



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0124170
(43) 공개일자 2022년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/127 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/127 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7022785

(22) 출원일자(국제) 2020년12월04일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년07월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2020/063475

(87) 국제공개번호 WO 2021/113761

국제공개일자 2021년06월10일

(30) 우선권주장

62/943,943 2019년12월05일 미국(US)

(71) 출원인

더 보드 오브 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 텍
사스 시스템

미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트
리트

(72) 발명자

칼루리 라구

미국 텍사스주 77030 휴스턴 홀콤브 블러바드
1515 유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터

(74) 대리인

장훈

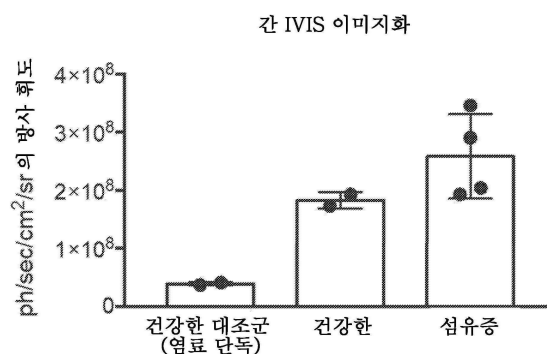
전체 청구항 수 : 총 83 항

(54) 발명의 명칭 간 섬유증 및 섬유증 관련 기타 질환에 대한 엑소좀 기반 치료요법

(57) 요약

본원에서는 치료학적 STAT3 표적화 억제성 RNA를 함유하는 엑소좀과 같은 지질 기반 나노입자의 조성물이 제공된다. 또한 섬유증 또는 섬유증과 관련된 질환을 갖는 환자를 치료하기 위해 상기 조성물을 사용하는 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 48/0008 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/50 (2013.01)

A61P 1/16 (2018.01)

A61P 43/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

STAT3 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 억제성 RNA를 함유하는 지질 기반 나노입자를 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 지질 기반 나노입자가 이의 표면 상에 CD47을 포함하는, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 지질 기반 나노입자가 이의 표면 상에 성장 인자를 포함하는, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 기반 나노입자가 리포솜 또는 엑소솜인, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 siRNA, shRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, miRNA, 또는 전구(pre)-miRNA인, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 변형된, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 STAT3 단백질의 발현을 녹다운시키는, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 18 내지 30개 뉴클레오타이드의 크기를 갖는, 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 1을 포함하는, 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 2를 포함하는, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 3을 포함하는, 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 4를 포함하는, 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 5를 포함하는, 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 조성물 및 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 조성물이 비경구 투여용으로 제형화된, 약제학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 조성물이 정맥내, 근육내, 피하 또는 복막내 주사용으로 제형화된, 약제학적 조성물.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항미생물 제제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 항미생물 제제가 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 벤질 알콜, 브로노폴, 센트리미드, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로르헥시딘, 클로로부탄올, 클로로크레졸, 클로록실레놀, 크레졸, 에틸 알콜, 글리세린, 액세티딘, 이미드우레아, 페놀, 페녹시에탄올, 페닐에틸 알콜, 페닐머큐릭 니트레이트, 프로필렌 글리콜 또는 티머로살인, 약제학적 조성물.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서 섬유증 또는 섬유증과 관련된 병태를 치료하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 약제학적 조성물의 투여가 상기 억제성 RNA의 상기 환자 내 세포로의 전달을 유도하는, 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 섬유증이 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐(pulmonary) 섬유증(IPF), 또는 방사선 유도 폐(lung) 손상인, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 섬유증이 간 섬유증인, 방법.

청구항 23

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 전신 투여를 통해 투여되는, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 전신 투여가 정맥내 투여인, 방법.

청구항 25

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 제2 치료요법을 상기 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 26

제19항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 사람인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 지질 기반 나노입자가 엑소솜이고, 상기 엑소솜이 상기 환자에 자가인, 방법.

청구항 28

제19항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물의 투여가 상기 환자의 간 세포에서 *Col1a1*의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 29

제19항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물의 투여가 상기 환자의 간 세포에서 *Acta2*의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 30

제19항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물의 투여가 상기 환자의 간 세포에서 *Col1a2*의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 31

제19항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제학적 조성물의 투여가 상기 환자의 간 세포에서 *Vim*의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 32

제19항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 간 세포가 간 정상 세포인, 방법.

청구항 33

제19항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 간 정상 세포가 활성화된 간 정상 세포인, 방법.

청구항 34

STAT3 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 억제성 RNA를 함유하는 지질 기반 나노입자를 포함하는 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 지질 기반 나노입자가 이의 표면 상에 CD47을 포함하는, 조성물.

청구항 36

제34항에 있어서, 상기 지질 기반 나노입자가 이의 표면 상에 성장 인자를 포함하는, 조성물.

청구항 37

제34항에 있어서, 상기 지질 기반 나노입자가 리포솜 또는 엑소솜인, 조성물.

청구항 38

제34항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 siRNA, shRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, miRNA, 또는 전구-miRNA인, 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 변형된, 조성물.

청구항 40

제34항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 STAT3 단백질의 발현을 녹다운시키는, 조성물.

청구항 41

제34항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 18 내지 30개 뉴클레오타이드의 크기를 갖는, 조성물.

청구항 42

제34항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 1을 포함하는, 조성물.

청구항 43

제34항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 2를 포함하는, 조성물.

청구항 44

제34항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 3을 포함하는, 조성물.

청구항 45

제34항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 4를 포함하는, 조성물.

청구항 46

제34항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 5를 포함하는, 조성물.

청구항 47

제34항 내지 제46항 중 어느 한 항의 조성물 및 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 조성물이 비경구 투여용으로 제형화된, 약제학적 조성물.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 조성물이 정맥내, 근육내, 피하 또는 복막내 주사용으로 제형화된, 약제학적 조성물.

청구항 50

제48항에 있어서, 항미생물 제제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 항미생물 제제가 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 벤질 알콜, 브로노폴, 센트리미드, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로르헥시딘, 클로로부탄올, 클로로크레졸, 클로록실레놀, 크레졸, 에틸 알콜, 글리세린, 엑세티딘, 이미드우레아, 페놀, 페녹시에탄올, 페닐에틸 알콜, 페닐머큐릭 니트레이트, 프로필렌 글리콜 또는 티머로살인, 약제학적 조성물.

청구항 52

제47항 내지 제51항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서 섬유증 또는 섬유증과 관련된 병태를 치료하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 약제학적 조성물의 투여가 상기 억제성 RNA의 상기 환자 내 세포로의 전달을 유도하는, 방법.

청구항 54

제52항에 있어서, 상기 섬유증이 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐(pulmonary) 섬유증(IPF), 또는 방사선 유도 폐(lung) 손상인, 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 섬유증이 간 섬유증인, 방법.

청구항 56

제52항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 전신 투여를 통해 투여되는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 전신 투여가 정맥내 투여인, 방법.

청구항 58

제52항에 있어서, 적어도 제2 치료요법을 상기 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 59

제52항에 있어서, 상기 환자가 사람인, 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 지질 기반 나노입자가 엑소솜이고, 상기 엑소솜이 상기 환자에 자가인, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 엑소솜이 상기 환자로부터 수득된 체액 샘플로부터 수득되는, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 체액 샘플이 혈액, 림프액, 타액, 소변, 뇌척수액, 골수 흡인물, 눈 삼출물/눈물, 또는 혈청인, 방법.

청구항 63

제60항에 있어서, 상기 엑소솜이 중간엽 세포로부터 수득되는, 방법.

청구항 64

제52항에 있어서, 상기 조성물이 1회 초과로 투여되는, 방법.

청구항 65

제52항에 있어서, 상기 억제학적 조성물의 투여가 상기 환자의 간 세포에서 *Colla1*의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 66

제52항에 있어서, 상기 억제학적 조성물의 투여가 상기 환자의 간 세포에서 *Acta2*의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 67

제52항에 있어서, 상기 억제학적 조성물의 투여가 상기 환자의 간 세포에서 *Colla2*의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 68

제52항에 있어서, 상기 억제학적 조성물의 투여가 상기 환자의 간 세포에서 *Vim*의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 69

제52항에 있어서, 상기 간 세포가 간 정상 세포인, 방법.

청구항 70

제52항에 있어서, 상기 간 정상 세포가 활성화된 간 정상 세포인, 방법.

청구항 71

STAT3 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 억제성 RNA를 지질 기반 나노입자에 도입하는 단계를 포함하는, 치료학적 조성물을 제조하는 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 지질 기반 나노입자가 이의 표면 상에 CD47을 포함하는, 방법.

청구항 73

제71항 또는 제72항에 있어서, 상기 지질 기반 나노입자가 이의 표면 상에 성장 인자를 포함하는, 방법.

청구항 74

제71항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지질 기반 나노입자가 리포솜 또는 엑소솜인, 방법.

청구항 75

제71항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 siRNA, shRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, miRNA, 또는 전구-miRNA인, 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 안티센스 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 변형된, 방법.

청구항 77

제71항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 STAT3 단백질의 발현을 녹다운시키는, 방법.

청구항 78

제71항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 18 내지 30개 뉴클레오타이드의 크기를 갖는, 방법.

청구항 79

제71항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 1을 포함하는, 방법.

청구항 80

제71항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 2를 포함하는, 방법.

청구항 81

제71항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 3을 포함하는, 방법.

청구항 82

제71항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 4를 포함하는, 방법.

청구항 83

제71항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제성 RNA가 서열번호 5를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] [0001]본 출원은 2019년 12월 5일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/943,943호의 우선권을 주장하며, 이는 그 내용 전체가 본원에 참고로 인용된다.

[0003] 1.분야

[0004] [0002]본 발명은 일반적으로 의학 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 본원은 섬유증 및 섬유증과 관련된 질환을

치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

2. 배경 기술

[0003] 간 섬유증은 간에서 과도한 세포외 매트릭스(ECM) 침착을 특징으로 하고, 이는 기능적 실질을 대체하고 전 세계적으로 건강에 심각한 영향을 미친다(문헌참조: Hernandez-Gea et al., 2001). 현재, 지속적인 간 손상을 줄이거나 간 이식을 제외하고는 효과적인 항섬유증 치료요법이 없다(문헌참조: Bataller et al., 2005). 간 섬유증에 대한 효과적인 치료는 혁신적인 새로운 접근 방식을 긴급히 필요로 한다. 간 섬유증의 중요한 조절인자 중 전사 3의 신호 변환기 및 활성화인자(STAT3) 신호 전달 경로가 중추적으로 관련되어 섬유아세포 및 간 성상 세포(HSC)의 활성화 및 근섬유아세포 유사 표현형으로의 전환을 구동시킨다(문헌참조: Chakraborty et al., 2017; Xiang et al., 2018; Pechkovsky et al., 2012). STAT3은 사이토킨 활성화에 응답하여 야누스 타이로신 키나제 (JAK)에 의해 인산화된 전사 인자이다. 활성화된 인산화된 STAT3가 이량체화되고 핵으로 전위되어 사이토킨 반응성 다운스트림 유전자의 전사를 활성화한다(문헌참조: Chakraborty et al., 2017). STAT3를 활성화시키는 사이토킨은 TGF β 1(문헌참조: Meng et al., 2016), 사이토킨의 IL-6 계열 및 성장 호르몬(GH)을 포함한다. STAT3 활성화는 환자 및 마우스 모델에서 관찰된 섬유증 간에서 보고되었고(문헌참조: Xiang et al., 2018; Choi et al., 2019), 소라페닙 또는 기타 억제제를 사용한 STAT3 억제는 마우스에서 CC14 유도 간 섬유증을 부분적으로 개선시킨다(문헌참조: Choi et al., 2019; Su et al., 2015). STAT3가 간 섬유증에 대한 중요한 취약성으로 부상했지만, STAT3 특이적 억제제의 부재로 인해 STAT3의 치료학적 표적화는 여전히 도전 과제로 남아 있다(문헌참조: Bartneck et al., 2014). 이와 같이, STAT3 신호전달을 억제하는 새로운 수단은 특이적 항-섬유증 치료요법을 개발하기 위해 필요하다.

발명의 내용

발명의 개요

[0004]본원 개시내용의 구현에는 나노입자, 조성물, 약제학적 조성물, 핵산, 억제성 RNA 분자, 치료학적 조성물의 제조 방법, 엑소좀의 분리 방법, 지질 기반 나노입자의 제조 방법, 및 대상체의 치료 방법을 포함한다. 본원 개시내용의 조성물은 적어도 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 하기의 성분을 포함할 수 있다: 리포솜, 엑소좀, 억제성 RNA, siRNA, shRNA, miRNA, 성장 인자, 비변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 변형된 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 및 항미생물 제제. 일부 구현예에서, 이들 많은 성분들 중 어느 하나는 본원 개시내용의 조성물로부터 배제될 수 있다. 본원 개시내용의 방법은 적어도 1, 2, 3, 4개 이상의 하기의 단계를 포함할 수 있다: 약제학적 조성물을 투여하는 단계, 엑소좀을 투여하는 단계, 리포솜을 투여하는 단계, 억제성 RNA를 투여하는 단계, 리포솜을 생성시키는 단계, 대상체로부터 엑소좀을 수득하는 단계, 중간엽 세포로부터 엑소좀을 정제하는 단계, 억제성 RNA를 생성시키는 단계, siRNA를 합성하는 단계, 지질 나노입자를 제조하는 단계, 억제성 RNA를 지질 기반 나노입자에 도입하는 단계, 나노입자에서 억제성 RNA를 캡슐화하는 단계, 대상체를 섬유증을 갖는 것으로서 진단하는 단계, 및 섬유증에 대해 대상체를 치료하는 단계. 일부 구현예에서, 임의의 하나 이상의 이들 단계는 본원의 개시내용의 방법으로부터 배제될 수 있다.

[0005]일부 구현예에서, 본원에서는 STAT3 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 억제성 RNA를 함유하는 지질 기반 나노입자를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 양상에서, 지질 기반 나노입자는 이의 표면에 CD47을 포함한다. 일부 양상에서, 지질 기반 나노입자는 이의 표면 상에 성장 인자를 포함한다. 일부 양상에서, 지질 기반 나노입자는 리포솜 또는 엑소좀이다. 일부 양상에서, 억제성 RNA는 siRNA, shRNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, miRNA, 또는 전구(pre)-miRNA이다. 특정 양상에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된다. 일부 양상에서, 억제성 RNA는 STAT3 단백질의 발현을 녹다운시킨다. 일부 양상에서, 억제성 RNA는 18 내지 30개 뉴클레오타이드의 크기를 갖는다. 일부 구현예에서, 억제성 RNA는 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나와 적어도, 최대 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.9, 또는 100% 동일성, 또는 그 안에서 유도 가능한 임의의 범위를 갖는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 억제성 RNA는 서열번호 1과 적어도, 최대 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.9, 또는 100% 동일성, 또는 그 안에서 유도 가능한 임의의 범위를 갖는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 억제성 RNA는 서열번호 1을 포함한다. 일부 구현예에서, 억제성 RNA는 서열번호 2와 적어도, 최대 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.9, 또는 100% 동일성, 또는 그 안에서 유도 가능한 임의의 범위를 갖는 서열을 포함한다. 일부 구현예

에서, 억제성 RNA는 서열번호 2를 포함한다. 일부 구현예에서, 억제성 RNA는 서열번호 3과 적어도, 최대로, 또는 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.9, 또는 100% 동일성, 또는 그 안에서 유도 가능한 임의의 범위를 갖는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 억제성 RNA는 서열번호 3을 포함한다. 일부 구현예에서, 억제성 RNA는 서열번호 4와 적어도, 최대로, 또는 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.9, 또는 100% 동일성, 또는 그 안에서 유도 가능한 임의의 범위를 갖는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 억제성 RNA는 서열번호 4를 포함한다. 일부 구현예에서, 억제성 RNA는 서열번호 5와 적어도, 최대로, 또는 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.9, 또는 100% 동일성, 또는 그 안에서 유도 가능한 임의의 범위를 갖는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 억제성 RNA는 서열번호 5를 포함한다. 일부 구현예에서, 임의의 하나 이상의 이들 성분들은 본원의 개시내용의 조성물로부터 배제될 수 있는 것으로 고려된다. 또한 일부 구현예에서 본원에서는 본원 개시내용의 억제성 RNA(예를 들어, STAT3 폴리뉴클레오타이드와 하이브리드화하는 억제성 RNA)를 지질 기반 나노입자 (예를 들어, 리포솜, 엑소솜 등)에 도입하는 단계를 포함하는 치료학적 조성물을 제조하는 방법이 기재된다.

[0010] [0006]일부 구현예에서, 본원에서는 본원 구현예 중 어느 하나의 지질 기반 나노입자 및 부형제를 포함하는 억제학적 조성물이 제공된다. 일부 양상에서, 상기 조성물은 비경구 투여를 위해 제형화된다. 특정 양상에서, 조성물은 정맥내, 근육내, 피하 또는 복막내 주사용으로 제형화된다. 특정 양상에서, 조성물은 항미생물 제제를 추가로 포함한다. 특정 양상에서, 항미생물 제제는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 벤질 알콜, 브로노폴, 센트리미드, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로르헥시딘, 클로로부탄올, 클로로크레졸, 클로록실레놀, 크레졸, 에틸 알콜, 글리세린, 액세티딘, 이미디우레아, 페놀, 페녹시에탄올, 페닐에틸 알콜, 페닐머큐릭 니트레이트, 프로필렌 글리콜 또는 티머로살을 포함한다.

[0011] [0007]일부 구현예에서, 본원에서는 본원 구현예의 어느 하나의 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서 섬유증 또는 섬유증과 관련된 병태를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 양상에서, 억제학적 조성물의 투여는 억제성 RNA의 환자 내 세포로의 전달을 유도한다. 일부 양상에서, 섬유증은 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐(pulmonary) 섬유증(IPF), 또는 방사선-유도 폐(lung) 손상이다. 일부 구현예에서, 섬유증은 간 섬유증이다. 일부 양상에서, 상기 억제학적 조성물은 전신 투여를 통해 투여된다. 특정 양상에서, 전신 투여는 정맥내 투여이다. 특정 양상에서, 상기 방법은 추가로 적어도 제2 치료요법을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양상에서, 환자는 사람이다. 특정 양상에서, 지질 기반 나노입자는 엑소솜이고, 여기서, 상기 엑소솜은 환자와 자가이다. 특정 양상에서, 엑소솜은 환자로부터 수득된 체액 샘플로부터 수득된다. 특정 양상에서, 체액 샘플은 혈액, 림프액, 타액, 소변, 뇌척수액, 골수 흡인물, 눈 삼출물/눈물, 또는 혈청이다. 특정 양상에서, 엑소솜은 중간엽 세포로부터 수득한다. 특정 양상에서, 조성물은 1회 초과로 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 적어도 또는 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15회, 또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위로 투여된다. 특정 양상에서, 본원 개시내용의 조성물(예를 들어, STAT3 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 억제성 RNA를 함유하는 지질 기반 나노입자를 포함하는 조성물)의 투여는 환자의 세포(예를 들어, 간 세포)에서 하나 이상의 STAT3 관련 유전자의 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 상기 조성물의 투여는 환자의 간 세포에서 *Col1a1*의 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 상기 조성물의 투여는 환자의 간 세포에서 *Acta2*의 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 상기 조성물의 투여는 환자의 간 세포에서 *Col1a2*의 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 상기 조성물의 투여는 환자의 간 세포에서 *Vim*의 발현을 감소시킨다.

[0012] [0008]본원에 사용된 바와 같은 특정 성분과 관련하여 “필수적으로 부재”는 본원에서 특정 성분의 어느 것도 의도적으로 조성물에 제형화되지 않고/않거나 오염물로서 또는 미량으로만 존재함을 의미하기 위해 사용된다. 따라서, 조성물의 의도치 않은 임의의 오염으로 비롯된 특정 성분의 총량은 0.05% 미만, 예를 들어, 0.01% 미만이다. 일부 구현예에서, 특정 성분이 “필수적으로 부재”인 조성물은 특정 성분을 최대 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.005%, 0.001%, 0.0001% 이하로 함유하거나 함유한다. 일부 구현예에서, 특정 성분이 “필수적으로 부재”인 조성물은 표준 분석 방법으로 특정 성분의 양이 검출될 수 없는 조성물이다.

[0013] [0009]본원 명세서에서, 단수형 관사("a" 또는 "an")는 하나 이상을 의미할 수 있다. 본원 청구항에서, 단수형 관사 ("a" 또는 "an")는 "포함하는"이라는 단어와 함께 사용되는 경우 하나 또는 하나 이상을 의미할 수 있다.

[0014] [0010]청구항에서 "또는"이라는 용어의 사용은, 그것이 명시적으로 대안만을 언급하지 않는 한 또는 명세서가 대안 및 "및/또는"만을 언급하는 정의를 뒷받침하고 있더라도 그 대안이 상호 배타적이지 않는 한 "및/또는"을

의미하는 것으로 사용된다. 본원에서 "또 다른"이라는 말은 적어도 두번째 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

- [0015] [0011]본원 전반에 걸쳐, "약"이라는 용어는 값이 측정 또는 정량 방법에 대한 고유한 오차 변동을 포함함을 지적하기 위해 사용된다.
- [0016] [0012]본 명세서 및 청구항(들)에 사용된 바와 같은, 용어 "포함하는" (및 포함하는의 임의의 형태, 예를 들어, "포함한다(comprise)" 및 "포함한다(comprises)"), "갖는(having)" (및 갖는의 임의의 형태, 예를 들어, "갖는다(have)" 및 "갖는다(has)"), "포함하는 (including)" (및 포함하는의 임의의 형태, 예를 들어, "포함한다(includes)" 및 "포함한다(include)") 또는 "함유하는(containing)" (및 함유하는의 임의의 형태, 예를 들어 "함유한다(contains)" 및 "함유한다(contain)")는 포괄적이거나 개방형(open-ended)이고 추가의 언급되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 용어 "포함하는" 과 관련하여 본원에 기재된 구현에는 또한 용어 "로 이루어진" 또는 "필수적으로 이루어진" 과 관련하여 수행될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0017] [0013]치료, 진단 또는 생리학적 목적 또는 효과와 관련하여 임의의 방법은 또한 기재된 치료, 진단, 생리학적 목적 또는 효과를 성취하거나 수행하기 위해 본원에 논의된 임의의 화합물, 조성물 또는 제제의 "용도"와 같은 "용도" 청구항 언어에 기재될 수 있다.
- [0018] [0014]하나 이상의 서열 또는 조성물의 사용은 본원에 기재된 임의의 방법에 기초하여 사용될 수 있다. 다른 구현에는 본원 전반에 걸쳐 논의된다. 본원 개시내용의 하나의 양상과 관련하여 논의된 임의의 구현에는 본원 개시내용의 다른 양상에도 적용되며 그 반대도 마찬가지이다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법에서 임의의 단계는 임의의 다른 방법에 적용할 수 있다. 더욱이, 본원에 기재된 임의의 방법은 임의의 단계 또는 단계의 조합이 배제될 수 있다. 실시예 섹션에서 구현에는 본원에 기재된 기술의 모든 양상에 적용될 수 있는 구현예인 것으로 이해된다.
- [0019] [0015]본 발명의 다른 목적, 특성 및 이점은 하기의 상세한 설명으로부터 자명해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 본 발명의 특정 구현예를 지적하는 구체적인 실시예는, 상기 상세한 설명으로부터 본 발명의 개념과 범위 내에서 다양한 변화 및 변형을 줄 수 있음이 당업자에게는 명백하기 때문에, 단지 예시로서만 제공되는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0020] [0016]하기의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 특정 양상을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제공된 특정 구현예의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조로 보다 잘 이해될 수 있다.
- [0017]도 1. 간 IVIS 이미징화.
- [0018]도 2a-2b. 간 실질의 손상. 도 2a는 다양한 엑소좀 치료로 치료받은 섬유증 마우스로부터의 간의 H&E-염색된 섹션을 보여준다. 도 2b는 도 2a에 나타낸 섬유증 수준의 정량화를 보여준다.
- [0019]도 3a-3b. 폐 실질의 손상. 도 3a는 다양한 엑소좀 치료로 치료받은 섬유성 마우스로부터의 폐의 H&E-염색된 섹션을 보여준다. 도 3b는 도 3a에 나타낸 섬유증 수준의 정량화를 보여준다.
- [0020]도 4a-4f. 1차 HSC에서 STAT3의 녹다운 효율 및 엑소좀의 생체 분포. 도 4a 및 4b는 5 μ g/20억개 iExo^{siRNA-STAT3} (도 4a) 또는 iExo^{mASO-STAT3} (도 4b)로 치료받은 HSC에서 상대적 Stat3 발현을 보여준다. 도 4c는 비-섬유증 (샴) (좌측 패널) 및 섬유증 마우스 (우측 패널)(n=1)에서 DiR 표지된 엑소좀의 존재에 대해 분석된 열거된 기관의 대표적인 이미지를 보여준다. 도 4d-4f는 나열된 그룹의 냉동 간 조직에서 AF647 표지된 엑소좀 및 DAPI의 면역형광 영상화(도 4d) 및 정량화(도 4e 및 4f)를 보여준다(분석된 각 조직에 대한 3개의 시야). 스케일 바: 100 μ m. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로서 나타낸다. 도 4a 및 4d에 대해, 독립적 양방 t-시험(unpaired two-tailed t-test)을 사용하였다. 도 4b에 대해, 시탁(Sidak)의 사후 분석을 사용한 일원 ANOVA를 사용하였다. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.
- [0021]도 5a-5k. 도 5a는 7일동안 배양된 마우스 간 정상 세포 (HSC)의 이미지를 보여준다 (좌측 패널). 스케일 바: 100 μ m. 1차 마우스 HSC에 대한 α -SMA 및 DAPI에 대한 면역형광 염색(중앙 및 우측 패널). 스케일 바: 100 μ m. 도 5b 및 5c는 TAT3의 qPCR 분석을 보여준다. 도 5d는 CC14₄ 및 i엑소좀/siRNA/mASO 처리 일정의 개략도를

보여준다. 상부 화살표는 CCl_4 주사 (0일)를 나타내고, 하부 화살표는 i엑소솜/siRNA/mASO 주사 (9일)를 나타낸다. 도 5e 및 5f는 10억개의 iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3} 1 μg 을 처리한 마우스에서 콜라겐 I(도 5e) 및 정량화(도 5f)의 면역조직화학적 염색을 보여준다. (분석된 각각의 조직에 대한 3개 시야). $n=3$; 스케일 바: 100 μm . 도 5g 및 5h는 10억개의 iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3} 1 μg 을 처리한 마우스에서 α -SMA(도 5g) 및 정량화(도 5h)의 면역형광 염색을 보여준다. (분석된 각각의 조직에 대한 3개 시야). $n=3$. 스케일 바: 100 μm . 도 5i는 10억 iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3} 1 μg 을 처리한 마우스 기원의 간의 H&E 염색을 보여준다(분석된 각각의 조직에 대한 5개 시야), $n=5$; 스케일 바: 100 μm . 도 5j 및 5k는 피사(도 5j) 및 변성 간세포 (도 5k)의 퍼센트를 보여준다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로서 제공된다. 그래프에서 개별 도트는 별개의 마우스를 나타낸다. 도 5b(좌측 패널), 독립적 양방 스튜던트 t-시험. 도 5b (우측 패널) 및 도 5c-5k. 시약의 사후 분석을 사용한 일원 ANOVA; p값은 모든 그래프에 지적된다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; ns: 유의적이지 않음.

[0022]도 6a-6j. STAT3 표적화 i엑소솜은 간 섬유증을 감소시켰다. 도 6a 및 6b는 1 $\mu\text{g}/10$ 억 (도 6a) 또는 5 $\mu\text{g}/20$ 억 (도 6b) iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3}의 지적된 치료로 처리된 마우스의 간에서 STAT3의 상대적 mRNA 발현을 보여준다. 5 $\mu\text{g}/20$ 억 그룹 내 $n=4-5$ 별개 마우스; $n = 4-5$ 별개의 마우스, 일원 ANOVA는 1 $\mu\text{g}/10$ 억 그룹에 사용하였다. 도 6c 및 6d는 1 $\mu\text{g}/10$ 억 처리 그룹으로부터의 간 색전의 대표적인 시리우스 레드 염색 (도 6c) 및 정량화 (도 6d)를 보여준다(분석된 각각의 조직에 대한 3개 시야). $n = 5-6$ 별개의 마우스, 일원 ANOVA. 스케일 바: 100 μm . 그래프는 시리우스 레드 양성 면적 퍼센트를 나타낸다. 도 6e 및 6f는 5 $\mu\text{g}/20$ 억 처리 그룹으로부터의 간 색전의 대표적인 시리우스 레드 염색 (도 6e) 및 정량화 (도 6f)를 보여준다(분석된 각각의 조직에 대한 3개 시야). $n = 3-5$ 별개의 마우스. 스케일 바: 100 μm . 그래프는 시리우스 레드 양성 면적 퍼센트를 나타낸다. 도 6g 및 6h는 콜라겐 I에 대한 면역조직화학적 염색의 대표적인 이미지 (분석된 각각의 조직에 대한 3개 시야) (도 6g) 및 시야 당 (100x) 콜라겐 I⁺ 면적의 퍼센트의 정량화(도 6h)를 보여준다. $n=3$. 도 6i 및 6j는 α -SMA 면역형광 염색 (도 6i; 분석된 각각의 조직에 대한 3개의 시야) 및 시야 (100x) 당 α -SMA⁺ 세포의 수의 정량화(도 6j)를 보여준다. $n = 3-4$ 별개의 마우스; 스케일 바: 100 μm . 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로서 나타낸다. 그래프에서 개별 도트는 별개의 마우스를 나타낸다. 달리 언급되지 않는 경우, 일원 ANOVA 또는 양방 독립적 t 시험; p값은 모든 그래프에 지적된다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns: 유의적이지 않음.

[0023]도 7a-7k. STAT3을 표적화하는 i엑소솜은 간 기능적 실질을 보존하였다. 도 7a-7d는 지적된 치료를 받은 간에서 상대적 *Col1a1* (도 7a 및 7b) 및 *Acta2* (도 7c 및 7d) 발현을 보여준다. 5 $\mu\text{g}/20$ 억 그룹에서 $n = 4-5$ 별개의 마우스; 1 $\mu\text{g}/10$ 억 그룹에서 $n = 5$ 별개의 마우스, 일원 ANOVA는 1 $\mu\text{g}/10$ 억 그룹에서 통계학적 분석을 위해 사용하였다. 도 7e 및 7f는 지적된 치료를 받은 마우스에서 ALT의 혈청 수준을 보여준다. 5 $\mu\text{g}/20$ 억 그룹에서 $n = 4-5$ 별개의 마우스; $n = 4-5$ 별개의 마우스, 일원 ANOVA는 1 $\mu\text{g}/10$ 억 그룹에서 통계학적 분석을 위해 사용하였다. 도 7g 및 7h는 지적된 치료를 받은 마우스에서 AST의 혈청 수준을 보여준다. 5 $\mu\text{g}/20$ 억 그룹에서 $n = 4-5$ 별개의 마우스; 1 $\mu\text{g}/10$ 억 그룹에서 $n = 4-5$ 별개의 마우스, 일원 ANOVA는 1 $\mu\text{g}/10$ 억 그룹에서 통계학적 분석을 위해 사용하였다. 도 7i는 파라핀 포매 간 색전 (분석된 각각의 조직에 대한 3 내지 5개 시야)의 H&E 염색을 보여준다. $n = 4-5$ 별개의 마우스; 스케일 바: 100 μm . 도 7j 및 7k는 피사 및 변성 간세포의 퍼센트를 보여준다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로서 제공된다. 그래프에서 개별 도트는 별개의 마우스를 나타낸다. 일원 ANOVA 또는 독립적 양방 t-시험; p 값은 모든 그래프에서 지적된다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; ns: 유의적이지 않음.

[0024]도 8a 및 8b. 도 8a는 5 $\mu\text{g}/20$ 억 iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3}으로 치료받은 마우스에서 나열된 기관의 H&E 염색을 보여준다. 도 8b는 1 $\mu\text{g}/10$ 억 iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3}으로 치료받은 마우스에서 나열된 기관의 H&E 염색을 보여준다.

[0025]도 9a-9h i엑소솜 치료 동안에 섬유증 간 전사체의 재프로그래밍. 도 9a는 실험 그룹(siCtrl iExo ($n=3$), siSTAT3 iExo ($n=3$), mASO Scrbl iExo ($n=3$) 및 mASO STAT3 iExo ($n=3$) 중에서 모든 프로브의 상대적 강도를 도시하는 히트 맵을 보여준다. $\log_2$ 로 변환된 mRNA-Seq 발현 데이터를 사용한 행과 열 둘다의 유클리드 클러스터링(Euclidean clustering). 도 9b 및 9c는 나열된 실험 그룹의 간에서 차등적으로 조절되는 유전자의 수를 나타내는 화산 플롯(volcano plot)을 보여준다. 도 9d는 STAT3 신호전달의 히트 맵을 보여준다. 도 9e는 ECM 침착 및 리모델링과 관련된 선택된 유전자를 보여준다. 도 9f 및 9g는 유전자 온톨로지(GO) 분석

(WebGestalt) 집적(enrichment)을 사용함에 의한 표적 유전자에서의 차이를 나타낸다. 도 9h는 STAT3 신호전달 및 ECM 관련 유전자에 대한 NetworkAnalst에 의해 생성된 상호작용 네트워크를 보여준다.

[0026]도 10a-10h. 활성화된 간 정상 세포에서 Col1a1 녹아웃. 도 10a는 섬유증과 관련하여 활성화된 간 정상 세포 또는 αSMA+ 근섬유아세포(Col1a1^{ck0})로부터의 I형 콜라겐의 유전적 손실 시 유의한 감소를 입증하는, ECM 및 콜라겐 I 관련 섬유증을 평가하기 위한 시리우스 레드 염색을 보여준다. 도 10b는 간 섬유증을 갖는 Col1a1^{ck0}에서 콜라겐 I의 유의적인 감소를 입증하는 결과를 보여준다. 도 10c는 간 섬유증을 갖는 Col1a1^{ck0}에서 간 조직학에서 유의적인 개선을 입증하는 결과를 보여준다. 도 10d-10f는 도 10a-10c로부터의 결과의 정량화를 보여준다. 도 10g 및 10h는 간 섬유증과 관련된 많은 범 발현 패턴이 간 섬유증을 갖는 Col1a1^{ck0} 마우스에서 상당히 개선됨을 입증하는 유전자 발현 데이터를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] [0027]본원에서는 간 및 폐 섬유증을 포함하는, 기관 섬유증의 매개인자인 STAT3을 표적화하는 항-센스 올리고 뉴클레오타이드 (ASO) 및 siRNA를 포함하는 억제성 RNA 분자를 운반하도록 가공된 엑소좀이 제공된다. 이들 가공된 엑소좀을 사용하여 간 섬유증 및 폐 섬유증을 포함하는 섬유증을 치료할 수 있다. 중간엽 줄기 세포로부터 수득된 엑소좀은 폐 및 간에 매우 높게 분포되어 있기 때문에, ASO 또는 siRNA의 전달은 효율적이다.

I. 지질 기반 나노입자

[0023] [0028]지질 기반 나노입자는 리포솜, 엑소솜, 지질 제제, 또는 또 다른 지질 기반 나노입자, 예를 들어, 지질 기반 소포 (예를 들어, DOTAP:콜레스테롤 소포)일 수 있다. 지질 기반 나노입자는 양으로 하전되거나, 음으로 하전되거나 중성일 수 있다. 지질 기반 나노입자는 전사 및 해독, 신호 전달, 화학주성 또는 기타 세포 기능을 허용하는 데 필요한 구성요소를 포함할 수 있다. 이들 항목의 하나 이상은 하나의 구현예에서 배제될 수 있는 것으로 고려된다.

[0024] [0029]지질 기반 나노입자는 이들의 표면 상에 CD47을 포함할 수 있다. CD47 (인테그린 연합 단백질)은 대부분의 조직 및 세포에서 발현되는 막관통 단백질이다. CD47은 대식세포 및 수지상 세포와 같은 식세포 상에 발현되는 신호 조절 단백질 알파 (SIRP-α)에 대한 리간드이다. 활성화된 CD47-SIRP-α는 식세포작용을 억제하는 신호 전달 캐스케이드를 개시한다. 따라서, 이론에 국한되는 것 없이, 엑소솜의 표면 상의 CD47의 발현은 대식세포에 의한 식세포작용을 막을 수 있다(문헌참조: WO 2016/201323, 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

A. 리포솜

[0026] [0030]“리포솜”은 봉입된 지질 이중층 또는 응집물의 생성에 의해 형성되는 다양한 단일 및 다중층 지질 비히클을 포괄하는 총칭 용어이다. 리포솜은 일반적으로 인지질, 및 일반적으로 수성 조성물을 포함하는 내부 매질을 포함하는 이중층 막을 갖는 소포 구조를 갖는 거으로서 특징화될 수 있다. 본원에 제공된 리포솜은 단일층 리포솜, 다중층 리포솜 및 다중소포 리포솜을 포함한다. 본원에 제공된 리포솜은 양으로 하전되거나, 음으로 하전되거나 중성일 수 있다. 특정 구현예에서, 리포솜은 중성 전하이다.

