의 심실내의 표적 부위에 주사되어야 하는 경우, ECM 현탁액은 하기와 같은 두 개의 가능한 시간 동안 표적 부위에 주사되어야 하는 것으로 예상된다: 개체의 염증성 반응의 충분한 개시 이전 또는 개체의 염증성 반응이 감소한 후. 하나의 양상에서, ECM 현탁액이 개체의 염증성 반응의 충분한 개시 이전에 표적 부위에 주사되는 경우, ECM 현탁액은 심장의 혈관 재개통(예를 들어, 관상동맥 우회 그래프트 또는 스텐트를 이용한)시까지 심근 경색의 발생 후 실질적으로 즉시 표적 부위에 주사되어야 하는 것으로 예상된다. 또 다른 양상에서, ECM 현탁액이 개체의 염증성 반응이 감소한 후 표적 부위에 주사되는 경우, ECM 현탁액은 음성적 재구성 및 반흔 조직 형성이 일어나는 심근 경색의 급성 단계 이후에 표적 부위에 주사되어야 하는 것으로 예상된다. 여러 양상에서, 개체의 심장 상에 또는 내부에 개시된 ECM 현탁액의 주사 후, ECM 현탁액은 분산하는 것이 아니라 줄기 세포를 표적 부위로 유인하여 심장의 원하는 양성 재구성을 촉진하는 것으로 예상된다. 본원에서 사용되는 용어 "양성 재구성"은 손상된 심장 조직의 이로운 재생 및/또는 재구성을 말하는 것으로서, 이러한 양성 재구성은 심장의 기능을 보존하고 반흔 조직의 형성을 예방하면서 새로운 세포의 성장을 촉진한다.

[0197] ECM 조성물의 멸균 및 탈세포화

[0198] 선택적으로, 개시된 세포의 기질 조성물, 예를 들어 제한 없이 NovaSterilis, Inc.사에 양도된 미국특허 7,108,832호에 기재된 장치와 같은 알려진 멸균 장치를 이용하여 멸균될 수 있는 것으로 예상된다. 상기 특허는 그 전체가 본원에 참조로 특별히 포함된다. 따라서, 몇몇 양상에서, 개시된 방법을 수행하기 위하여 사용된 장치는 표준 압축식 저장 실린더 및 부스터(booster)와 함께 작동하도록 사용되는 표준 공기 압축기를 포함할 수 있다(예를 들어, Haskel Booster AGT 7/30). 다른 양상에서, 상기 공기 압축기 및 부스터는 단일 압축기로 대체될 수 있다. 예시적인 양상에서, 압축식 저장 실린더는 이산화탄소를 수용하도록 구성될 수 있고, 부스터는 이산화탄소 부스터일 수 있다.

[0199] 상기 장치는 저장소에 함유된 한 종 이상의 첨가제가 밸브 및 첨가 라인을 통해 반응 용기에 첨가될 수 있도록 하는 입구를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "반응 용기"는 ECM 물질을 수용하고 그 ECM 물질이 본원에 개시한 바와 같은 한 종 이상의 멸균제 및 첨가제에 노출될 수 있도록 구성되는 내부 공간을 갖는 임의의 용기를 말한다. 예시적인 양상에서, 상기 반응 용기는 제한 없이, 바스켓, 버킷, 배럴, 박스, 및 다른 알려진 용기일 수 있다. 하나의 양상에서, 상기 반응 용기는 ECM 물질이 채워지는 주사기일 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 상기 반응 용기는 Tyvek® 패키징을 포함하는 파우치(pouch)(E.I. du Pont de Nemours and Company사)일 수 있다.

[0200] 예를 들어 제한 없이 이산화탄소와 같은 선택된 주요 멸균제가 밸브 및 공급 라인을 통해 헤더 라인(header line)으로부터 도입될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 예를 들어 제한 없이 0.5  $\mu\text{m}$  필터와 같은 필터가 용기로부터 물질의 이탈을 방지하기 위해 공급 라인에 제공될 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 압력이 육안으로 확인할 수 있도록 헤더 라인의 섷-오프 밸브(shut-off valve)의 하류측에 압력 게이지가 제공될 수 있다. 유체 흐름이 부스터로 역류하는 것을 방지하기 위하여 밸브의 상류 측의 헤더 라인에 체크 밸브가 설치될 수 있다. 헤더 라인에 과압 조건이 존재하는 것을 방지하기 위하여, 압력 조절 밸브가 선택적으로 설치될 수 있다.

[0201] 하나의 양상에서, 상기 반응 용기의 감압은 반응 용기와 소통하는 배출 라인 및 밸브를 이용하여 달성될 수 있다. 이러한 양상에서, 감압된 유체는 공급 라인을 통해 용기로부터 배출되고, 필터 유닛을 통해 여과된 다음, 분리기로 이송되어, 이산화탄소와 같은 여과된 유체가 배출 라인을 통해 배출될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상류측 성분들의 유체 분리가 가능하도록 장치의 여러 라인에 밸브가 포함될 수 있는 것으로 예상된다.

[0202] 하나의 예시적인 양상에서, 상기 반응 용기는 예를 들어 제한 없이 316 게이지 스테인리스 강과 같은 스테인리스 강을 포함할 수 있다. 또 다른 예시적인 양상에서, 상기 반응 용기는 멸균되는 물질을 실험실 규모 또는 상업적인 규모로 수용하기에 충분한 전체 내용적을 가질 수 있다. 예를 들어, 반응 용기는 약 8 인치의 길이, 약 2.5 인치의 내경, 및 약 600 mL의 내용적을 가질 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 양상에서, 반응 용기는 진동기, 온도 제어 유닛, 및 임펠러 및 자성 드라이버를 포함하는 기계적 교반 장치를 포함할 수 있다. 하나의



선택적인 양상에서, 반응 용기는 316 게이지 스테인리스 강을 포함하는 바스켓을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 상기 바스켓은 멸균될 물질을 유지하면서 임펠러를 보호하고 주요 멸균제를 예정 방법으로 전달하도록 구성될 수 있는 것으로 예상된다.

[0203] 상기 반응 용기는 튜밍(splashing) 또는 난류로 인한 물질의 손실이 없이 그리고 역확산에 의한 압력 라인의 오염이 없이 지속적인 가압 및 감압(압력 사이클) 하에서 또는 일정한 압력에서 조작될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 장치내의 밸브들은 그 장치의 다른 구성요소들로부터 반응 용기의 용이한 분리 및 제거를 가능하게 하는 것으로 예상된다. 하나의 양상에서, 반응 용기의 상부는 감압시 제거되어 반응 용기의 내부 공간에의 접근이 가능하도록 할 수 있다.

[0204] 선택적으로, 상기 장치는 사용자가 반응 용기내의 온도를 조절하도록 할 수 있도록 하는 온도 조절 유닛을 포함할 수 있다.

[0205] 사용 시, 개시된 장치는 본원에 개시한 바와 같은 멸균된 무세포성 ECM 조성물을 제조하는 방법에서 이용될 수 있다. 그러나, 개시된 장치는 단지 예시적인 것으로서, 개시된 방법 단계들을 수행할 수 있는 임의의 장치가 멸균된 무세포성 ECM 조성물을 제조하기 위해 이용될 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 청구한 방법은 결코 특정 장치로 제한되는 것이 아니다.

[0206] 콜로니 형성 단위(CFUs)의 유의한 감소는 분리된 ECM 물질을 주요 멸균제를 이용하여 멸균 온도 및 압력 조건에 처하게 함으로써 개시된 방법에 따라 달성될 수 있는 것으로 예상된다. 선택적으로, 주요 멸균제는 원하는 멸균을 달성하기 위해 한 종 이상의 보조 멸균제와 결합될 수 있는 것으로 예상된다. 선택적으로, 얻어지는 ECM 조성물에 원하는 특성을 부여하기 위해, 선택된 첨가제들이 ECM 물질에 혼입될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 방법은 개체의 신체내에 이식하기 위한 멸균된 무세포성 ECM 조성물을 제조하기 위해 이용될 수 있는 것으로 예상된다.

[0207] 본원에 기재한 바와 같이, 개시한 방법은 ECM 물질이 무세포성이 되도록 하기 위하여 분리된 ECM 물질의 급속 감압을 이용한다. 이러한 ECM 물질의 급속 감압은 예전에 알려진 방법에서 적용되는 감압 속도보다 유의하게 높은 감압 속도로 일어난다. 전술한 바와 같이 ECM 물질이 무세포성이 되도록 하는 외에도, ECM 물질의 급속 감압은 ECM 물질내로 원하는 멸균제 및 첨가제의 혼입을 강화하기 위해서도 사용될 수 있다. 또한, ECM 물질의 급속 감압은 예전에 알려진 탈세포화 방법과 비교하여 천연 성장 인자의 유지를 개선하면서 ECM 물질이 무세포성이 되도록 할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, ECM 물질의 급속 감압은 예전에 알려진 탈세포화 방법과 비교하여 ECM 물질의 인장 강도의 유지를 개선하기 위하여 사용될 수 있는 것으로 예상된다.

[0208] 개시한 방법은 ECM 조성물의 기계적 강도 및 생물학적 특성을 유의하게 약화시키지 않는 외에도, 상기 방법은 ECM 조성물을 탈세포화하고 ECM 조성물내의 여러 첨가제의 혼입을 강화하는데 있어서 더욱 효과적이다. 따라서, 개시한 멸균 및 탈세포화 방법은 당업계에 알려진 ECM 조성물과 비교하여 더욱 많이 탈세포화되고 더욱 많은 첨가제를 혼입 및 전달하기 위한 더욱 큰 능력을 갖는 ECM 조성물을 제공한다. 또한, 개시한 멸균 및 탈세포화 방법은 당 업계에 알려진 멸균 및 탈세포화된 ECM 조성물과 비교하여 더욱 많은 양 및/또는 농도의 보유된 천연 성장 인자를 갖고 더욱 큰 인장 강도를 갖는 ECM 조성물을 제공한다.

[0209] 예시적인 양상에서, 주요 멸균제는 그의 초임계 압력 및 온도 조건 또는 그 조건 근처에 있는 이산화탄소일 수 있다. 그러나, 예를 들어 ECM 물질의 본래의 특성을 방해하지 않는 기체, 액체 또는 분말 멸균제를 비롯한 임의의 통상적인 멸균제가 주요 멸균제로서 사용될 수 있는 것으로 예상된다.

[0210] 하나의 예시적인 양상에서, 개시한 멸균 공정은 약 1000 내지 약 3500 psi의 압력 및 약 25 °C 내지 약 60 °C의 온도에서 주요 멸균제로서 이산화탄소를 이용하여 실시될 수 있다. 더욱 바람직하게, 초임계 이산화탄소가 사용되는 경우, 그 멸균 공정은 약 1,071 psi 이상의 압력 및 31.1°C 이상의 온도에서 주요 멸균제로서 이산화탄소를 이용할 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 멸균하고자 하는 ECM 물질은 약 10 분 내지 약 24 시간, 더욱 바람직하게는 약 15 분 내지 약 18 시간, 가장 바람직하게는 약 20 분 내지 약 12 시간 동안 그러한 압력 및 온도 조건 또는 그 조건 근처에서 이산화탄소에 노출될 수 있다. 바람직하게, 개시한 장치 및 방법에서 이용되는 이산화탄소는 순수하거나, 그렇지 않으면, 이산화탄소의 멸균 특성을 저해하지 않는 미량의 다른 기체를 함유할 수 있다. 하기의 설명을 용이하게 하기 위하여, 용어 "초임계 이산화탄소"가 사용되지만, 이러한 용어는 전술한 바와 같은 압력 및 온도 범위 내의 이산화탄소가 개시한 방법의 실시에서 만족스럽게 이용될 수 있다는 점에서 비제한적인 것이다. 개시한 압력 및 온도 범위 내에서, 이산화탄소는 기체, 액체, 유체 또는 플라즈마 형태로 ECM 물질에 제시될 수 있는 것으로 예상된다.