[0027] [0031]다중층 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다중 지질층을 갖는다. 상기 리포솜은 인지질을 포함하는 지질이 과량의 수용액 중에 현탁되는 경우 자발적으로 형성된다. 지질 성분은 폐쇄된 구조의 형성 전에 자가-재정렬을 진행하고 지질 이중층 사이에 물 및 용해된 용질을 포집한다. 친지성 분자 또는 친지성 영역을 갖는 분자는 또한 지질 이중층 내에 용해될 수 있거나 이와 연합될 수 있다.

[0028] [0032]특정 양상에서, 폴리펩타이드, 핵산 또는 소분자 약물은 예를 들어, 리포솜의 수성 내부에 캡슐화될 수 있거나, 리포솜의 지질 이중층 내 분산될 수 있거나, 리포솜 및 폴리펩타이드/핵산과 연합된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜에 포집되거나 리포솜과 복합체화되는 등일 수 있다.

[0029] [0033]본원의 구현예에 따라 사용된 리포솜은 당업자에게 공지된 바와 같이 상이한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 중성 인지질 디올레오일포스파티딜콜린(DOPC)과 같은 인지질은 3급-부탄올 중에 용해시킨다. 지질(들)은 이어서 폴리펩타이드, 핵산, 및/또는 다른 성분(들)과 혼합한다. Tween 20은 지질 혼합물에 첨가하여 Tween 20이 조성물 중량의 약 5%가 되도록 한다. 과량의 3급-부탄올은 상기 혼합물에 첨가하여 3급-부탄올의 용적이 적어도 95%가 되도록한다. 혼합물을 볼텍싱하고 드라이 아이스/아세톤 욕조에서 동결시키고 밤새 동결건조시킨다. 동결건조된 제제는 -20℃에서 저장하고 3개월까지 사용될 수 있다. 요구되는 경우, 동결건조된 리포

좁은 0.9% 식염수 중에 재구성된다.

- [0030] [0034] 대안적으로, 리포솜은 지질을 컨테이너, 예를 들어, 유리의 배 형상의 플라스크 내 용매 중에서 혼합함에 의해 제조될 수 있다. 컨테이너는 리포솜의 예상된 현탁액의 용적 보다 10배 큰 용적을 가져야만 한다. 회전 증발기를 사용하여, 용매는 음압하에서 대략 40℃에서 제거한다. 상기 용매는 요구되는 리포솜의 용적에 의존하여 약 5분 내지 2h 내에 제거한다. 조성물은 진공하에 건조기에서 추가로 건조시킬 수 있다. 건조된 지질은 일반적으로 시간 경과에 따라 악화되는 경향 때문에 약 1주 후 버린다.
- [0031] [0035] 건조된 지질은 모든 액체 필름이 재현탁될때까지 진탕시킴에 의해 멸균성 발열원 부재 물 중에서 대략 25-50 mM 인지질에서 수화시킬 수 있다. 이어서 수성 리포솜은 분취액으로 분리될 수 있고, 각각의 바이알에 위치시키고, 진공하에 동결건조시키고 밀봉시킬 수 있다.
- [0032] [0036] 상기된 바와 같이 제조된 건조된 지질 또는 동결건조된 리포솜은 탈수될 수 있고 단백질 또는 펩타이드 용액 중에서 재구성될 수 있고 적합한 용매, 예를 들어, DPBS를 사용하여 적당한 농도로 희석될 수 있다. 혼합물은 이어서 볼텍스 믹서에서 왕성하게 진탕시킨다. 호르몬, 약물, 핵산 작제물 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 제제와 같은 캡슐화되지 않은 추가의 물질은 29,000×g에서 원심분리하여 제거하고 리포솜 펠렛을 세척하였다. 세척된 리포솜은 적당한 총 인지질 농도, 예를 들어, 약 50 내지 200 mM에서 재현탁시킨다. 캡슐화된 추가의 물질 또는 활성 제제의 양은 표준 방법에 따라 결정될 수 있다. 리포솜 제제 중에 캡슐화된 추가의 물질 또는 활성 제제의 양을 결정한 후, 리포솜은 적당한 농도로 희석될 수 있고 사용때까지 4℃에서 저장될 수 있다. 리포솜을 포함하는 약제학적 조성물은 일반적으로 멸균성의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제, 예를 들어, 물 또는 식염 용액을 포함한다.
- [0033] [0037] 본원 구현예와 유용할 수 있는 또 다른 리포솜은 예를 들어, 모두가 단서조항 없이 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된 W002/100435A1, 미국 특허 제5,962,016호, 미국 출원 제2004/0208921호, W003/015757A1, W004/029213A2, 미국 특허 제5,030,453호, 및 미국 특허 제6,680,068호에 기재된 바와 같이 양이온성 리포솜을 포함한다.
- [0034] [0038] 상기 리포솜을 제조하는데 있어서, 본원에 기재되거나, 당업자에게 공지된 임의의 프로토콜이 사용될 수 있다. 리포솜을 제조하는 추가의 비제한적인 예는 미국 특허 제4,728,578호, 제4,728,575호, 제4,737,323호, 제4,533,254호, 제4,162,282호, 제4,310,505호, 및 제4,921,706호; 국제 출원 PCT/US85/01161 및 PCT/US89/05040 에 기재되어 있고, 이의 각각은 본원에 참조로 인용된다.
- [0035] [0039] 특정 구현예에서, 지질 기반 나노입자는 중성 리포솜 (예를 들어, DOPC 리포솜)이다. 본원에 사용된 바와 같은 "중성 리포솜" 또는 "비-하전된 리포솜"은 필수적으로 중성의 총 전하 (실질적으로 비-하전된)를 산출하는 하나 이상의 지질 성분들을 갖는 리포솜으로서 정의된다. "필수적으로 중성" 또는 "필수적으로 비-하전된"은 임의의 경우 소정의 집단 (예를 들어, 리포솜 집단) 내 소수의 지질 성분들이 또 다른 성분의 반대 전하에 의해 상쇄되지 않는 전하를 포함함을 의미한다(즉, 성분의 10% 미만, 보다 바람직하게 5% 미만, 및 가장 바람직하게 1% 미만은 상쇄되지 않는 전하를 포함한다). 특정 구현예에서, 중성 리포솜은 대부분 생리학적 조건 (즉, 약 pH 7에서)하에 그들 자체가 중성인 지질 및/또는 인지질을 포함할 수 있다.
- [0036] [0040] 본원의 구현예의 리포솜 및/또는 지질 기반 나노입자는 인지질을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 단일 종류의 인지질은 리포솜의 생성에 사용될 수 있다(예를 들어, 중성 인지질, 예를 들어, DOPC는 중성 리포솜을 생성하기 위해 사용될 수 있다). 다른 구현예에서, 하나 초과 종류의 인지질은 리포솜을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 인지질은 천연 또는 합성 공급원으로부터 기원할 수 있다. 인지질은 예를 들어, 포스파티딜콜린, 포스파티딜글리세롤 및 포스파티딜에탄올아민을 포함하고; 포스파티딜에탄올아민 및 포스파티딜 콜린은 생리학적 조건 (즉, 약 pH 7에서) 하에 하전되어 있지 않기 때문에, 이들 화합물은 특히 중성 리포솜을 생성하기 위해 유용할 수 있다. 특정 구현예에서, 인지질 DOPC는 비-하전된 리포솜을 생성하기 위해 사용된다. 특정 구현예에서, 인지질이 아닌 지질 (예를 들어, 콜레스테롤)이 사용될 수 있다.
- [0037] [0041] 인지질은 글리세로인지질 및 특정 스핑고지질을 포함한다. 인지질은 디올레오일포스파티딜콜린("DOPC"), 에그 포스파티딜콜린("EPC"), 디라우릴로일포스파티딜콜린("DLPC"), 디미리스토일포스파티딜콜린("DMPC"), 디팔미토일포스파티딜콜린("DPPC"), 디스테아로일포스파티딜콜린("DSPC"), 1-미리스토일-2-팔미토일 포스파티딜콜린("MPPC"), 1-팔미토일-2-미리스토일 포스파티딜콜린("PMPC"), 1-팔미토일-2-스테아로일 포스파티딜콜린("PSPC"), 1-스테아로일-2- 팔미토일 포스파티딜콜린("SPPC"), 디라우릴로일포스파티딜글리세롤("DLPG"), 디미리스토일포스파티딜글리세롤("DMPG"), 디팔미토일포스파티딜글리세롤("DPPG"), 디스테아로일포스파티딜글리세롤

("DSPG"), 디스테아로일 스펡고미엘린 ("DSSP"), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민 ("DSPE"), 디올레오일포스파티딜글리세롤("DOPG"), 디미리스토일 포스파티드산("DMPA"), 디팔미토일 포스파티드산("DPPA"), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민("DMPE"), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민("DPPE"), 디미리스토일 포스파티딜세린("DMPS"), 디팔미토일 포스파티딜세린("DPPS"), 너 포스파티딜세린("BPS"), 너 포스파티딜세린("BPS"), 디팔미토일 스펡고미엘린("DPSP"), 디미리스틸 포스파티딜콜린("DMPC"), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린("DAPC"), 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린("DBPC"), 1,2-디에이코세노일-sn-글리세로-3-포스포콜린("DEPC"), 디올레오일포스파티딜에탄올아민("DOPE"), 팔미토일로에오일 포스파티딜콜린("POPC"), 팔미토일로에오일 포스파티딜에탄올아민("POPE"), 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민, 및 디리놀레오일포스파티딜콜린을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0038] B. 엑소솜

[0039] [0042]본원에 사용된 바와 같은 용어 "나노소포" 및 "엑소솜"은 약 10 nm 내지 약 5000 nm, 보다 전형적으로 30 nm 내지 1000 nm, 및 가장 전형적으로 약 50 nm 내지 750 nm의 직경 (또는 입자가 구형이 아닌 경우 최대 치수)을 갖는 막 입자를 언급하고, 여기서, 엑소솜의 막의 적어도 일부는 직접 세포로부터 수득된다. 본원 개시내용의 엑소솜은 적어도, 최대, 또는 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 또는 5000 nm, 또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위의 직경을 가질 수 있다. 가장 통상적으로, 엑소솜은 공여자 세포의 크기의 최대 5%인 크기 (평균 직경)를 갖는다. 따라서, 특히 고려되는 엑소솜은 세포로부터 배출된 것들을 포함한다.

[0040] [0043]엑소솜은 예를 들어, 체액과 같은 임의의 적합한 샘플 유형에서 검출될 수 있거나 이로부터 분리될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "단리된"은 이의 천연 환경으로부터의 분리를 언급하고, 적어도 부분적 정제를 포함하는 것으로 의미되고 실질적 정제를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "샘플"은 본 발명에 의해 제공된 방법을 위해 적합한 임의의 샘플을 언급한다. 샘플은 검출 또는 단리를 위해 적합한 엑소솜을 포함하는 임의의 샘플일 수 있다. 샘플의 공급원은 혈액, 골수, 흉강액, 복막액, 뇌척수액, 뇨, 침샘, 양수, 악성 복수, 기관지 폐포 세척액, 활액, 모유, 땀, 눈물, 관절액, 및 기관지 세척액을 포함한다. 하나의 양상에서, 상기 샘플은 예를 들어, 전혈 또는 임의의 분획 또는 이의 성분을 포함하는 혈액 샘플이다. 본 발명과 함께 사용하기 위해 적합한 혈액 샘플은 혈액 세포 또는 이의 성분을 포함하는, 공지된 임의의 공급원, 예를 들어, 정맥, 동맥, 말초, 조직, 척수 등으로부터 추출될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 널리 공지되고 통상적인 임상적 방법 (예를 들어, 전혈을 인출하고 가공하기 위한 절차)을 사용하여 수득되고 가공될 수 있다. 하나의 양상에서, 예시적인 샘플은 암을 갖는 대상체로부터 인출된 말초 혈액일 수 있다.

[0041] [0044]엑소솜은 또한 조직 샘플, 예를 들어, 수술 샘플, 생검 샘플, 조직, 대변 및 배양된 세포로부터 분리될 수 있다. 조직 공급원으로부터 엑소솜을 분리하는 경우, 단일 세포 현탁액을 수득한 다음 세포를 용해하여 엑소솜을 방출하기 위해 조직을 균질화시킬 필요가 있다. 조직 샘플로부터 엑소솜을 분리하는 경우, 엑소솜을 파괴시키지 않는 균질화 및 용해 절차를 선택하는 것은 중요하다. 본원에서 고려되는 엑소솜은 바람직하게는, 생리학적으로 허용되는 용액, 예를 들어 완충 식염수, 성장 배지, 다양한 수성 배지 등의 체액으로부터 분리된다.

[0042] [0045]엑소솜은 새롭게 수거된 샘플로부터 또는 동결되거나 냉장 저장된 샘플로부터 분리될 수 있다. 일부 구현예에서, 엑소솜은 세포 배양 배지로부터 분리될 수 있다. 필요하지 않지만, 보다 높은 순도의 엑소솜은 유체 샘플이 샘플로부터 임의의 파쇄물을 제거하기 위해 용적 배제 중합체와의 침전 전에 정화되는 경우 수득될 수 있다. 정화 방법은 원심분리, 초원심분리, 여과 또는 한외여과를 포함한다. 가장 전형적으로, 엑소솜은 당업계에 널리 공지된 다양한 방법에 의해 분리될 수 있다. 하나의 바람직한 방법은 체액 또는 세포 배양 상등액으로부터 차등 원심분리이다. 엑소솜 단리를 위한 예시적인 방법은 문헌(참조: Losche *et al.*, 2004; Mesri and Altieri, 1998; Morel *et al.*, 2004)에 기재되어 있다. 대안적으로, 엑소솜은 또한 문헌(참조: Combes *et al.*, 1997)에 기재된 바와 같이 유동 세포측정을 통해 분리될 수 있다.

[0043] [0046]엑소솜의 단리를 위한 하나의 수용된 프로토콜은 흔히 상대적으로 저밀도 엑소솜을 부유시키기 위해 슈크로스 밀도 구배 또는 슈크로스 쿠션과 조합된 초원심분리를 포함한다. 순차적 차등 원심분리에 의한 엑소솜의 단리는 다른 미세소포 또는 거대분자 복합체와의 중복된 크기 분포의 가능성에 의해 복잡해진다. 추가로, 원심분리는 이들의 크기를 기준으로 소포를 분리하기에 불충분한 수단을 제공할 수 있다. 그러나, 슈크로스 농도 구배 원심분리와 조합되는 경우 순차적 원심분리는 고농축의 엑소솜을 제공할 수 있다.

[0044] [0047]초원심분리 경로에 대한 대안을 사용하여 크기를 기반으로 하는 엑소솜의 단리는 또 다른 선택사항이다. 초원심분리 보다 시간 소모가 적고 특수 장비의 사용을 요구하지 않는 초원심분리 과정을 사용한 엑소솜의 성공

적인 정제가 보고되었다. 유사하게, 상업적 키트는 가용하고(EXOMIR™ Bioo Scientific) 이는 하나의 미세여과기 상에 세포, 혈소판 및 세포 파쇄물의 제거 및 유체를 구동시키기 위한 양압을 사용하여 제2 미세여과기 상에 30 nm 보다 큰 소포의 포획을 가능하게 한다. 그러나, 상기 공정을 위해, 엑소좀은 회수되지 않고, 이들의 RNA 내용물은 PCR 분석을 위해 사용될 수 있는 제2 미세여과기 상에 포획된 물질로부터 직접 추출된다. HPLC-기반 프로토콜은 잠재적으로 고도로 순수한 엑소좀을 수득할 수 있게 하지만 이들 공정은 정교한 장비를 요구하고 스케일 업하기가 어렵다. 상당한 문제점은 혈액 및 세포 배양 배지 둘다가 엑소좀과 동일한 크기 범위의 다수의 나노입자 (일부 비-소포)를 함유한다는 것이다. 예를 들어, 일부 miRNA는 엑소좀 보다는 차라리 세포의 단백질 복합체 내 함유될 수 있지만; 프로테아제 (예를 들어, 프로테이나제 K)를 사용한 처리는 “엑소좀외” 단백질을 갖는 임의의 가능한 오염물을 제거하기 위해 수행될 수 있다.

[0045] [0048]또 다른 구현예에서, 암 세포 유래 엑소좀은 엑소좀에 대한 샘플을 농축시키기 위해 일반적으로 사용되는 기술, 예를 들어, 면역특이적 상호작용(예를 들어, 면역자기 포획)을 수반하는 기술에 의해 포획될 수 있다. 면역자기 세포 분리라고도 알려진 면역자기 포획은 일반적으로 특정 세포 유형에서 발견되는 단백질에 대한 항체를 작은 상자성 비드에 부착하는 것을 포함한다. 항체 코팅된 비드가 혈액과 같은 샘플과 혼합되는 경우, 특정 세포에 부착되어 이를 둘러싼다. 이어서 샘플은 강한 자기장에 위치시켜 비드가 하나의 측면으로 펠렛화하도록 한다. 혈액을 제거한 후, 포획된 세포는 비드와 함께 보유된다. 상기 일반적인 방법의 많은 변형이 당업계에 잘 공지되어 있고 엑소좀을 분리하는 데 사용하기에 적합하다. 하나의 예에서, 엑소좀은 자기 비드(예를 들어, 알테히드/셀페이트 비드)에 부착될 수 있고, 이어서 항체는 혼합물에 첨가되어 비드에 부착된 엑소좀 표면의 에피토프를 인지한다. 암 세포 유래 엑소좀 상에 발견되는 것으로 공지된 예시적인 단백질은 ATP-결합 카세트 서브 패밀리 A 구성원 6 (ABCA6), 테트라스판닌-4 (TSPAN4), SLIT 및 NTRK-유사 단백질 4 (SLITRK4), 추정 프로토카드헤린 베타-18 (PCDHB18), 골수 세포 표면 항원 CD33 (CD33), 및 글리피칸-1 (GPC1)을 포함한다. 암 세포 유래 엑소좀은 예를 들어 이러한 단백질 중 하나 이상에 대한 항체 또는 압타머를 사용하여 분리될 수 있다.

[0046] [0049]세포에서 발현되는 모든 단백질이 그 세포에 의해 분비되는 엑소좀에서 발견되는 것은 아니라는 점에 유의해야 한다. 예를 들어, 칼넥신, GM130 및 LAMP-2는 모두 MCF-7 세포에서 발현되지만 MCF-7 세포에서 분비되는 엑소좀에서는 발견되지 않는 단백질이다(문헌참조: Baietti *et al.*, 2012). 또 다른 예로서, 한 연구에서는 190/190 체관 선암종 환자가 건강한 대조군보다 GPC1+ 엑소좀 수치가 더 높다는 것을 밝혔다(문헌참조: Melo *et al.*, 2015, 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 특히, 평균적으로 건강한 대조군의 2.3%만이 GPC1+ 엑소좀을 가졌다.

[0047] 1. 세포 배양물로부터 엑소좀을 수거하기 위한 예시적 프로토콜

[0048] [0050]1일째, T225 플라스크에서 충분한 세포 (예를 들어, 약 500만개 세포)를 10% FBS를 함유하는 배지에 씨딩하여, 다음날 세포가 약 70% 컨플루언트하도록 한다. 2일째, 세포 상의 배지를 흡인하고, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 이어서 25-30 mL의 염기 배지 (즉, PenStrep 또는 FBS 부재)를 세포에 첨가한다. 상기 세포를 24 내지 48시간 동안 항온처리한다. 48시간 항온처리가 바람직하지만 일부 세포주는 무혈청 배지에 보다 민감성이므로, 따라서 항온처리 시간은 24시간으로 감소되어야만 한다. FBS는 NanoSight 결과를 크게 왜곡하는 엑소좀을 함유함을 주지한다.

[0049] [0051]3/4일째에, 상기 배지를 수거하고 800xg에서 5분 동안 실온에서 원심분리하여 죽은 세포 및 대형 파쇄물을 펠렛화한다. 상등액을 새로운 원뿔 튜브로 이동시키고, 2000 x g에서 10분 동안 다시 배지를 원심분리하여 다른 대형 파쇄물 및 대형 소포를 제거한다. 배지를 0.2 μ m 필터에 통과시키고 이어서 튜브 당 35 mL를 사용하여 초원심분리 튜브 (예를 들어, 25×89 mm Beckman Ultra-Clear)에 분취한다. 튜브 당 배지의 용적이 35 mL 미만인 경우, 튜브의 나머지를 PBS로 채워서 35 mL에 도달하도록 한다. SW 32 Ti 로터 (k-인자 266.7, RCF max 133,907)를 사용하여 4℃에서 28,000 rpm에서 2 내지 4시간동안 배지를 초원심분리한다. 대략 1인치의 액체가 잔류할때까지 상등액을 주의깊게 흡인 제거한다. 튜브를 기울이고, 잔류 배지가 흡인기 피펫에 서서히 진입하도록 한다. 경우에 따라, 엑소좀 펠렛은 PBS 중에 재현탁시킬 수 있고, 28,000 rpm에서 초원심분리를 1 내지 2시간 동안 반복하여 엑소좀 집단을 추가로 정제하였다.

[0050] [0052]최종적으로, 210 μ L PBS 중에서 엑소좀 펠렛을 재현탁시킨다. 각각의 샘플에 대해 다수의 초원심분리 튜브가 있는 경우, 동일한 210 μ L의 PBS를 사용하여 각각의 엑소좀 펠렛을 연속으로 재현탁시킨다. 각각의 샘플에 대해, 10 μ L를 취하고 990 μ L H₂O에 첨가하여 나노입자 트래킹 분석을 위해 사용한다. 다운스트림 공정을 위해 잔류 200 μ L의 엑소좀-함유 현탁액을 사용하거나 즉시 -80℃에 저장한다.

[0051] 2. 혈청 샘플로부터 엑소좀을 추출하기 위한 예시적 프로토콜

[0052] [0053] 먼저, 혈청 샘플이 빙상에서 해동되도록 한다. 이어서, 250 μ L의 무세포 혈청 샘플을 11 mL의 PBS 중에 희석시키고; 0.2 μ m 공극 필터를 통해 여과한다. 4°C에서 150,000 x g에서 밤새 희석된 샘플을 초원심분리한다. 다음 날, 상등액을 주의깊게 버리고, 11 mL의 PBS 중에서 엑소좀 펠렛을 세척한다. 2시간동안 4°C에서 150,000 x g에서 제2 라운드의 초원심분리를 수행한다. 최종적으로, 상등액을 주의깊게 버리고, 분석을 위해 100 μ L PBS 중에 엑소좀 펠렛을 재현탁시킨다.

[0053] C. 엑소좀 및 리포좀의 전기천공을 위한 예시적 프로토콜

[0054] [0054] 1×10^8 엑소좀(NanoSight 분석에 의해 측정됨) 또는 100 nm 리포좀(예를 들어, 제조사(Encapsula Nano Sciences)로부터 구입됨) 및 1 μ g의 siRNA (Qiagen) 또는 shRNA를 400 μ L의 전기천공 완충액(1.15 mM 인산칼륨, pH 7.2, 25 mM 염화칼륨, 21% Optiprep)을 혼합한다. 4 mm 큐벳을 사용하여 엑소좀 또는 리포좀을 전기천공한다(문헌참조: 예를 들어, Alvarez-Erviti *et al.*, 2011; El-Andaloussi *et al.*, 2012). 전기천공 후, 엑소좀 또는 리포좀을 프로테아제 부재 RNase로 처리하고, 이어서 $10 \times$ 농축된 RNase 억제제를 첨가한다. 최종적으로, 상기된 바와 같이 초원심분리 방법하에 엑소좀 또는 리포좀을 PBS로 세척한다.

[0055] II. 억제성 RNA

[0056] A. 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0057] [0055] 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO) 치료학적 제제는 일반적으로 약 16 내지 30개 뉴클레오타이드 길이인 단일 가닥 핵산 치료제이고, 배양물 중에 또는 유기체 중에 표적 세포에서 표적 핵산 서열에 상보적이다.

[0058] [0056] 일부 구현예에서, 제제는 단일 가닥 안티센스 RNA 분자, 단일 가닥 안티센스 DNA 분자, 또는 DNA 및 RNA 둘 다를 포함하는 단일 가닥 안티센스 폴리뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, 안티센스 분자는 DNA 및 RNA 둘 다를 포함하는 ASO이다. 안티센스 분자는 표적 mRNA, 예를 들어, *STAT3* mRNA 내 서열에 상보적이다. 안티센스 분자는 mRNA에 염기쌍을 형성하고 해독 기구를 물리적으로 방해함으로써 화학량론적 방식으로 해독을 억제할 수 있다. 상기 안티센스 분자는 표적 mRNA와 상보적인 적어도 또는 최대 15-30개 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 예를 들어, 안티센스 분자는 표적 mRNA에 상보적인 연속 뉴클레오타이드인, 적어도 또는 최대 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25, 또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위 또는 값의 서열을 가질 수 있다.

[0059] [0057] 일부 구현예에서, ASO는 적어도 또는 최대 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개 뉴클레오타이드 또는 그 안에서 유도 가능한 임의의 범위 또는 값을 포함한다. 임의의 이들 값은 ASO 내 뉴클레오타이드 수에 대한 범위를 한정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, ASO는 8-50, 15-30, 또는 20-25개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있거나, 적어도 포함할 수 있거나 최대로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, ASO는 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개 뉴클레오타이드 또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위 또는 값으로 이루어진다. 임의의 이들 값은 ASO 내 뉴클레오타이드 수에 대한 범위를 한정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, ASO는 8-50, 15-30, 또는 20-25개 뉴클레오타이드로 이루어질 수 있다.

[0060] [0058] 본원 개시내용의 한 양상에서, 제제는 단일 가닥 안티센스 핵산 분자(ASO)이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)는 합성 분자이고, 일부 구현예에서 길이가 18-21개인 뉴클레오타이드를 포함하고 표적 유전자의 mRNA 서열에 상보적이다. ASO는 서열 특이적 하이브리드화를 통해 동족 mRNA 서열에 결합하여 mRNA의 절단 또는 불능화 및 표적 유전자의 발현 억제를 유도한다.

[0061] 1. ASO의 변형

[0062] [0059] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 ASO는 변형될 수 있다. "변형된 ASO"는 핵산의 성분 중 하나 이상, 즉 당, 염기 및 포스페이트 모이어티가 자연에서 발생하는 것과 상이하고, 예를 들어, 사람 신체에 존재하는 것과 상이하다. ASO에 대한 여러 변형은 당업계에 기재되어 있다. 이들 변형은 표적 mRNA에 대한 특이성을 유지하면서 뉴클레아제에 대한 내성, 생물학적 막을 통한 투과성, 용해도, 안정성 또는 약동학 및 약력학 성질의 조절과 같은 ASO 성질을 개선하는 것을 목표로 한다. 예를 들어, 뉴클레오타이드에 대한 변형은 LNA, HNA, CeNA, 2'-메톡시에틸, 2'-O-알킬, 2'-O-알릴, 2'-C-알릴, 2'-C-알릴, 2'-플루오로, 2'-데옥시, 2'-하이드록실, 및 이들의 조합을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 이들 변형의 하나 이상은 하나의 구현예에서 배제될 수 있는

것으로 고려된다.

[0063] [0060] 안티센스 핵산, 화학적 변형 및 치료 용도에 관한 특허가 제공되고, 예를 들어, 미국 특허 제5,898,031호는 화학적으로 변형된 RNA-함유 치료 화합물에 관한 것이고, 미국 특허 제6,107,094호는 치료학적 제제로서 이들 화합물을 사용하는 방법에 관한 것이다. 미국 특허 제7,432,250호는 단일 가닥의 화학적으로 변형된 RNA-유사 화합물을 투여함으로써 환자를 치료하는 방법에 관한 것이고; 미국 특허 제7,432,249호는 단일 가닥의 화학적으로 변형된 RNA-유사 화합물을 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 미국 특허 제7,432,249호는 다수의 RNA 뉴클레오타이드를 갖는 단일 가닥의 올리고뉴클레오타이드 및 적어도 하나의 화학적 변형을 사용하여 표적 mRNA를 절단하는 방법에 관한 것이다. 상기 문단에 나열된 특허 문헌 각각은 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0064] a. 변형된 염기

[0065] [0061] 치료학적 핵산은 천연(즉, A, G, U, C, 또는 T) 또는 변형된(예를 들어, 7-테아자구아노신, 이노신 등) 염기를 포함할 수 있다. 염기의 변형은 리보핵산(즉, A, C, G 및 T) 및 데옥시리보핵산(즉, A, C, G 및 T)에 존재하는 표준 염기, 당 및/또는 포스페이트 골격 화학적 구조의 변형인 변형된 염기(또는 변형된 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드)의 혼입을 포함한다. 상기 범위내에 포함된 것은 예를 들어 다음과 같다: Gm (2'-메톡시구아닐산), Am (2'-메톡시아데닐산), Cf (2'-플루오로시티딜산), Uf (2'-플루오로우리딜산), Ar (리보아데닐산). 압타머는 또한 시토신, 또는 5-메틸시토신, 4-아세틸시토신, 3-메틸시토신, 5-하이드록시메틸시토신, 2-티오시토신, 5-할로시토신(예를 들어, 5-플루오로시토신, 5-브로모시토신, 5-클로로시토신, 및 5-요오도시토신), 5-프로피닐 시토신, 6-아조시토신, 5-트리플루오로메틸시토신, N4,N4-에타노시토신, 페녹사진 시티딘, 페노티아진 시티딘, 카바졸 시티딘 또는 피리딘인돌 시티딘을 포함하는 임의의 시토신 관련 염기를 포함할 수 있다. 압타머는 구아닌, 또는 6-메틸구아닌, 1-메틸구아닌, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸구아닌, 7-메틸구아닌, 2-프로필구아닌, 6-프로필구아닌, 8-할로구아닌(예를 들어, 8-플루오로구아닌, 8-브로모구아닌, 8-클로로구아닌, 및 8-요오도구아닌), 8-아미노구아닌, 8-설프하이드릴구아닌, 8-티오알킬구아닌, 8-하이드록실구아닌, 7-메틸구아닌, 8-아자구아닌, 7-테아자구아닌 또는 3-테아자구아닌을 포함하는 구아닌 관련 염기를 추가로 포함할 수 있다. 압타머는 여전히 아데닌, 또는 6-메틸아데닌, N6-이소펜테닐아데닌, N6-메틸아데닌, 1-메틸아데닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 8-할로아데닌(예를 들어, 8-플루오로아데닌, 8-브로모아데닌, 8-클로로아데닌 및 8-요오도아데닌), 8-아미노아데닌, 8-설프하이드릴아데닌, 8-티오알킬아데닌, 8-하이드록실아데닌, 7-메틸아데닌, 2-할로아데닌(예를 들어, 2-플루오로아데닌, 2-브로모아데닌, 2-클로로아데닌 및 2-요오도아데닌), 2-아미노아데닌, 8-아자아데닌, 7-테아자아데닌 또는 3-테아자아데닌을 포함하는 임의의 아데닌 관련 염기를 추가로 포함할 수 있다. 또한 우라실, 또는 5-할로우라실(예를 들어, 5-플루오로우라실, 5-브로로우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실), 5-(카복시하이드록실메틸)우라실, 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오우라실, 5-카복시메틸아미노메틸우라실, 디하이드로우라실, 1-메틸슈도우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 5'-메톡시카보닐메틸우라실, 5-메톡시우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산, 슈도우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카복시프로필)우라실, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-프로피닐 우라실, 6-아조우라실 또는 4-티오우라실을 포함하는 임의의 우라실 관련 염기가 포함된다.

[0066] [0062] 당업계에 공지된 다른 변형된 염기 변이체의 예는 제한 없이, 예를 들어, 4-아세틸시티딘, 5-(카복시하이드록실메틸)우리딘, 2'-메톡시시티딘, 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카복시메틸아미노메틸우리딘, 디하이드로우리딘, 2'-O-메틸슈도우리딘, b-D-갈락토실큐에오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데노신, 1-메틸아데노신, 1-메틸슈도우리딘, 1-메틸구아노신, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아노신, 2-메틸아데노신, 2-메틸구아노신, 3-메틸시티딘, 5-메틸시티딘, N6-메틸아데노신, 7-메틸구아노신, 5-메틸아미노메틸우리딘, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우리딘, b-D-만노실큐에오신, 5-메톡시카보닐메틸우리딘, 5-메톡시우리딘, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데노신, N-((9-b-D-리보푸라노실-2-메틸티오펜-6-일)카바모일)트레오닌, N-((9-b-D-리보푸라노실푸린-6-일)N-메틸-카바모일)트레오닌, 우리딘-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우리딘-5-옥시아세트산 (v), 위부톡소신, 슈도우리딘, 큐에오신, 2-티오시티딘, 5-메틸-2-티오우리딘, 2-티오우리딘, 4-티오우리딘, 5-메틸우리딘, N-((9-b-D-리보푸라실푸린-6-일)카바모일)트레오닌, 2'-O-메틸-5-메틸우리딘, 2'-O-메틸우리딘 및 위부톡소신, 3-(3-아미노-3-카복시프로필)우리딘을 포함한다.

[0067] [0063] 또한 이들 각각이 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제3,687,808호, 제3,687,808호, 제4,845,205호, 제5,130,302호, 제5,134,066호, 제5,175,273호, 제5,367,066호, 제5,432,272호, 제5,457,187호, 제5,459,255호, 제5,484,908호, 제5,502,177호, 제5,525,711호, 제5,552,540호, 제5,587,469호,

제5,594,121호, 제5,596,091호, 제5,614,617호, 제5,645,985호, 제5,830,653호, 제5,763,588호, 제6,005,096호, 및 제5,681,941호에 기재된 변형된 뉴클레오타이드가 포함된다.

[0068] b. 변형된 당

[0064] ASO에 사용하기 위한 변형된 당 모이어티는 당업계에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제9,045,754호에 기재되어 있다. 변형된 당을 사용하여 이의 표적에 대한 ASO의 친화성을 변경하고, 전형적으로 이를 증가시키고/시키거나 뉴클레아제 내성을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이들의 표적에 대한 ASO의 결합 친화성은 ASO의 뉴클레오사이드 서브유닛에서 치환체 그룹을 혼입함에 의해 증가될 수 있다. 일부 구현예에서, 치환체 그룹은 T 치환체 그룹, ASO의 뉴클레오사이드 서브유닛의 펜토피라노실 당 모이어티의 2' 위치에 위치한 치환체 그룹이다. 치환체 그룹은 플루오로, 알콕시, 아미노-알콕시, 알릴옥시, 이미다졸릴알콕시 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 알콕시 및 아미노-알콕시 그룹은 일반적으로 저급 알킬 그룹, 특히 C1-C9 알킬을 포함한다. 특정 구현예에서, 2' 치환체 그룹은 2' -O-메틸이다. 폴리에틸렌 글리콜은 구조식 $(O-CH_2-CH_2)_n-O$ -알킬이다. 특정 구현예에서, 치환체는 화학식 $(-O-CH_2-CH_2)_n-O$ -알킬의 폴리에틸렌 글리콜 치환체이고, 상기 화학식에서 $n=1$ 및 알킬=CH₃이다. 상기 변형은 올리고뉴클레오타이드의 이의 표적에 대한 친화성 및 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레아제 내성 둘다를 증가시키는 것으로 나타났다. 상기 인용된 미국 특허 제7,629,321호를 참조한다. 결합 친화성을 증가시키기 위해 추가로 특히 유용한 2' -치환체 그룹은 2' -플루오로 그룹이다.