- [0211] 몇몇 양상에서, 개시한 방법에서 이용되는 보조 멸균제로는, 예를 들어 제한 없이 과산화물 및/또는 카르복시산과 같은 화학적 멸균제가 있다. 바람직한 카르복시산으로는 알칸카르복시산 및/또는 알칸피카르복시산이 있는데, 이들은 각각 할로겐, 산소 및 질소 기와 같은 한 종 이상의 전자끄는 치환기로 알파 카본에서 선택적으로 치환될 수 있다. 개시한 방법의 실시에서 이용되는 화학적 멸균제의 예로는 중으로는 예를 들어 제한 없이 과산화수소( $H_2O_2$ ), 아세트산(AcA), 과아세트산(PAA), 트리플루오로아세트산(TFA), 및 이들의 혼합물 등이 있다. 하나의 예시적인 양상에서, 화학적 멸균제로는 아세트산, 과산화수소 및 과아세트산을 포함하는 혼합물인 Sporeclenz® 멸균제를 들 수 있다.
- [0212] 보조 멸균제는 주요 멸균제의 전체 부피를 기준으로 적어도 약 0.001 부피% 이상의 멸균 강화에 효과적인 양으로 이용될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 보조 멸균제의 양은 이용되는 특정 멸균제에 의존할 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, 예를 들어, 과아세트산은 약 0.005 부피% 이상의 비교적 소량으로 존재하는 반면에, 아세트산은 약 1.0 부피% 이상의 양으로 이용될 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, 보조 멸균제의 농도는 약 0.001 부피% 내지 약 2.0 부피%일 수 있고, 일반적으로 예를 들어 초임계 이산화탄소와 같은 개시한 주요 멸균제와의 조합으로 멸균 강화 효과를 달성하기 위해 본원에 개시한 바와 같이 사용될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0213] 하나의 양상에서, 멸균된 무세포성 ECM 조성물을 제조하는 방법은 선택된 조직을 포유동물로부터 수득하고, 예를 들어 제한 없이 링거액 또는 평형 생리학적 염 용액을 비롯한 멸균수 또는 다른 생체적합성 액체에서 상기 선택된 조직을 세척하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 선택된 조직은, 예를 들어 제한 없이 위 조직(예, 위점막하층(SS)), 소장조직(예, 소장 점막하층(SIS)), 대장 조직, 방광 조직(예, 비뇨 방광 점막하층(UBS)), 간조직(예, 간기저막(LBM)), 심장 조직(예, 심낭막, 외심막, 심장내막, 심근막), 폐조직, 신장 조직, 췌장 조직, 전립선 조직, 중피 조직, 태아 조직, 태반, 수노관, 정맥, 동맥, 혈관이 부착되어 있거나 부착되지 않은 심장 판막, 발생하는 치아의 뿌리 주변의 조직, 및 성장하는 뼈 주변의 조직일 수 있다. 또 다른 양상에서, 상기 방법은 상기 선택된 조직을 약 12 내지 약 36 시간, 더욱 바람직하게는 약 18 내지 약 30 시간, 가장 바람직하게는 약 22 내지 약 26 시간 동안 동결하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 선택된 조직이 동결되는 시간은 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간, 16 시간, 17 시간, 18 시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 23 시간, 24 시간, 25 시간, 26 시간, 27 시간, 28 시간, 29 시간, 30 시간, 31 시간, 32 시간, 33 시간, 34 시간, 35 시간, 36 시간, 및 상기 값들의 사이에 속하는 임의의 다른 시간일 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 양상에서, 상기 방법은 상기 선택된 조직을 차가운 저장(hypotonic) 트리스 완충액에서 해동하는 것을 포함할 수 있다. 선택적으로, 이러한 양상에서, 상기 방법은 5 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 갖는 얼음 상의 차가운 저장 트리스 완충액에서 상기 선택 조직을 해동하는 것을 포함할 수 있다. 예시적인 양상에서, 상기 선택된 조직을 동결 및 해동하는 단계들은 주기적으로 6회까지 반복될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0214] 또 다른 양상에서, 상기 방법은 선택된 조직으로부터 ECM 물질을 분리하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질은, 예를 들어 제한 없이 위조직(예, 위점막하층(SS)), 소장조직(예, 소장 점막하층(SIS)), 대장 조직, 방광 조직(예, 비뇨 방광 점막하층(UBS)), 간조직(예, 간기저막(LBM)), 심장 조직(예, 심낭막, 외심막, 심장내막, 심근막), 폐조직, 신장 조직, 췌장 조직, 전립선 조직, 중피 조직, 태아 조직, 태반, 수노관, 정맥, 동맥, 혈관이 부착되어 있거나 부착되지 않은 심장 판막, 발생하는 치아의 뿌리 주변의 조직, 및 성장하는 뼈 주변의 조직을 비롯한 알려진 세포의 기질 성분을 포함하는 임의의 물질일 수 있다. 하나의 예시적인 비제한적 양상에서, ECM 물질을 분리하는 단계는 포유동물의 조직 소스로부터 SIS를 분리하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 방법은 소장의 세로축에 실질적으로 평행한 경로를 따라 소장의 벽을 절개하고; 상기 절개 경로를 따라 소장을 열어서 소장이 표면에 평평하게 놓이도록 하고; 소장을 멸균 식염수 또는 다른 생체적합성 유체로 세척하고; 주변의 평활근 및 장막층 및 점막층으로부터 소장의 SIS를 기계적으로 벗겨내서, 본질적으로 점막하층 및 기저막층이 남도록 하는 것을 포함할 수 있다. 그러나, ECM 물질은 그 각각의 전체가 참조로 본원에 명백히 포함되는 다음 문헌들에 기재된 것들을 비롯한 임의의 기법을 이용하여 분리될 수 있는 것으로 예상된다: 미국특허 제 4,902,508호; 미국특허 제 5,275,826호; 미국특허 제 5,281,422호; 미국특허 제 5,554,389호; 미국특허 제 6,579,538호; 미국특허 제 6,933,326호; 미국특허 제 7,033,611호; Voytik-Harbin 등, "Identification of Extractable Growth Factors from Small Intestinal Submucosa," J. Cell. Biochem., Vol. 67, pp. 478-491 (1997); Hodde 등, "Virus Safety of a Porcine-Derived Medical Device: Evaluation of a Viral Inactivation Method," Biotech. & Bioeng., Vol. 79, No. 2, pp. 211-216 (2001); Badylak 등, "The Extracellular Matrix as a Scaffold for Tissue Reconstruction," Cell & Developmental Biology, Vol. 13, pp. 377-383 (2002); Robinson 등, "Extracellular Matrix Scaffold for Cardiac Repair," Circulation, Vol. 112, pp. I-135-I-143 (2005); Hodde 등, "Effects of Sterilization on an Extracellular Matrix

Scaffold: Part I. Composition and Matrix Architecture," J. Mater. Sci.: Mater. Med., Vol. 18, pp. 537-543 (2007); 및 Hodde 등, "Effects of Sterilization on an Extracellular Matrix Scaffold: Part II. Bioactivity and Matrix Interaction," J. Mater. Sci.: Mater. Med., Vol. 18, pp. 545-550 (2007).

- [0215] 추가의 양상에서, 상기 방법은 분리된 ECM 물질을 인산염 완충액 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Lonza Walkersville, Inc.사))에서 5 mM EDTA이 첨가된 0.5-1% Triton X-100/0.5-1% 테옥시콜린 산에서 24 내지 48 시간 동안 배양하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 위점막하층(SS), 소장 점막하층(SIS) 및 방광 점막하층(UBS)과 같은 평평하거나 관형의 ECM 물질이 신장된 형태로 배양될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 수노관, 동맥, 정맥 및 관형 SIS와 같은 ECM 물질 도관 또는 다른 내강 (luminal) ECM 물질에 침적을 통해 또는 튜브 연동식 펌프의 사용을 통해 여러 가지 개시된 용액들이 관류될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0216] 추가의 양상에서, 배양 후, 상기 방법은 ECM 물질을 DPBS로 세척하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질을 세척하는 단계는 ECM 물질을 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 또는 6회를 비롯한 6회까지 각 세척당 약 30 분간 세척하는 것을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, ECM 물질을 세척하는 단계는 ECM 물질을 각 세척당 약 30분씩 3회 세척하는 것을 포함할 수 있는 것으로 예상된다.
- [0217] 선택적으로, 예시적인 양상에서, 상기 방법은 제 2 배양 과정을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 제 2 배양 과정은 5 mM EDTA가 첨가된 10-50  $\mu\text{g/mL}$ 의 RNAase/0.2-0.5  $\mu\text{g/mL}$  DNAase를 함유하는 등장성 트리스 완충액에서 ECM 물질을 배양하는 것을 포함할 수 있다. 상기 등장성 트리스 완충액에서 ECM 물질을 배양하는 단계는 인체의 온도에 실질적으로 해당하는 약 37 °C의 온도에서 수행될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 등장성 트리스 완충액에서 ECM 물질을 배양하는 단계는 약 30 분 내지 약 24 시간, 더욱 바람직하게는 약 1 시간 내지 약 18 시간, 가장 바람직하게는 약 2 시간 내지 약 12 시간 동안 수행될 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 양상에서, 상기 제 2 배양 과정은 ECM 물질을 DPBS로 세척하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질을 세척하는 단계는 ECM 물질을 각 세척 당 30분씩 3회 세척하는 것을 포함하는 것으로 예상된다.
- [0218] 여전히 또 다른 양상에서, 제 2 배양 과정이 수행되는 지의 여부에 상관없이, 상기 방법은 ECM 물질을 약 1 °C 내지 약 10 °C, 더욱 바람직하게는 약 2 °C 내지 약 6 °C, 가장 바람직하게는 약 3 °C 내지 약 5 °C에서 보관하는 것을 포함할 수 있다. 예시적인 양상에서, ECM 물질은 4 °C에서 보관될 수 있다.
- [0219] 추가의 양상에서, 상기 방법은 ECM 물질을 반응 용기의 내부 공간에 도입하는 것을 포함할 수 있다. 선택적으로, 이러한 양상에서, 저장소로부터의 한 종 이상의 멸균제들이 ECM 물질과 함께 반응 용기의 내부 공간에 첨가될 수 있다. 이러한 양상에서, 저장소로부터의 한 종 이상의 멸균제들이 ECM 물질보다 먼저, 이후 또는 동시에 반응 용기의 내부 공간에 첨가될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 반응 용기의 내부 공간에서 원하는 온도를 생성하기 위해 온도 조절 유닛이 선택적으로 조절될 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 양상에서, 상기 방법은 반응 용기 내부의 압력 및 저장 실린더 내부의 압력을 평형화하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 양상에서, 반응 용기 내부의 압력 및 저장 실린더 내부의 압력은 대기압과 실질적으로 동일할 수 있는 것으로 예상된다. 여전히 또 다른 양상에서, 장치 내부의 압력을 평형화한 후, 상기 방법은 자성 드라이버를 작동시켜서 반응 용기의 임펠러를 작동시키는 것을 포함할 수 있다. 여전히 추가의 양상에서, 상기 방법은 반응 용기 내부의 원하는 압력이 달성될 때까지 저장 실린더로부터 반응 용기내로 주요 멸균제를 추가로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 주요 멸균제를 반응 용기내로 선택적으로 도입하는 단계는 공기 압축기 및 부스터를 선택적으로 작동시켜서 반응 용기 내로의 주요 멸균제의 흐름을 증가시키는 것을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 상기 공기 압축기 및 부스터는 ECM 물질이 초임계 이산화탄소를 생성하는데 필요한 압력 및 온도와 같은 초임계 압력 및 온도에 처하도록 약 20 분 내지 약 60 분간 작동될 수 있다.
- [0220] 추가의 양상에서, 상기 방법은 상기 반응 용기를 급속 감압하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 예를 들어 제한 없이 초임계 이산화탄소와 같은 예정된 양의 주요 멸균제가 반응 용기로부터 감압 라인을 통해 방출될 수 있다. 상기 주요 멸균제는 반응 용기에 결합된 밸브의 열림을 통해 반응기로부터 방출되어 반응 용기 내부의 압력을 감소시킬 수 있는 것으로 예상된다. 본원에서 사용되는 용어 "급속 감압"은 400 psi/min 이상의 속도로 반응기를 감압하는 것을 말한다. 예를 들어, 반응 용기는 약 2.9 MPa/min 내지 약 18.0 MPa/min (약 420 psi/min 내지 약 2,610 psi/min), 더욱 바람직하게는 약 5.0 MPa/min 내지 약 10.0 MPa/min (725 psi/min 내지 약 1,450 psi/min), 가장 바람직하게는 약 7.0 MPa/min 내지 약 8.0 MPa/min (약 1,015 psi/min 내지 약 1,160 psi/min)의 범위의 감압 속도로 급속 감압될 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, 이러한 급속 감압은 미국 특허 제 7,108,832호에 기재된 300 psi/min의 감압 속도보다 유의하게 크다. 임의의 특정 이론에 구속되지