[0065] 당업계에 공지된 변형된 뉴클레오사이드 및 뉴클레오타이드 당 골격 변이체의 예는 제한 없이 예를 들어, 2' 리보실 치환체, 예를 들어, F, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂, CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, OCH₂OCH₂N(CH₃)₂, O(C1-10 알킬), O(C2-10 알케닐), O(C2-10 알킬), S(C1-10 알킬), S(C2-10 알케닐), S(C2-10 알킬), NH(C1-10 알킬), NH(C2-10 알케닐), NH(C2-10 알킬), 및 O-알킬-O-알킬을 갖는 것들을 포함한다. 바람직한 2' 리보실 치환체는 2' -메톡시 (2' -OCH₃), 2' -아미노프로폭시 (2' -OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2' -O-알릴 (2' -CH₂-CH=CH₂), 2' -O-알릴 (2' -O-CH₂-CH=CH₂), 2' -아미노 (2' -NH₂), 및 2' -플루오로 (2' -F)를 포함한다. 2' -치환체는 아라비노 (상부) 위치 또는 리보 (하부) 위치에 있을 수 있다. 이들 변이체의 하나 이상은 본원 개시내용의 구현예로부터 배제될 수 있다.

[0066] 당업계에 공지되고 본원 개시내용의 ASO에 사용될 수 있는 또 다른 부류의 변형된 ASO는 리보스 모이어티의 2' 위치에서 알킬 변형을 함유한다. 이들 ASO는 표적 mRNA와의 결합 친화성 및 하이브리드화 안정성을 개선시키고 ASO의 뉴클레아제 내성을 증가시키기 위해 개발되었다. 상기 카테고리에서, 가장 통상적으로 사용되는 ASO는 2' -O-메틸 (2' -OME) 및 2' -O-메톡시에틸 (2' -MOE) ASO이다. 상기 유형의 변형을 갖는 ASO는 RNase H를 활성화시킬 수 없다. 따라서, RNase H 활성화를 유도하기 위해, 키메라 ASO가 개발되었고, 여기서, 포스포로티오에이트 테옥시리보스 코어로 이루어진 중앙 겹 영역은 보다 큰 뉴클레아제 내성을 갖는 2' -OME 또는 2' -MOE와 같은 뉴클레아제 내성 아암으로 플랜킹되어 있다. 결과로서 “깍머”가 제조되고, 여기서, RNase H는 중앙 겹에 착석하고 표적 특이적 mRNA 분해를 활성화시킬 수 있고, 상기 아암은 ASO 분해를 예방한다. 상기 카테고리에서 ASO는 제1 부류의 변형된 ASO와 비교하여, mRNA에 대해 보다 높은 친화성을 갖고, 보다 양호한 조직 취득을 보여주고, 뉴클레아제에 대해 증가된 내성을 갖고, 생체내 반감기가 보다 길고 독성이 적다.

[0067] 당업계에 공지되어 있고 본원 개시내용의 ASO에 사용될 수 있는 추가 부류의 ASO는 포스페이트 연결, 리보스 모이어티 또는 뉴클레오타이드의 변형과 함께 푸라노스 환의 변형을 함유한다. 이들 변형은 ASO의 뉴클레아제 안정성, 표적 친화성 및 약동학적 프로파일을 개선하도록 디자인되었다. ASO의 제3 카테고리의 일반적인 예는 잠금 핵산(LNA), 펩타이드 핵산(PNA) 및 모르폴리노 포스포로아미데이트(MF)이다. 상기 카테고리에서 ASO는 뉴클레아제 및 펩티다제에 의한 분해에 대해 이들의 높은 내성 때문에 생물학적 유체에서 보다 안정하다. 이들은 또한 mRNA와 강한 하이브리드화 친화성을 나타낸다. 추가로, PNA는 이중 가닥 DNA를 인지하고, 염색체 듀플렉스 DNA의 가닥 침습에 의해 유전자 발현을 조절하거나 돌연변이를 유도할 수 있다. 상기 카테고리에서 ASO는 또한 RNase H를 활성화시키지 않고, 해독 정지를 유발하도록 리보솜 기구를 입체적으로 방해하는 것에 의존한다. 이들은 하전되어 있지 않기 때문에 혈청 단백질에 결합하지 않는다. 하전 부재는 비특이적 상호작용의 가능성을 감소시키지만 신체로부터의 제거율을 증가시킨다. 이들의 정전기적으로 중성인 골격은 용해도를 감소시키고 흡수를 더 어렵게 할 수 있다.

[0068] 바람직한 변형된 당의 대표적인 목록은 메틸렌옥시 (4' -CH₂-O-2') BNA 및 에틸렌옥시 (4' -(CH₂)₂-O-2') 브릿지 BNA를 포함하는 바이사이클릭 변형된 당 (BNA); 치환된 당, 특히 2' -F, 2' -OCH₃ 또는 2' -O(CH₂)₂-OCH₃ 치환체 그룹을 갖는 2' -치환된 당; 및 4' -티오 변형된 당을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 당은

또한 무엇 보다 당 모사체 그룹으로 대체될 수 있다. 변형된 당의 제조 방법은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 상기 변형된 당의 제조를 교시하는 일부 대표적인 특허 및 공보는 미국 특허 제4,981,957호; 제5,118,800호; 제5,319,080호; 제5,359,044호; 제5,393,878호; 제5,446,137호; 제5,466,786호; 제5,514,785호; 제5,519,134호; 제5,567,811호; 제5,576,427호; 제5,591,722호; 제5,597,909호; 제5,610,300호; 제5,627,053호; 제5,639,873호; 제5,646,265호; 제5,658,873호; 제5,670,633호; 제5,792,747호; 제5,700,920호; 제6,531,584호; 및 제6,600,032호; 및 WO 2005/121371을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0074] c. 변형된 뉴클레오타이드간 연결

[0069] 핵산 치료제는 추가로 적어도 하나의 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함할 수 있다. 포스포로티오에이트 또는 메틸포스포네이트 뉴클레오타이드간 연결 변형은 가닥의 임의의 위치에서 센스 가닥, 안티센스 가닥 또는 가닥 둘다(센스 가닥을 포함하는 핵산 치료제에서)의 임의의 뉴클레오타이드 상에 존재할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드간 연결 변형은 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 상의 모든 뉴클레오타이드에서 발생할 수 있거나; 각각의 뉴클레오타이드간 연결 변형은 센스 가닥 또는 안티센스 가닥 상의 교호 패턴으로 발생할 수 있거나; 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 교호 패턴으로 뉴클레오타이드간 연결 변형 둘다를 포함할 수 있다. 센스 가닥 상의 뉴클레오타이드간 연결 변형의 교호 패턴은 안티센스 가닥과 동일하거나 상이할 수 있고, 센스 가닥 상의 뉴클레오타이드간 연결 변형의 교호 패턴은 안티센스 가닥 상의 뉴클레오타이드간 연결 변형의 교호 패턴에 상대적인 전환을 가질 수 있다.

[0070] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 ASO는 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 3'-(또는 -5')데옥시-3'-(또는 -5')티오-포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레네이트, 3'-(또는 -5')데옥시 포스포네이트, 보라노 포스포에이트, 3'-(또는 5')아미노 포스포라미데이트, 수소 포스포네이트, 보라노 포스포에이트 에스테르, 포스포라미데이트, 알킬 또는 아릴 포스포네이트 및 포스포트리에스테르인 연결을 포함하는 인 연결에 의해 연결된 하나 이상의 뉴클레오타이드 서브유닛을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 ASO는 카보네이트, 카바메이트, 실릴, 황, 설포네이트, 설포아미드, 포름아세탈, 티오포름아세탈, 옥심, 메틸렌이미노, 메틸렌메틸이미노, 메틸렌하이드라조, 메틸렌디메틸하이드라조 및 메틸렌옥시메틸이미노 연결에 의해 연결된 뉴클레오타이드 서브유닛을 포함한다.

[0071] 예를 들어, 당업계에 기재되고 본원 개시내용의 ASO에 사용될 수 있는 1개 부류의 변형된 ASO는 황 그룹(포스포로티오에이트), 메틸 그룹(메틸 포스포네이트) 또는 아민 그룹(포스포라미데이트)으로 대체된 ASO의 포스포에이트 그룹에서 비-브릿징 산소 원자 중 하나를 갖는 것들이다. 이들 ASO는 포스포디에스테르 올리고뉴클레오타이드와 비교하여, 뉴클레아제에 대해 보다 큰 내성 및 보다 긴 혈장 반감기를 갖는다. 이들은 RNase H를 활성화시킬 수 있고, 세포로의 전달을 용이하게 하는 음전하를 운반하며, 적합한 약동학을 갖고 있다. 이들 변형 중에서, 포스포로티오에이트 변형은 가장 광범위하게 사용된다. 예를 들어, 비트라벤, FDA 승인된 ASO 약물 및 임상 시험에서 다른 ASO 약물의 대부분은 포스포로티오에이트 ASO이다.

[0072] 또한, 뉴클레오타이드에서 염기들은 하이브리드화를 방해하지 않는 한 포스포디에스테르 결합 이외의 연결에 의해 연결될 수 있다. 따라서, 억제 핵산은 구성 염기가 포스포디에스테르 결합보다는 펩타이드 결합에 의해 연결된 펩타이드 핵산일 수 있다. 억제성 핵산은 공지된 방법을 사용하여 RNA를 cDNA로 전환시킴에 의해 제조될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Ausubel et. al., Current Protocols in Molecular Biology Wiley 1999). 억제성 핵산은 또한 cRNA일 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Park et. al., (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun. 325(4):1346-52).

[0079] B. 소형 간섭 RNA

[0073] siRNA (예를 들어, siNA)는 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, siRNA 및 이중 가닥 RNA는 미국 특허 제6,506,559호 및 제6,573,099호, 및 미국 특허 출원 제2003/0051263호, 제2003/0055020호, 제2004/0265839호, 제2002/0168707호, 제2003/0159161호, 및 제2004/0064842호에 기재되었고, 이 모두는 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0074] siRNA 내에, 핵산의 성분들은 동일한 유형이거나 전반적으로 균질일 필요는 없다(예를 들어, siRNA는 뉴클레오타이드 및 핵산 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다). 전형적으로, siRNA는 이중 가닥 구조를 형성하고; 이중 가닥 구조는 부분적으로 또는 완전히 상보적인 2개의 별도의 핵산으로부터 비롯될 수 있다. 본원 개시내용의 특정 구현예에서, siRNA는 단지 단일 핵산(폴리뉴클레오타이드) 또는 핵산 유사체를 포함할 수 있고, 그 자체가 상보체화함에 의해 (예를 들어, 헤어핀 루프 형성) 이중 가닥 구조를 형성할 수 있다. siRNA의

이중 가닥 구조는 모든 범위 및 그 안에 값을 포함하는, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500개 이상의 연속 뉴클레오타이드를 포함할 수 있거나, 적어도 포함할 수 있거나 최대 포함할 수 있다. siRNA는 17 내지 35개 연속 뉴클레오타이드, 18 내지 30개 연속 뉴클레오타이드, 19 내지 25개 뉴클레오타이드, 20 내지 23개 연속 뉴클레오타이드, 20 내지 22개 연속 뉴클레오타이드, 또는 21개 연속 뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 이는 상보적인 핵산 (이는 동일한 핵산 또는 별도의 상보적 핵산의 또 다른 일부일 수 있는)과 하이브리드화하여 이중 가닥 구조를 형성한다.

[0082] [0075]본원 개시내용의 방법을 수행하기 위해 유용한 본원 개시내용의 제제는 siRNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 전형적으로, 대안적으로 본원에서 소형 간섭 RNA (siRNA)로서 언급될 수 있는 이중 가닥 RNA (dsRNA)의 도입은 강력하고 특이적인 유전자 사일런싱을 유도하고 이러한 현상은 RNA 간섭 또는 RNAi로 불리운다. RNA 간섭은 “동시억제”, “전사 후 유전자 사일런싱”, “센스 억제” 및 “쿠엘링(quelling)”으로서 언급되었다. RNAi는 이것이 특이적 유전자의 활성을 녹아웃시키기 위한 수단을 제공하기 때문에 매력적인 생물공학 도구이다.

[0083] [0076]RNAi를 디자인하는데 있어서, siRNA의 성질, 사일런싱 효과의 지속성 및 전달 시스템의 선택과 같은, 고려될 필요가 있는 여러 인자들이 있다. RNAi 효과를 생성하기 위해, 유기체에 도입되는 siRNA는 전형적으로 엑손 서열을 함유한다. 추가로, RNAi 프로세스는 상동성 의존적이므로 유전자 특이성을 최대화하는 한편 상동하지만 유전자 특이적 서열 사이의 교차 간섭 가능성을 최소화하도록 서열을 신중하게 선택해야 한다. 바람직하게, siRNA는 siRNA의 서열과 억제될 유전자의 서열 간에 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 심지어 100% 동일성, 또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위 또는 값을 나타내거나 이들 초과로 나타난다. 표적 유전자와 약 80% 미만으로 동일한 서열은 실질적으로 덜 효과적이다. 따라서, siRNA와 억제될 유전자 사이의 상동성이 클수록, 관련 없는 유전자의 발현이 덜 영향을 받을 것이다.

[0084] [0077]또한 siRNA의 크기는 중요한 고려 사항이다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용은 19-25개의 뉴클레오타이드, 또는 그 안에서 유도가능한 임의의 범위 또는 값을 포함하거나, 적어도 포함하거나, 최대 포함하고, 유전자 발현을 조절할 수 있는 siRNA 분자에 관한 것이다. 본원 개시내용과 관련하여, siRNA는 일부 구현예에서, 500, 200, 100, 50, 또는 25개 미만의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 구현예에서, siRNA는 약 19개 뉴클레오타이드 내지 약 25개 뉴클레오타이드 길이이다.

[0085] [0078]표적 유전자는 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 영역을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 폴리펩타이드의 발현에 중요한 복제, 전사 또는 해독 또는 기타 과정을 조절하는 폴리뉴클레오타이드 영역, 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 영역과 이에 작동적으로 연결되어 발현을 조절하는 영역 둘다를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 세포 내에서 발현되는 임의의 유전자는 표적화될 수 있다. 바람직하게, 표적 유전자는 질환에 중요한 또는 연구 대상으로서 특정 관심 대상의 세포 활성의 진행에 관여하거나 이와 관련된 것이다.

[0086] [0079]siRNA는 상업적 공급원, 천연 공급원으로부터 취득될 수 있거나, 또는 당업자에게 널리 공지된 다수의 기술 중 임의의 것을 사용하여 합성될 수 있다. 예를 들어, 미리 디자인된 siRNA의 상업적 공급원 중 하나는 Ambion®, Austin, Tex이다. 다른 하나는 Qiagen®(Valencia, CA)이다. 본원 개시내용의 조성물 및 방법에 적용될 수 있는 억제 핵산은 관심 대상의 단백질의 검증된 하향조절자인 것으로 임의의 공급원에 의해 발견된 임의의 핵산 서열일 수 있다. 과도한 실험 없이 본원 개시내용의 개시내용을 사용하여, 추가 siRNA가 개시내용의 방법을 실시하기 위해 디자인되고 사용될 수 있음이 이해된다.

[0087] [0080]siRNA는 또한 하나 이상의 뉴클레오타이드의 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 19 내지 25개 뉴클레오타이드 RNA의 말단(들)에 또는 내부에(RNA의 하나 이상의 뉴클레오타이드에) 비-뉴클레오타이드 물질의 추가를 포함할 수 있다. 특정 양상에서, RNA 분자는 3' -하이드록실 그룹을 함유한다. 본원 개시내용의 RNA 분자 내의 뉴클레오타이드는 또한 비-천연적으로 존재하는 뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드를 포함하는 비표준 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드는 변형된 골격, 예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 또는 당업계에 공지된 기타 변형된 골격을 함유할 수 있거나 비-천연적 뉴클레오사이드 연결을 함유할 수 있다. siRNA의 추가의 변형(예를 들어, 2' -O-메틸 리보뉴클레오타이드, 2' -데옥시-2' -플루오로 리보뉴클레오타이드, “범용 염기” 뉴클레오타이드, 5-C-메틸 뉴클레오타이드, 하나 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결, 및 역위 데옥시무염기 잔기 혼입)은 미국 출원 공보 2004/0019001 및 미국 특허 제6,673,611호 (이의 각각은 이의 전문이 참조로 인용됨)에서 찾을 수 있다. 총체적으로, 모든 상기 변형된 핵산 또는 상기된 RNA는 변형된 siRNA로서 지칭된다.

[0088] [0081]엑소좀은 DICER 및 활성 RNA 프로세싱 RISC 복합체를 포함하는 것으로 알려져 있기 때문에(전문이 참조로

본원에 인용되는 PCT 공개공보 WO 2014/152622 참조), 엑소좀으로 형질감염된 shRNA는 엑소좀 자체 내에서 RISC-복합체 결합 siRNA로 성숙화될 수 있다. 대안적으로, 성숙한 siRNA는 자체적으로 엑소좀 또는 리포좀으로 형질감염될 수 있다. 임의의 억제성 핵산은 이러한 억제성 핵산이 관심 대상의 단백질의 검증된 하향조절자인 것으로 임의의 공급원에 의해 밝혀진 경우 본원 개시내용의 조성물 및 방법에 적용될 수 있다.

III. 질환 치료

[0082] 사람을 포함하는 포유동물의 다수의 중증 질환은 섬유증과 관련이 있다. 본원에 사용된 바와 같은 “섬유증”은 섬유성 조직의 형성을 포함하는 임의의 병태(이러한 형성이 바람직하거나 바람직하지 않은지의 여부)를 포함한다. 이러한 병태는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 연결 조직 염증, 섬유종 형성(섬유종증), 섬유증(폐 섬유증 및 간 섬유증 포함), 섬유탄성증(심내막 섬유), 섬유근병증 형성, 섬유종 형성, 섬유선종 형성, 섬유점액종 형성 및 섬유낭염(낭포성 섬유증 포함).

[0083] 일부 구현예에서, STAT3 발현의 억제제를 사용하여 동물에서 치료될 수 있는 섬유증은 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF), 또는 방사선-유도 폐 손상을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 치료될 수 있는 섬유증은 폐 섬유증(예를 들어, 폐 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF), 방사선 유도된 폐 손상, 또는 암에 대한 치료로 인한 방사선 유도된 폐 손상), 피부 섬유증, 콩팥 섬유증, 간 섬유증(예를 들어, 간경변), 위장 섬유증(예를 들어, 위장관 섬유증, 위장 염증과 관련된 섬유증, 염증성 장 질환과 관련된 섬유증, 궤양성 대장염과 관련된 섬유증, 크론 질환 관련 섬유증, 장 섬유증, 소장 섬유증, 장괄 섬유증, 맹장 섬유증 또는 결장 섬유증), 심장 섬유증(예를 들어, 심방 섬유증, 심근내막 섬유증 또는 심근경색증), 뇌 섬유증(예를 들어, 신경교 흉터) 또는 동맥 경화, 관절 섬유증(예를 들어, 무릎, 어깨 또는 기타 관절), 크론 질환(예를 들어, 장), 듀피트렌 구축(예를 들어, 손 또는 손가락), 켈로이드(예를 들어, 피부), 종격동 섬유증(예를 들어, 종격동의 연조직), 골수 섬유증(예를 들어, 골수), 폐이로니 질환(예를 들어, 음경), 신인성 전신 섬유증(예를 들어, 피부), 진행성 거대 섬유증(예를 들어, 석탄 노동자 진폐증의 합병증), 후복막 섬유증(예를 들어, 후복막의 연조직), 경피증/전신 경화증(예를 들어, 피부 또는 폐), 유착성 낭염(예를 들어, 어깨), 또는 기타 기관 섬유증을 포함하지만 이에 제한되지 않는 기타 형태의 섬유증을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0084] 치료될 수 있는 동물은 포유류, 설치류, 영장류, 몽키(예를 들어, 마카쿠에, 레서스 마카쿠에, 돼지 꼬리 마카쿠에), 사람, 개, 고양이, 돼지, 조류(예를 들어, 닭), 소, 마우스, 토끼 및 래트를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 “개체”, “대상체” 및 “환자”는 상호교환적으로 사용되고, 사람 및 비-사람 대상체 둘 다를 지칭할 수 있다. 일부 경우에, 동물은 치료를 필요로 한다(예를 들어, 질환 또는 섬유증의 징후를 보여줌에 의해).

[0085] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “치료하는”(및 이의 변형어구, 예를 들어, “치료”)는 이의 가장 광범위한 문맥으로 고려되어야 한다. 특히, “치료하는”이라는 용어는 동물이 완전히 회복될 때까지 치료된다는 것을 반드시 의미하지는 않는다. 따라서, “치료하는”은 증상의 개선, 병태와 관련된 증상 또는 영향의 경감, 병태의 중증도 감소, 또는 증상의 예방, 예방적으로 증상의 개선, 또는 달리 특정 병태의 발병 위험 감소를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이 동물을 “치료하는”에 대한 언급은 예방학적 치료 및 치료학적 치료를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본원에 기재된 임의의 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)은 동물을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0086] 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF) 또는 방사선 유도된 폐 손상)의 치료와 관련하여, 치료는 예방학적 치료 및 치료학적 치료를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 이와 같이, 치료는 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF) 또는 방사선 유도된 폐 손상) 예방; 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF) 또는 방사선 유도된 폐 손상)의 위험 감소; 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF) 또는 방사선 유도된 폐 손상)의 증상의 개선 또는 완화; 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF) 또는 방사선 유도된 폐 손상에 대한 신체 반응 유도; 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF), 또는 방사선 유도된 폐 손상의 발달 또는 진행 억제; 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF), 또는 방사선 유도된 폐 손상)과 관련된 증상의 발병 억제 또는 예방; 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐

(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF) 또는 방사선 유도된 폐 손상)의 중증도 감소; 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF) 또는 방사선 유도된 폐 손상) 또는 섬유증과 관련된 하나 이상의 증상(예를 들어, 섬유증의 양의 감소)의 퇴행 유발; 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF), 또는 방사선 유도된 폐 손상)의 완화 유발; 또는 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐 섬유증(IPF) 또는 방사선 유도된 폐 손상)의 재발 방지를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 치료는 섬유증의 예방적 치료(예를 들어, 미래의 섬유증을 예방 또는 개선)를 포함하지 않는다.

[0095] [0087]동물(예를 들어, 사람)의 치료는 임의의 적합한 투여 방법(예를 들어, 본원에 기재된 것들) 및 임의의 적합한 양의 *STAT3* 발현 억제제(예를 들어, siRNA 또는 ASO)를 사용하여 수행할 수 있다. 일부 구현예에서, 치료 방법은 섬유증(예를 들어, 간 섬유증, 폐(lung) 섬유증, 폐(pulmonary) 섬유증, 낭포성 섬유증, 특발성 폐(pulmonary) 섬유증(IPF), 또는 방사선 유도된 폐(lung) 손상에 대해 동물을 치료하는 것을 포함한다. 본원 개시내용의 일부 구현예는 하나 이상의 *STAT3* 발현 억제제(예를 들어, siRNA 또는 ASO)를 포함하는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)로 대상체(예를 들어, 사람 또는 영장류와 같은 동물)를 치료하기 위한 방법을 포함하고, 이는 하나 이상의 상기 조성물의 하나 이상의 투여를 포함하고; 상기 조성물은 1회 초과 투여가 있는 경우 동일하거나 상이할 수 있다.

[0096] [0088]*STAT3* 발현 억제제를 사용한 치료는 *STAT3* 활성화와 관련된(예를 들어, 이에 의해 조절되는) 하나 이상의 유전자의 감소된 발현을 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 치료는 예를 들어, *Col1a1*, *Acta2*, *Col1a2*, 및/또는 *Vim*을 포함하는, *STAT3* 활성화와 관련된 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 치료는 환자의 표적 세포(예를 들어, 간 세포)에서 *Col1a1*의 발현을 감소시킨다. 본원 개시내용의 예시적 표적 세포는 간 세포, 예를 들어, 활성화된 간 정상 세포 및 αSMA^+ 근섬유아세포를 포함한다.

[0097] [0089]일부 구현예에서, 기타 섬유증 치료는 임의로 포함되고, 본원에 기재된 본 발명의 치료와 함께 사용될 수 있다. 다른 섬유증 치료는 섬유증을 치료하기 위해 적합한 임의의 공지된 섬유증 치료를 포함할 수 있다. 공지된 섬유증 치료제의 예는 항생제(예를 들어, 페니실린, 메티실린, 옥사실린, 나프실린, 카페니실린, 티카르실린, 피페라실린, 메즐로실린, 아즐로실린, 티카르실린, 클라불란산, 피페라실린, 타조박탐, 세팔로스포린, 세팔렉신, 세프디니르, 세프로질, 세파클로르, 세페픽, 설파, 설파메톡사졸, 트리메토프림, 에리트로마이신/설피속사졸, 마크롤리드, 에리트로마이신, 클라리트로마이신, 아지트로마이신, 테트라사이클린들, 테트라사이클린, 독시사이클린, 미노사이클린, 티게사이클린, 반코마이신, 이미페넴, 메리페넴, 콜리스티메테이트/콜리스틴, 아미노글리코사이드, 토브라마이신, 아미카신, 겐타마이신, 퀴놀론, 아즈트레오남 또는 리네졸리드), 항염증제(예를 들어, NSAID, 아스피린, 이부프로펜, 나프록센, 코르티코스테로이드, 코르티솔, 코르티코스테론, 코르티손 또는 알도스테론), 기관지 확장제(예를 들어, 알부테롤 또는 레발부테롤 하이드로클로라이드), 점액 희석제(예를 들어, 고장성 식염수 또는 도마세 알파(Domase alfa)) 및 항섬유증 약물(예를 들어, 피르페니돈, 닌테다닙, N-아세틸시스테인, 이바카프터, 또는 루마카프터/이바카프터)의 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다른 섬유증 치료는 또한 기도 제거 기술로 제한되지 않지만 이와 같은 비-약물 호흡 치료요법(예를 들어, 자세 배액 및 흉부 타악기, 운동, 호흡 운동 또는 고주파 흉부 압박 조끼 또는 호기 양압 요법과 같은 기계 장비 사용)을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 다른 섬유증 치료는 또한 기관 이식(예를 들어, 폐, 피부, 콩팥, 간, 심장, 소장 또는 결장)을 포함할 수 있다. 하나 이상의 다른 섬유증 치료가 본원 개시내용의 구현예에서 배제될 수 있는 것으로 고려된다.

[0098] [0090]일부 구현예에서, 오피오이드 수용체 억제제, 날트렉손, 피르페니돈, 닌테다닙, 또는 이들의 조합의 투여는 치료 용법의 일부로서(즉, 또 다른 섬유증 치료로서) 사용될 수 있거나; 오피오이드 수용체 억제제, 날트렉손, 피르페니돈, 닌테다닙 또는 이들의 조합의 투여는 별도의 투여를 포함할 수 있거나(즉, *STAT3* 발현 억제제와 별개의 조성물로) *STAT3* 발현 억제제를 포함하는 조성물에 첨가될 수 있다.

[0099] [0091]일부 구현예에서, 추가의 임의의 치료(예를 들어, 또 다른 섬유증 치료로서)는 또한 외과적 개입, 호르몬 치료요법, 면역치료요법 및 보조 전신 치료요법 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 하나 이상의 추가의 임의의 치료가 본원 개시내용의 구현예에서 배제될 수 있는 것으로 고려된다.

[0100] [0092]질환의 치료를 위해, 치료학적 조성물의 적절한 용량은 상기 정의된 바와 같이 치료될 질환의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 환자의 임상 병력 및 제제에 대한 반응, 및 담당 의사의 재량에 따라 달라질 것이다. 제제

는 적합하게 한번에 또는 일련의 치료과정 동안 환자에게 투여된다.

[0101] [0093] 치료학적 및 예방학적 방법 및 조성물은 목적하는 효과를 성취하기에 효과적인 조합된 양으로 제공될 수 있다. 조직, 종양 또는 세포는 하나 이상의 제제를 포함하는 하나 이상의 조성물 또는 약리학적 제형(들)과 접촉될 수 있거나 조직, 종양 및/또는 세포를 2개 이상의 별개의 조성물 또는 제형과 접촉시킴으로써 접촉될 수 있다. 또한, 상기 조합 치료요법은 화학치료요법, 방사선치료요법, 수술 치료요법 또는 면역치료요법과 연계하여 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0102] [0094] 조합 투여는 동일한 투여 형태로 2개 이상의 제제의 동시 투여, 별도의 투여 형태로 동시 투여, 및 별도의 투여를 포함할 수 있다. 즉, 본 발명의 치료학적 조성물 및 또 다른 치료제는 동일한 투여 형태로 함께 제형화되어 동시에 투여될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 치료학적 조성물 및 또 다른 치료제는 동시에 투여될 수 있고, 여기서 2개 제제는 별개의 제형으로 존재한다. 또 다른 대안으로, 치료학적 제제는 투여되는 즉시 다른 치료학적 제제가 투여되거나 그 반대일 수 있다. 별도의 투여 프로토콜에서, 본 발명의 치료학적 조성물 및 또 다른 치료학적 제제는 몇 분 간격으로, 또는 몇 시간 간격으로, 또는 며칠 간격으로 투여될 수 있다.

[0103] IV. 약제학적 조성물

[0104] [0095] 치료학적 제제를 발현하거나 포함하는 엑소솜은 전신으로 또는 국부적으로 투여되어 텔로머라제 활성을 증진시키는 것으로 고려된다. 이들은 정맥내, 척추강내 및/또는 복막내 투여될 수 있다. 이들은 단독으로 또는 제2 약물과 조합하여 투여될 수 있다.

[0105] [0096] 본 발명은 치료학적 제제의 특정 성질에 의해 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 예를 들어, 상기 조성물은 생리학적으로 허용되는 액체, 겔, 고체 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 제형 중에 제공될 수 있다. 이들 치료학적 제제는 다른 치료학적 제제와 유사한 방식으로 가축과 같은 수의학적 용도 및 사람에서의 임상 용도를 위해 포유동물에 투여될 수 있다. 일반적으로, 치료학적 효능에 필요한 용량은 사용 유형 및 투여 방식뿐만 아니라 개별 대상체의 특정 요구사항에 따라 달라질 것이다.

[0106] [0097] 임상 적용이 고려되는 경우, 의도된 적용에 적합한 형태로 엑소솜을 포함하는 약제학적 조성물을 제조하는 것이 필요할 수 있다. 일반적으로, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체에 용해되거나 분산된 유효량의 하나 이상의 엑소솜 및/또는 추가 제제를 포함할 수 있다. 용어 "약제학적 또는 약제학적으로 허용되는"은 동물, 예를 들어, 적절하게 사람에게 투여되는 경우 역반응, 알레르기 반응 또는 다른 원치않는 반응을 생성하지 않는 분자 실체 및 조성물을 언급한다. 본원에 기재된 바와 같은 엑소솜을 포함하는 약제학적 조성물의 제조는 본원 개시내용에 비추어 당업자에게 공지되어 있고, 이는 본원에 참조로 인용된 문헌(참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990)에 의해 예시된 바와 같다. 더욱이, 동물(예를 들어, 사람) 투여에 대해, 제조는 생물학적 표준의 FDA 사무국에 의해 요구되는 바와 같이 멸균성, 발열성, 일반적인 안정성 및 순도 표준을 충족해야만 하는 것으로 이해될 것이다.

[0107] [0098] 추가로 본원 개시내용의 특정 양상에 따르면, 투여에 적합한 조성물은 불활성 희석제의 존재 또는 부재하에 약제학적으로 허용되는 담체로 제공될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, "약제학적으로 허용되는 담체"는 당업자에게 공지된 바와 같이, 임의의 및 모든 수성 용매(예를 들어, 물, 알콜/수용액, 에탄올, 식염수 용액, 비경구 비히클, 예를 들어, 염화나트륨, 링거 텍스트로스 등), 비-수성 용매(예를 들어, 지방, 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물성 오일, 및 주사가 가능한 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸올레이트), 지질, 리포솜, 분산 매질, 코팅(예를 들어, 텍시틴), 계면활성제, 향산화제, 보존제(예를 들어, 항생균 또는 항진균 제제, 항-산화제, 킬레이팅 제제 및 불활성 가스, 파라벤(예를 들어, 메틸파라벤, 프로필파라벤), 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 또는 이의 조합), 등장성 제제(예를 들어, 당 및 염화나트륨), 흡수 지연제(예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 겔라틴), 염, 약물, 약물 안정화제, 겔, 수지, 충전제, 결합제, 부형제, 봉해제, 운환제, 감미제, 향제, 염료, 유체 및 영양물 보충제, 상기 유사 물질 및 이의 조합물을 포함한다. 담체는 동화될 수 있어야 하고, 액체, 반고체, 즉 페이스트 또는 고체 담체를 포함한다. 추가로, 경우에 따라, 상기 조성물은 습윤화제 또는 유화제, 안정화 제제 또는 pH 완충제와 같은 소량의 보조 물질을 함유할 수 있다. 약제학적 조성물 중 다양한 성분들의 pH 및 정확한 농도는 널리 공지된 파라미터에 따라 조정된다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅제의 사용에 의하여, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의하여, 그리고 계면활성제의 사용에 의하여 유지될 수 있다.

[0108] [0099] 약제학적으로 허용되는 담체는 특히 사람에 대한 투여를 위해 제형화되지만, 특정 구현예에서는 비-사람 동물에 대한 투여를 위해 제형화되지만 사람에 대한 투여에 허용되지 않는(예를 들어, 정부 규제에 의해) 약제

학적으로 허용되는 담체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 임의의 통상적인 담체가 활성 성분과 상용할 수 없는 경우를 제외하고(예를 들어, 수용자에게 또는 그 안에 함유된 조성물의 치료 효과에 유해한), 치료학적 또는 약제학적 조성물에서 이의 사용이 고려된다. 본원 개시내용의 특정 측면에 따르면, 조성물은 임의의 편리하고 실제적인 방식으로, 즉 용액, 현탁액, 유화, 혼합물, 캡슐화, 흡수 등에 의해 담체와 조합된다. 이러한 절차는 당업자에게 일상적인 것이다.

- [0109] [00100]본원 개시내용의 특정 구현에는 고체, 액체 또는 에어로졸 형태로 투여되어야 하는지의 여부, 및 주사와 같은 투여 경로에 대해 멸균되어야 하는지의 여부에 따라 상이한 유형의 담체를 포함할 수 있다. 조성물은 정맥내, 피내, 경피, 척추강내, 동맥내, 복막내, 비강내, 질내, 직장내, 근육내, 피하, 점막, 경구, 국소, 국부, 흡입(예를 들어, 에어로졸 흡입), 주사, 주입, 연속 주입에 의해, 직접적으로 국부 관류 욕조 표적 세포에 의해, 카테터를 통해, 세척을 통해, 지질 조성물(예를 들어, 리포솜)에서, 또는 다른 방법 또는 당업자에게 공지된 바와 같은 전술한 것의 임의의 조합에 의해 투여될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, 본원에 참조로 인용됨).
- [0110] [00101]엑소솜은 비경구 투여용으로 제형화될 수 있고, 예를 들어 정맥내, 근육내, 피하 또는 심지어 복강내 경로를 통한 주사용으로 제형화될 수 있다. 전형적으로, 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로 제조될 수 있고; 주사 전에 액체를 첨가하면 용액 또는 현탁액을 제조하는 데 사용하기에 적합한 고체 형태도 제조될 수 있고; 제제는 또한 유화될 수 있다.
- [0111] [00102]주사용으로 적합한 약제학적 형태는 멸균 수용액 또는 분산액; 참깨유, 땅콩유 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함하는 제형; 및 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에, 상기 형태는 멸균되어야만 하고, 용이하게 주사될 수 있는 정도로 유동성이어야만 한다. 또한 제조 및 저장 조건 하에서 안정하여야 하고, 미생물, 예를 들어, 세균 및 진균류의 오염 작용에 대해서 보존되어야 한다.
- [0112] [00103]제형화 시, 용액은 투여 제형과 상용성인 방식으로 및 치료학적으로 효과적인 양으로 투여될 것이다. 제형은 주사용 용액과 같은 비경구 투여용 제형 또는 폐로의 전달을 위한 에어로졸 또는 약물 방출 캡슐 등과 같은 소화 투여용 제형과 같은 다양한 투여 형태로 용이하게 투여된다.
- [0113] [00104]"유닛 용량" 또는 "용량"이라는 용어는 대상체에서 사용하기에 적합한 물리적으로 분리된 단위를 언급하고, 각 유닛은 투여, 즉 적절한 경로 및 치료 용법과 관련하여 위에서 논의된 목적하는 반응을 생성하도록 계산된 치료학적 조성물의 미리 결정된 양을 함유한다. 치료 수 및 유닛 용량 둘다에 따라 투여될 양은 목적하는 효과에 따라 달라진다. 환자 또는 대상체에 투여되는 본원 개시내용의 조성물의 실제 투여량은 대상체의 체중, 연령, 건강 및 성별, 치료되는 질환의 유형, 질환 침투 정도, 이전 또는 동시 치료 중재, 환자의 특발성, 투여 경로, 특정 치료 물질의 효능, 안정성 및 독성과 같은 물리적 및 생리학적 인자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 용량은 또한 투여 당 약 1 $\mu\text{g/kg}$ /체중 내지 약 1000 mg/kg/체중 (이러한 상기 범위는 사이의 용량을 포함한다) 이상 및 그 안에서 유도가능한 임의의 범위를 포함할 수 있다. 본원에 열거된 수로부터 유도가능한 범위의 비제한적인 예에서, 약 5 $\mu\text{g/kg}$ /체중 내지 약 100 mg/kg/체중, 약 5 $\mu\text{g/kg}$ /체중 내지 약 500 mg/kg/체중 등의 범위가 투여될 수 있다. 또 다른 예로서, 용량은 또한 투여 당 약 10억 내지 약 5000억 엑소솜(이러한 상기 범위는 사이의 용량을 포함한다) 이상 및 그 안에서 유도가능한 임의의 범위를 포함할 수 있다. 본원에 열거된 수로부터 유도가능한 범위의 비제한적인 예에서, 약 100만 엑소솜 내지 약 5000억 엑소솜, 약 500만 엑소솜 내지 약 2500억 엑소솜의 범위가 투여될 수 있다. 하나의 예에서, 용량은 5 mL 용적의 약 1500억개의 엑소솜을 포함할 수 있고, 이러한 용량은 체중이 70 kg인 사람 환자에게 투여될 수 있다. 투여를 담당하는 개업의는 임의의 경우에 개별 대상체에 대한 적절한 용량(들) 및 조성물 중 활성 성분(들)의 농도를 결정할 것이다.
- [0114] [00105]동물 환자에게 투여되는 조성물의 실제 투여량은 신체 및 생리학적 인자들, 예를 들어, 체중, 병태의 중증도, 치료될 질환의 유형, 이전 또는 동시 치료 개입, 환자의 특발증 및 투여 경로에 의해 결정될 수 있다. 용량 및 투여 경로에 의존하여, 바람직한 용량 및/또는 유효량의 투여 횟수는 대상체의 반응에 따라 다양할 수 있다. 투여를 담당하는 개업의는 임의의 경우에 개별 대상체에 대한 적절한 용량(들) 및 조성물 중 활성 성분(들)의 농도를 결정할 것이다.
- [0115] [00106]특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 예를 들어, 적어도 또는 최대 약 0.1%의 활성 화합물을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 활성 화합물은, 예를 들어, 유닛 중량의 약 2% 내지 약 75%, 또는 약 25% 내지 약 60% 및 이들로부터 유도가능한 임의의 범위를 차지할 수 있다. 천연적으로, 각각의 치료학적으로 유용한 조성물 중에 활성 화합물(들)의 양은 적절한 용량이 화합물의 임의의 소정의 유닛 용량으로 수득되는 방식으로 제조될 수 있다. 용해도, 생물유용성, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 저장 수명 및 기타 약리학적 고려사항과 같은 인

자는 이러한 억제학적 제형을 제조하는 기술분야의 당업자에 의해 고려될 것이며, 그 자체로 다양한 용량 및 치료 용법이 바람직할 수 있다.

[0116] [00107] 다른 비제한적인 예에서, 용량은 또한 투여 당 약 1 마이크로그램/kg/체중, 약 5 마이크로그램/kg/체중, 약 10 마이크로그램/kg/체중, 약 50 마이크로그램/kg/체중, 약 100 마이크로그램/kg/체중, 약 200 마이크로그램/kg/체중, 약 350 마이크로그램/kg/체중, 약 500 마이크로그램/kg/체중, 약 1 밀리그램/kg/체중, 약 5 밀리그램/kg/체중, 약 10 밀리그램/kg/체중, 약 50 밀리그램/kg/체중, 약 100 밀리그램/kg/체중, 약 200 밀리그램/kg/체중, 약 350 밀리그램/kg/체중, 약 500 밀리그램/kg/체중 내지 약 1000 밀리그램/kg/체중 이상 및 그 안에서 유도가능한 임의의 범위를 포함할 수 있다. 본원에 열거된 수로부터 유도가능한 범위의 비제한적인 예에서, 상기에서 기재된 수에 기초하여, 약 5 밀리그램/kg/체중 내지 약 100 밀리그램/kg/체중, 약 5 마이크로그램/kg/체중 내지 약 500 밀리그램/kg/체중 등의 범위가 투여될 수 있다.

[0117] V. 키트 및 진단제

[0118] [00108] 본원 개시내용의 다양한 양상에서, 체액 또는 조직 배양 배지로부터 엑소좀을 정제하기 위해 필요한 성분을 함유하는 키트가 고려된다. 다른 양상에서, 엑소좀을 단리하고 이들을 치료학적 핵산, 치료학적 단백질 또는 억제성 RNA로 형질감염시키는 데 필요한 성분을 함유하는 키트가 고려된다. 키트는 상기 임의의 성분들을 함유하는 하나 이상의 밀봉된 바이알을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 또한 키트의 성분과 반응하지 않는 컨테이너, 예를 들어, 에펜도르프 튜브, 검정 플레이트, 주사기, 병 또는 튜브인 적합한 컨테이너 수단을 포함할 수 있다. 컨테이너는 플라스틱 또는 유리와 같은 안정화 가능한 물질로부터 제조될 수 있다. 키트는 본원에 제시된 방법의 절차적 단계를 명시하는 지침서 시트를 추가로 포함할 수 있고, 실질적으로 본원에 기재된 바와 동일한 과정에 따르거나 당업자에게 공지되어 있다. 지침서 정보는 컴퓨터를 사용하여 수행되는 경우, 샘플로부터 엑소좀을 정제하고, 엑소좀에 치료학적 카고를 형질감염시키는 실제 또는 가상의 절차를 디스플레이시키는 기계 판독가능한 지침서를 함유하는 컴퓨터 판독가능한 매체에 있을 수 있다.

[0119] VI. 실시예

[0120] [00109] 하기의 실시예는 본 발명의 특정 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 당업자라면, 하기의 실시예에 기재된 기법들이 본 발명을 잘 수행하기 위해 본 발명자들에 의해 발견된 기법들을 대표하는 것이기 때문에, 발명의 수행에 대한 바람직한 양태를 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 알 수 있을 것이다. 그러나, 당업자라면, 본 명세서의 내용을 고려하여, 개시된 구체적인 구현예에 있어서 본 발명의 개념과 범위를 벗어나지 않으면서 여러 가지 변화를 주어도 그와 비슷하거나 유사한 결과를 얻을 수 있다는 사실을 알 수 있을 것이다.

[0121] 실시예 1 - CC14에 의해 유도된 간 섬유증의 마우스 모델의 간으로 엑소좀의 국소화

[0122] [00110] 간 섬유증은 6주 동안 CC14의 2주 마다 i.p. 주사를 사용하여 Balb/c 성체 마우스에서 유도하였다. 간 섬유증의 존재 또는 부재 둘다의 마우스에는 10^9 염료-표지된 엑소좀 또는 염료만을 정맥내 투여하였다. 투여 3시간 후 마우스를 안락사시켰다. DiR-표지된 엑소좀이 투여된 마우스는 IVIS 이미지화를 사용하여 검정하였다(도 1). PHK67-표지된 엑소좀이 투여된 마우스는 공초점 현미경을 사용하여 검정하였다. 엑소좀은 건강한 마우스 및 섬유증 마우스 둘다에서 간으로 국소화되지만; 국소화 수준은 건강한 마우스에 비해 섬유증 마우스에서 증가하였다.

[0123] 실시예 2 - STAT3 억제성 RNA가 부하된 엑소좀의 투여 후 간 섬유증에서 감소

[0124] [00111] 간 섬유증은 6주 동안 CC14의 2주 마다 i.p. 주사를 사용하여 C57B16 성체 마우스에서 유도하였다. 이어서, MSC-유래된 엑소좀(1.5 μ g siRNA 또는 ASO/주사를 포함하는 10억 5천개 엑소좀/용량)은 48시간 마다 투여하였다. 엑소좀은 스크램블된 siRNA, STAT3 siRNA, 변형되지 않은 STAT3 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 변형된 스크램블된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 변형된 STAT3 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함유하였다. 치료 후, 마우스를 안락사시키고, 이들의 간을 절개하고 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 위해 가공하고, 염색된 절개부를 이미지화하였다(도 2a). 섬유증 수준을 정량하였다(도 2b). 상기 결과는 STAT3 siRNA, 비변형된 STAT3 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 변형된 STAT3 안티센스 올리고뉴클레오타이드 둘다가 섬유증 수준을 감소시킴을 보여준다.

[0125] 실시예 3 - STAT3 억제성 RNA가 부하된 엑소좀의 투여 후 폐 섬유증에서 감소

[0126] [00112] 폐 섬유증은 블레오마이신을 사용하여 마우스에 유도하였다. 이어서, MSC-유래된 엑소좀(5 μ g siRNA 또

는 ASO/주사를 포함하는 20억개 엑소좀/용량)은 48시간 마다 투여하였다. 엑소좀은 STAT3 siRNA, 변형되지 않은 STAT3 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 변형된 스크램블된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 변형된 STAT3 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 함유하였다. 치료 후, 마우스를 안락사시키고, 이들의 폐를 절개하고 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 염색을 위해 가공하고, 염색된 절개부를 이미지화하였다(도 3a). 섬유증 수준은 정량하였다(도 3b). 상기 결과는 STAT3 siRNA가 섬유증 수준에서 최대 감소를 제공함을 보여준다.

[0127] 실시예 4 - 간 섬유증에서 STAT3의 엑소좀-매개된 치료학적 표적화

[0128] 결과

[00113]STAT3을 표적화하는 siRNA 또는 ASO가 부하된 i엑소좀 (핵산 페이로드를 전달하도록 가공된 엑소좀)의 효율을 결정하기 위해, 야생형 (WT) 마우스로부터 단리된 1차 간 정상 세포 (HSC)는 7일동안 배양하고, 이는 HSC의 자발적 활성화를 유도하였다(도 4a) (문헌참조: Zhai et al., 2019; Lu et al., 2014; Mederacke et al., 2013). HSC의 활성화는 알파-평활근 액틴 (α -SMA)의 발현을 특징으로 한다(도 4b). iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3}은 HSC에서 *Stat3* mRNA 수준을 유의적으로 감소시켰고(도 4c 및 4d) 효율은 지질 기반 형질감염 시약과 비교하여 유사하였다(도 5a 및 5b).

[00114]마우스에서 외인성으로 투여된 엑소좀의 친화성은 이전에 보고되었고(문헌참조: Mendt et al., 2018; Kamerkar et al., 2017), 이는 췌장 및 간과 같은 여러 GI 기관을 포함하였다. 본 발명자들은 사람 중간엽 기질 세포(MSC) 유래된 엑소좀의 건강한 마우스의 간에 대한 간 친화성을 확인하였다(도 4c). 섬유증 조직에서 엑소좀의 생분포를 추가로 조사하기 위해, DiR 표지된 엑소좀을 사염화탄소(CCl₄)에 의해 유도된 섬유증 간 및 WT 마우스에 복막내(i.p.) 투여하였다. 상기 결과는 정상 간 및 췌장에서 엑소좀과 연관된 특이적 축적 신호, 및 보다 낮은 양의 신호가 콩팥, 장 및 비장에서 검출됨을 보여주었다(도 4c). 그러나, 섬유증 간은 건강한 간과 비교하여 DiR 표지된 엑소좀의 더 높은 농축을 나타냈다. 추가로 본원 발명자들은 태그된 i엑소좀/siSTAT3/mASO STAT3의 i.p. 주사 후 (24시간 후) Alexa-Fluor 647 (AF647)-태그된 siSTAT3 또는 변형된 ASO (mASO) STAT3을 엑소좀 (iExo^{siRNA647-STAT3} 또는 iExo^{mASO647-STAT3})에 전기천공하였고, 상기 결과는 나출된 siRNA 또는 ASO 보다 높은 비율로 간에서 형광성 표지된 siRNA 및 ASO의 축적을 밝혔다(도 4d-f).

[00115]생체 내 간 섬유증 치료에서 i엑소좀의 기능을 입증하기 위해, WT 마우스에 매주 2회 CCl₄를 i.p. 주사하여 만성 간 섬유증을 유도하였다(도 5d). 마우스는 또한 섬유증 유도 후 9일째에 나출된 siRNA 또는 ASO, 또는 iExo^{siRNA} 또는 iExo^{mASO}로 처리하였다(도 5d). STAT3을 표적화하는 siRNA 또는 ASO를 갖는 i엑소좀은 2개의 용량으로 투여하였고, 10억개의 엑소좀에는 1 μ g siRNA 또는 ASO (1 μ g / 10억개 iExo)를 전기천공하였고, 20억개 엑소좀에는 5 μ g siRNA 또는 ASO (5 μ g / 20억개 iExo)를 전기천공하였다. siRNA는 사람 및 마우스 STAT3 둘다를 표적화하고, ASO는 사람 STAT3을 표적화하도록 디자인되고, 마우스 서열에 대해 3개의 뉴클레오타이드 미스매치가 제공된다. ASO 디자인은 비변형된(umASO) 및 변형된 ASO (mASO, 방법 참조)를 포함하였다. 대조군은 처리되지 않은 마우스와 비표적 대조군 siRNA(siCtrl) 또는 ASO(변형된 스크램블[mASO Scrb1] 또는 umASO STAT3)를 함유하는 엑소좀으로 처리된 마우스를 포함하였다. siRNA 또는 mASO를 사용한 STAT3을 표적화하는 i엑소좀은 1 μ g/10억개 iExo^{siRNA-STAT3} 및 5 μ g/20억개 iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3} 둘다를 사용한 치료시 섬유증 간에서 *Stat3* 발현을 유의적으로 감소시켰다(도 6a 및 6b). 보다 우수한 효능은 siRNA (siRNA-STAT3) 또는 ASO (mASO-STAT3) 단독과 비교하여 5 μ g/20억개 iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3}에서 관찰되었다(도 6a 및 6b). umASO는 생체내에서 *Stat3*을 유의적으로 억제하지 않았고, 이는 상기 설정에서 안정성이 감소한 결과로서 가능한 반면, mASO의 증진된 안정성은 *Stat3*의 강력한 표적화와 상관관계가 있다(도 6a 및 6b). i엑소좀을 표적화하는 siRNA 및 mASO 둘다는 섬유증 간에서 *Stat3* 발현을 억제하는데 유사한 효능을 보여주었다(도 6a 및 6b).

[00116]간독소 CCl₄에 대한 반복적인 노출은 현저한 염증과 간 손상을 유발하여 진행성 섬유증과 활성화된 HSC 또는 근섬유아세포의 축적을 유발한다.(문헌참조: Mederacke et al., 2013). 간 절개부의 시리우스 레드 염색 및 콜라겐 I 염색을 적용하여 세포외 매트릭스 (ECM) 침착을 평가하였다. 결과는 5 μ g/20억개 iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3}으로 처리한 마우스에서 ECM의 유의적인 감소를 보여준 반면, 1 μ g/10억개 iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3}으로 처리된 마우스에서는 섬유증의 약간의 감소가 관찰되었다(도 6c-6h, 도 5d 및 e). I형 콜라겐 침착은 또한 5 μ g/20억개 iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3}을 사용한 처리에 의해 유의적으로 억제되었다(도 6e-

h). 특히, 섬유증 간에서 활성화된 HSC(aHSC)의 잘 확립된 마커인 α -SMA의 발현 패턴(도 4b)은 siRNA-STAT3 또는 mASO-STAT3 단독으로 처리된 마우스와 비교하여 $5\mu\text{g}/20\text{억개}$ iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3}으로 처리된 마우스에서 유의하게 억제되었고(도 6j), $1\mu\text{g}/10\text{억개}$ iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3}으로 처리된 마우스에서 유의한 감소가 관찰되지 않았다(도 5h).

[0133] [00117]전사 수준에서 STAT3의 하향 조절 외에도 $5\mu\text{g}/20\text{억개}$ iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3} 처리는 siRNA-STAT3 또는 mASO-STAT3에 의한 처리와 비교하여, I형 콜라겐(*Col1a1*) 및 평활근 액틴(*Acta2*)의 알파 1 체의 상당한 전사 억제를 초래하였다(도 7a-7d). 간 기능은 알려진 아미노트랜스퍼라제(ALT) 및 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 수준에 의한 측정시, $5\mu\text{g}/20\text{억개}$ iExo^{siRNA-STAT3} 및 iExo^{mASO-STAT3}으로 처리된 마우스에서 유의적으로 개선되었고, siRNA-STAT3 또는 mASO-STAT3도 또한 어느 정도 개선되었다(도 7e-7h). ALT 및 AST 수준 둘다 $5\mu\text{g}/20\text{억개}$ iExo^{siRNA-STAT3} 및 iExo^{mASO-STAT3} 처리로 건강한 대조군 마우스의 수준에 가까운 수준으로 감소되었다(도 7e-7h). CCl₄-유도된 간 섬유증의 조직병리학적 평가는 간세포 변성, 병소 브릿징 괴사 및 소엽 구조의 유의적인 구조적 붕괴 (도 7i-7k, 비처리된 그룹)를 보여주었다. siRNA-STAT3 또는 mASO-STAT3 처리를 포함하는 대조군 처리와 비교하여 마우스에 $5\mu\text{g}/20\text{억개}$ iExo^{siRNA-STAT3} 및 iExo^{mASO-STAT3}을 투여한 경우 간세포 괴사 및 변성의 퍼센트가 유의적으로 감소된 것으로 주지되었다(도 7i - 7k). $1\mu\text{g}/10\text{억개}$ iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3}을 투여한 경우 마우스에서 간 조직병리학의 미미한 개선이 관찰되었다(도 5i-5k). iExo^{siRNA-STAT3} 또는 iExo^{mASO-STAT3} 처리는 다른 기관에 대해 관찰 가능한 세포독성을 유도하지 않았다(도 8a 및 8b).

[0134] [00118]표적 세포 유전자 발현에 대한 i엑소좀 처리의 영향을 결정하기 위해, 본원 발명자들은 $5\mu\text{g}/20\text{억개}$ iExo^{siRNA-STAT3} 및 iExo^{mASO-STAT3} 처리된 마우스로부터 전체 간의 RNA 서열분석을 수행하였다. 각 실험 그룹에서 차등적으로 발현된 유전자(DEG)를 히트맵(도 9a)에 플롯팅하고, 소정의 유전자의 발현의 유의적인 변화를 2배 증감 초과와 비율 및 조정된 p-값 < 0.05로 정의되었다. 히트 맵 및 화산 플롯은 iExo^{siRNA-STAT3} 및 iExo^{mASO-STAT3} 처리가 이들 각각의 대조군과 비교하는 경우 유전자 발현 변화를 초래함을 나타내었다(도 9a-9c). iExo^{siRNA-STAT3} 그룹의 간 전사체 분석은 1,918개의 유전자 발현 증가, 2,460개 유전자 발현 감소를 보여준 반면, iExo^{mASO-STAT3} 그룹의 간 전사체 분석은 2,140개 유전자의 발현 증가 및 2,021개 유전자의 발현 감소를 보여주었다(도 9b 및 9c). STAT3 신호 전달에 관여하는 유전자 클러스터는 간 섬유증의 발달에 중요한 역할을 하는 SPP1 및 Thbs1(문헌참조: Arriazu et al., 2017; Breitkopf et al., 2005)을 포함한 iExosomes 처리 후 억제되었다(도 9d). 간 섬유증에서 STAT3 신호전달과 관련된 일반적으로 차등적으로 탈조절된 유전자는 ECM 침착 및 리모델링과 연관되었다(도 9e). i엑소좀 치료는 *Col1a1*, *Acta2*, *Col1a2* 및 *Vim*을 포함한 정규(canonical) 섬유증 관련 유전자의 발현을 억제하여(도 9e), STAT3이 간 섬유증의 주요 매개인자임을 시사한다. 과잉 표현 분석은 DEG가 주로 ECM-수용체 상호작용 경로에서 집적되어 있음을 입증하였고(도 9f 및 9g) 또한 하향조절된 유전자가 시토크롬 P450, 단백질 소화 및 흡수, 1차 담즙산 생합성, 리놀레산 대사 및 화학적 발암성에 의한 생체이물 대사에 관여하는 경로에 대해 집적되어 있음을 나타냈다(도 9f 및 9g). 변경된 다운스트림 경로의 유사한 세트가 iExo^{siRNA-STAT3} 및 iExo^{mASO-STAT3} 치료 둘다에 대해 관찰되었고(도 9f 및 9g), 간 섬유증에서 STAT3 조절 경로에 대한 추가 조사를 위해 유용한 도구로서 상기 데이터세트를 지원한다. 간 섬유증에서 STAT3 신호 전달과 표적화된 ECM 유전자 사이의 연관성을 추가로 조사하기 위해, DEG를 기반으로 STAT3 mRNA 및 간 섬유증과 관련된 ECM 조절 네트워크를 구축하였다. 도 9h에 나타난 바와 같이, 생성된 네트워크는 24 ECM 연합된 유전자에서 연결을 나타냈다. 상기 네트워크 분석은 STAT3을 향후 임상적 치료를 위한 ECM 침착을 위한 중요한 재결화 노드로 동정하였다.

[0135] [00119]종합하면, 이들 연구는 간 섬유증 촉진에 있어 간세포 및 정상 세포에서 STAT3의 중요한 역할에 대한 이전 보고서를 뒷받침한다(문헌참조: Wang, Lafdil, Kong et al., 2011). 간 섬유증에서 STAT3 탈조절은 간세포에서 보호 기능을 갖고 aHSC/근섬유아세포에서 섬유증 촉진 기능과 함께 복잡하다(문헌참조: Chakraborty et al., 2017; Wang, Lafdil, Kong et al., 2011; Wang, Lafdil, Wang et al., 2011). 표적 STAT3에 대한 i엑소좀 접근법의 항섬유증 결과는 aHSC/근섬유아세포에 의한 우선적인 흡수를 반영할 수 있다(도 5c). 이것은 또한 STAT3 발현을 억제하는 엑소좀 miR-181-5p를 통해 간 섬유증을 예방하는 것으로 나타난 지방 유래 중간엽 줄기세포로부터의 엑소좀을 사용한 이전 보고서에 따른 것이다(문헌참조: Qu et al., 2017). 다양한 억제제가 마우스에서 효능을 보여주긴 했지만, STAT3을 표적화하는 이들의 특이성은 여전히 검증되어야 한다(문헌참조: Beebe

et al., 2018). 개시된 접근법은 유전자 표적화 특이성을 제공하고 추가 siRNA 표적과 조합하여 사용될 수 있다. 또한 간암에 대한 치료학적 접근법에 있어서 엑소좀의 역할도 대두되고 있다(문헌참조: Lou et al., 2020). 간암에서 형질전환된 간세포는 STAT3 발현에 의존하고(문헌참조: Wang, Lafdil, Wang et al., 2011; Jung et al., 2017), STAT3을 표적화하는 i엑소좀은 또한 간 암 진행을 제한하는데 이득을 제공할 수 있다. 췌장암에 대한 이전 연구는 발암성 *Kras*의 siRNA 표적화와 함께 임상 등급 엑소좀의 개발을 제시하였다(문헌참조: Mendt et al., 2018; Kamekar et al., 2017). 이는 간 섬유증에서 엑소좀을 사용하여 STAT3을 억제하기 위한 임상 적용 가능성을 뒷받침한다.

[0136] 방법

[0137] HSC 단리 및 α -SMA 염색

[0138] [00120]마우스 1차 HSC는 이전에 기재된 방법에 따라 8주령 암컷 Balb/c 마우스로부터 단리하였다(문헌참조: Vinas et al., 2003). 이들은 20% FBS(Gemini)를 함유하는 고글루코스 돌베코(Dulbecco)의 변형된 이글 배지(DMEM, Gibco)에서 배양하였다. 배양-활성화된 1차 HSC (7일째)에는 Cy3- α -SMA 항체(Sigma, C6198, 1:200)로 밤새 면역염색하였다. 200X 배율의 대표적인 이미지는 Axiovert 200 및 AxioCam HRC 카메라(Zeiss)로 취득되었다.

[0139] 실시간 PCR 분석

[0140] [00121]총 RNA는 TRIzol™(Invitrogen, 15596018)을 사용하여 간 조직으로부터 단리되었고 cDNA는 제조업체의 지침에 따라 고용량 cDNA 역전사 효소(High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase) 키트(Life Technology)를 통해 생성되었다. 정량적 RT-PCR은 SYBR 녹색 PCR 마스터 믹스를 사용하여 수행하였다. 표적 유전자의 mRNA의 총량은 *GAPDH* 발현으로 정규화하였다. 하기의 프라이머 서열을 사용하였다: *GAPDH* 정배향 5' - CTGGAGAAACCTGCCAAGTA-3', 역배향 5' - AAGAGTGGGAGTGTGTTG-3', *STAT3* 정배향 5' - AGAACCTCCAGGACGACTTTG-3', 역배향 5' -TCACAATGCTTCTCCGCATCT-3'; *Col1a1* 정배향 5' - CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT-3', 역배향 5' -GCAGCTGACTTCAGGGATGT-3'; *Acta2* 정배향 5' - GTCCCAGACATCAGGGAGTAA-3', 역배향 5' - TCGGATACTTCAGCGTCAGGA-3'. 분산에 대한 통계학적 분석은 Δ Ct에 대해 수행되었다. 배수 변화는 대조군에 제시되고 정규화되어 대조군 비교군을 1로 설정한다.

[0141] 엑소좀의 정제 및 전기천공

[0142] [00122]골수 유래된 MSC는 기관(University of Texas MD Anderson Cancer Center)에서 세포 치료요법 연구소(Cell Therapy Laboratory)로부터 획득하였고, 20% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신(Corning), 1% L-글루타민(Corning) 및 1% 비필수 아미노산(NEAA, Gibco)이 보충된 α MEM(Corning)에서 배양하였다. 제대 4 내지 6회 MSC는 엑소좀 수거를 위해 사용하였다. 엑소좀은 본원 발명자의 확립된 프로토콜에 따라 차등 원심분리 과정에 의해 정제하였다(문헌참조: Mendt et al., 2018; Kamekar et al., 2017). 간략하게, 세포를 70-80% 컨플루언시로 성장시키고, 1X PBS(Corning)로 세척하고, 무혈청 배지(1% 페니실린-스트렙토마이신, 1% L-글루타민 및 1% NEAA가 포함된 α MEM)에서 48시간 동안 배양하였다. 상등액을 수거하고, 800 x g에서 5분 동안 원심분리한 후 2,000 x g에서 10분 동안 원심분리한 후 0.2 μ m 필터(Thermo Fisher)로 여과하였다. 여과된 상등액을 SW 32 Ti 로터(Beckman)에서 4°C에서 3시간 동안 100,000 x g로 원심분리하였다. 상등액을 흡인하고, 펠렛을 1X PBS 100 μ L에 재현탁시켰다. 엑소좀 농도 및 크기는 나노입자 트래킹 분석에 의해 입증하였다(NTA, NanoSight LM10, Malvern). 100억개의 엑소좀 분취량은 사용 전에 -80°C에서 저장하였다. 저용량 혼합물은 100 μ L의 PlasmaLyte(Medline, BHL2B2544XH)에, NTA에 따른 10억개의 총 엑소좀 및 1 μ g의 siRNA 또는 안티센스 올리고(ASO)를 포함하는 반면, 고용량 혼합물은 100 μ L의 PlasmaLyte에 20억개의 총 엑소좀 및 5 μ g의 siRNA 또는 ASO를 함유하였다. 400 μ L의 RNAi-엑소좀 혼합물은 큐벳에 부하시키고 이어서 400V, 125 μ F 및 ∞ ohms에서 전기천공하였다. 큐벳은 즉시 얼음으로 전달하였다. siSTAT3 서열: 센스 가닥 5' - GUUGAAUUAUCAGCUUAAA-3' (서열번호 1), 안티센스 5' - UUUAGCUGAAUUAUUAAC-3' (서열번호 2) (Sigma-Aldrich). mASO Scrbl 서열은 5' - mG*mG*mC*mU*mA*C*U*A*C*G*C*mC*mG*mU*mC*mA-3' (서열번호 3)이었다. umASO STAT3 서열은 5' - CTATTTGGATGTCAGC-3' (서열번호 4)였다. mASO STAT3 서열은 5' -mC*mU*mA*mU*mU*U*G*G*A*U*G*mU*mC*mA*mG*mC-3' (서열번호 5)였다. 'm'은 2' O-메톡시-에틸 염기를 지칭하고, *는 포스포로티오에이트 결합을 지칭한다. siCtrl은 제조사(Sigma-Aldrich) (SIC001, Sigma-Aldrich)로부터 획득하였다. ASO는 기관(Integrated DNA Technologies, Inc.)에 의해 합성하였다. siRNA는 마우스 및 사람 STAT3을 표적화하기 위해 동일한 잠재적 효율로 디자인되었다. ASO는 또한 마우스 및 사람 STAT3을 표적화하기 위해 디자인되었지만, 마우스 서열과 3개의

뉴클레오타이드 미스매치로 인해 마우스 STAT3에 대해 잠재적으로 보다 낮은 효능을 갖는다.

[0143] **생체내 엑소좀 생체분포의 가시화.**

[00123]마우스를 CCl_4 로 처리하여 간 섬유증을 유도하였다(아래에 자세히 설명된 바와 같이). MSC 유래된 엑소좀의 생체분포를 위해, XenoLight DiR (1,1'-디옥타데실테트라메틸 인도트리카보시아닌 요오다이드, Perkin Elmer, catalog 125964)로 표지된 8×10^9 의 정제된 엑소좀은 이전에 기재된 바와 같이 건강하고(삼) 섬유증 Balb/c 마우스에 i.p (100 μ l) 주사하였다(문헌참조: Mendt et al., 2018). 희석된 DiR (100 μ l)은 대조군으로서 주사하였다. 주사 6시간 후, 마우스를 안락사시키고, 다양한 조직(콩팥, 비장, 간, 췌장 및 장)을 수거하고 즉시 이미지화하였다. 간략하게, 모든 5×10^9 MSC 유래 엑소좀을 1 μ M DiR로 표지시킨 다음, 37°C에서 1시간, 4°C에서 15분 동안 배양한 다음, 10 ml의 1XPBS에서 40,000g로 초원심분리하여 4°C에서 3시간 동안 세척하였다(문헌참조: Mendt et al., 2018). 표지된 엑소좀 (8×10^9)은 100 μ l의 1X PBS에 재현탁시켰다. 대조군 그룹에 대해, 1 μ l의 DiR은 상기된 바와 동일한 절차에 따라 3시간 동안 초원심분리함에 의해 11 ml 1X PBS에 희석시켰다. 대조군 샘플(단지 DiR)은 100 μ l 1X PBS 중에 재현탁시켰다. 변이 기관의 형광성 강도는 780 nm에서 Em 필터와 710 nm에서 Ex 필터가 있는 IVIS 200 작은 동물 이미지화 시스템(PerkinElmer)을 사용함에 의해 이미지화하고 정량하였다.

[0145] **간 조직에서 표지된 siSTAT3 및 mASO STAT3 국소화의 가시화**

[00124]마우스를 CCl_4 로 처리하여 간 섬유증을 유도하였다(아래에 자세히 설명된 바와 같이). MSC-유래된 엑소좀은 주사 전에 AF647 태그된 siRNA 및 mASO를 전기천공하였다. 이들 AF647 표지된 i엑소좀 및 AF647 태그된 나출된 siRNA 또는 mASO는 이어서 WT Balb/c 및 섬유증 마우스에 i.p. 주사하였다. 절개된 간 표본은 DAPI로 염색시키고 이어서 탑재하였다. 이미지는 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (Zeiss LSM800)에 의해 획득하고 이어서 AF647의 핵의 수를 계수함에 의해 정량하고 핵의 총수로 나누었다. 3개의 무작위 시야는 기관 당 캡처하였다 (200X).

[0147] **마우스**

[00125]간 섬유증은 Balb/c 마우스(연구소(Jackson laboratory)로부터 구입한 8주령 암컷)에 유도하였다. 간 손상은 37일 동안 1주 2회 100 μ l 올리브유에서 10%의 용량에서 CCl_4 (Sigma, 56-23-5)의 i.p. 주사로 유도하였다. 대조군 마우스에는 CCl_4 가 없는 올리브유를 투여하였다(도 5d). 9일 후, 마우스는 13개 그룹으로 무작위 할당하였다. 마우스에는 또한 10억개의 가공된 엑소좀의 1 μ g siRNA/ASO 또는 20억개의 가공된 엑소좀의 5 μ g siRNA/ASO를 i.p.로 100 μ l 용적의 PlasmaLyte(Medline) 중에서 또는 siRNA-STAT3/mASO-STAT3 단독을 격일로 투여하였다. 마우스는 마지막 i엑소좀 주사 후 24시간 이내에 안락사시켰다. 모든 프로토콜과 절차는 MDACC의 동물 관리 및 사용 위원회 연구소의 승인을 받았다.

[0149] **시리우스 레드 염색 및 정량**

[00126]간을 10% 중성 완충 포르말린에 고정시키고 파라핀에 포매하였다. 5 μ m 두께의 파라핀 절개부를 시리우스 레드 염색을 위해 사용하였다. 3회 동안 세정하고 비거트(Weigert)의 헤마톡실린으로 8분 동안 염색한 후, 슬라이드를 피크로시리우스 레드로 1시간 동안 대조염색하였다. 간 섬유증을 정량화하기 위해 계수 그리드를 사용하여 각 마우스에서 3개의 독립적인 시리우스 레드 염색 절개부를 분석하였다. 간 섬유증의 퍼센트 면적은 이전에 기재된 바와 같이 계산하였다(문헌참조: Whittaker et al., 1994).

[0151] **면역조직화학**

[00127]조직은 10% 중성 포르말린에 밤새 고정시키고, 탈수시키고, 파라핀에 포매하였다. 이어서 5 μ m 절개부를 분석을 위해 가공하였다. 1시간 동안 1 mM EDTA-TE(pH 9.0)에서 열 매개 항원 검색을 수행하였다. 콜라겐 I(Southern Biotech, 1310-01, 1:200) 염색을 위한 절개부는 1차 항체와 함께 밤새 항온처리하기 1시간 전에 TBS에서 4% CWFS 젤라틴(Aurion)으로 차단시켰다. 비오티닐화된 항-염소(Vector Laboratories, BA9500, 1:400)로 항온처리한 후, 절개부는 30분동안 ABC와 반응시킴에 이어서 제조업자의 프로토콜에 따라 DAB에 의해 전개시켰다.

[0153] **간 기능 평가**

[00128]마우스 혈액은 안와 뒤 신경총에서 수거하였다. 이어서 혈청을 4°C에서 10분 동안 6,000rpm으로 원심분

리하여 즉시 분리하고 사용할 때까지 -80°C 에서 저장하였다. 혈청의 ALT 및 AST 함량의 측정은 MDACC에서 수의 병리과(Veterinary Pathology)에 의해 수행되었다.

[0155] **해마톡실린 및 에오신 염색**

[00129]간 조직 샘플을 10% 완충 포르말린에 고정시키고 파라핀에 포매하였다. $5\ \mu\text{m}$ 두께의 조직 절개부는 해마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다. 5개의 별개의 200X 시야는 각 슬라이드에 대해 무작위로 선택되었고, 피사 및 변성 간세포의 수는 Adobe Photoshop 7.0의 계수 도구를 사용하여 수동으로 계산하였다. 간세포는 세포질의 응축 및 암 염색 및 핵의 부재에 따라 피사성으로 정의하였다(문헌참조: Krishna et al., 2017). 간세포 변성은 특히 이전에 보고된 바와 같이 발견된 세포 팽창 및 확대에 의해 결정하였다(문헌참조: Lackner et al., 2008).