않고, 개시된 급속 감압 속도는 ECM 물질에서 달성되는 탈세포화의 수준을 증가시킬 수 있는 것으로 판단된다. 예를 들어, 개시한 ECM 물질의 급속 감압은 96.1%, 96.2%, 96.3%, 96.4%, 96.5%, 96.6%, 96.7%, 96.8%, 96.9%, 97.0%, 97.1%, 97.2%, 97.3%, 97.4%, 97.5%, 97.6%, 97.7%, 97.8%, 97.9%, 98.0%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99.0%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 및 100.0%를 비롯한, 약 96%보다 큰 ECM 물질 내의 탈세포화 수준으로 이어질 수 있는 것으로 예상된다.

[0221] 예시적인 양상에서, 상기 방법은 한 종 이상의 첨가제를 ECM 물질에 혼입하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 한 종 이상의 첨가제는 분말이나 액체 형태로 제공될 수 있는 것으로 예상된다. 하나의 선택적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제를 혼입하는 단계는 반응 용기를 급속 감압하는 단계 동안에 한 종 이상의 첨가제를 반응 용기에 도입하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제의 도입은 통상의 발포(foaming) 공정으로 특징지어질 수 있다. 또 다른 선택적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제를 도입하는 단계는 반응 용기를 급속 감압한 후 반응 용기에 한 종 이상의 첨가제를 도입하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는 반응 용기의 급속 감압이 ECM 물질을 팽윤 및/또는 팽창시켜서 ECM 물질에의 첨가제의 침투를 개선한 후에 ECM 물질에 첨가될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 예시적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는 반응 용기의 급속 감압 후 약 30 분 이내에 ECM 물질에 첨가될 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 선택적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제를 혼입하는 단계는 반응 용기를 급속 감압하는 단계 동안 및 이후에 반응 용기에 한 종 이상의 첨가제를 도입하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는 반응 용기 내로 신속하게 또는 느리게 방출될 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 선택적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제를 혼입하는 단계는 반응 용기를 급속 감압하는 단계 이전에 반응 용기 내로 한 종 이상의 첨가제를 도입하는 것을 포함할 수 있다.

[0222] 개시된 첨가제는 얻어지는 멸균 무세포성 ECM 조성물에 선택된 특성을 부여하기 위하여 ECM 물질에 혼입될 수 있다. 따라서, 상기 한 종 이상의 첨가제는 본원에 개시된 바와 같은 ECM 물질의 처리 동안에 손실되는 ECM 물질의 성분들을 대체 또는 보충하도록 선택될 수 있는 것으로 예상된다. 예를 들어, 후술하는 바와 같이, 상기 한 종 이상의 첨가제는 성장 인자, 시토킨, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸(GAGs), 단백질, 펩티드, 핵산, 소분자, 약물, 또는 세포를 포함할 수 있다. 또한, 상기 한 종 이상의 첨가제는 ECM 물질내로 비천연 성분을 혼입하기 위해 선택될 수 있는 것으로 예상된다. 예를 들어, 상기 한 종 이상의 첨가제는 예를 들어 제한 없이, 줄기 세포를 동원하기 위한 성장 인자, 항원성 시토킨, 및 항염 시토킨을 포함할 수 있다. 또한, 상기 한 종 이상의 첨가제는 스타틴, 코르티코스테로이드, 비스테로이드성 항염 약물, 항염 화합물, 항부정맥제 등과 같은 약학적 약물일 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 은 나노입자, 금 나노입자, 백금 나노입자, 이리듐 나노입자, 로듐 나노입자, 팔라듐 나노입자, 구리 나노입자, 아연 나노입자 및 다른 금속 나노입자와 같은 나노입자일 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 한 종 이상의 첨가제는 금속 화합물일 수 있는 것으로 예상된다. 하나의 예시적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는 얻어지는 ECM 물질을 개체의 신체내로 이식한 후 면역 반응을 약화적으로 억제하기 위해 선택될 수 있다.

[0223] 하나의 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 전환 성장인자- $\beta$  -1, -2 또는 -3(TGF- $\beta$  1, 2 또는 3), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF)라고도 알려진 섬유아세포 성장 인자(FGF-2), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 태반 성장 인자(PGF), 결합 조직 성장 인자(CTGF), 간세포 성장 인자(HGF), 인슐린 유사 성장 인자(IGF), 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF), 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), 상피 성장 인자(EGF), 및 전환 성장 인자- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )를 비롯한 한 종 이상의 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0224] 또 다른 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 줄기 세포 인자(SCF), 간엽 세포 유래 인자-1 (SDF-1), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 인터페론 감마(IFN-gamma), 인터루킨-3, 인터루킨-4, 인터루킨-10, 인터루킨-13, 백혈병 억제 인자(LIF), 암피레굴린(amphiregulin), 트롬보스폰딘(thrombospondin 1), 트롬보스폰딘 2, 트롬보스폰딘 3, 트롬보스폰딘 4, 트롬보스폰딘 5, 및 안지오텐신 전환 효소(ACE)를 비롯한 한 종 이상의 시토킨을 포함할 수 있다.

[0225] 추가의 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 헤파란 설페이트 프로테오글리칸, 베타글리칸, 신데칸, 데코린, 어그리칸, 비글리칸, 피브로모듈린, 케라토칸, 루미칸, 에피피칸(epiphykan), 펠레칸(perlecan), 아그린(agrins), 테스트칸(testican), 신데칸(syndecan), 글리피칸(glypican), 서글리신(serglycin), 셀렉틴(selectin), 렉티칸(lectican), 버시칸(versican), 뉴로칸(neurocan) 및 브레비칸(brevican)을 비롯한 한 종 이상의 프로테오글리칸을 포함할 수 있다.

- [0226] 추가의 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 히파란 설페이트, 히알루론산, 히파린, 콘드로이틴 설페이트 B(더마탄 설페이트) 및 콘드로이틴 설페이트 A를 비롯한 한 종 이상의 글리코사미노글리칸을 포함할 수 있다.
- [0227] 여전히 추가의 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 엘라스틴, 비트로넥틴, 베르시칸, 라미닌, 피브로넥틴, 피브릴린-1, 피브릴린-2, 플라스미노젠, 작은 루신 풍부 단백질, 세포 표면 관련 단백질, 세포 부착 분자(CAMs), 매트리카인, 기질 금속단백분해효소(MMP), 카드헤린, 면역글로불린, 멀티플렉신, 세포질 도메인-44(CD-44), 아밀로이드 전구 단백질, 테나신(tenascin), 니도겐/엔탁신(nidogen/entactin), 피블린 I, 피블린 II, 인테그린, 막관통 분자(transmembrane molecules) 및 오스테오폰틴(osteopontin)을 비롯한 한 종 이상의 단백질, 펩티드 또는 핵산을 포함할 수 있다.
- [0228] 여전히 또 다른 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 스타틴 약물, 예를 들어 세레바스타틴, 아토르바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 메바스타틴, 피타바스타틴, 프라바스타틴, 로슈바스타틴 및 심바스타틴, 코르티코스테로이드, 비스테로이드성 항염 약물, 항염 화합물, 항부정맥제, 항균제, 항생제 등을 비롯한 한 종 이상의 약학적 약물을 포함할 수 있다.
- [0229] 예시적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제를 반응 용기에 도입하는 단계는 밸브를 열어서 상기 한 종 이상의 첨가제를 저장소로부터 유입구로 이동시키는 것을 포함할 수 있다. 감압 전에, 상기 한 종 이상의 첨가제는 밀봉 전에 반응 용기에 직접 도입되고/되거나 유입구를 통해 도입될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0230] 상기 반응 용기의 개시된 급속 감압 또는 재감압은 한 종 이상의 첨가제를 첨가하거나 첨가하지 않고, 임의의 원하는 수의 주기 동안 반복될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 급속 감압 및 재감압의 주기 외에도, 주요 멸균제 및/또는 보조 멸균제 및/또는 첨가제의 도입은 원하는 압력 조건 및 주기를 달성하도록 장치의 여러 밸브를 선택적으로 열고/열거나 닫도록 구성되는 제어기를 통해 자동으로 제어될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0231] 몇몇 양상에서, 상기 개시된 방법은 반응 용기의 내용물을 교반하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 반응 용기의 내용물을 교반하는 단계는 진동기를 이용하여 반응 용기의 내용물을 주기적으로 교반하는 것을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 반응 용기의 교반은 간헐적, 계속적 또는 연속적일 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 상기 반응 용기의 내용물을 교반하는 단계는 반응 용기내로 주요 멸균제를 도입하는 단계 동안에 일어날 수 있다. 상기 반응 용기의 내용물의 교반은 반응 용기내의 유체내의 보이드(void)를 제거하여 ECM 물질과 멸균제 및/또는 첨가제 사이의 접촉을 더욱 완전하게 함으로써 멸균제 및/또는 첨가제의 물질 전달을 강화할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 반응 용기의 내용물을 교반하는 단계는 멸균 시간, 온도 및 가압/감압 주기를 최적화하도록 교반의 강도 및 기간을 선택적으로 조절하는 것을 포함할 수 있는 것으로 예상된다.
- [0232] 추가의 양상에서, ECM 물질의 멸균 및 탈세포화가 종료된 후, 상기 방법은 반응 용기를 감압하고 자성 드라이버를 불활성화하여 교반 임펠러의 운동을 멈추게 하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 끝으로, 상기 방법은 얻어지는 멸균 무세포성 ECM 조성물을 반응 용기의 상부를 통해 제거하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0233] 개시된 단계들의 기간 외에도, 개시된 단계들과 관련된 온도 및 압력은 ECM 물질의 특성의 변화에 따라 선택적으로 변화될 수 있는 것으로 예상된다. 예를 들어, ECM 물질이 다층 적층 구조이거나, 증가된 두께를 갖거나 주시기 내에 위치하는 경우, 개시된 단계들의 기간은 증가될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0234] 하나의 선택적인 양상에서, 멸균 무세포성 ECM 조성물을 미립자 형태로 만들기 위하여, 상기 방법은 ECM 조성물은 원하는 길이를 갖는 조각들로 절단하는 것을 포함할 수 있다. 또 다른 양상에서, 상기 방법은 상기 ECM 조성물의 조각을 동결 건조하는 것을 선택적으로 포함할 수 있다. 추가의 양상에서, 상기 방법은 상기 ECM 조성물의 동결되고 수화된 조각들을 분쇄한 다음, 원하는 크기의 ECM 미립자가 분리될 때까지 ECM 조성물의 조각들을 사이저 스크린(sizer screen)에 통과시키는 것을 선택적으로 포함할 수 있다. 추가의 선택적인 양상에서, 상기 방법은 상기 ECM 미립자를 멸균 식염수 또는 기타 멸균 생체 적합성 유체를 이용하여 재수화하여 본원에 기재한 바와 같은 ECM 현탁액을 형성하는 것을 포함할 수 있다.
- [0235] 실시예
- [0236] 하기의 실시예들은 본원에 청구한 화합물, 조성물, 제품, 장치 및/또는 방법이 어떻게 제조되고 평가되는지를 당업자에게 완전히 개시 및 설명하기 위해 기재되는 것으로서, 오로지 본 발명을 예시하기 하는데 목적이 있고 본 발명자들이 이들의 발명이라 여기는 것의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다. 수치(예, 양, 온도 등)에 대