[0157] **RNA 서열분석**

[00130]TRIzolTM (Invitrogen, 15596018)을 사용하여 간에서 총 RNA를 추출하고 제조업자의 지침에 따라 정제하였다. RNA 무결성은 MDACC 서열분석 및 ncRNA 프로그램 코어에 의한 RNA 6000 나노 검정을 사용하여 결정되었다. 간 RNA 서열분석은 Illumina TrueSeq 가닥의 mRNAseq MDACC 서열분석 및 ncRNA 프로그램 코어를 사용하여 수행하였다. 게놈 맵핑은 TopHat 소프트웨어 (v2.0.9; ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml의 월드 와이드 웹상에서 가용함)를 사용하여 수행하였다. 본원 발명자들은 RNA-Seq 데이터로부터 전사체의 동정을 위해 Cufflinks 알고리즘을 사용하였고, 유전자 발현 프로파일링을 위해 DESeq2 bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html에서 월드 와이드 웹 상에서 가용함)를 사용하여 차등적으로 발현된 유전자를 결정하였다. 오류-발견율(False-discovery rate) (FDR)을 수행하여 다수의 시험에 대한 p-값의 유의적 역치를 결정하였다. 유의적으로 발현된 유전자는 0.05 미만의 FDR에 의해 결정하였다. 유전자 세트 농축 분석(Gene Set Enrichment Analysis)(GSEA) 및 유전자 주석은 WebGestalt 2019(webgestalt.org/의 월드 와이드 웹에서 가용함)에 의해 수행하였다(문헌참조: He et al., 2019). STAT-ECM 유전자 상호작용 조절 네트워크는 NetworkAnalyst 3.0 (networkanalyst.ca/의 월드 와이드 웹상에서 가용함)를 사용하여 수행하였다(문헌참조: Zhou et al., 2019).

[0159] **통계학적 분석**

[00131]사용되는 통계학적 분석은 도면의 간단한 설명에서 상세히 기재되어 있다. 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차로 표현한다. $p < 0.05$ 는 통계학적으로 유의적인 것으로 간주되었다. 일원 ANOVA 또는 독립적 양방 스튜던트 t-시험은 웰치 (Welch) 보정과 함께 사용하여 GraphPad 프리즘 (GraphPad 소프트웨어)을 사용한 통계학적 유의성을 확립하였다. 통계학적 시험의 유의성은 다음과 같이 그래프에 보고된다: **** ($p < 0.0001$), *** ($p < 0.001$), ** ($p < 0.01$), * ($p < 0.05$), n.s. ($p > 0.05$).

[0161] **실시예 5 - 간 정상 세포에서 *Col1a1* 녹아웃**

[00132]활성화된 간 정상 세포 또는 α SMA+ 근섬유아세포(Col1a1^{ck0})에서 *Col1a1* 유전자의 녹아웃 돌연변이를 보유하는 마우스를 생성하였다. 간 섬유증은 CCl₄의 i.p. 주사로 한 그룹의 마우스에서 유도하였고, 대조군은 CCl₄를 투여받지 않았고, 섬유증과 대조군("건강한") 그룹을 모두 희생시키고 분석하였다. 콜라겐 I 및 간 섬유증의 상당한 감소가 야생형(WT)과 비교하여 Col1a1^{ck0} 마우스에서 관찰되었다(도 10a-f). 간 섬유증과 관련된 많은 범용 발현 패턴은 WT와 비교하여 간 섬유증을 갖는 Col1a1^{ck0} 마우스에서 유의적으로 개선되었다(도 10g 및 10h).

[0163] * * *

[00133]본원에 개시되고 청구된 모든 방법들은 본 명세서의 내용을 고려하여 과도한 실험없이 만들어 수행할 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 특정 구현예의 관점에서 기술되었지만, 본 발명의 당업계의 개념, 의미 및 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변화들을 본원에 기술된 방법들, 상기 방법의 단계들 또는 상기 방법 단계들의 순서에 적용할 수 있다는 사실은 당업자들에게는 명백할 것이다. 예를 들어, 화학적 및 생리학적으로 모두 관련되어 있는 특정 제제의 경우 이들을 사용하여도 동일하거나 유사한 결과가 달성된다면 본원에 기술된 제제를 대체할 수 있음도 명백할 것이다. 당업계의 숙련자들에게 명백한 이러한 모든 유사한 대체물 및 변형은 첨부된 특허청구범위에 정의된 본 발명의 의미, 범위 및 개념에 속하는 것으로 간주된다.

[0165] **참고문헌**

[0166] 하기의 참고문헌들은, 본원에 기술된 내용에 대하여 예시적인 절차이거나 이를 보충하는 기타 상세한 설명을 제공하는 정도로, 본원에 참고로서 구체적으로 포함된다.

Arriazu E, Ge X, Leung TM, Magdaleno F, Lopategi A, Lu Y, et al. Signalling via the osteopontin and high mobility group box-1 axis drives the fibrogenic response to liver injury. *Gut*. 2017;66(6):1123-37.

Bartneck M, Warzecha KT, and Tacke F. Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014;3(6):364-76.

Battaller R, and Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209-18.

Beebe JD, Liu JY, and Zhang JT. Two decades of research in discovery of anticancer drugs targeting STAT3, how close are we? *Pharmacol Ther*. 2018;191:74-91.

Breitkopf K, Sawitza I, Westhoff JH, Wickert L, Dooley S, and Gressner AM. Thrombospondin 1 acts as a strong promoter of transforming growth factor beta effects via two distinct mechanisms in hepatic stellate cells. *Gut*. 2005;54(5):673-81.

Chakraborty D, Sumova B, Mallano T, Chen CW, Distler A, Bergmann C, et al. Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis. *Nat Commun*. 2017;8(1):1130.

Choi S, Jung HJ, Kim MW, Kang JH, Shin D, Jang YS, et al. A novel STAT3 inhibitor, STX-0119, attenuates liver fibrosis by inactivating hepatic stellate cells in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;513(1):49-55.

Gong XH, Chen C, Hou P, Zhu SC, Wu CQ, Song CL, et al. Overexpression of miR-126 inhibits the activation and migration of HSCs through targeting CRK. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(1):97-106.

He W, Fu L, Yan Q, Zhou Q, Yuan K, Chen L, et al. Gene set enrichment analysis and meta-analysis identified 12 key genes regulating and controlling the prognosis of lung adenocarcinoma. *Oncol Lett*. 2019;17(6):5608-18.

Hernandez-Gea V, and Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:425-56.

Jung KH, Yoo W, Stevenson HL, Deshpande D, Shen H, Gagea M, et al. Multifunctional Effects of a Small-Molecule STAT3 Inhibitor on NASH and Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Clin Cancer Res*. 2017;23(18):5537-46.

[0167]

Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*. 2017;546(7659):498-503.

Krishna M. Patterns of necrosis in liver disease. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2017;10(2):53-6.

Lackner C, Gogg-Kamerer M, Zatloukal K, Stumptner C, Brunt EM, and Denk H. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. *J Hepatol*. 2008;48(5):821-8.

Lou G, Chen L, Xia C, Wang W, Qi J, Li A, et al. MiR-199a-modified exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve hepatocellular carcinoma chemosensitivity through mTOR pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):4.

Lu Y, Lv F, Kong M, Chen X, Duan Y, Chen X, et al. A cAbl-MRTF-A Feedback Loop Contributes to Hepatic Stellate Cell Activation. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:243.

Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun*. 2013;4:2823.

Mendt M, Kamerkar S, Sugimoto H, McAndrews KM, Wu CC, Gagea M, et al. Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI Insight*. 2018;3(8).

Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, and Lan HY. TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(6):325-38.

Pechkovsky DV, Prele CM, Wong J, Hogaboam CM, McAnulty RJ, Laurent GJ, et al. STAT3-mediated signaling dysregulates lung fibroblast-myofibroblast activation and differentiation in UIP/IPF. *Am J Pathol*. 2012;180(4):1398-412.

Qu Y, Zhang Q, Cai X, Li F, Ma Z, Xu M, et al. Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation. *J Cell Mol Med*. 2017;21(10):2491-502.

Su TH, Shiau CW, Jao P, Liu CH, Liu CJ, Tai WT, et al. Sorafenib and its derivative SC-1 exhibit antifibrotic effects through signal transducer and activator of transcription 3 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(23):7243-8.

Vinas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Berenguer C, Enrich C, et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology*. 2003;38(4):919-29.

Wang H, Lafdil F, Kong X, and Gao B. Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. *Int J Biol Sci.* 2011;7(5):536-50.

Wang H, Lafdil F, Wang L, Park O, Yin S, Niu J, et al. Hepatoprotective versus oncogenic functions of STAT3 in liver tumorigenesis. *Am J Pathol.* 2011;179(2):714-24.

Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, and Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol.* 1994;89(5):397-410.

Xiang DM, Sun W, Ning BF, Zhou TF, Li XF, Zhong W, et al. The HLF/IL-6/STAT3 feedforward circuit drives hepatic stellate cell activation to promote liver fibrosis. *Gut.* 2018;67(9):1704-15.

Zeybel M, Luli S, Sabater L, Hardy T, Oakley F, Leslie J, et al. A Proof-of-Concept for Epigenetic Therapy of Tissue Fibrosis: Inhibition of Liver Fibrosis Progression by 3-Deazaneplanocin A. *Mol Ther.* 2017;25(1):218-31.

Zhai X, Wang W, Dou D, Ma Y, Gang D, Jiang Z, et al. A novel technique to prepare a single cell suspension of isolated quiescent human hepatic stellate cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):12757.

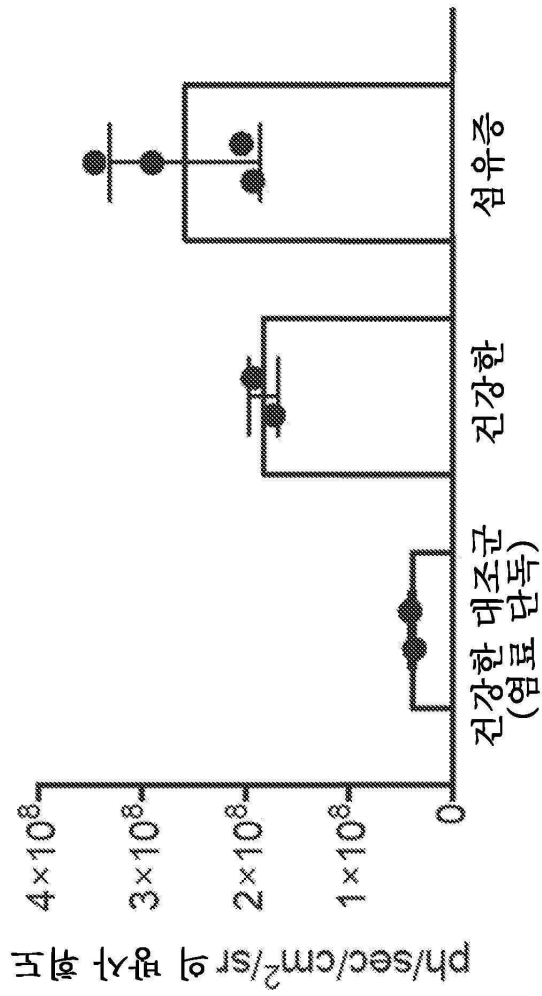
Zhou G, Soufan O, Ewald J, Hancock REW, Basu N, and Xia J. Network Analyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W234-W41.

[0169]