하여 정확성을 확보하고자 노력하였으나, 약간의 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 나타내지 않는 경우, 부(part)는 중량부이고, 온도는 °C이거나 주위 온도이고, 압력은 상압이거나 상압 근처이다.

[0237] 실시예 1: CorMatrix<sup>®</sup> ECM<sup>™</sup>을 받는 환자에서 새로이 발생한 수술후 동맥 세동의 사후적 평가

[0238] 사후적인 다중-중심, 투-암 차트 평가(retrospective, multi-center, two-arm, chart review)를 CorMatrix<sup>®</sup> ECM<sup>™</sup>을 이용하여 수행했다. 이러한 사후 시험의 목적은 정상 심낭 장벽을 재구성하기 위한 CorMatrix<sup>®</sup> ECM<sup>™</sup>의 사용이 심낭 봉합을 받지 않은 환자와 비교하여 새로이 발생한 수술후 심방 세동의 속도를 감소시킬 수 있는지의 여부를 평가함에 있었다.

[0239] CorMatrix<sup>®</sup> ECM<sup>™</sup>는 개심 수술 후 심낭의 재구성 및 회복을 위해 사용될 수 있다. 온전한 상태에서, 심막은 심장에 수동 억제 장치를 제공하여 팽창을 방지하고 급격한 체적 변화를 조정하는 것을 돕는다. CorMatrix<sup>®</sup> ECM<sup>™</sup>을 이용하여 심낭을 재구성함으로써, 본래의 심낭 억제장치가 회복될 수 있다. 이러한 사후적 임상 시험의 목적은 분리된 관상 동맥 우회 그래프트(CABG) 시술 후 심근 봉합을 받지 않은 환자와 비교하여 CorMatrix<sup>®</sup> ECM<sup>™</sup>을 이용하여 재구성된 그의 본래 심낭을 갖는 환자를 분석함으로써 새로이 발생한 수술 후 심방 세동의 감소가 관찰되는 지를 평가함에 있었다.

[0240] CorMatrix<sup>®</sup> ECM<sup>™</sup>은 의사가 시술에 필요한 크기로 절단할 수 있는 여러 치수의 4겹 시트의 형태로 제공되었다.

[0241] 이러한 사후적 연구에 사용된 새로이 발생한 수술후 심방 세동의 정의는 "Society of Thoracic Surgeons (STS) Adult Cardiac Surgery Database 2007"에서 사용된 정의에 근거한 것이다. 그 정의는 다음과 같다: "치료를 필요로 하는 심방 세동/조동(AF)이 환자에서 새로이 발생했는 지를 나타낸다. 수술 후에 존재하는 AF의 재발은 제외한다. 수술 전에 심방 세동(치료 또는 비치료)을 가진 환자는 제외한다. 발병은 새로운 기원이어야 한다".

[0242] 모든 환자는 이러한 사후적 임상 시험의 일부로서 포함되기 위하여는 하기의 선정 기준을 만족시켜야 했다: 이러한 심장 수술은 개체의 첫 번째 또는 일차 심장 수술이고, 그 개체는 분리된 CABG 시술을 받은 경험이 있어야 한다.

[0243] 환자가 하기의 제외 기준들 중 하나 이상에 부합하는 경우 이러한 사후적 임상 시험에서 제외했다: 심낭 세동의 이전의 병력, 개심 수술의 이전의 병력, 심낭염의 이전의 병력, 과거 6 개월 이내에 아미오다론(amiodarone)의 이전의 병력, 및 관막 수술이 수반되는 지의 여부.

[0244] 그의 본래의 심낭이 CorMatrix<sup>®</sup> ECM<sup>™</sup>을 이용하여 재구성된 환자는 분리된 관상 동맥 우회 그래프트(CABG) 시술 후 심근 봉합을 받지 않은 환자와 비교하여 A-fib의 발병률의 통계학적으로 유의하게 감소했다. A-fib의 통상적인 발병률은 약 25% 이다. 이러한 연구의 경우, A-fib 발병률은 4% 내지 8% (1/25 내지 4/52)였다.

[0245] 실시예 2: 무세포성 기질 에멀션을 이용한 심장 재구성의 조절은 심근 경색 후 C-키트 양성 세포를 동원하는 것을 통해 근섬유아세포 증식 및 신생혈관형성과 관련이 있다

[0246] 천연 세포외 기질(ECM)의 분해는 경색 후의 적응성이 없는 심장 재구성과 관련이 있다. 본원에 도시한 바와 같이, 경색된 심근막에 주입된 이중이식 무세포성 세포외 기질 에멀션은 C-키트 양성 세포를 동원함으로써 근섬유아세포 증식 및 신생혈관형성을 촉진했다.

[0247] 64 마리의 쥐를 45 분간 국부적으로 허혈한 다음, 3, 7, 21 및 42 일간 재관류했다. 면역조직학적 염색을 통해 조직학적 검사를 수행하고, 심장 초음파 검사를 이용하여 심장 기능을 분석했다. 재관류 후 위험성이 있는 심근막 부위에 ECM 에멀션(30-50  $\mu$ l)을 주사하고, 그 에멀션의 국소화를 Masson Trichome 염색을 이용하여 확인했다. 관류 7일째에, 그 에멀션 내의 c-키트 양성 세포의 개체군은 대조군과 비교하여 유의하게 증가했는데 ( $32 \pm 0.6^*$  대  $15 \pm 3/1000$  핵), 이는 웨스턴 블러팅에 의해 검출된 31 kDa 세포 인자의 유의하게 증가한 발현과 일치했다. 이러한 변화와 함께, 근섬유아세포는 대조군과 비교하여 유의한 정도까지 에멀션 영역에 축적되었다 ( $59 \pm 8^*$  대  $30 \pm 3/HPF$ ). VEGF의 강한 면역반응성이 에멀션 영역에서 관찰되었고, 신생혈관형성이 대조군과 비교하여 유의하게 향상되었는데, 이는  $\alpha$ -민무늬근 악틴-양성 혈관 밀도의 증가( $70 \pm 10^*$  대  $20 \pm 4/HPF$ ) 및 vWF-양성 혈관 밀도의 증가( $95 \pm 14^*$  대  $34 \pm 8/HPF$ )에 의해 각각 입증되었다. 관류 42일째에, 심장 초음파 검사 결과, 에멀션 군의 경우 말단 심장 수축의 개선( $0.3 \pm 0.1^*$  대  $0.6 \pm 0.3$  ml), 분획 단축률의 개선( $33 \pm 5^*$  대  $24 \pm$

6%) 및 박출 계수의 개선( $67 \pm 6\%$  대  $53 \pm 10\%$ )이 확인되었다. 또한, 에멀션 군의 경우 경색된 중간 전방 중격의 벽 두께는 대조군의 경우보다 유의하게 컸다( $0.19 \pm 0.02\%$  대  $0.15 \pm 0.02\text{cm}$ ).

[0248] 무세포성의 세포외 기질 에멀션을 허혈/재관류된 심근막에 주입한 결과, 적응성이 없는 심장 재구성이 약화되었고 심장 기능이 유지되었는데, 이는 어쩌면 상기 에멀션이 C-키트 양성 세포를 동원함으로써 근섬유아세포 증식 및 신생혈관형성을 강화했기 때문이었다.\*  $p < 0.05$  에멀션 대 대조군.

[0249] 실시예 3

[0250] 개시된 멸균 및 탈세포화 방법의 예시적인 적용에 있어서는, 선택된 조직을 수집하고 멸균 식염수에서 세척했다. 다음에, 그 선택된 조직을 24 시간 동안 동결했다. 동결한 조직을 5 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)이 첨가된 얼음 상의 차가운 저장 트리스 완충액에서 해동했다. 다음에, 본원에 기재된 바와 같이, 각각의 선택된 조직으로부터 세포외 기질 물질을 분리했다.

[0251] 상기 분리된 세포외 기질 물질을 완충 식염수(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)(Lonza Walkersville, Inc.사))에서 5 mM EDTA가 첨가된 0.5-1% Triton X-100/0.5-1% 테옥시콜린산에서 24 내지 48 시간 동안 배양했다. 위점막하층(SS), 소장점막하층(SIS) 및 방광 점막하층(UBS)과 같은 평평한 세포외 기질 물질을 신장된 형태로 배양했다. 수노관, 동맥, 정맥, 관형 SIS와 같은 관형 세포외 기질 물질에는 침적을 통해 그리고 튜브 연동식 펌프의 사용을 통해 상기 용액을 관류했다.

[0252] 배양 후, 각각의 세포외 기질 물질을 DPBS로 3회 세척했다. DPBS를 이용한 각각의 세척은 30분간 계속했다. 다음에, 몇몇의 세포외 기질 물질을, 5 mM EDTA가 첨가된 10-50  $\mu\text{g/mL}$ 의 RNase/0.2-0.5  $\mu\text{g/mL}$  DNase를 함유하는 등장성 트리스 완충액에서 37  $^{\circ}\text{C}$ 로 2 내지 12 시간 동안 배양했다. 이러한 배양 단계 후, 그 세포외 기질 물질을 DPBS로 다시 3회 세척했다. DPBS를 이용한 각각의 세척은 30분간 계속했다. 그 세포외 기질 물질을 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관했다.

[0253] 보관 48 이내에, 상기 세포외 기질 물질을, 본원에 개시한 바와 같이 31.1  $^{\circ}\text{C}$  이상의 온도 및 1,071 psi 이상의 압력에서 20-60분 동안 초임계 이산화탄소에서 처리했다. 이러한 멸균 단계 후, 그 세포외 기질 물질을 1 분 19 초 동안 2.7 MPa/10 초 (391.6 psi/ 10 초)의 속도로 급속 감압했다. 이때, 세포외 기질 물질에 인가된 압력은 9.9 MPa에서 0.69 MPa로 급속히 감소했다.