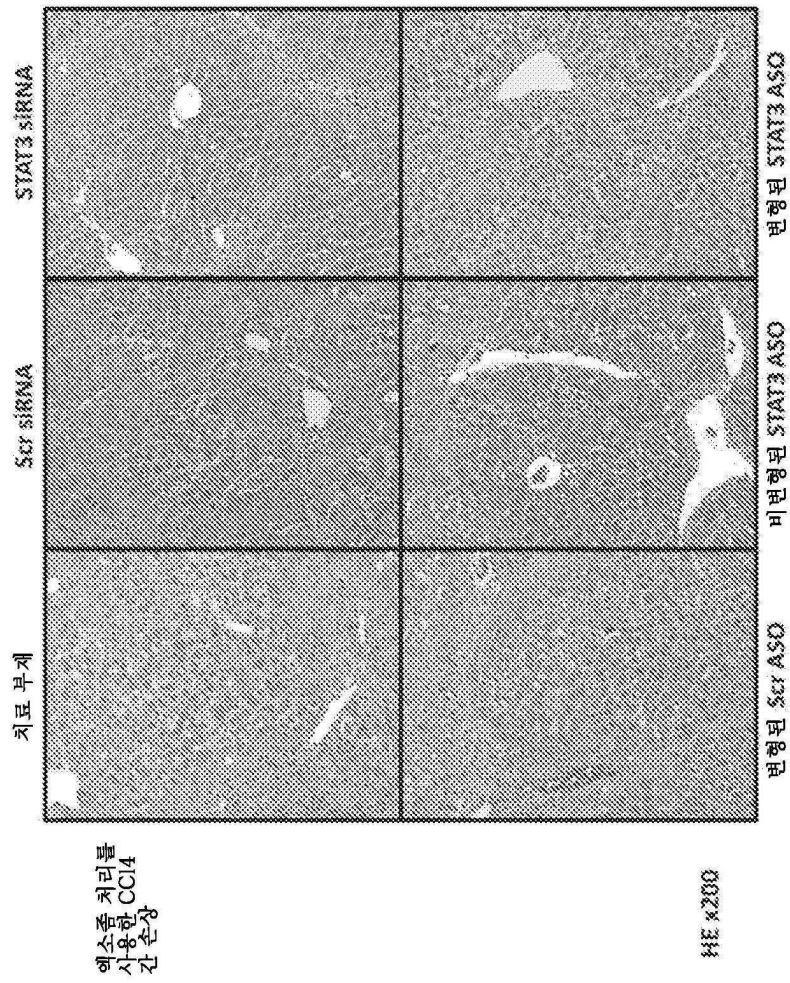
도면

도면1

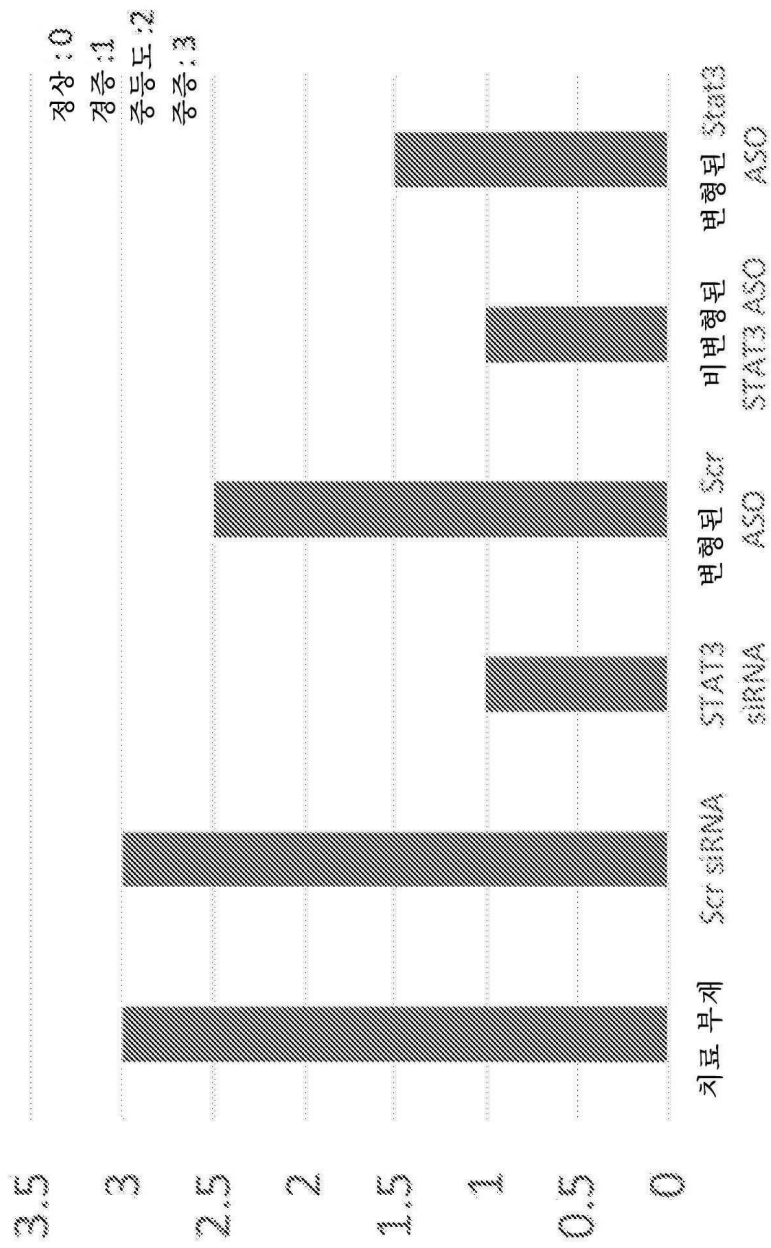
간 IVIS 이미징화



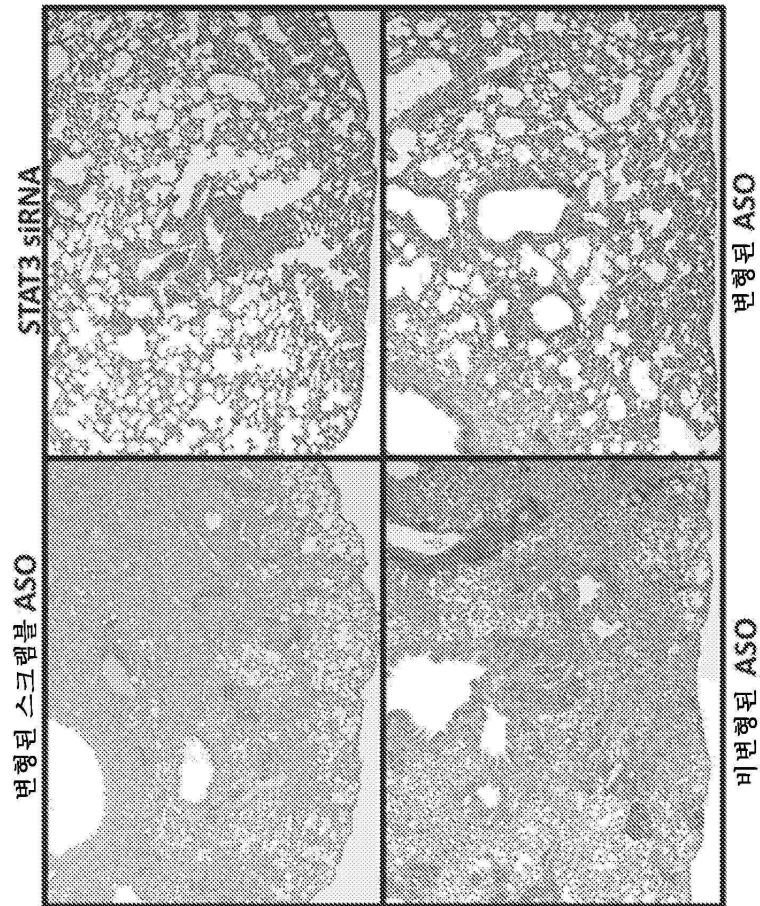
도면2a



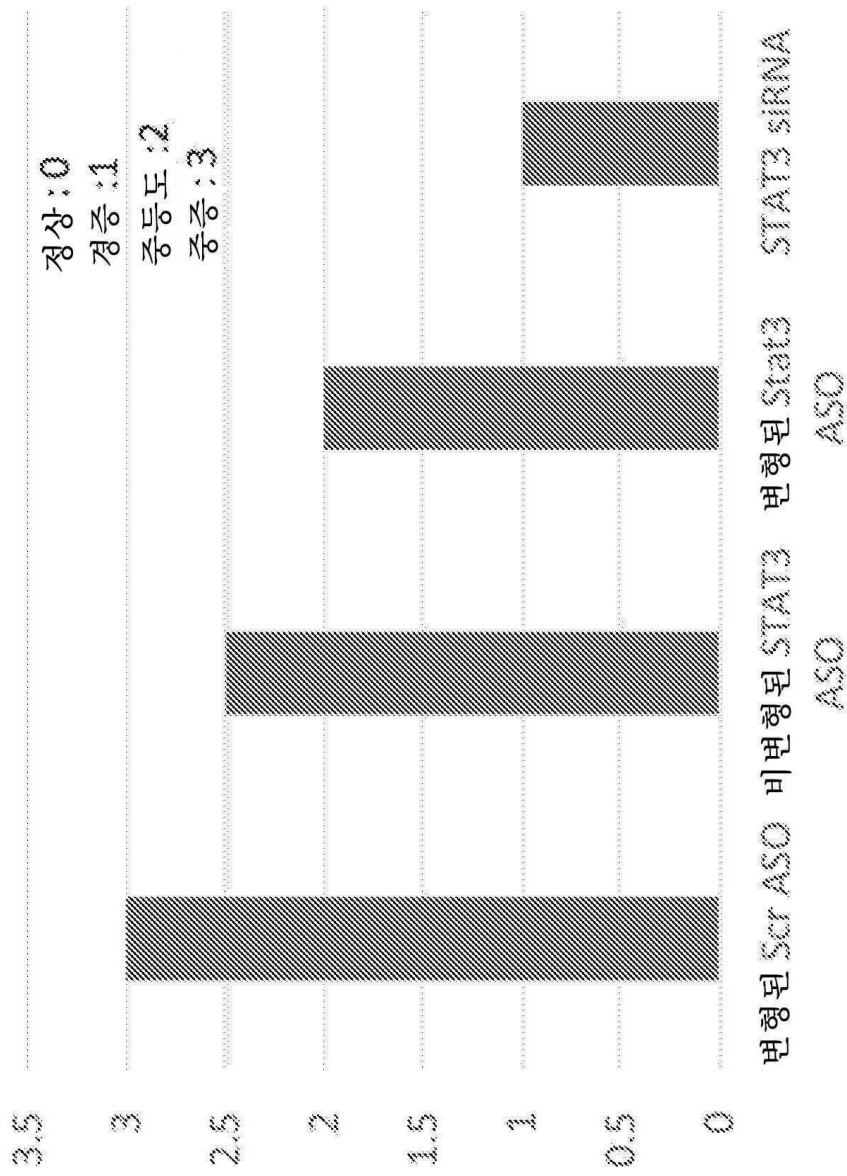
도면2b



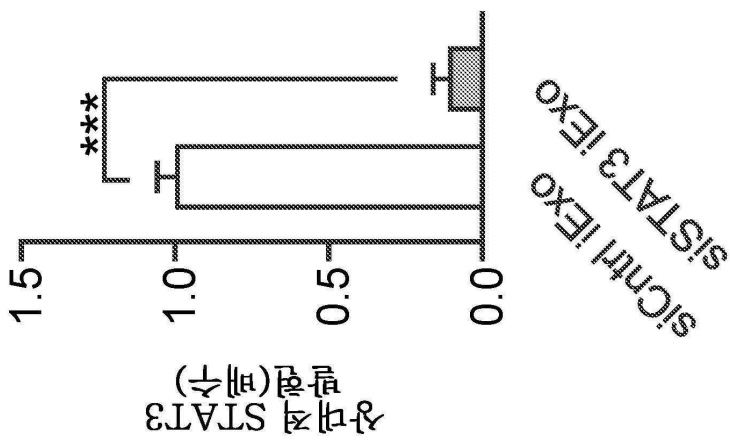
도면3a



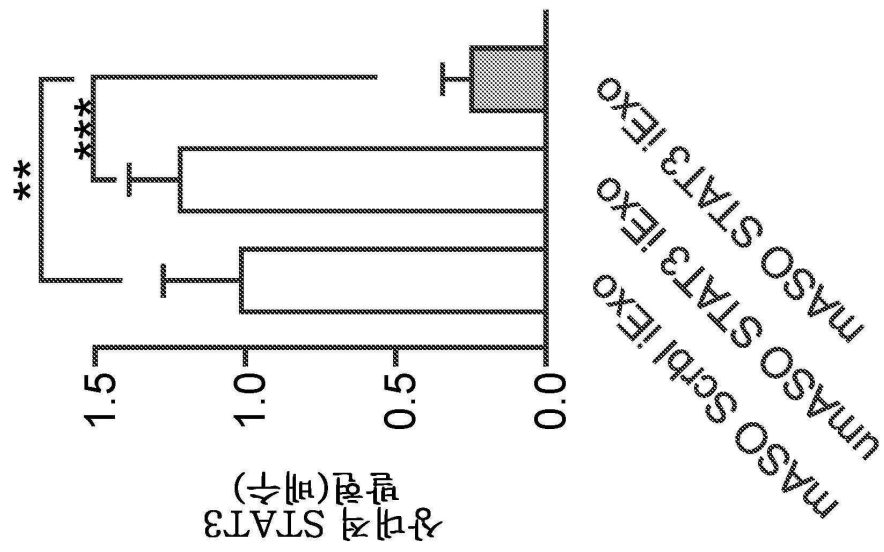
도면3b



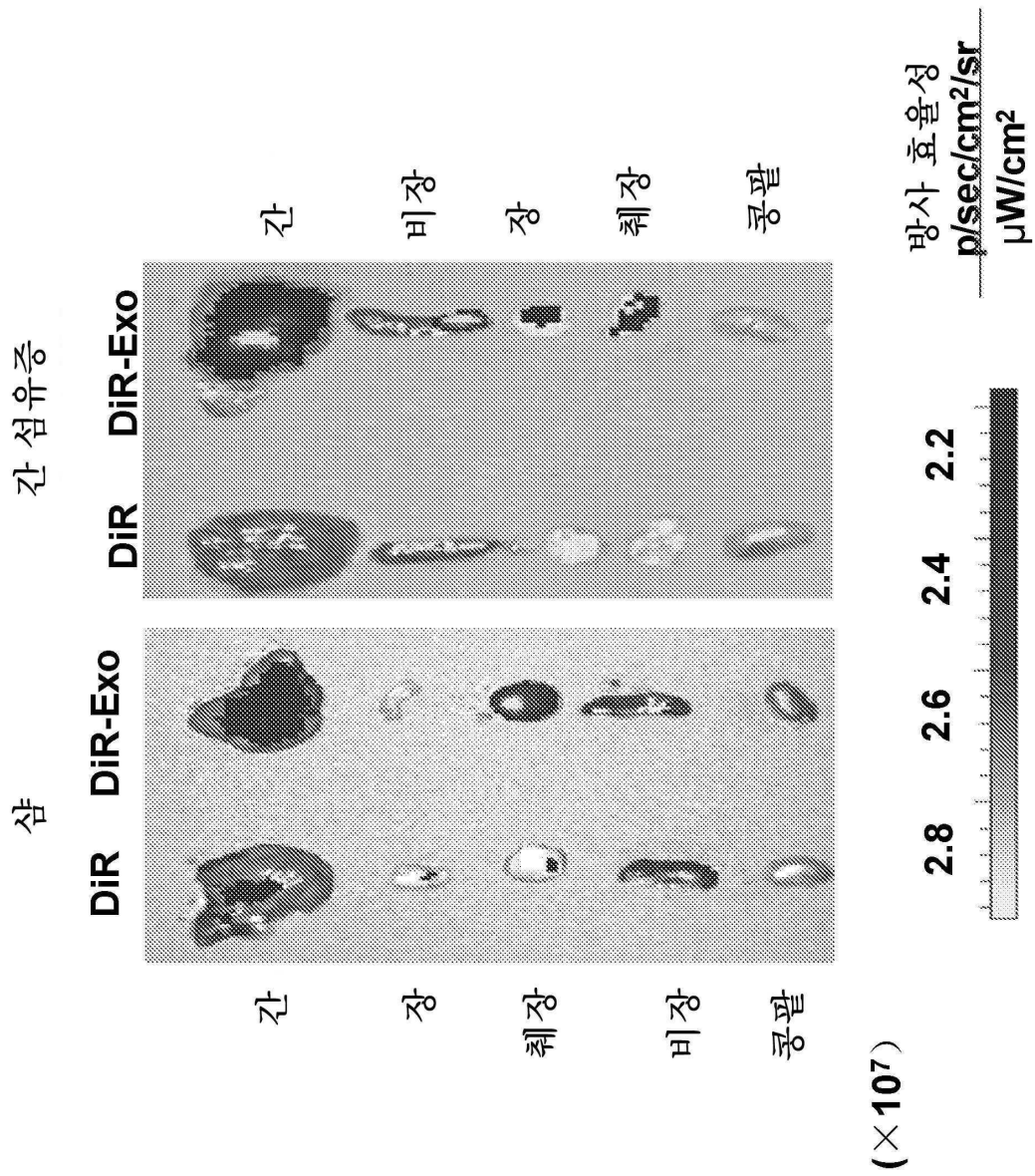
도면4a



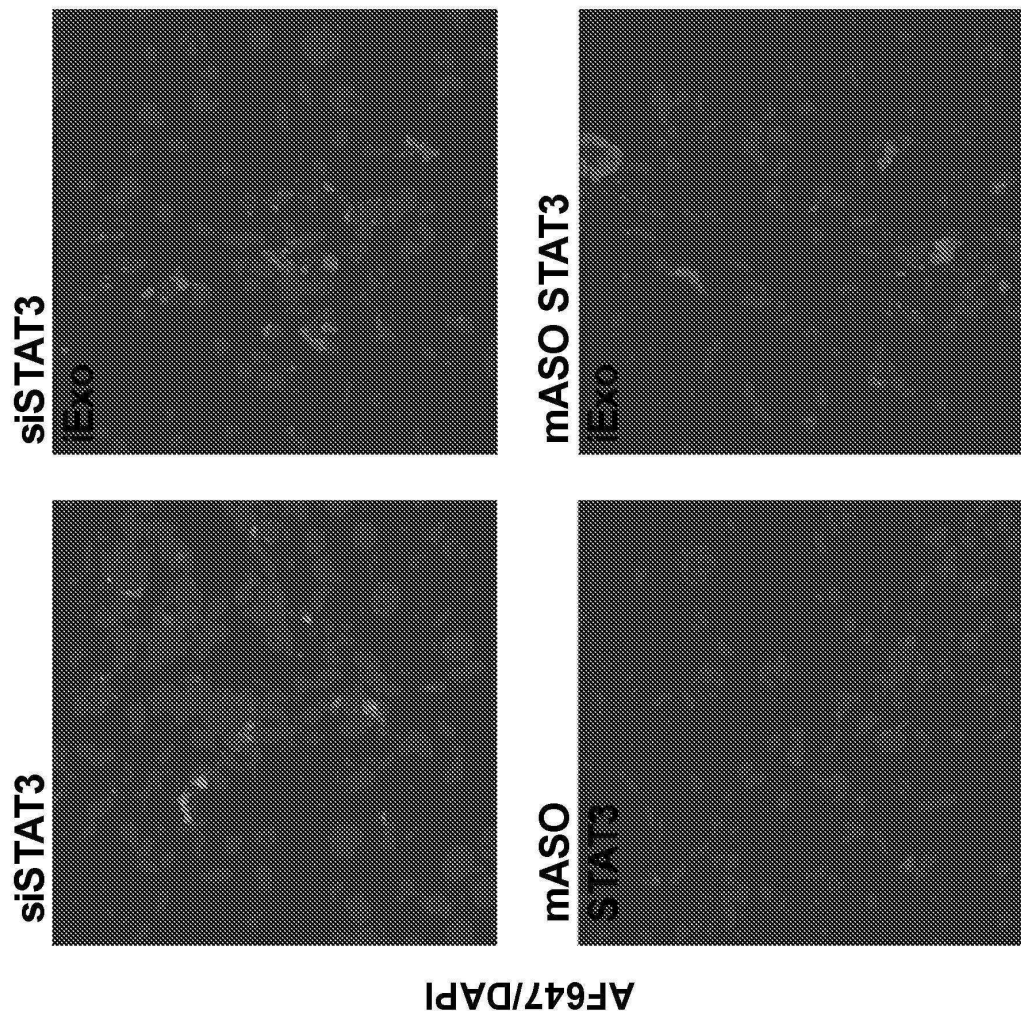
도면4b



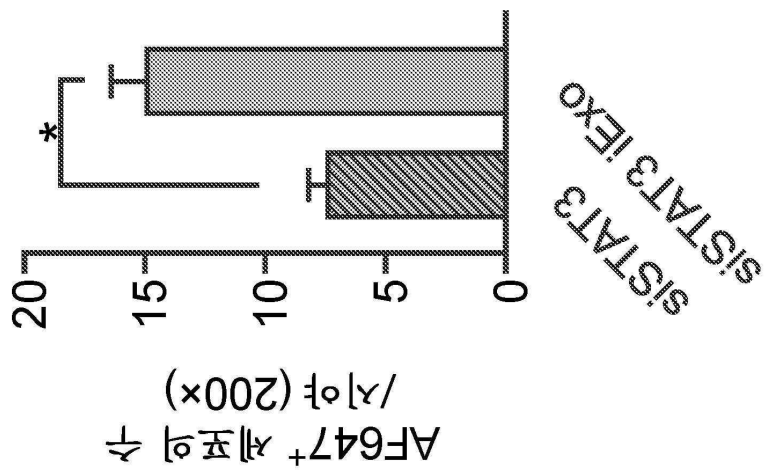
도면4c



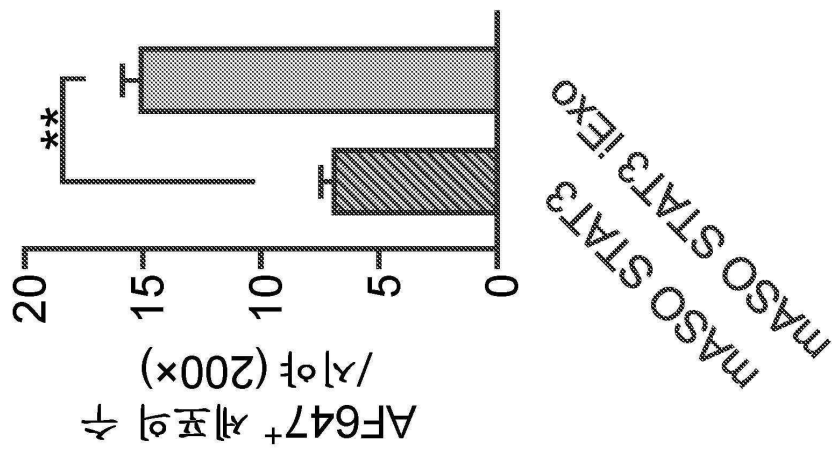
도면4d



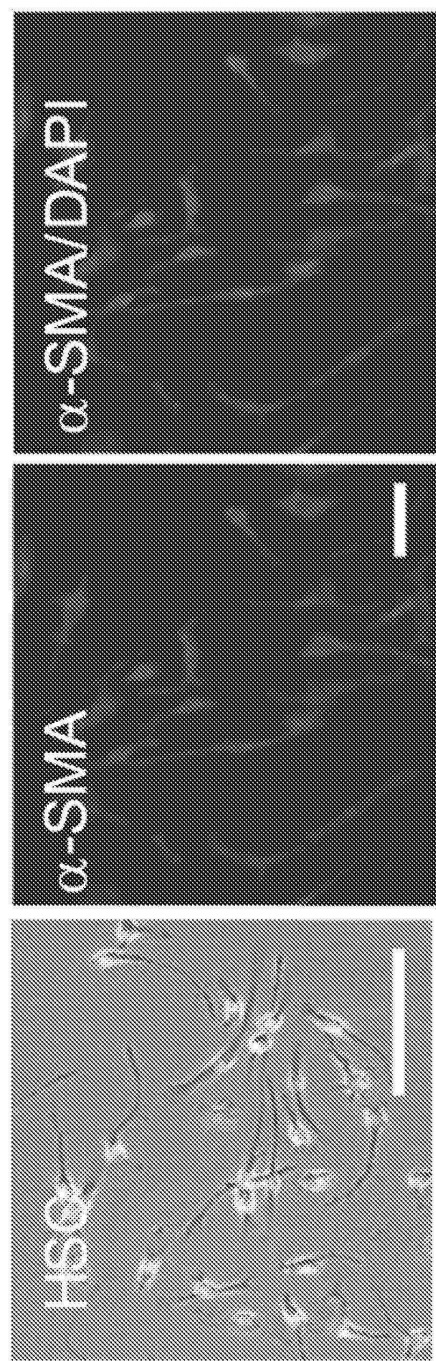
도면4e



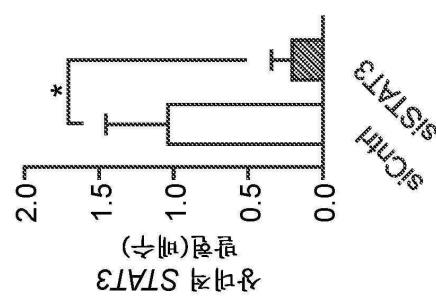
도면4f



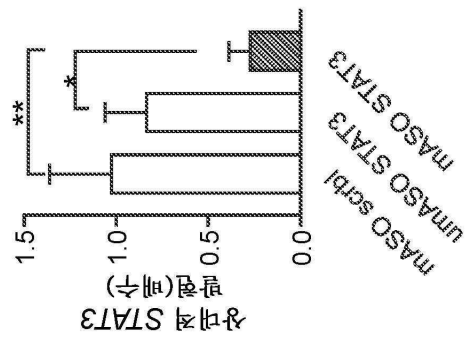
도면5a



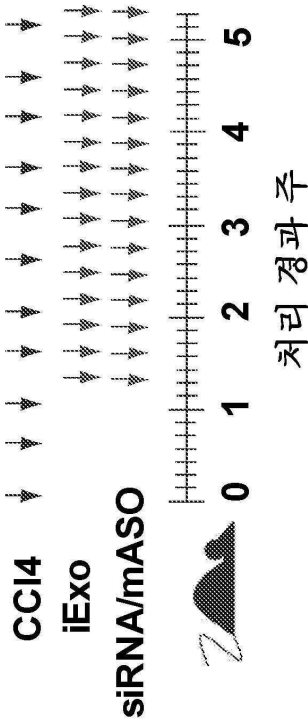
도면5b



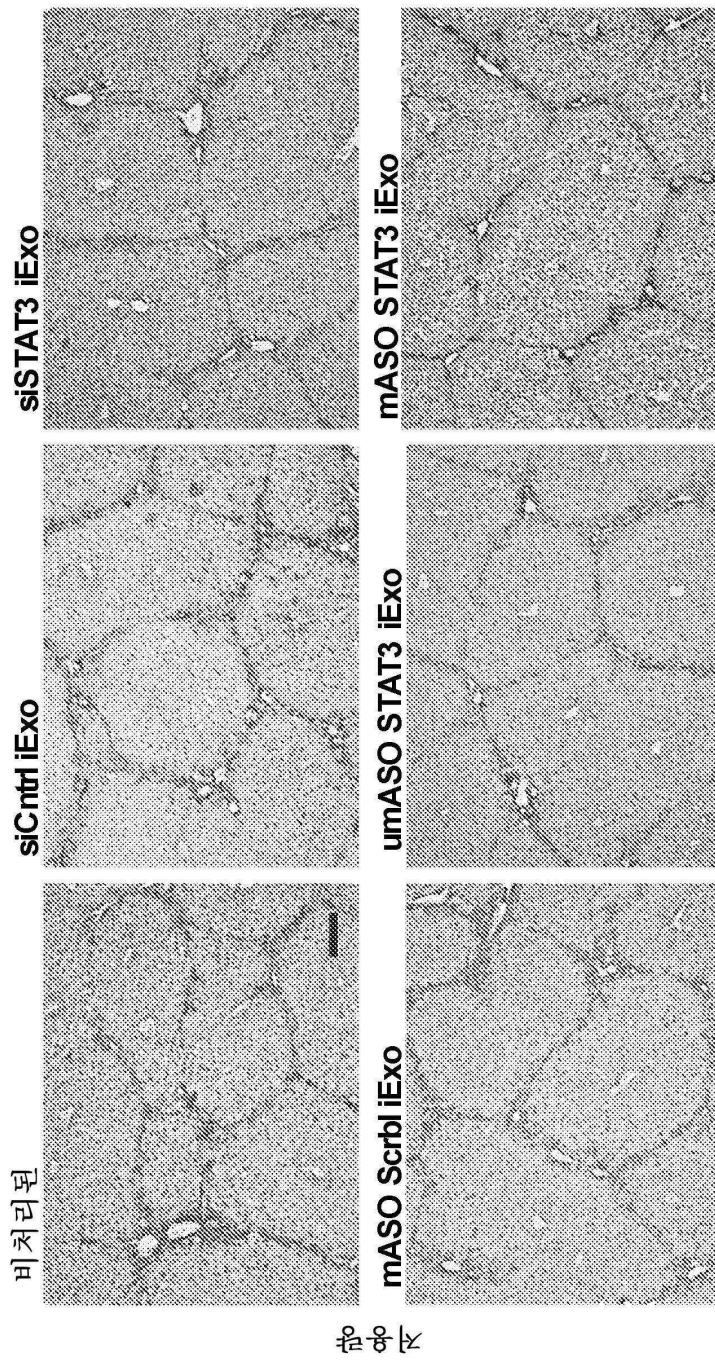
도면5c



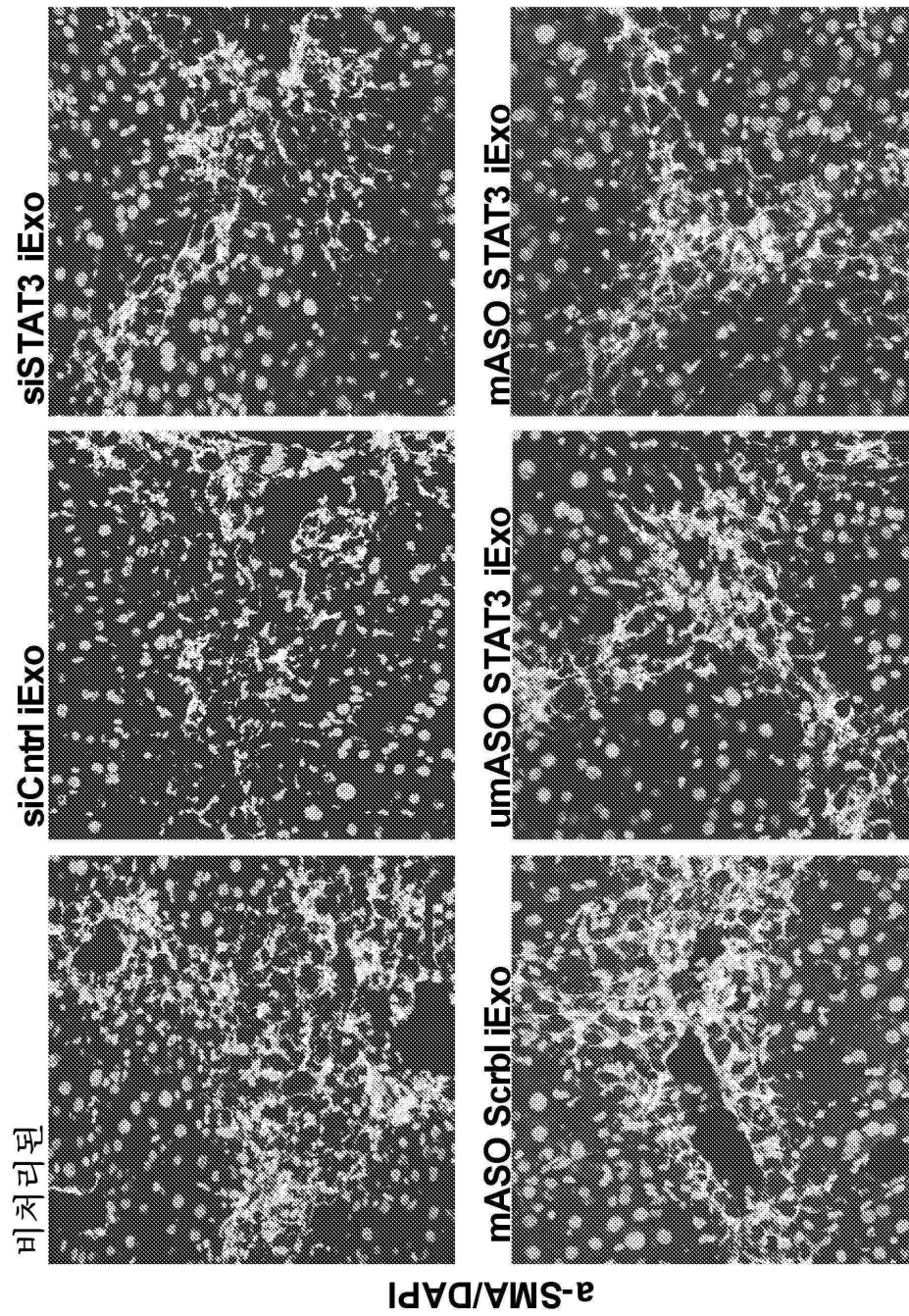
도면5d



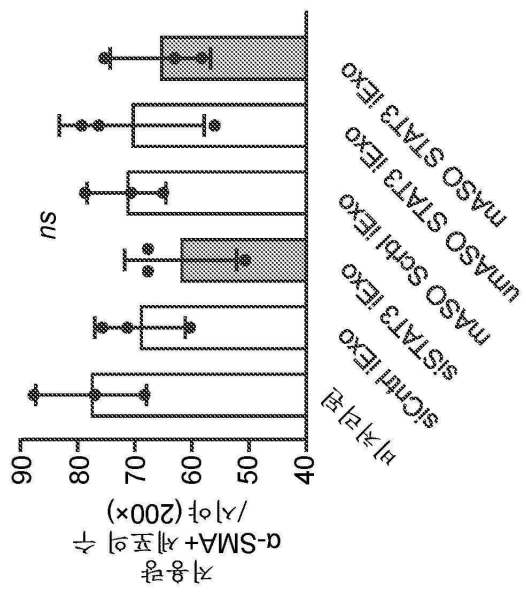
도면5e



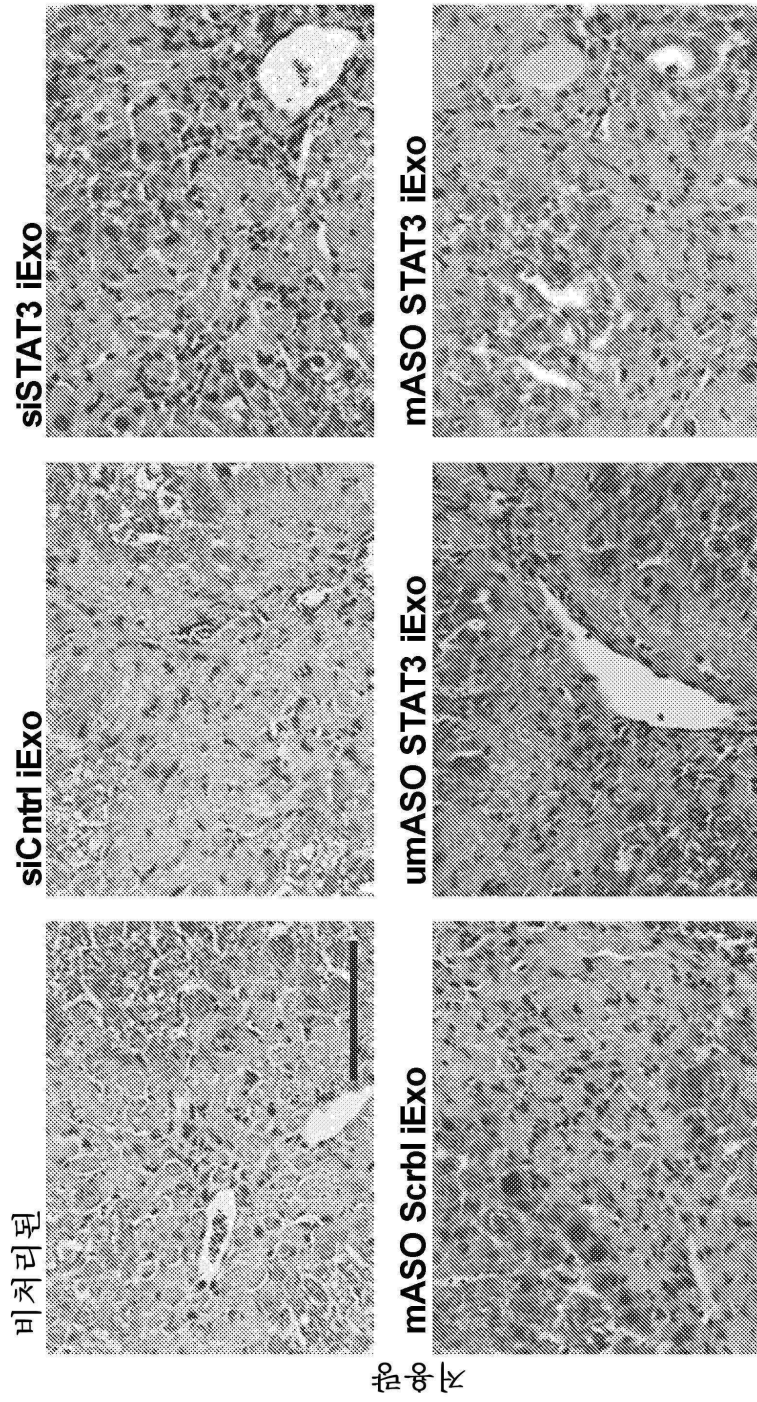
도면5g



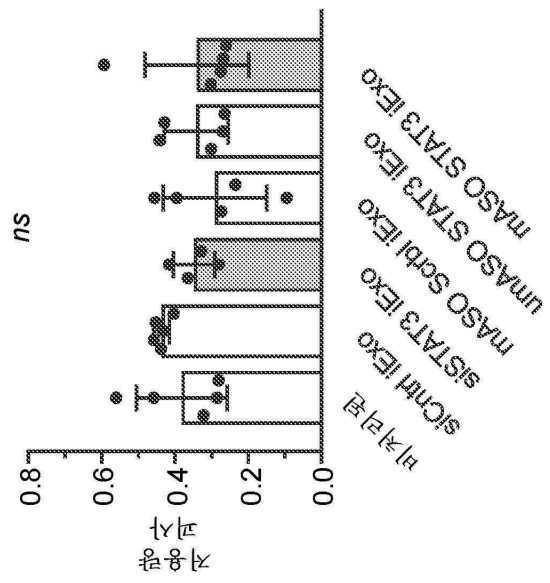
도면5h



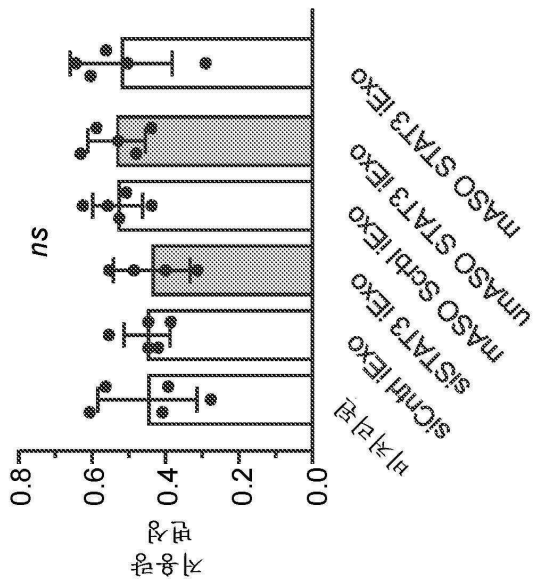
도면5i



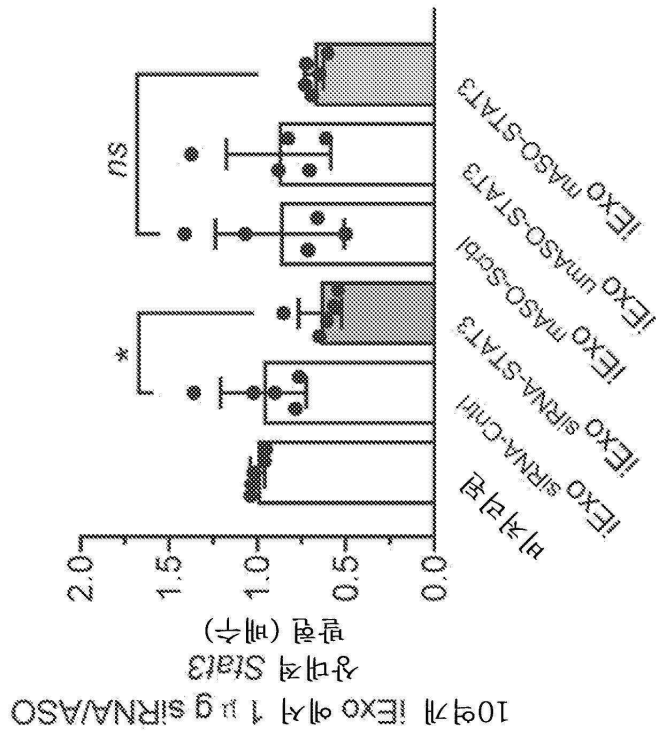
도면5j



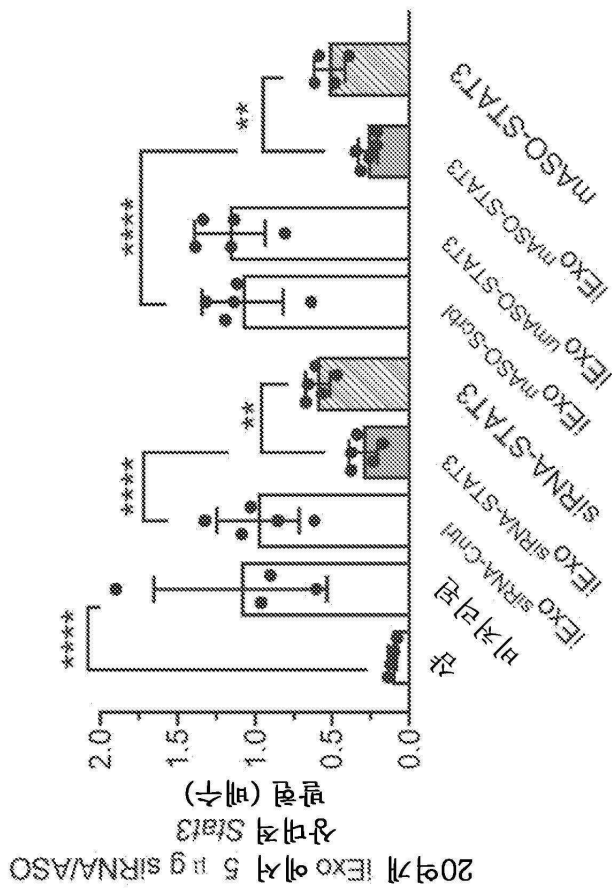
도면5k



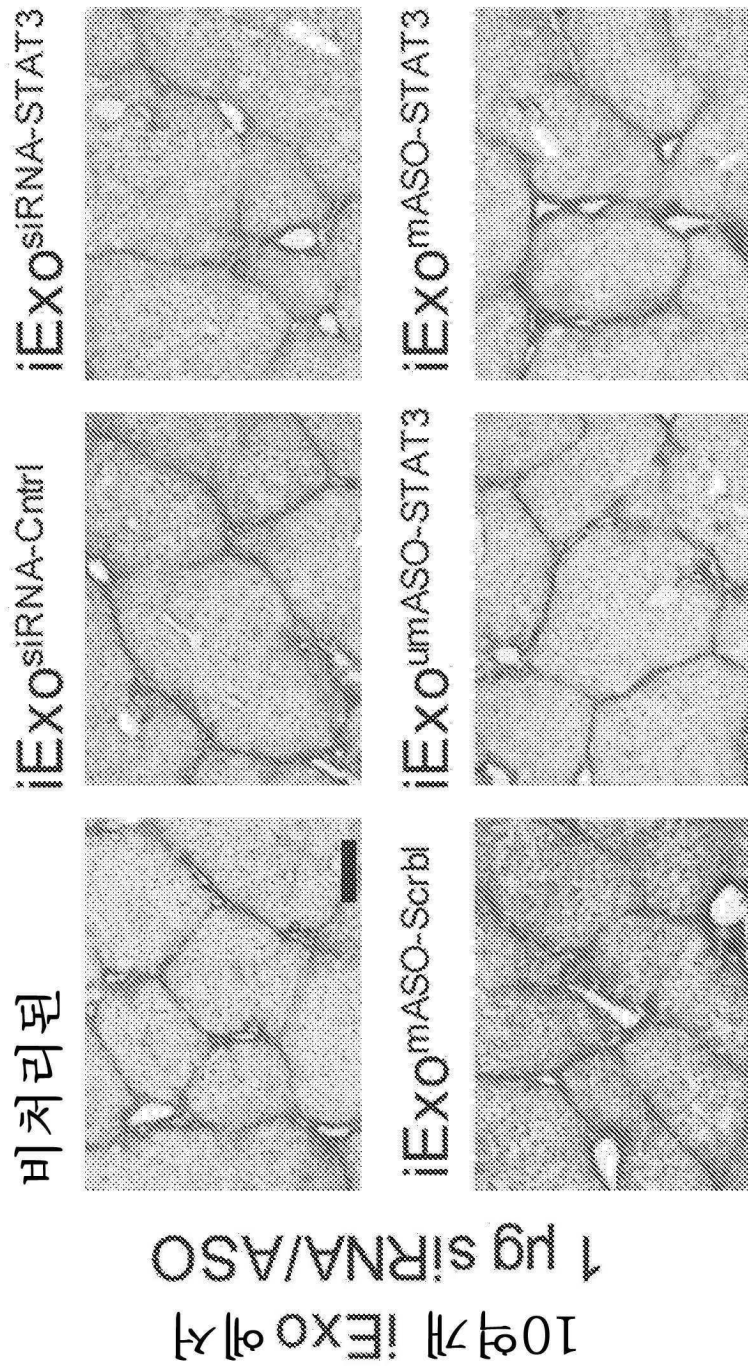
도면6a



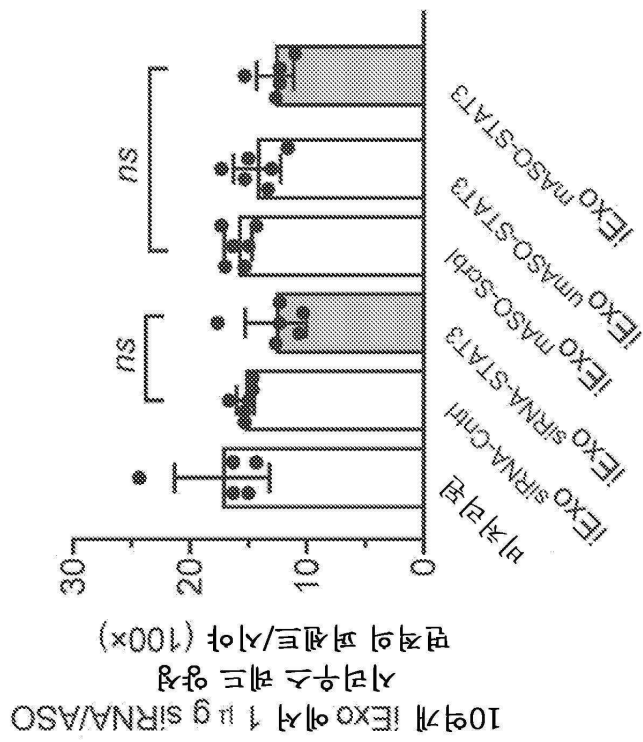
도면6b



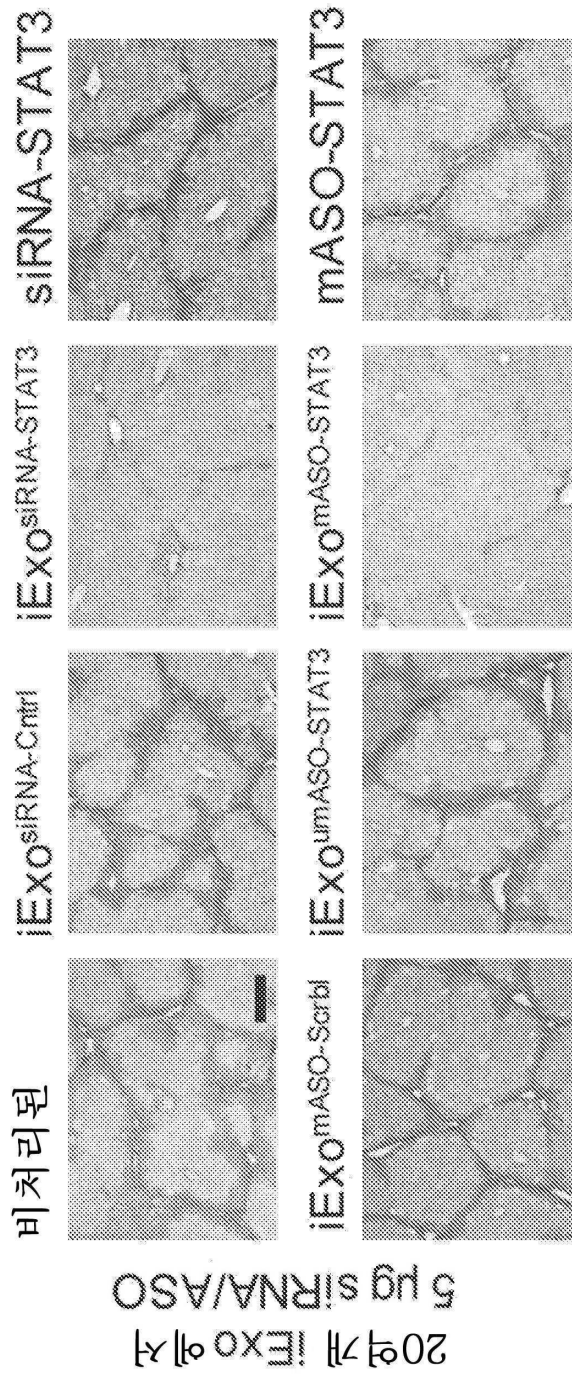
도면6c



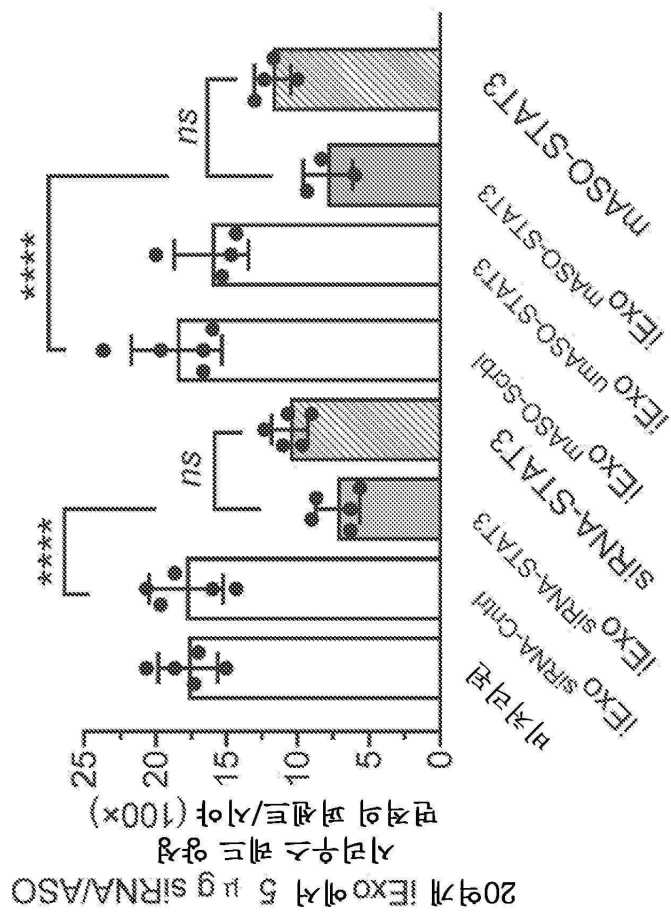
도면6d



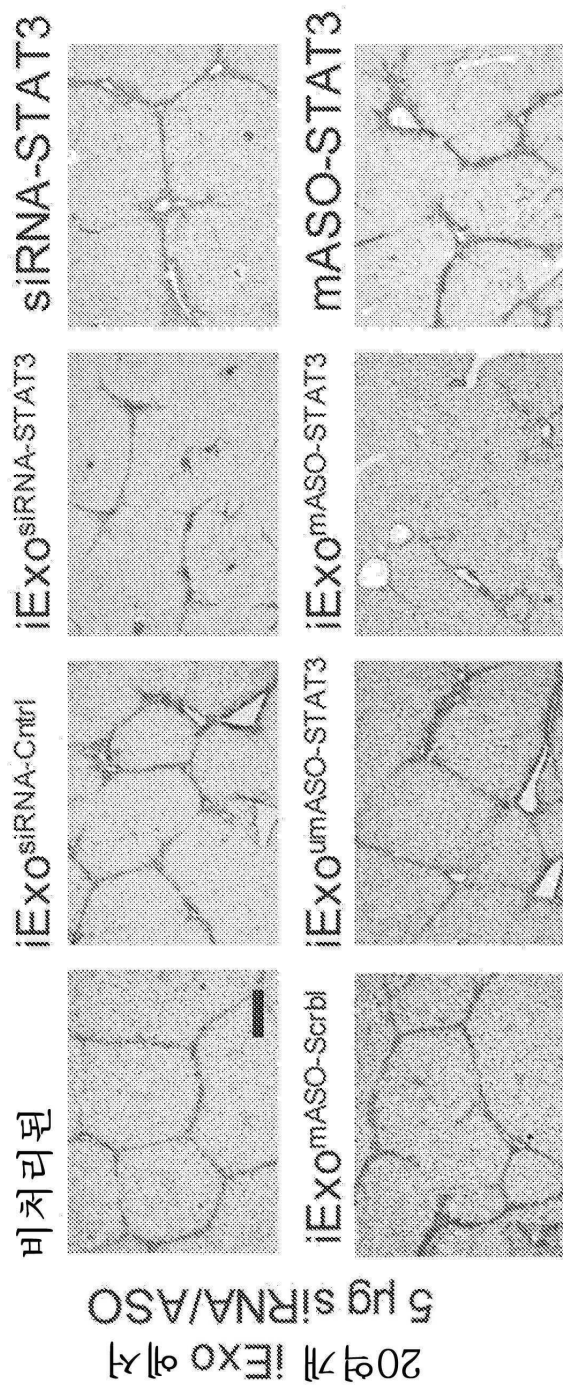
도면6e



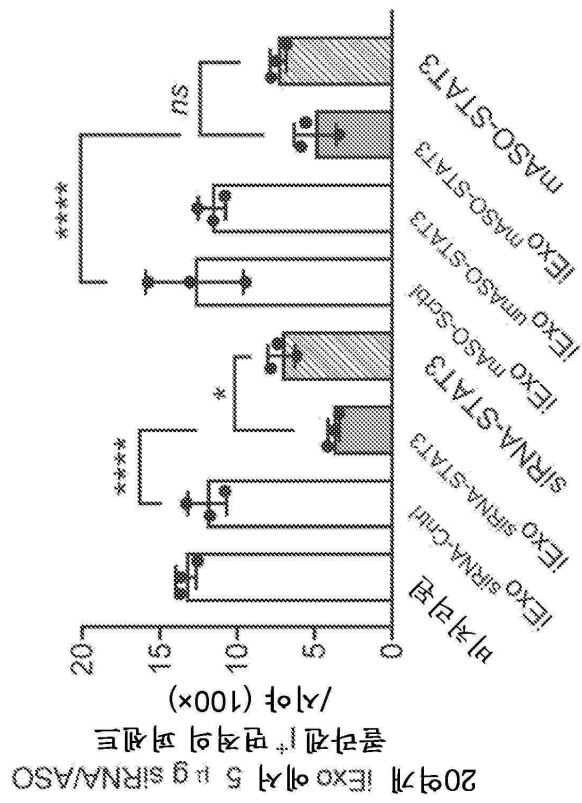
도면6f



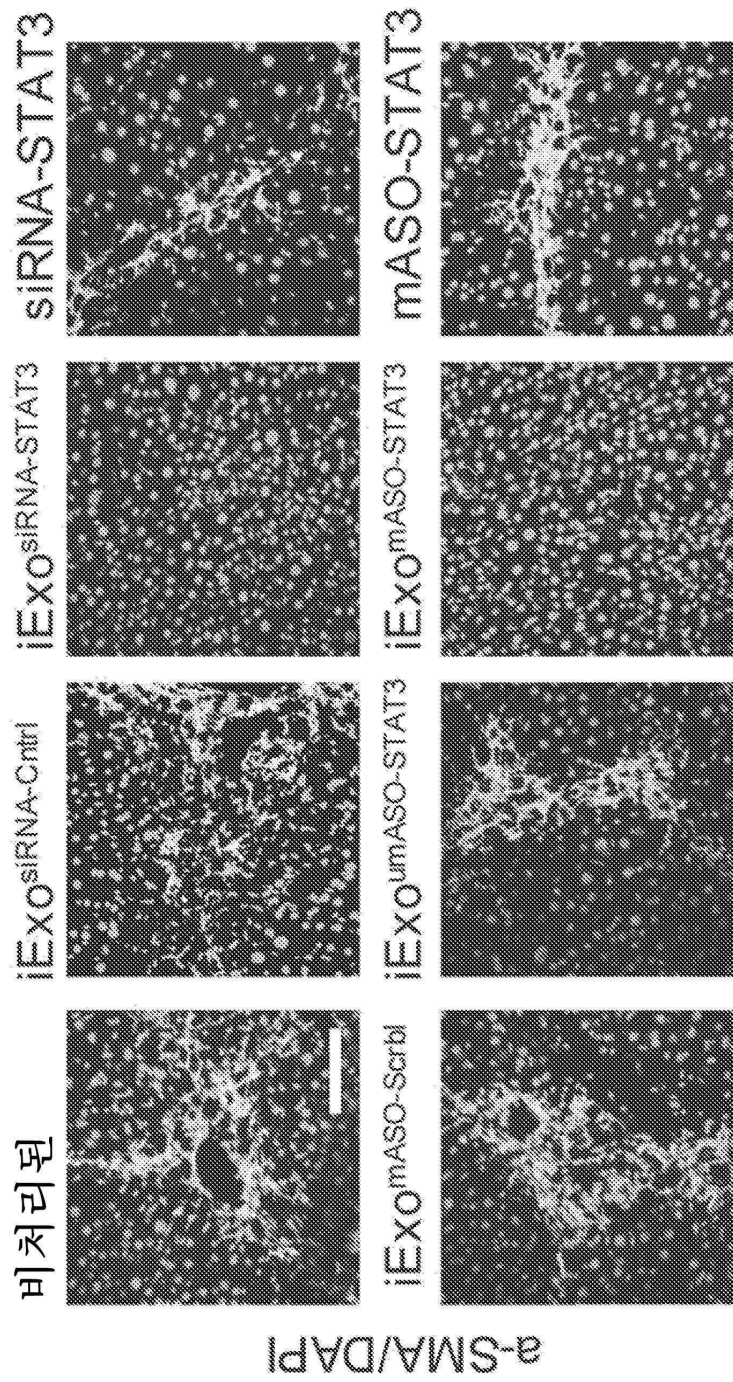
도면6g



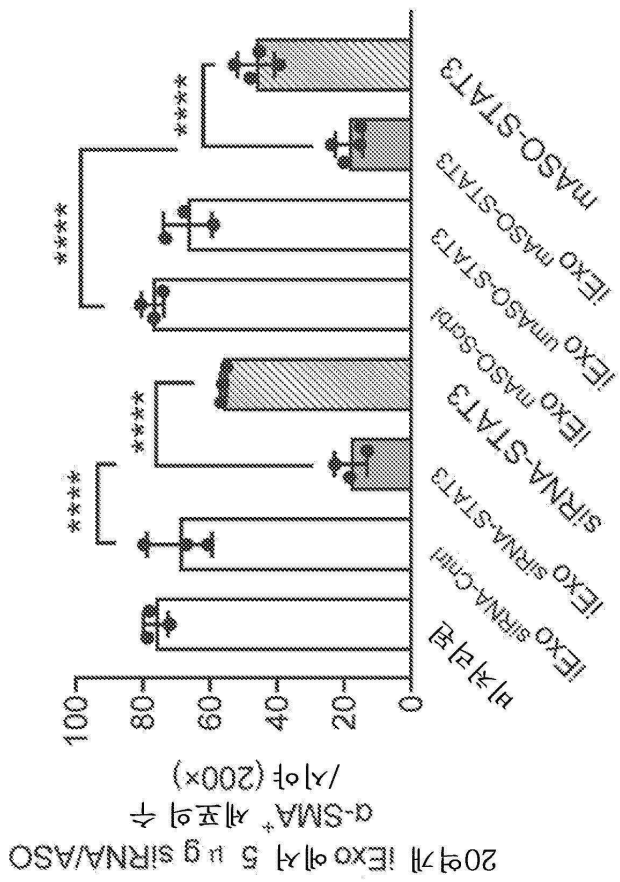
도면6h



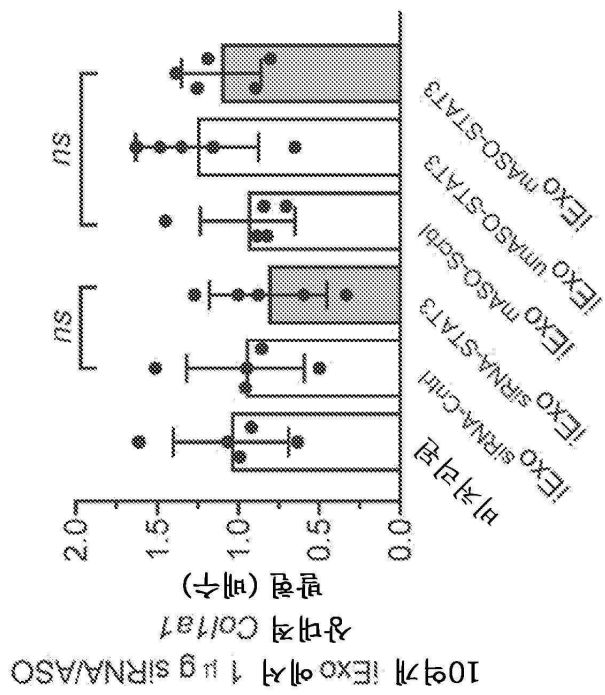
도면6i



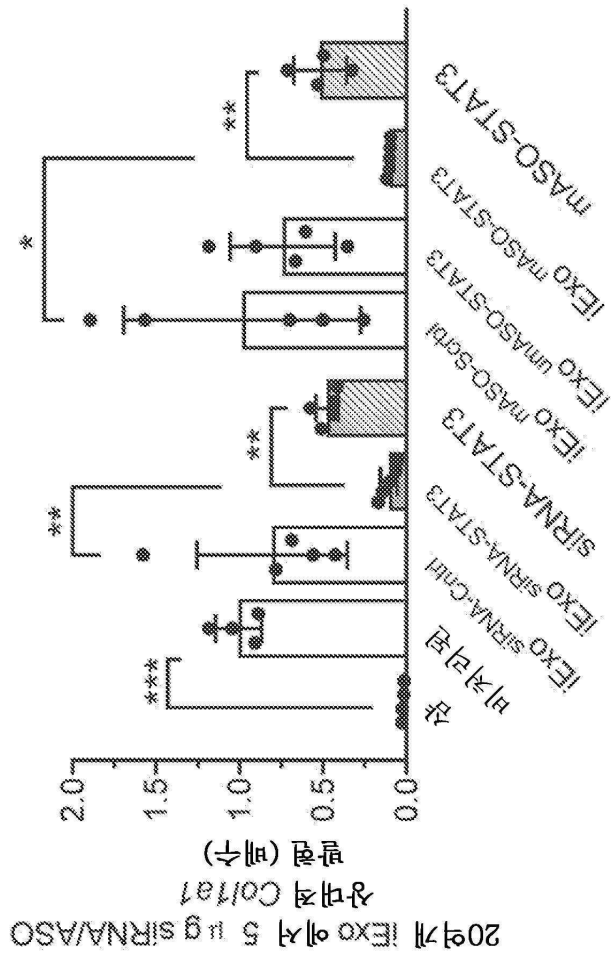
도면6j



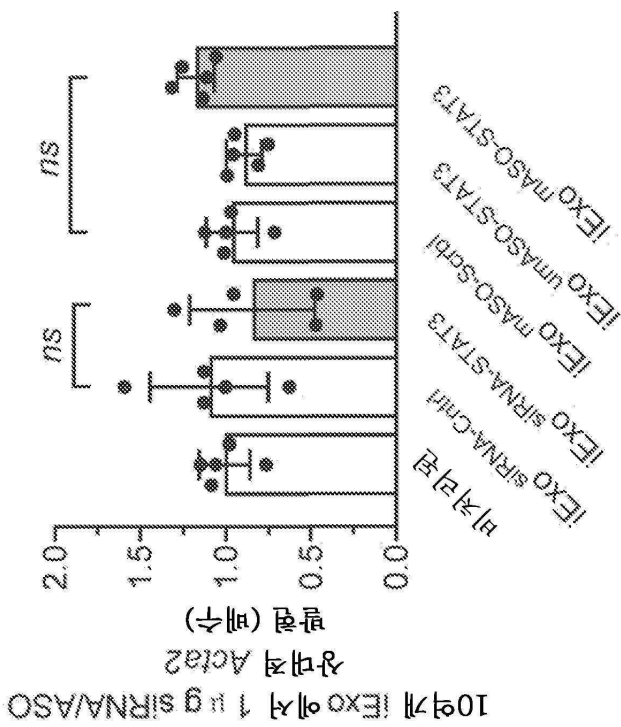
도면7a



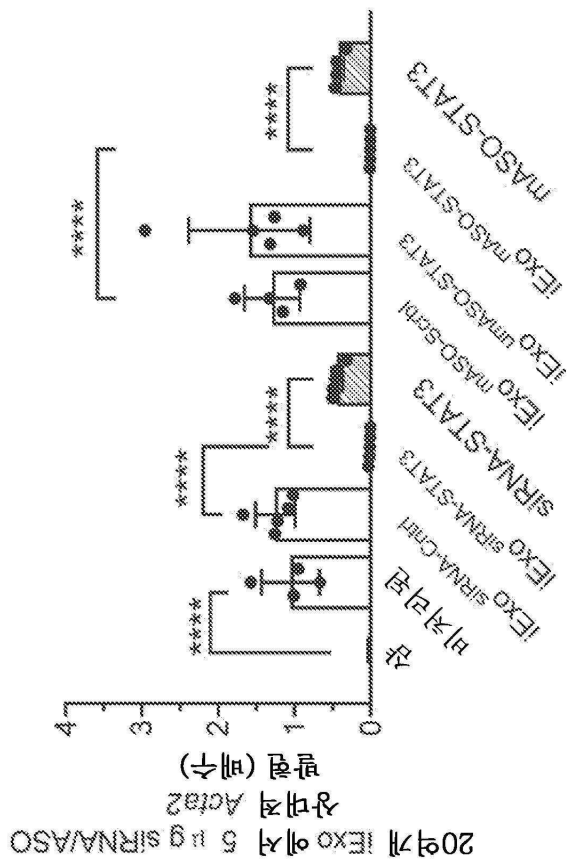
도면7b



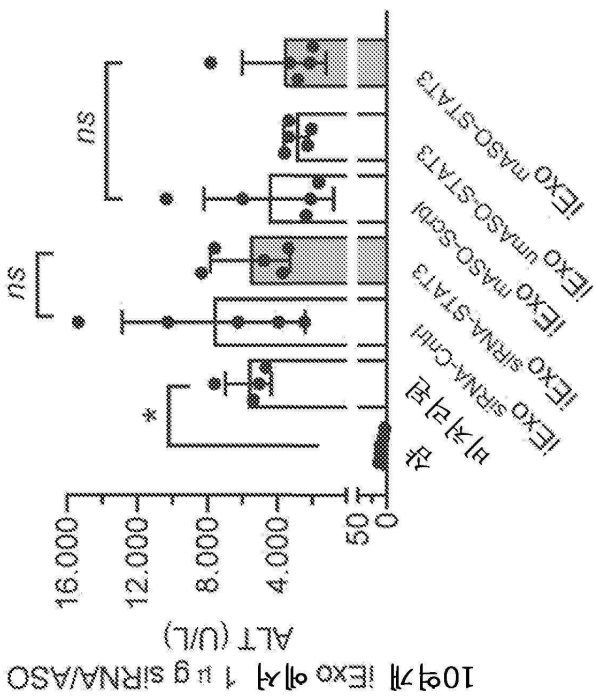
도면7c



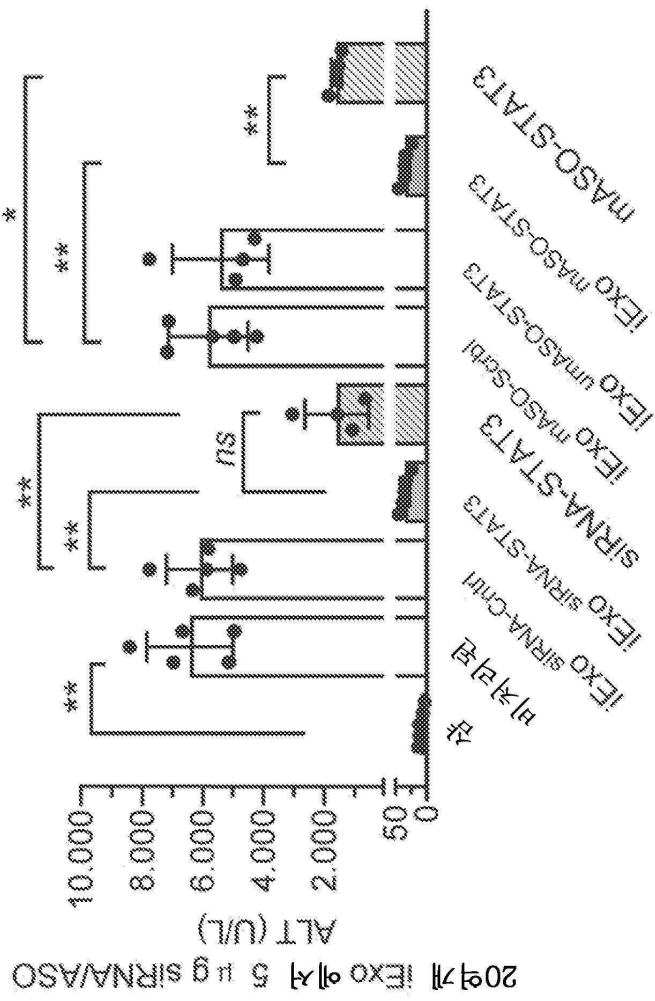
도면7d



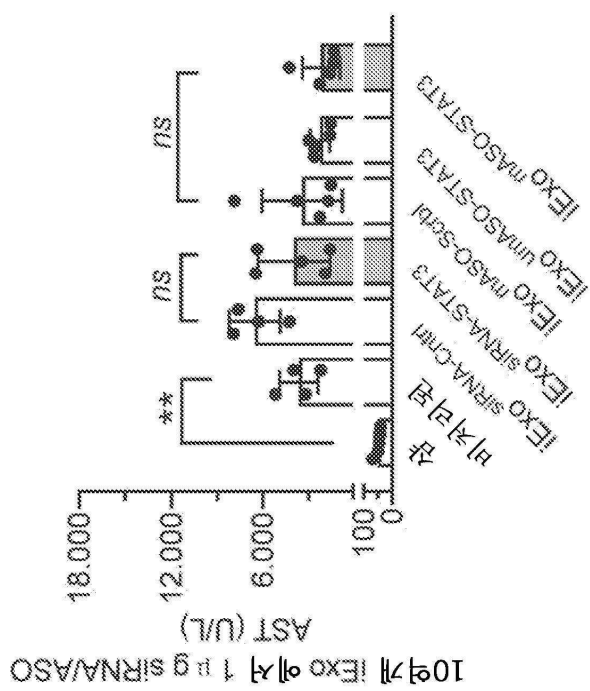
도면7e



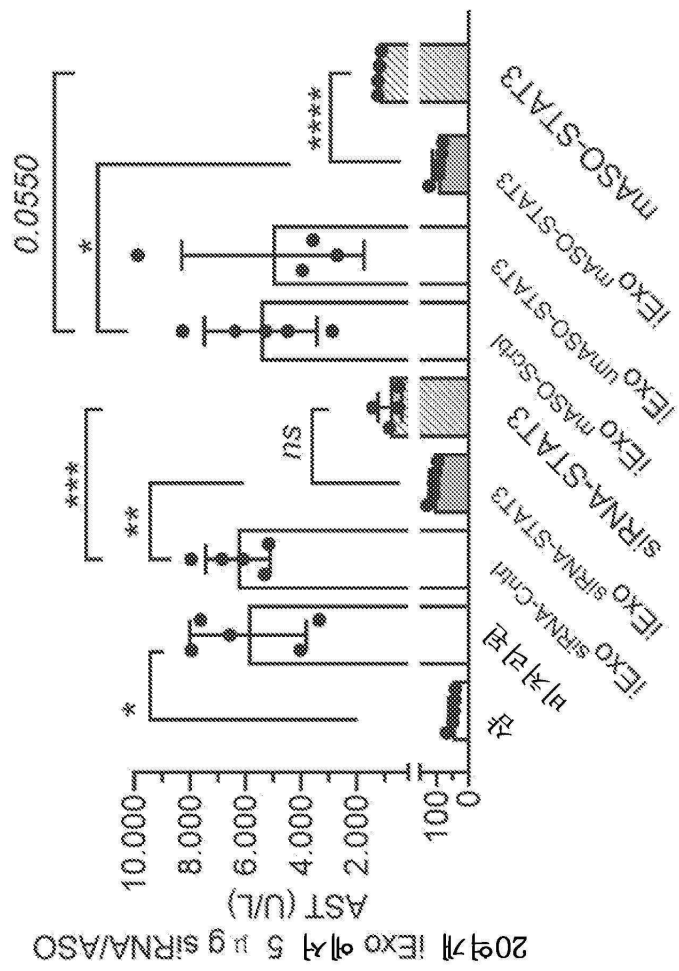
도면7f



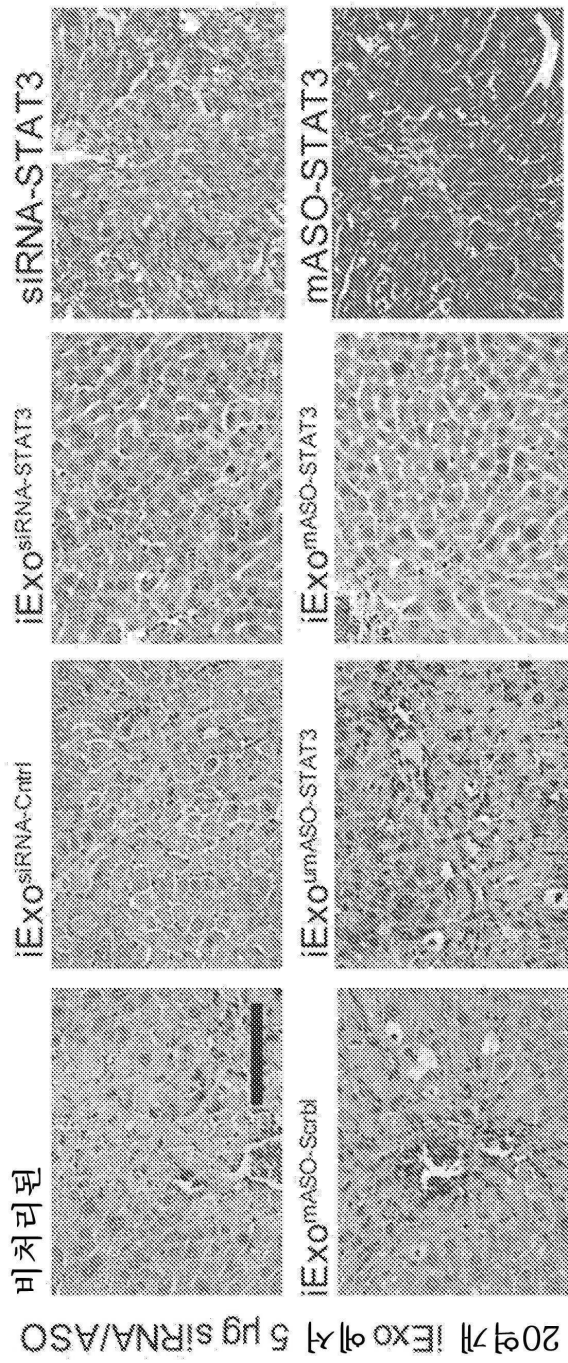
도면7g



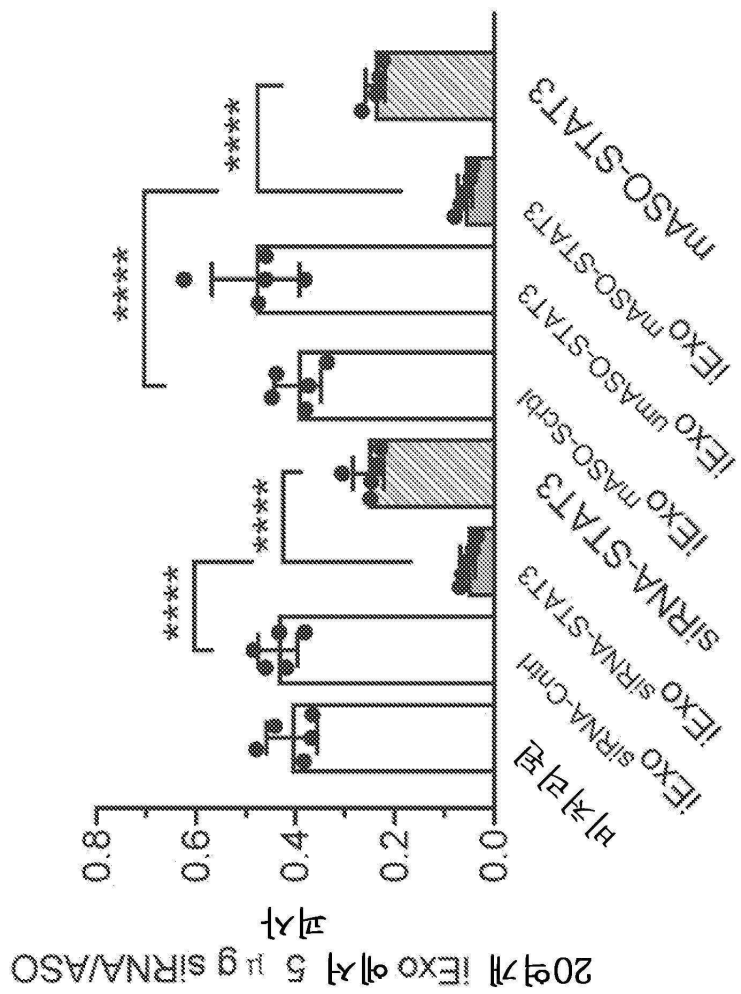
도면 7h



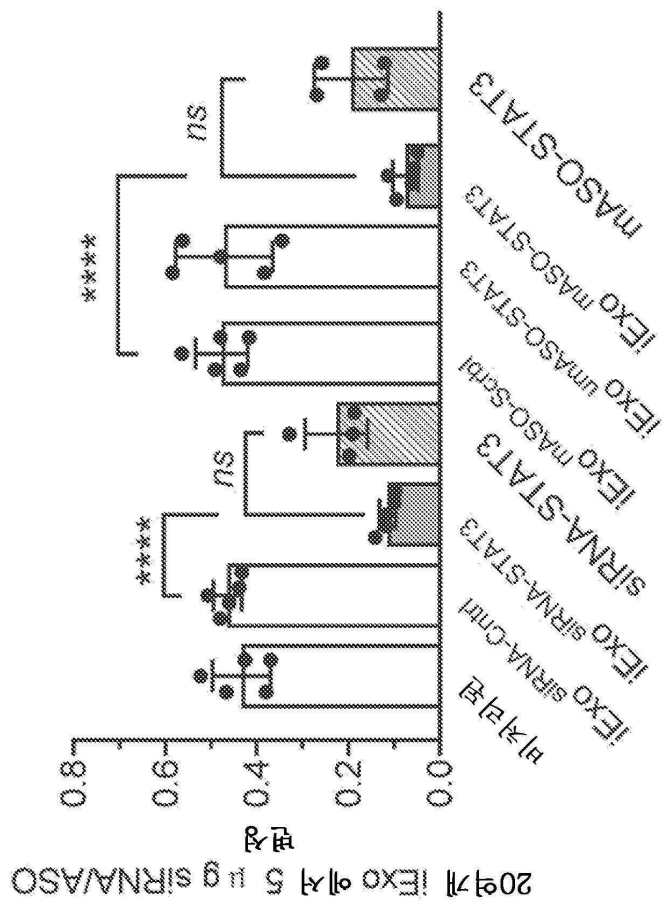
도면7i



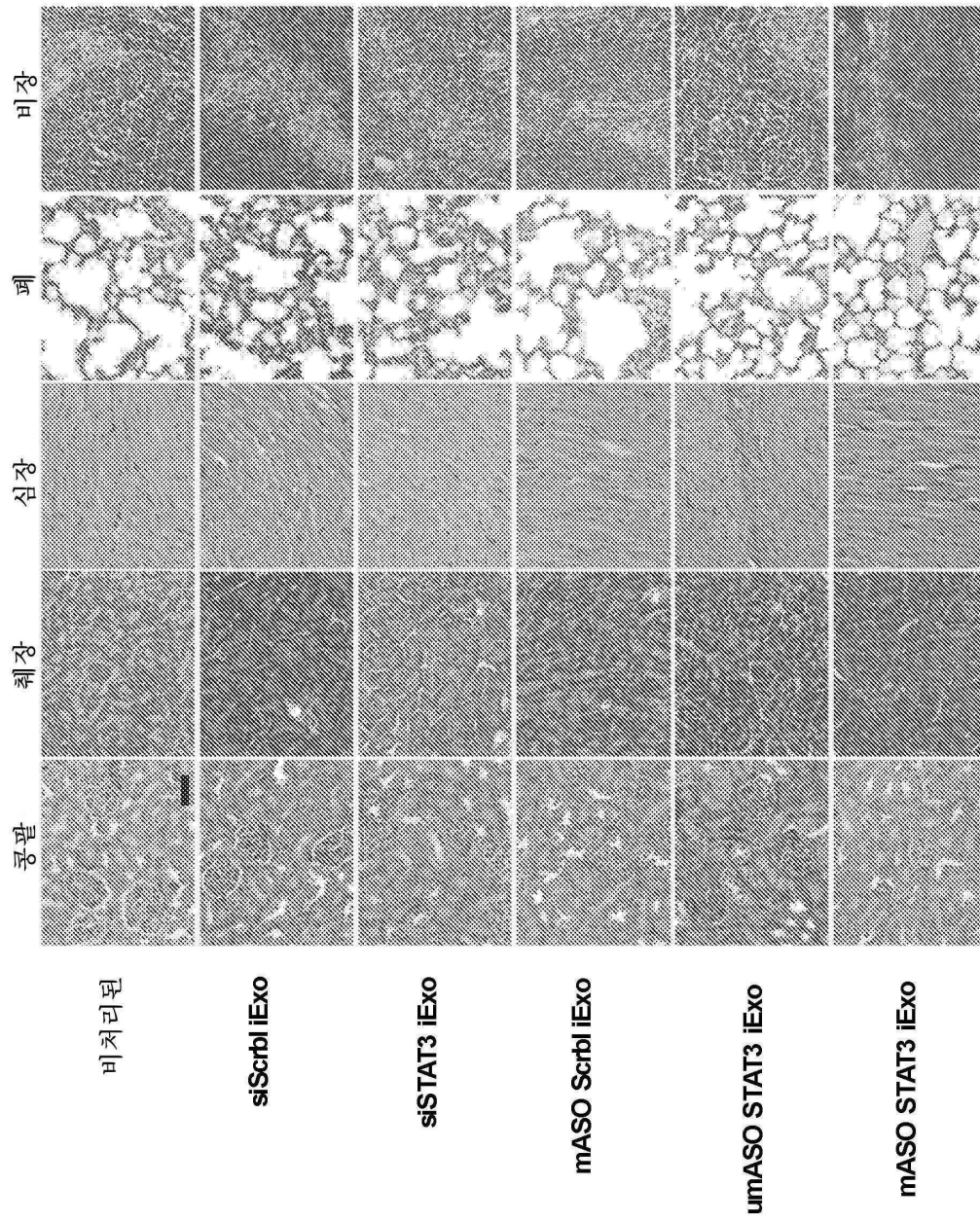
도면7j



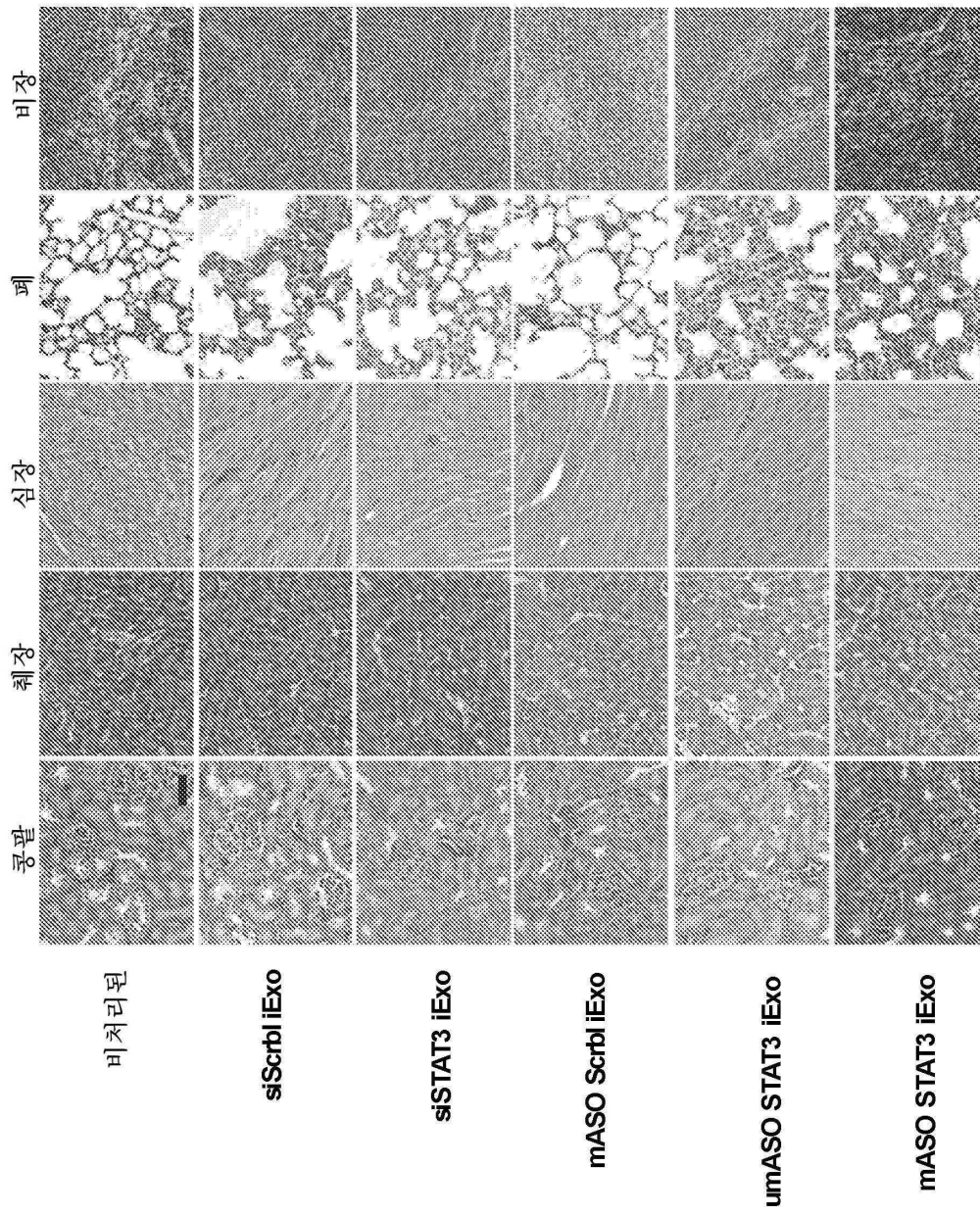
도면 7k



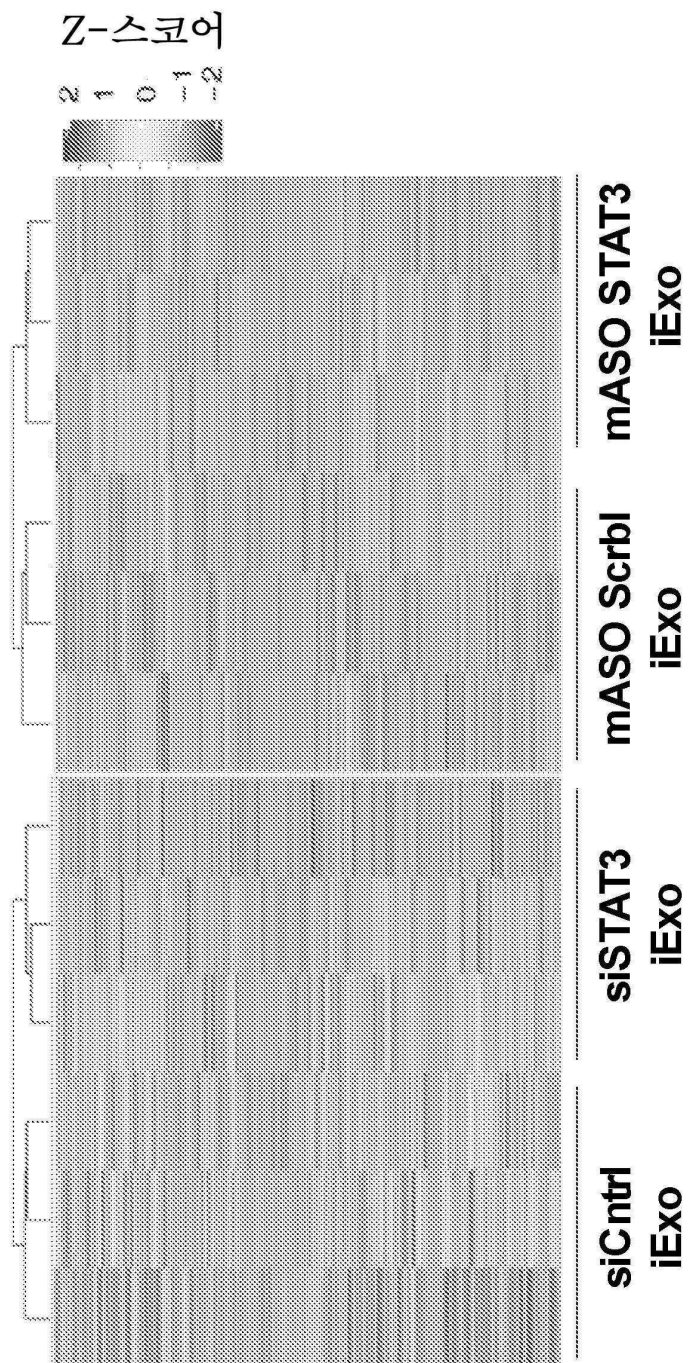
도면8a



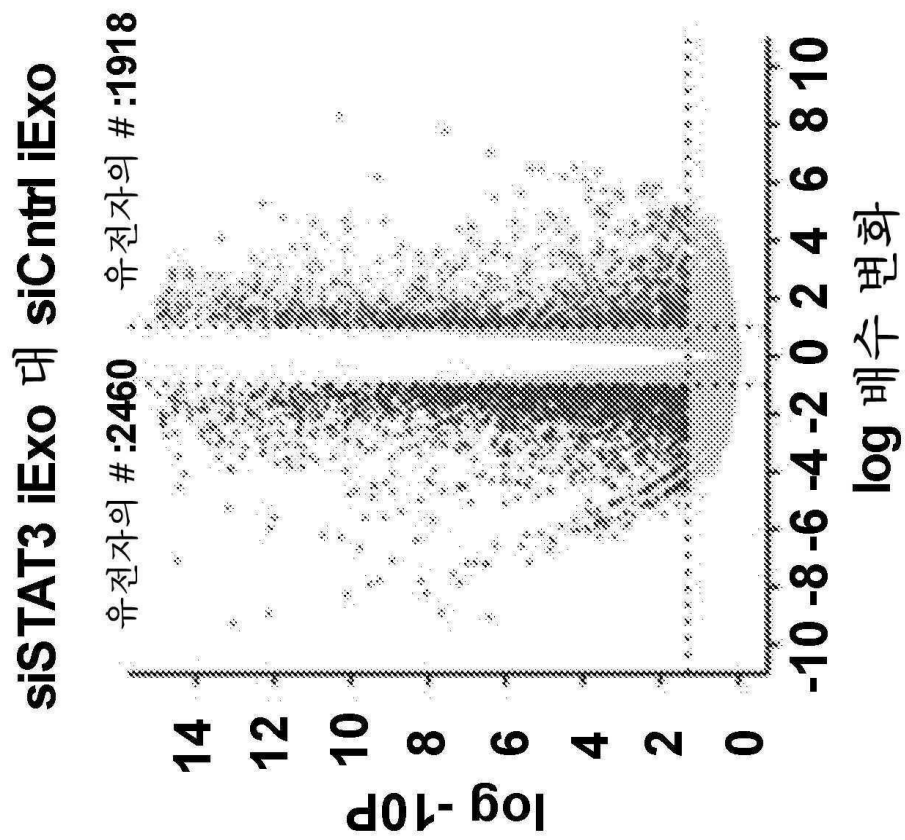
도면8b



도면9a



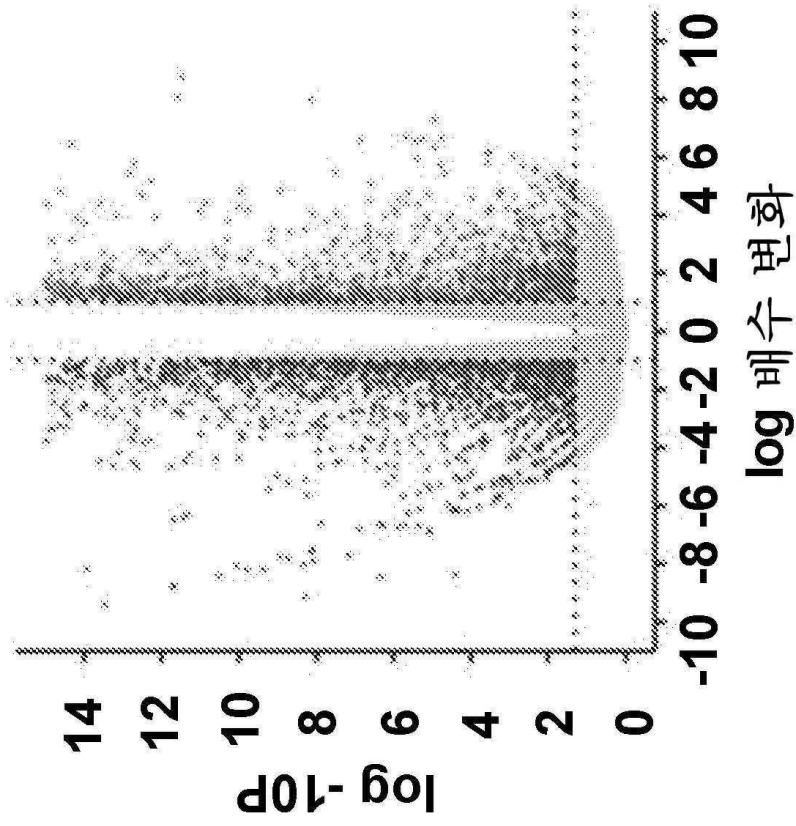
도면9b



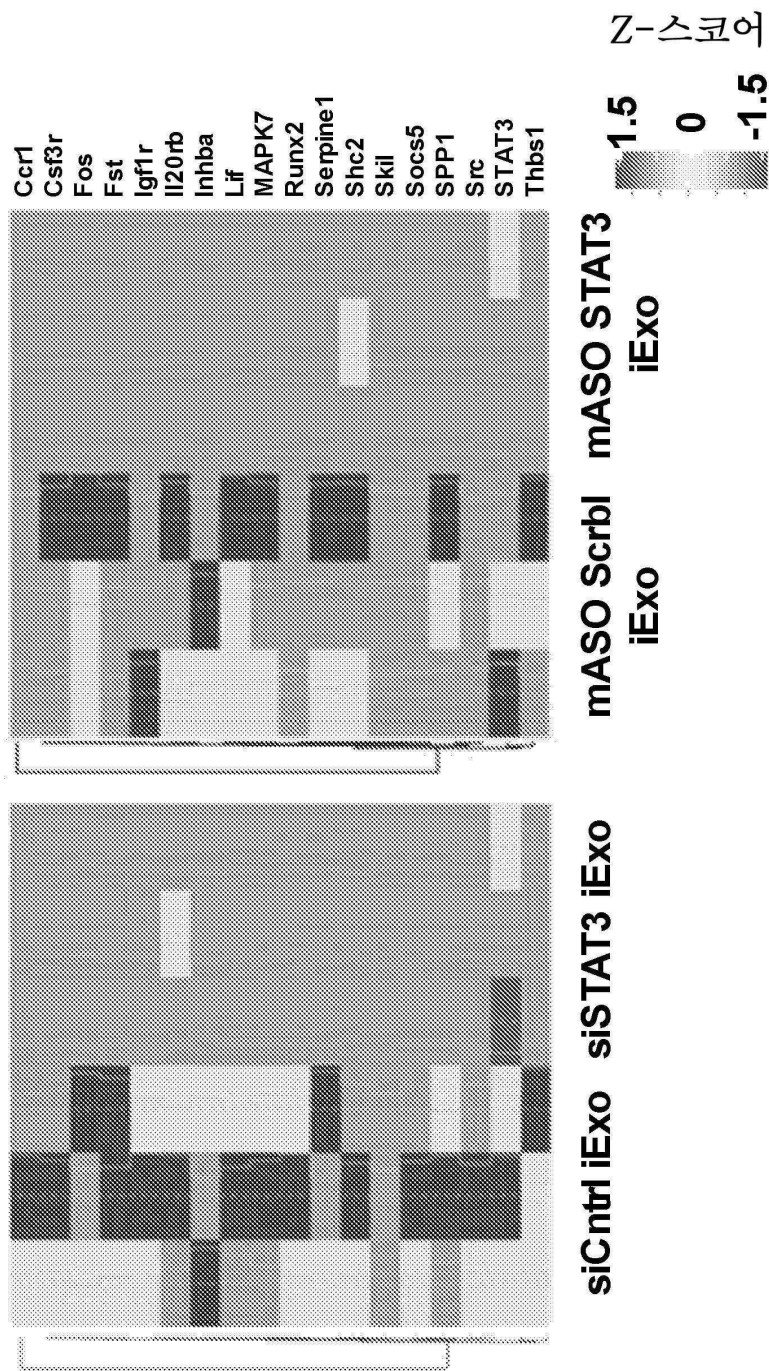
도면9c

mASO Scrbl iExo 대 mASO Scrbl iExo

유전자 # :2021 유전자의 # :2140

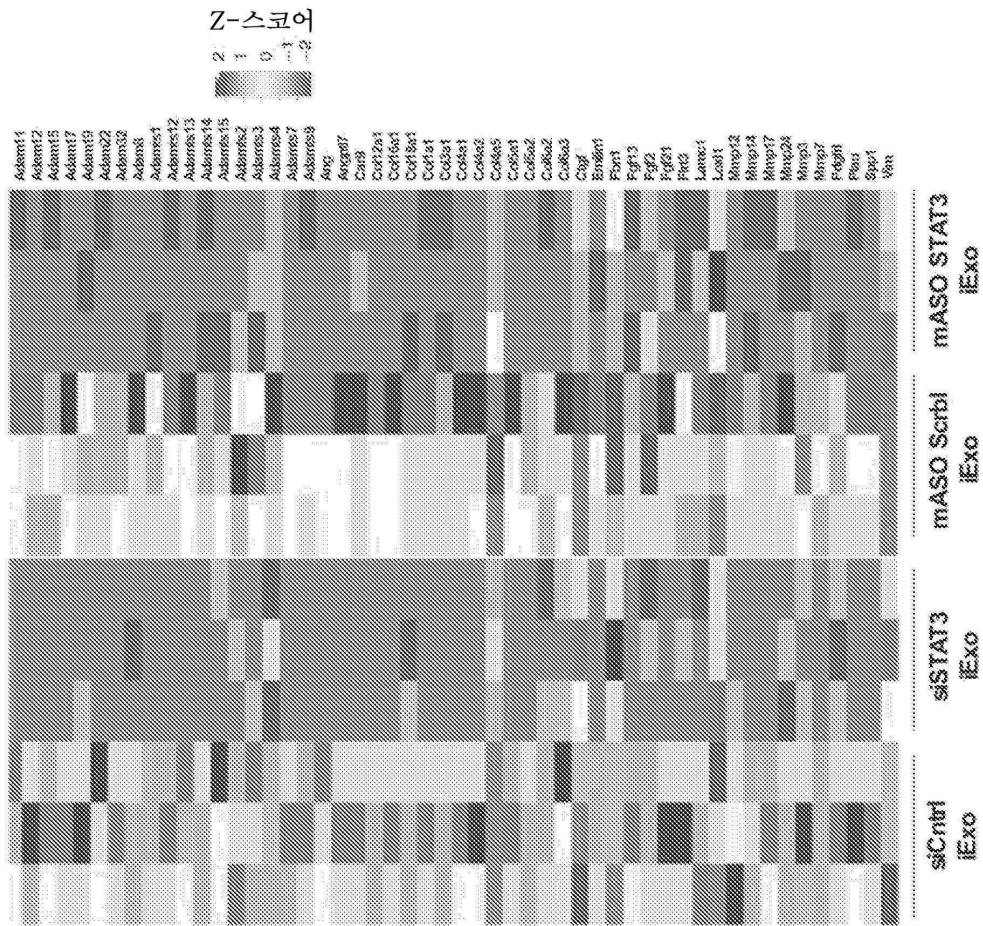


도면9d

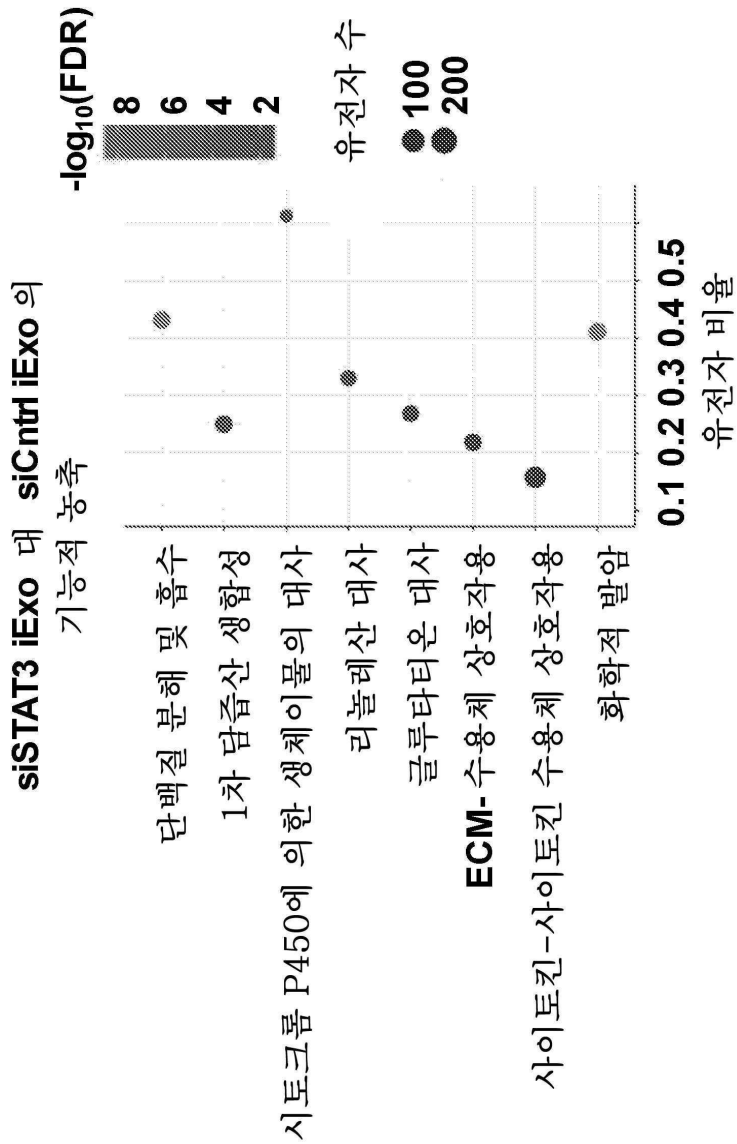


도면9e

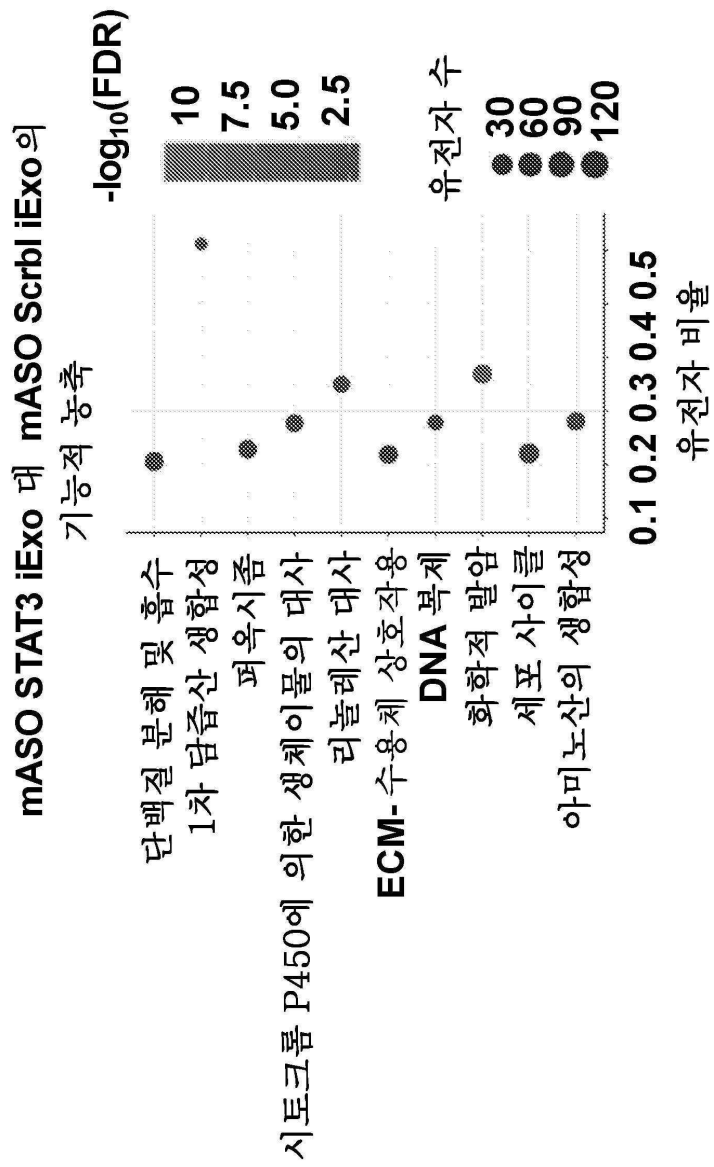
ECM 침적 및 리모델링과 관련된 선택된 프로브



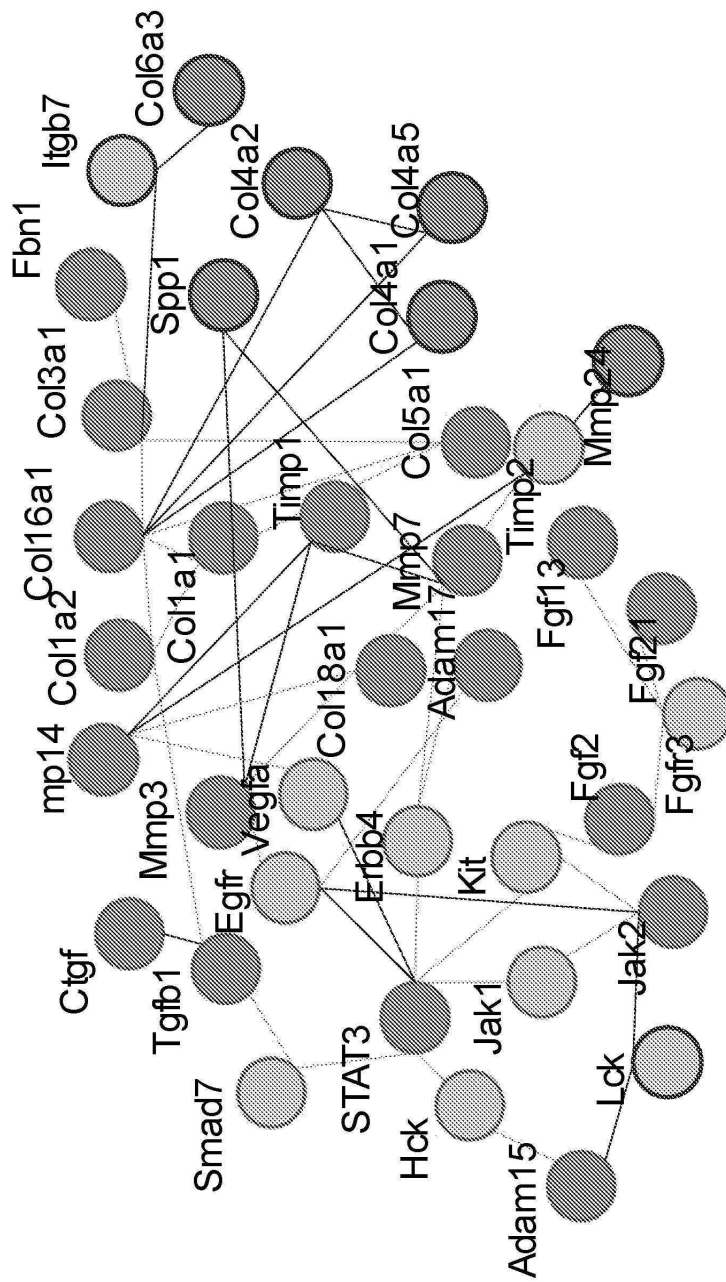
도면9f



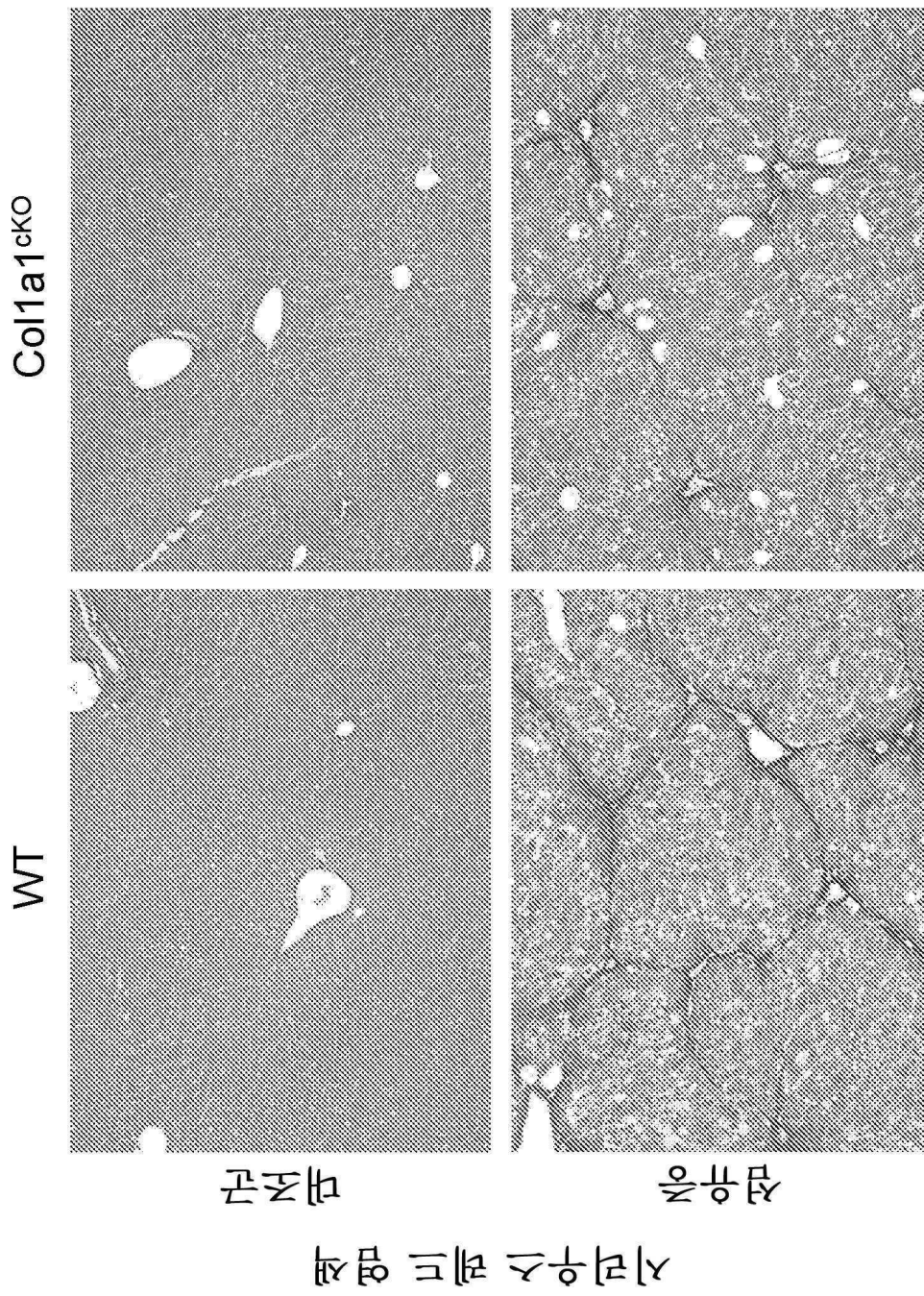
도면9g



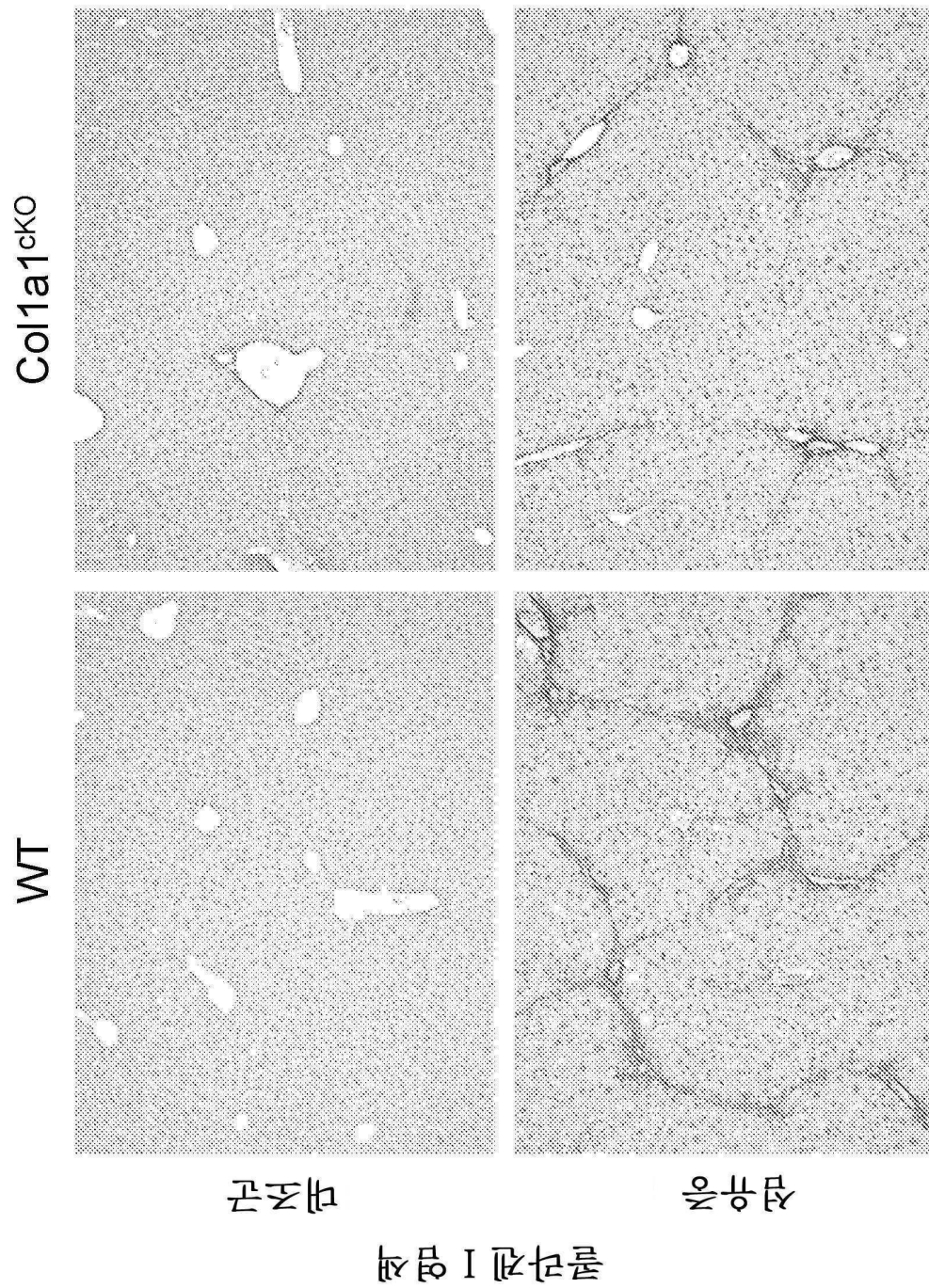
도면9h



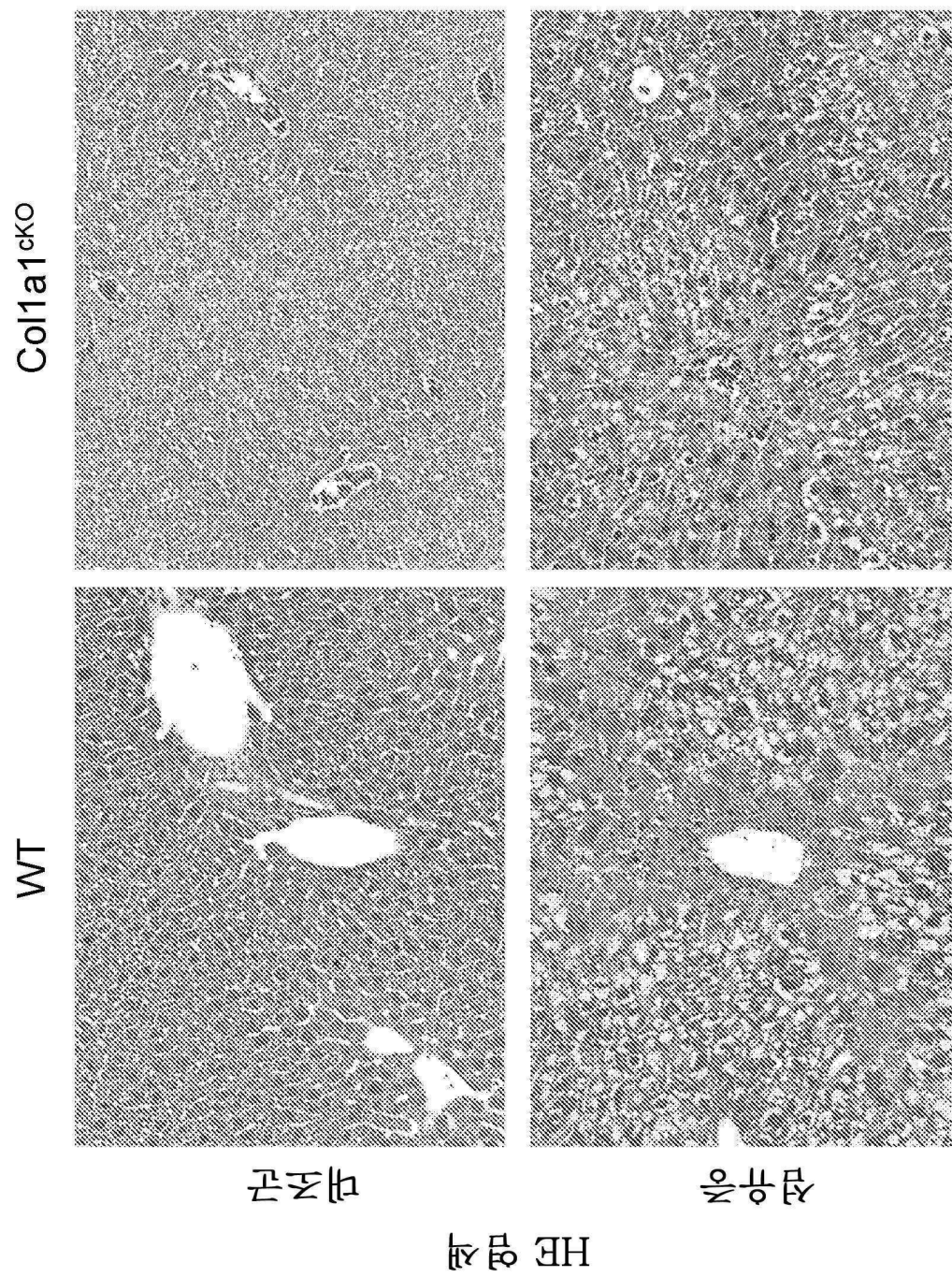
도면10a



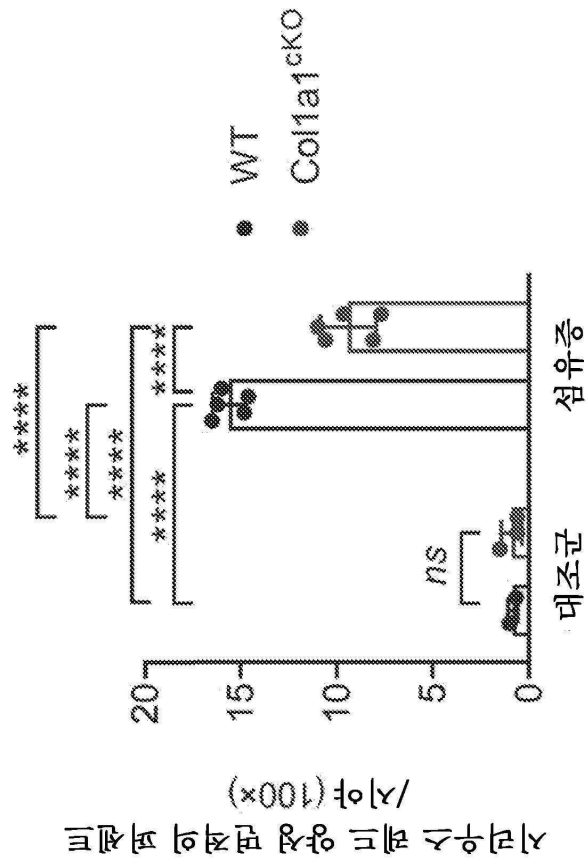
도면10b



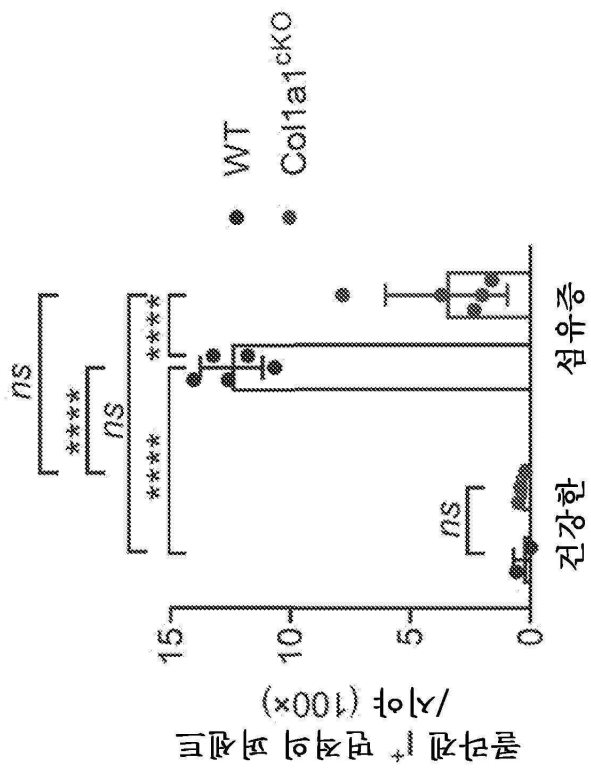
도면10c



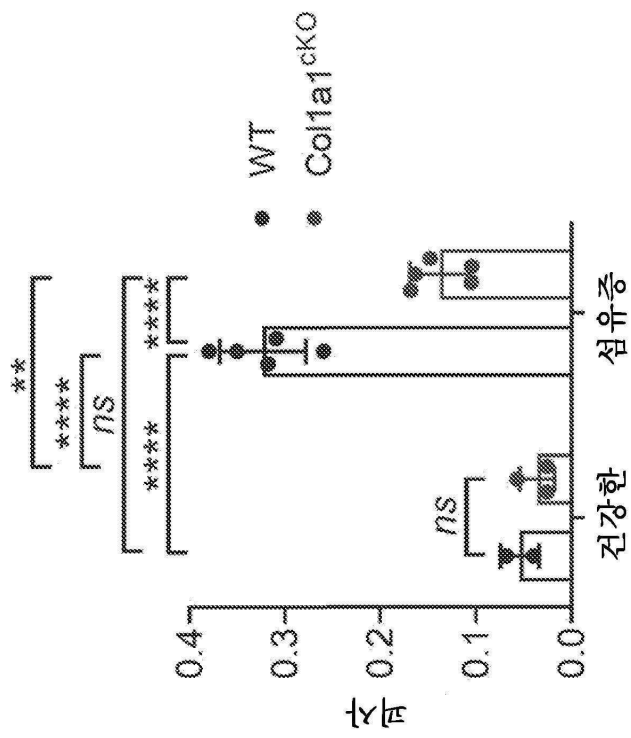
도면10d



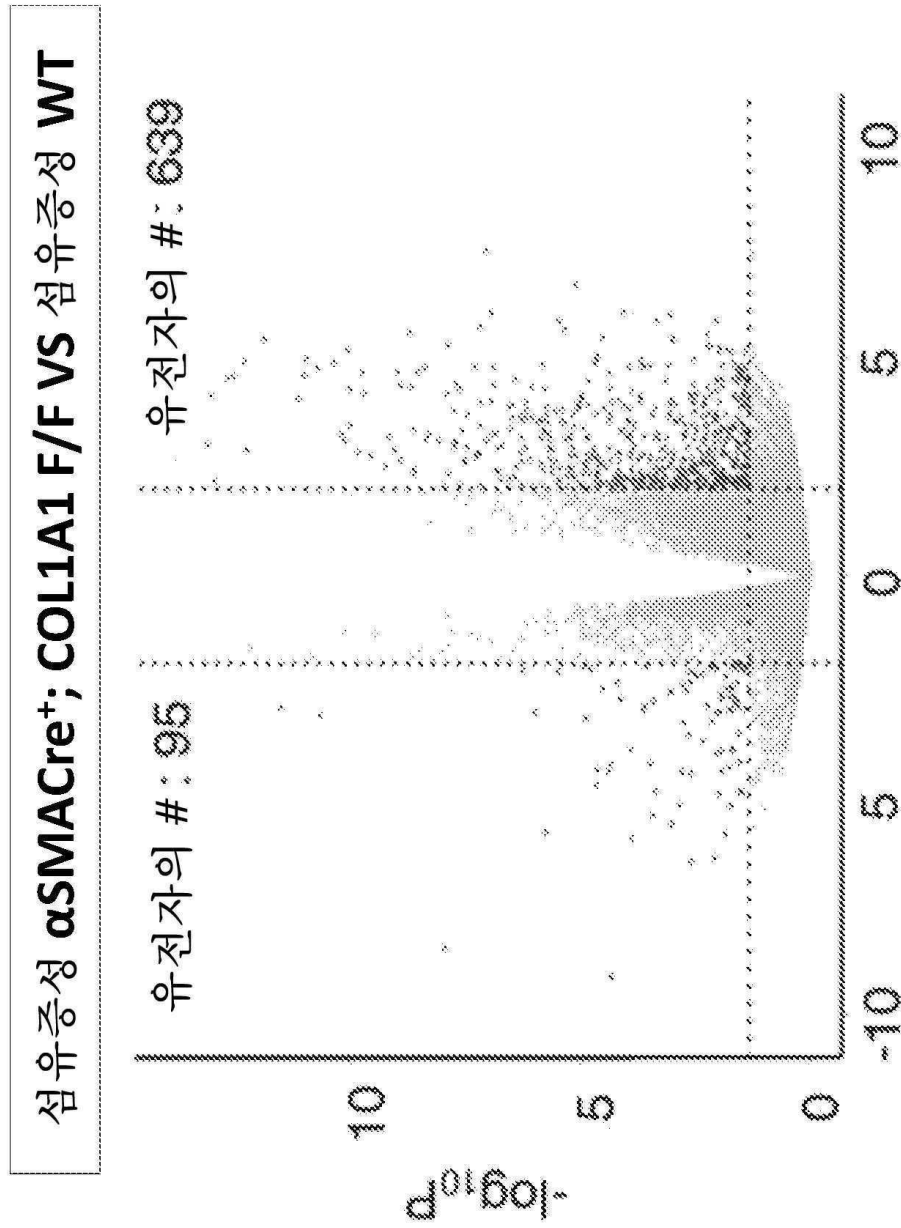
도면10e



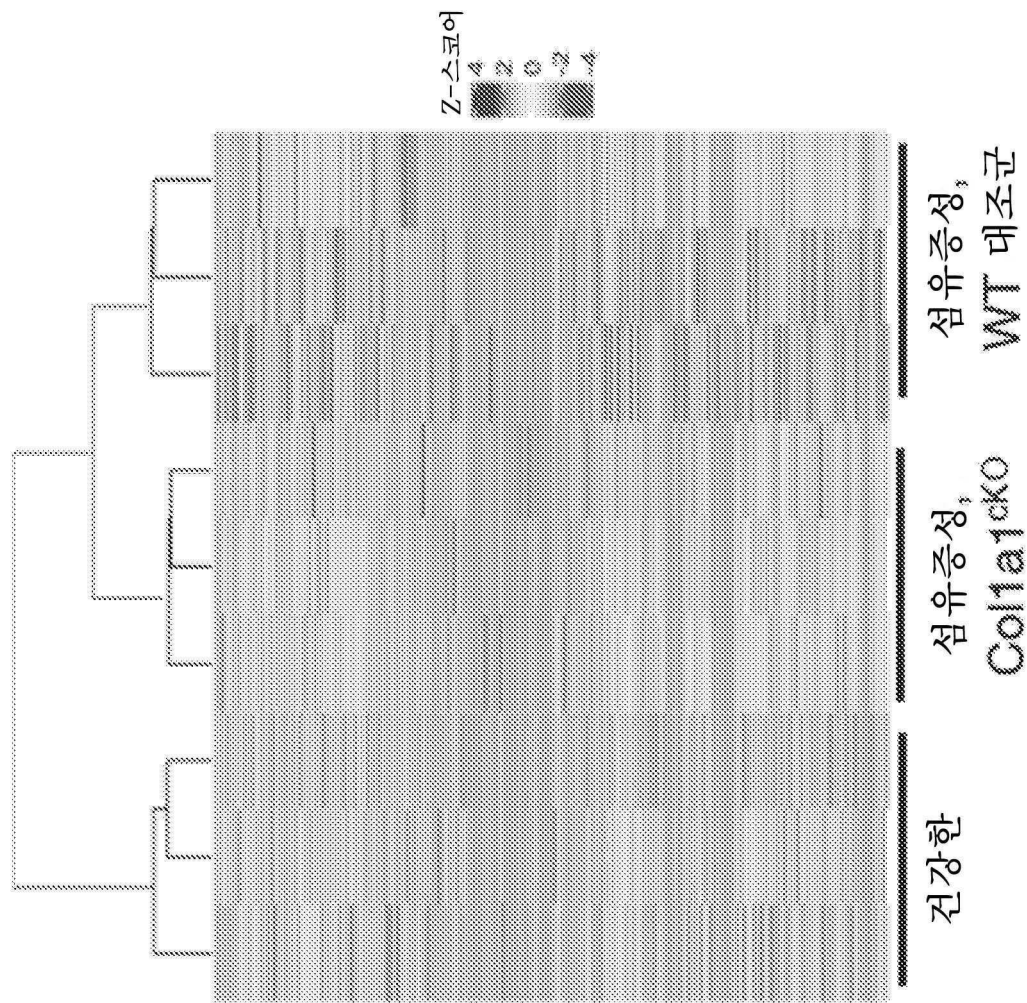
도면10f



도면10g



도면10h



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> EXOSOMES-BASED THERAPY FOR LIVER FIBROSIS AND OTHER DISEASES
ASSOCIATED WITH FIBROSIS

<130> MDAC.P1230W0

<140> PCT/US2020/063475

<141> 2020-12-04

<150> 62/943,943

<151> 2019-12-05

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 1
 guugaauuau cagcuuaaa 19

<210> 2
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <400> 2
 uuuaagcuga uaauucaac 19

<210> 3
 <211> 16
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 <223> 2' O-methoxy-ethyl base
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> Phosphorothioate bond between nucleotides

<220><221> misc_feature
 <222> (12)..(16)
 <223> 2' O-methoxy-ethyl base
 <400> 3
 ggcuacuacg ccguca 16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 4

ctatttggat gtcagc

16

<210> 5

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> 2' O-methoxy-ethyl base

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> Phosphorothioate bond between nucleotides

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(16)

<223> 2' O-methoxy-ethyl base

<400> 5

cuauuuggau gucagc

16

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 6

ctggagaaac ctgccaagta

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 7

aagagtggga gttgctgttg 20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 8

agaacctcca ggacgacttt g 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 9

tcacaatgct tctccgcatc t 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 10

catgttcagc tttgtggacc t 21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<

<400> 11

gcagctgact tcagggatgt 20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 12

gtcccagaca tcagggagta a 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 13

tcggatactt cagcgtcagg a 21