[0254] 다음에, 상기 세포외 기질 물질을, 본원에 개시한 바와 같이 30 분 내지 6 시간 동안 초임계 이산화탄소 및 과아세트산(PAA)에서 처리하여 사후 멸균을 달성했다. 이러한 처리 단계에서, 세포외 기질에 인가된 압력은 9.9 MPa로 증가했다. 다음에, 얻어지는 멸균된 무세포성 세포외 기질 물질을 Tyvek®(E.I. du Pont de Nemours & Company사) 파우치(pouch)에 포장하고, 상기 파우치를 유체 누출을 방지하기 위하여 플라스틱 파우치내에 밀봉했다.

[0255] 하기 표 1은 돼지 수노관, 소 심낭 및 돼지 중피 조직의 멸균 및 탈세포화를 요약하고 있다.

표 1

물 질	Triton X-100 농도	테옥시콜린 산 농도	TX-100/테옥시 배양	RNase/DNase 배 양	초임계 CO <sub>2</sub> /PAA 시간
돼지 수노관	0.5%	0.5%	24 시간	2 시간	120 분
소 심낭	0.5%	0.5%	24 시간	2 시간	180 분
돼지 중피조직	0.5%	0.5%	24 시간	2 시간	120 분

[0257] 실시예 4

[0258] ECM 물질 샘플의 DNA 함량을, 여러 멸균 및 탈세포화 기법을 이용한 각각의 ECM 물질 샘플의 탈세포화의 지표로서 측정하였다. 측정된 DNA 함량은 피코 그린 분석법(pico green assay)을 이용하여, DNA를 분광광도계로 검출되는 형광 표지로 표시하여 평가했다. 측정된 DNA 함량은 시료의 건조 중량에 의해 표준화했다. DNA 함량은 하기의 처리군에 대하여 측정 및 평가했다: (1) 동결건조된 비멸균 SIS; (2) 산화 에틸렌(EtO)-멸균 SIS; (3) 본원에 개시한 바와 같이 PAA 및 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 60분 처리를 통해 멸균되는 동결건조된 비멸균 SIS; (4) 본원에 개시한 바와 같이 PAA 및 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 20분 처리를 통해 멸균되는 동결건조된 비멸균 SIS; 및 (5) 원료 상태의 미처리 SIS.

[0259] 도 1은 건조 중량에 의해 표준화된 각각의 샘플에 대한 전체 DNA 함량을 도시한다. 도 2는 원료 상태의 미처리 SIS와 비교하여, 각각의 샘플로부터 제거된 DNA의 %를 나타낸다. 이들 결과는 본원에 개시한 바와 같이 PAA 및 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 60 분 처리에 의해 비멸균 SIS를 멸균함으로써, 미처리 SIS에서 확인된 DNA의 96% 이상이 제거된 반면, SIS가 EtO로 멸균된 경우 겨우 94%, SIS가 어느 방법으로도 멸균되지 않은 경우 겨우 93% 제거되었다는 것을 나타냈다.

[0260] 실시예 5

[0261] 수노관을 온화한 세제(DPBS중의 5mM EDTA에서 0.5% Triton X-100/0.5% 테옥시콜린산나트륨)로 24 시간 처리한 다음, 본원에 기재한 바와 같이 DPBS에서 3회 세척했다. 이러한 전처리 후, 상기 수노관을 본원에 개시한 바와 같이 급속 감압 및 PAA 및 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 처리를 통해 탈세포화 및 멸균했다. 하기의 처리 단계에서 하나의 샘플 수노관에 대한 헤마톡실린&이오신(H&E) 염료를 준비했다: (A) 천연 수노관; (B) 전처리된 수노관; 및 (C) 본원에 개시한 바와 같이 급속 감압 및 PAA 및 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 처리를 받은 전처리된 수노관. 이러한 염색 결과, DNA 함량은 급속 감압에 의해 유의하게 감소된 것으로 확인되었다.

[0262] 실시예 6

[0263] ECM 물질 샘플의 성장 인자 함량을 측정했다. ECM 물질 샘플에 대한 효소 결합 면역분석(ELISA)을 수행하여 각각의 샘플에서 TGF- $\beta$ 의 활성 형태 및 bFGF의 함량을 정량했다. 하기의 처리군들이 평가되었다: (1) 동결건조된 비멸균 SIS; (2) 산화 에틸렌(EtO)-멸균 SIS; (3) 본원에 개시한 바와 같이 PAA 및 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 60분 처리를 통해 멸균되는 동결건조된 비멸균 SIS; (4) 본원에 개시한 바와 같이 PAA 및 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 20분 처리를 통해 멸균되는 동결건조된 비멸균 SIS; 및 (5) 원료 상태의 미처리 SIS. bFGF 함량 및 TGF- $\beta$  함량의 측정치는 각각의 샘플의 건조 중량에 의해 표준화했다. 그 결과가 도 3 및 도 4에서 보여진다. 이들 결과는 두 성장 인자의 농도가 EtO에의 노출에 의해 감소되었다는 것을 나타냈다. 그러나, 그 성장 인자들의 농도는 PAA 및 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용한 멸균에 영향받지 않았다.

[0264] 실시예 7

[0265] 본원에 개시한 방법을 이용하여, 주요 멸균제로서 그리고 SIS 시트에 bFGF를 첨가하기 위한 운반체로서 초임계 CO<sub>2</sub>를 이용했다. 우선, 각각의 SIS 시트를 다양한 양의 bFGF와 함께 Tyvek® 파우치내로 위치시켰다. 상기 파우치를 9.6 MPa에서 60 분간 초임계 CO<sub>2</sub>에 노출시켰다. 그 파우치를 7.20 MPa/min의 속도로 급속 감압했다. 샘플을 초임계 CO<sub>2</sub>내의 16 mL PAA에서 직접 20분간 처리했다. 하기의 처리 군들이 평가되었다: (1) bFGF 첨가 없음; (2) 5  $\mu$ L의 bFGF 첨가; 및 (3) 15  $\mu$ L의 bFGF 첨가. 각각의  $\mu$ L의 bFGF는 0.1  $\mu$ L의 bFGF를 함유했다. 따라서, 각각의 SIS 시트는 약 0.5 g으로 칭량되었기 때문에, 5  $\mu$ L 및 15  $\mu$ L 군에 대한 bFGF의 최대 농도는 각각 약 4170 pg/mg 건조 중량 및 약 12,500 pg/mg 건조 중량이었다. 이러한 군에 대한 bFGF 함량은 각각의 샘플의 건조 중량에 대하여 측정된 것으로, 도 5에서 보여진다. 이들 결과는 bFGF의 측정된 농도가 최대 농도에 도달하지 않았고, 15  $\mu$ L의 bFGF가 첨가된 샘플은 5  $\mu$ L의 bFGF가 첨가된 샘플에서 측정된 bFGF의 농도보다 3배 더 큰 bFGF 측정 농도를 갖지 않았다는 것을 나타냈다.

[0266] 실시예 8

[0267] 두 겹(two-ply) SIS 샘플의 인장 강도를 측정했다. 하기의 처리 군들이 평가되었다: (1) EtO 처리; (2) 20분간 PAA/초임계 CO<sub>2</sub> 처리; (3) 60분간 PAA/초임계 CO<sub>2</sub> 처리; 및 (4) 120분간 PAA/초임계 CO<sub>2</sub> 처리. 인장 강도 시험 결과가 도 6에서 보여진다. 이들 결과는 본원에서 개시한 바와 같이 PAA/초임계 CO<sub>2</sub>로 20 분 또는 120 분간 처리된 SIS 샘플이 EtO로 처리된 샘플과 비교하여 유의하게 강했다는 것을 나타냈다.

[0268] 실시예 9

[0269] 하기 표 2에 나타난 농도에서 및 시간 동안 표 2에 나타난 ECM 물질의 관류 또는 온화한 세제 침적 후 급속 감압을 사용했다. 조직을 수집하여 식염수에 세척했다. 그 조직을 적어도 24 시간 동안 동결했다. 그 조직을 5 mM EDTA가 첨가된 얼음 상의 차가운 트리스 완충액에서 해동했다. 원하는 ECM을 분리했다. 평평한 조직(예, 위 점막하층, 소장 점막하층, 및 방광 점막하층)의 경우, 그 조직을 조직 신장 기기상에서 신장시키고 신장 상태로 용액 상태로 배양했다. 관형 조직(예, 수노관, 동맥, 정맥 및 관형 SIS)의 경우, 그 조직에 튜브 연동식 펌프를

이용하여 용액을 관류하고 배양동안 침적했다. 그 조직을 DPBS에서 5 mM EDTA가 첨가된 0.5% Triton X-100/0.5% 데옥시콜린산에서 2 내지 24 시간 동안 배양했다. 그 조직을 DPBS에서 각각 15 내지 30분씩 3회 세척했다. 그 조직을 4 °C에서 보관했다. 조직 보관 48 시간 이내에, 그 조직을 초임계 CO<sub>2</sub>에서 20 내지 120 분간 처리한 후, 급속 감압(RDP)(1 분 19초 이내에 9.9 MPa에서 0.69 MPa로 압력 감소, 2.7 MPa/10sec의 감압에 해당)했다.

표 2

[0270]

물질	Triton X-100 농도	데옥시콜린산 농도	TX-100/데옥시 배양	초임계 CO <sub>2</sub> 시간
돼지 수뇨관	0.5%	0.5%	24 시간	60 분
소 심낭	0.5%	0.5%	24 시간	60 분
돼지 중피 조직	0.5%	0.5%	2 시간	60 분
SIS	0.5%	0.5%	2 시간	60 분

[0271]

그 결과, 초임계 CO<sub>2</sub> 노출 및 그 이후의 급속 감압(SCCO<sub>2</sub>+RDP)은 ECM에서 성장 인자를 보존하면서 세포 찌꺼기 및 DNA 제거를 촉진한 것으로 확인되었다.

[0272]

실시예 10

[0273]

여러 ECM 조성물의 성장 인자 함량을 대표적인 성장 인자인 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF)를 이용하여 측정했다. bFGF는 천연 ECM 조직에서 우세한 성장 인자이기 때문에 선택되었다. 효소 결합 면역 분석(ELISA, R&D Systems사, Minneapolis, MN)를 이용하여 하기의 샘플에서 bFGF 함량을 측정했다: (1) 미처리(원료상태) SIS; (2) 세제 침적(TX-deoxy) 후의 SIS; (3) TX-deoxy 및 RDP (SCCO<sub>2</sub> 포함)후의 SIS; (4)TX-deoxy, RDP 및 PAA (멸균의 경우 PAA와 함께 SCCO<sub>2</sub>)후의 SIS; (5) TX-deoxy 및 PAA후의 SIS; (6) EtO(Cook Biotech, Inc.사 공급)에 의해 멸균된 SIS; 및 (7) 비멸균 SIS (Cook Biotech, Inc.사 공급).

[0274]

이러한 연구에서는, SIS를 이용하여, RDP로 처리되거나 처리되지 않은 ECM 조성물을, Cook Biotech, Inc사가 제공한 SIS와 비교했다. 처리된 SIS 중 일부는 탈세포화 후 기재된 SCCO<sub>2</sub> + PAA 방법을 이용하여 멸균했다. 각각의 ECM 조성물의 측정된 성장 인자 함량이 도 7에서 보여진다.

[0275]

그 결과, 상기 급속 감압 과정은 bFGF 함량을 보존하는데 있어서 다른 탈세포화 과정들보다 더욱 효과적이었고, 잔류 DNA 및 세포 단편을 제거하기 위한 추가의 RDP 처리 과정은 bFGF의 작은 손실만을 초래한다는 것을 확인했다. 비교로, PAA 멸균 과정은 RDP가 없는 경우에도 잔류 bFGF의 거의 전부를 제거하는 것으로 보였다. 게다가, 급속 감압 과정은 Cook 탈세포화 방법과 비교하여 천연 SIS의 bFGF 함량을 더욱 많이 보존했다. 이러한 결과의 취지에서, bFGF 함량이 감소된 경우, 다른 성장 인자들이 모두 ECM 조성물에 결합되기 때문에 마찬가지로 그 성장 인자의 함량이 모두 감소하는 것으로 판단된다.

[0276]

본 출원에서는 여러 간행물들이 참조된다. 이러한 간행물들의 개시내용은 본 발명이 속하는 기술 분야의 상태를 더욱 충분히 설명하기 위하여 본원에 참조로 포함된다.

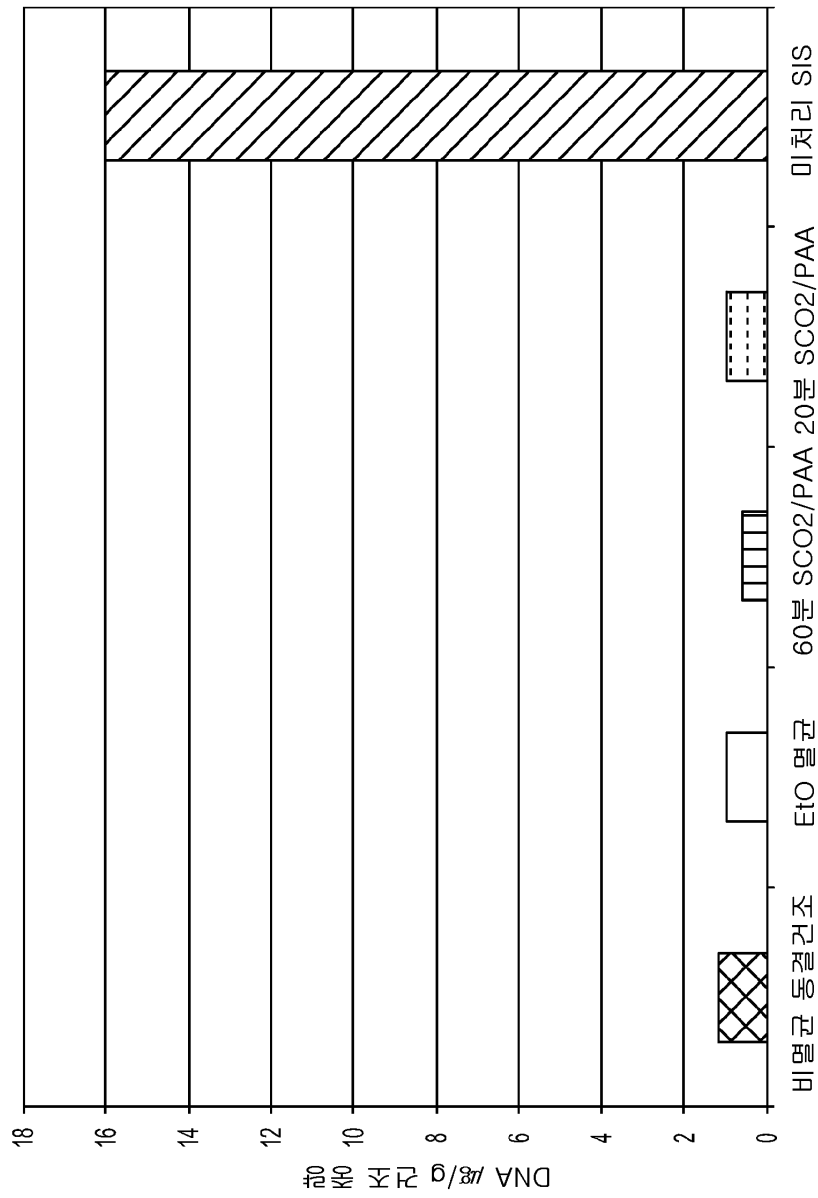
[0277]

본 발명의 범위 및 정신을 벗어나지 않고 여러 변경 및 변화가 본 발명에서 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 명백하게 된다. 본원에 개시한 본 발명의 명세서 및 실시를 고려하면 본 발명의 다른 실시예들이 당업자에게 명백하게 된다. 본 명세서 및 실시예들은 오로지 예시적인 것으로 해석되어야 하고, 본 발명의 진정한 범위 및 정신은 하기의 특허청구범위에 의해 나타내어 진다.

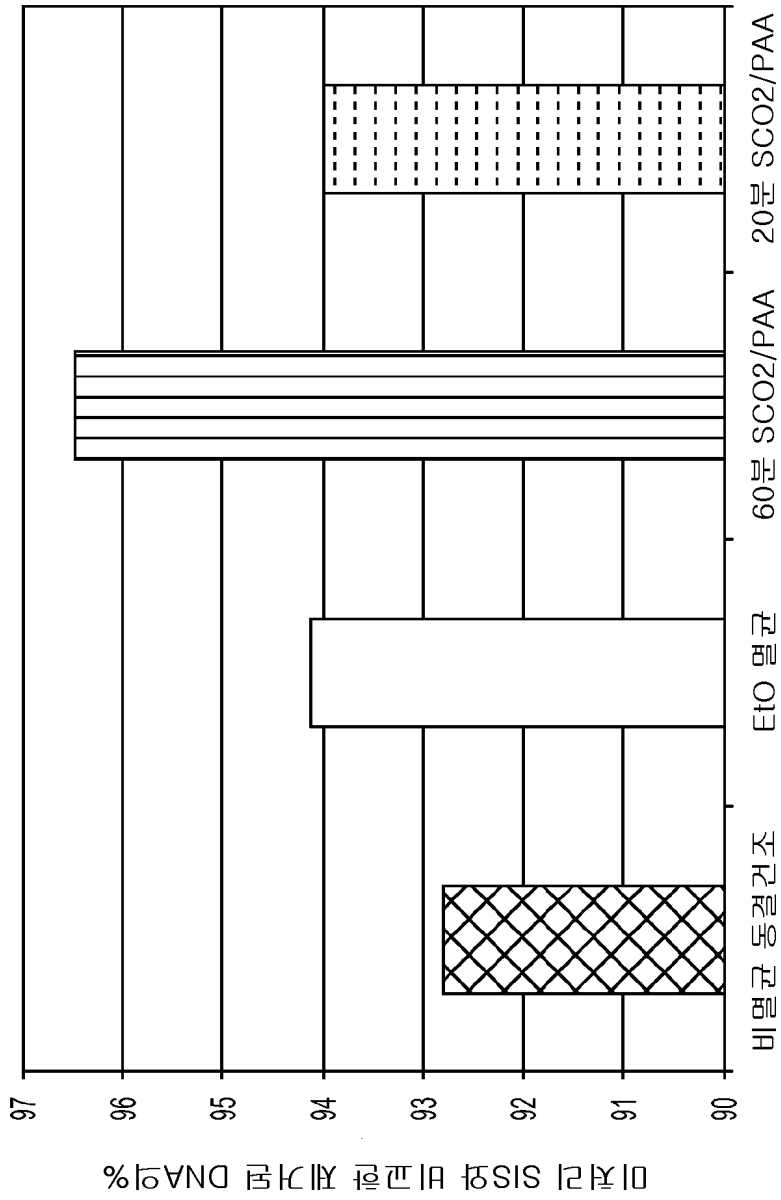


도면

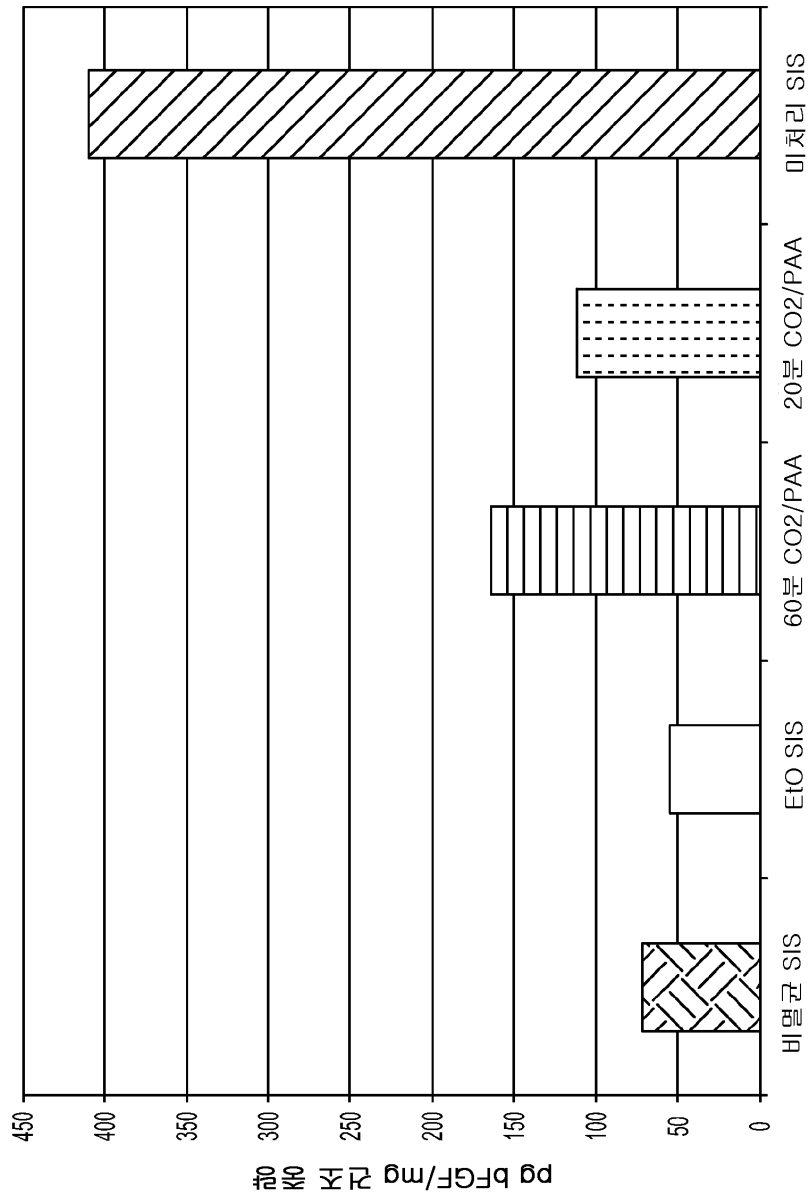
도면1



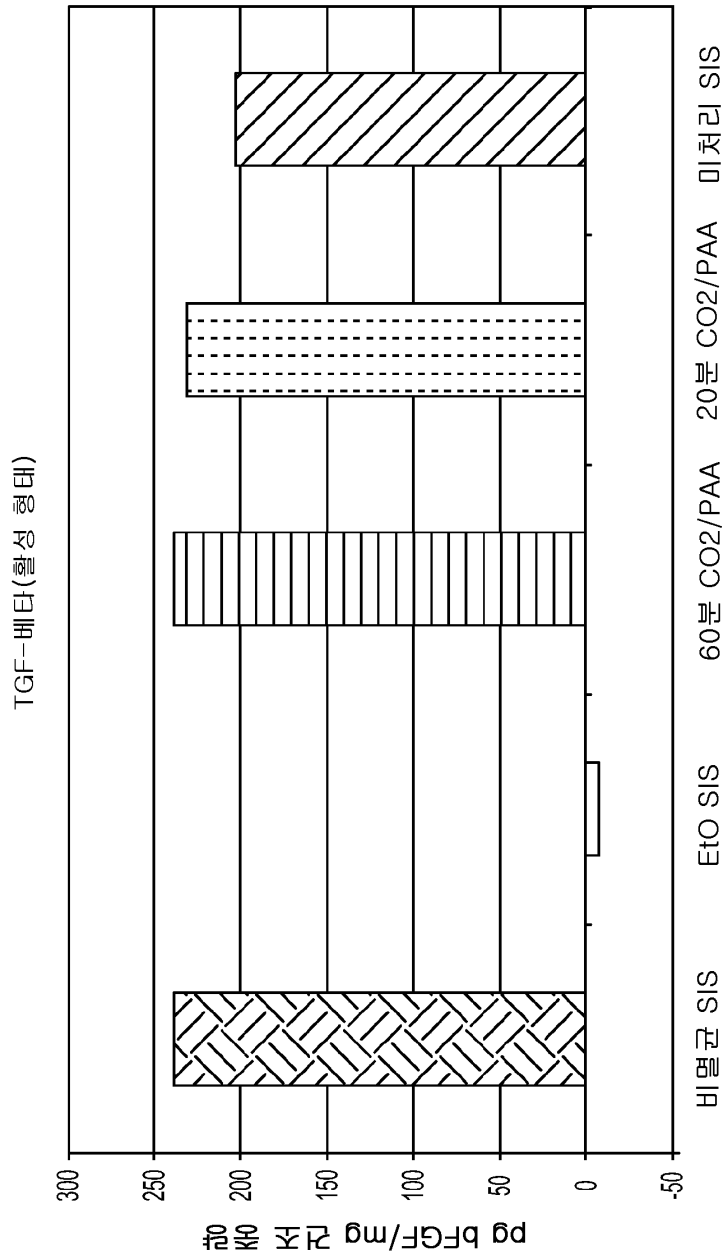
도면2



도면3

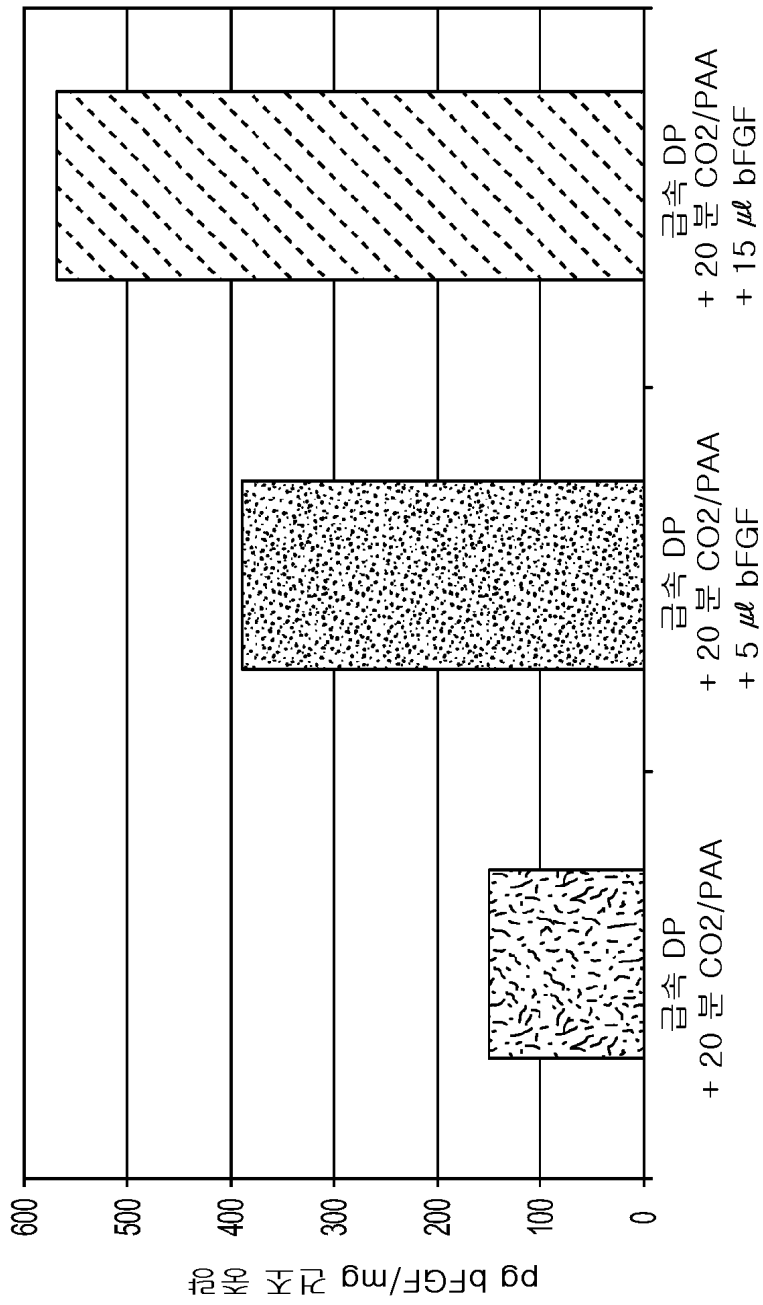


도면4

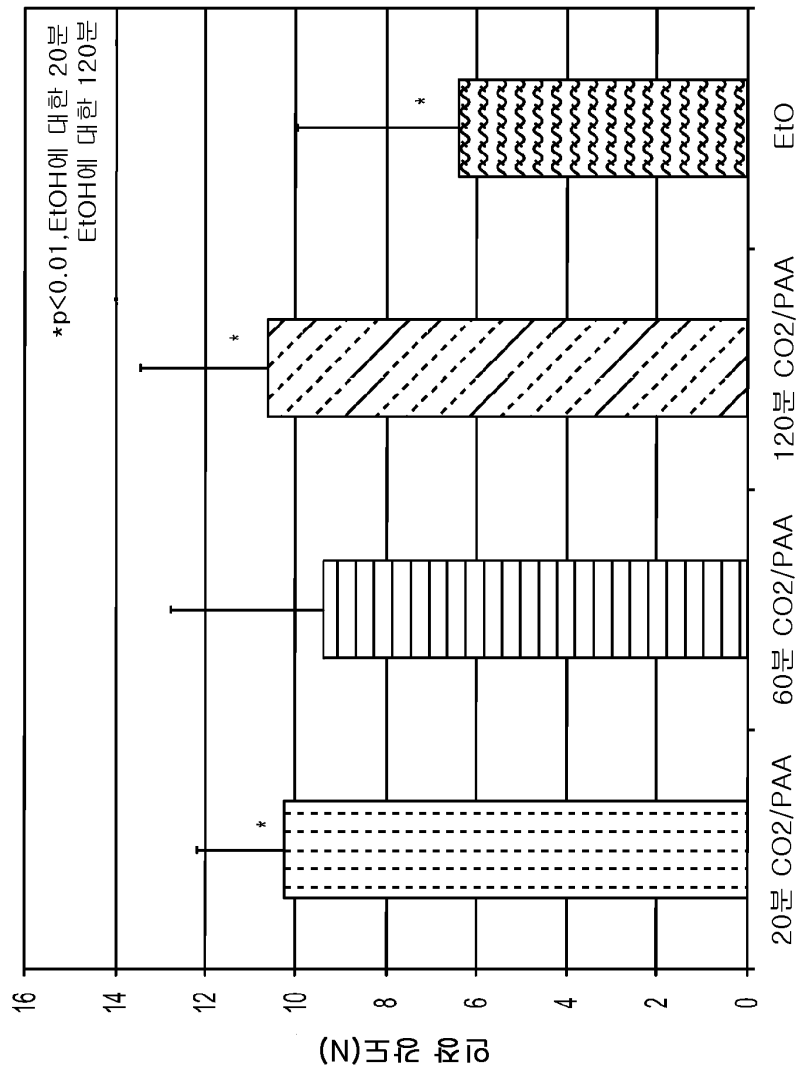




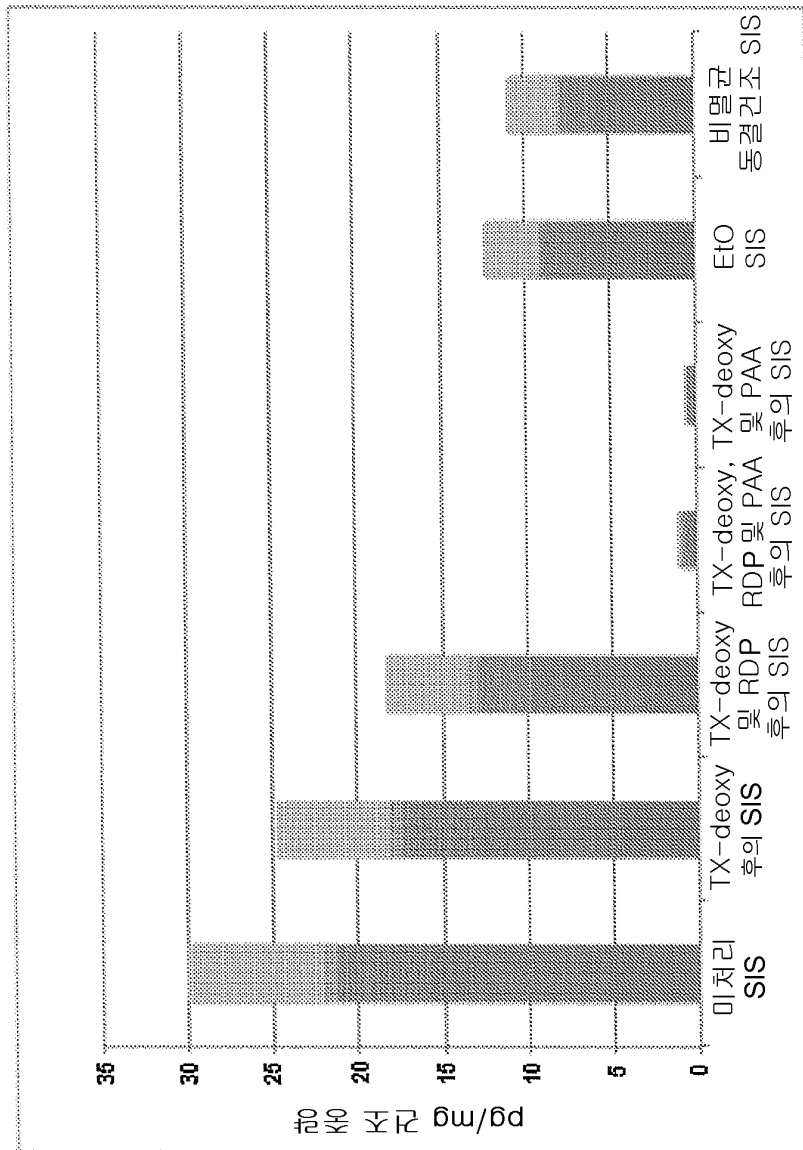
도면5



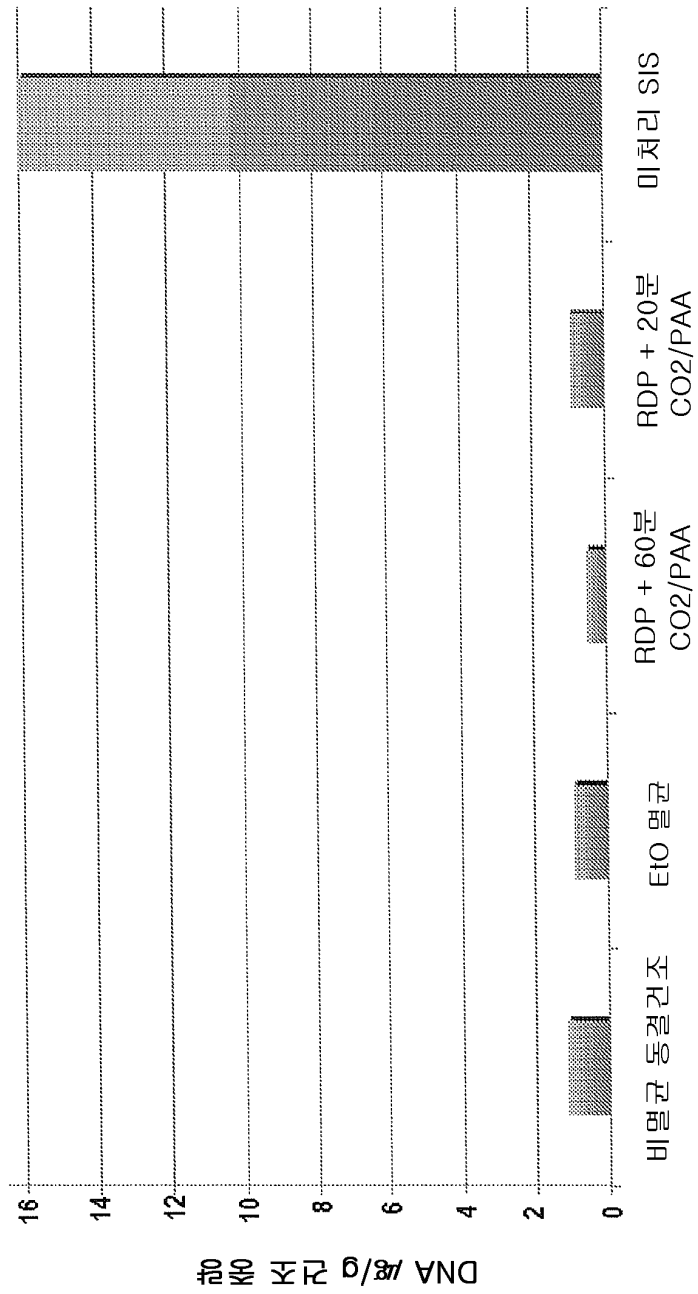
도면6



도면7

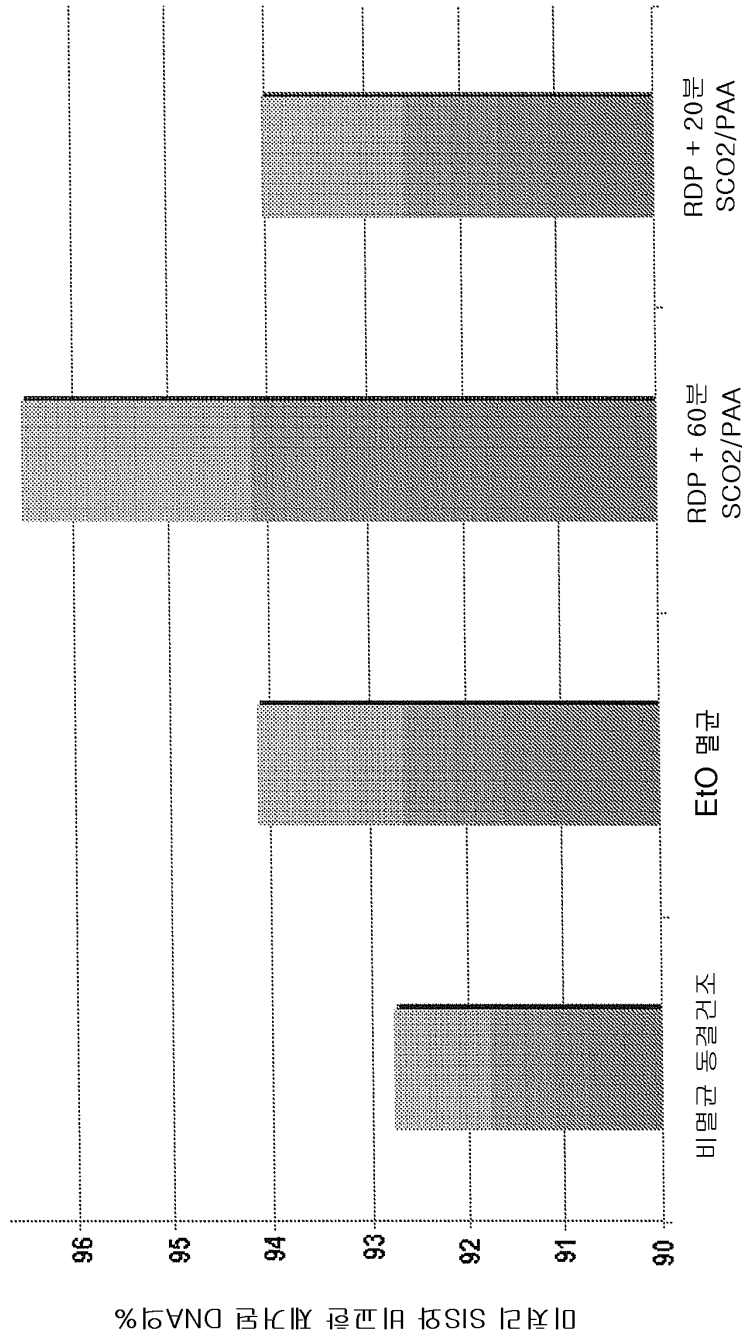


도면8

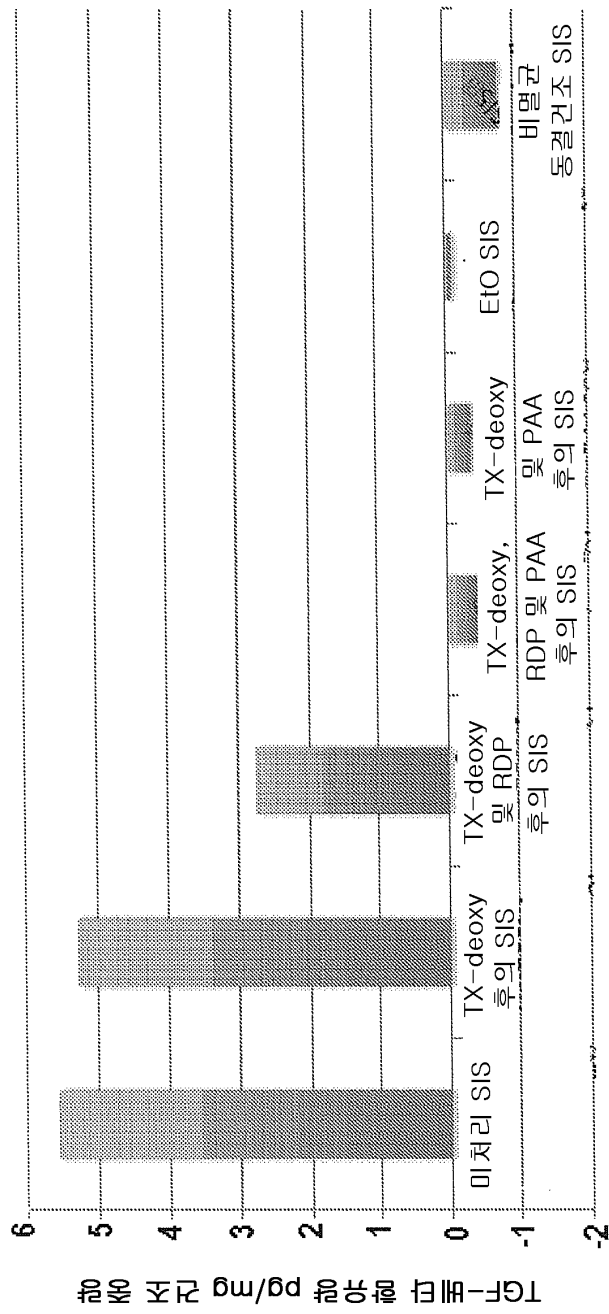




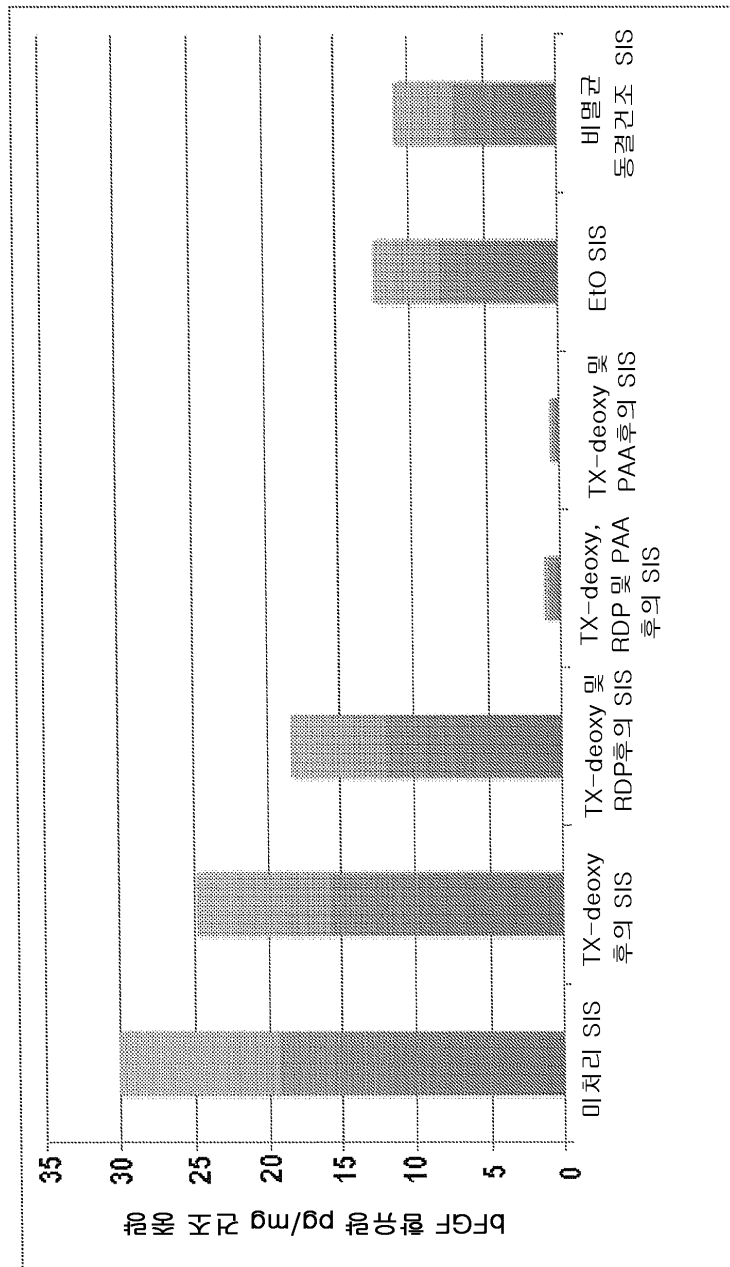
도면9



도면10



도면11



도면12

