(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0005942
(43) 공개일자 2021년01월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 38/44* (2006.01)
A61K 47/46 (2017.01) *A61K 9/50* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *A61P 9/04* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) *C07K 14/54* (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/077* (2010.01)
C12N 9/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/127 (2013.01)
A61K 38/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7034813
(22) 출원일자(국제) 2019년05월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년12월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/030547
(87) 국제공개번호 WO 2019/213482
국제공개일자 2019년11월07일
(30) 우선권주장
62/666,624 2018년05월03일 미국(US)

(71) 출원인
유니버시티 오브 피츠버그 - 오브 더 커먼웰쓰 시스템 오브 하이어 에듀케이션
미국 펜실베니아 15260, 피츠버그, 130 새커리 애비뉴, 퍼스트 플로어 가드너 스틸 컨퍼런스 센터
(72) 발명자
베디락, 스티븐 프랜시스
미국, 인디애나 47906, 웨스트 라피예트, 킹스우드 로드 사우스 1150
허시, 조지 에스.
미국, 펜실베이니아 16066, 크랜베리 티더블유피, 맥도널드 드라이브 105
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **IL-33을 포함하는 매트릭스 결합 소포 (MBVS) 및 그 용도**

(57) 요 약

IL-33을 포함하는 매트릭스 결합 소포 (MBVS) 및 그 용도

이에 제한되지는 않으나 a) 장기 또는 조직의 섬유증; b) 고형 장기 이식 거부; 또는 c) 심근 경색 또는 심근 허혈이 아닌 심장병과 같은 장애가 있는 대상 개체를 치료하는 방법을 개시한다. 이러한 방법은 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체를 선택하는 단계 및 세포외 기질로부터 유래된 유리된 나노소포를 상기 개체에 치료적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 나노소포는 인터루킨-33 (IL-33) 및 리실 산화효소 (lysyl oxidase)를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이다. 추가적인 구체예에서, 근원세포 분화 (myoblast differentiation)를 증가시키는 방법을 개시한다.

(52) CPC특허분류
A61K 38/44 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/46 (2013.01)
A61K 9/5063 (2013.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A61P 9/04 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)
C12N 5/0658 (2013.01)
C12N 5/0679 (2013.01)

(72) 발명자
턴퀴스트, 헤스
미국, 펜실베이니아 15215, 피츠버그, 이스턴 에비뉴 98
드지키, 제나 린
미국, 펜실베이니아 15203, 피츠버그, 2915 시드니 스트리트, 에이피티. 410
리우, 콴
중국, 광둥 518055, 선전, 난산 디스트릭트, 룸 33디, 빌딩 3, 화훼윈먼 콤플렉스
장, 종치앙
중국, 창사 410011, 룸 1311, 7# 빌딩, 샤오샨 로드 298#

명 세 서

청구범위

청구항 1

장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체에서 장애를 치료하거나 억제하는 방법으로서 하기의 단계를 포함하는 방법:

장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체를 선택하는 단계; 및

세포외 기질로부터 유래된 분리된 나노소포를 상기 개체에 치료적으로 유효한 양으로 투여하는 단계, 여기서 상기 나노소포는 인터루킨-33 (IL-33) 및 리실 산화효소 (lysyl oxidase)를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이고, 상기 장애는 a) 장기 또는 조직의 섬유증; b) 고형 장기 이식 거부; 또는 c) 심근 경색 또는 심근 허혈이 아닌 심장 질환이다.

청구항 2

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 포유동물의 세포외 기질인 방법.

청구항 3

제 2 항의 방법에 있어서, 상기 포유동물의 세포외 기질은 인간의 세포외 기질인 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 식도 조직, 방광, 소장 점막하층, 진피, 탯줄, 심낭, 심장 조직 또는 골격근으로부터 유래된 것인 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 miR-145 및/또는 miR-181을 포함하는 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 장애는 고형 장기이식 거부이고, 상기 대상 개체는 이식된 고형 장기의 수용자인 방법.

청구항 7

제 6 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 이식된 고형장기에 투여되는 방법.

청구항 8

제 7 항의 방법에 있어서, 상기 이식된 고형장기가 심장인 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 장애가 심장병인 방법.

청구항 10

제 9 항의 방법에 있어서, 상기 심장병은 심부전 (heart failure) 또는 심장 허혈 (cardiac ischemia)인 방법.

청구항 11

제 9 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 심장병은 급성 관상동맥 증후군 (acute coronary syndrome), 만성 안정형 협심증 (chronic stable angina pectoris), 불안정 협심증 (unstable angina pectoris), 혈관 성형술 (angioplasty), 일과성 허혈 발작 (transient ischemic attack), 파행 (claudication(s)), 혈관 폐색 (vascular occlusion(s)), 동맥 경화증 (arteriosclerosis), 심부전 (heart failure), 만성 심부전 (chronic heart failure), 급성 비대상성 심부전 (acute decompensated heart failure), 심장 비대 (cardiac hypertrophy), 심장 섬유증 (cardiac fibrosis), 대동맥판증 (aortic valve disease), 대동맥 또는 승모판 협착증 (aortic or mitral valve stenosis), 심근증 (cardiomyopathy), 심방세동 (atrial fibrillation), 심장 부정맥 (heart arrhythmia) 및 심낭 질환 (pericardial disease) 등을 포함하는 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 정맥내로 투여되는 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 장애가 장기 또는 조직의 섬유증인 방법.

청구항 14

제 13 항의 방법에 있어서, 상기 섬유증이 간경변 (cirrhosis of the liver), 폐 섬유증 (pulmonary fibrosis), 심장 섬유증 (cardiac fibrosis), 종격 섬유증 (mediastinal fibrosis), 관절섬유화 (arthrofibrosis), 골수 섬유증 (myelofibrosis), 신원성 전신 섬유증 (nephrogenic systemic fibrosis), 켈로이드 섬유증 (keloid fibrosis), 경피증 섬유증 (scleroderma fibrosis), 신장 섬유증 (renal fibrosis), 림프조직 섬유증 (lymphatic tissue fibrosis), 동맥 섬유증 (arterial fibrosis), 모세혈관 섬유증 (capillary fibrosis), 혈관 섬유증 (vascular fibrosis), 또는 췌장 섬유증 (pancreatic fibrosis)인 방법.

청구항 15

제 14 항의 방법에 있어서, 상기 섬유증이 폐 섬유증인 방법.

청구항 16

제 14 항의 방법에 있어서, 상기 섬유증이 심장 섬유증인 방법.

청구항 17

제 16 항의 방법에 있어서, 상기 심장 섬유증은

a) 비대성 심근증 (hypertrophic cardiomyopathies), 사르코이드증 (sarcoidosis), 만성 신부전 (chronic renal insufficiency), 독성 심근증 (toxic cardiomyopathies), 허혈-재관류 손상 (ischemia-reperfusion injury), 급성 장기 거부 (acute organ rejection), 만성 장기 거부 (chronic organ rejection), 노화 (aging), 만성 고혈압 (chronic hypertension), 비-허혈성 확장성 심근증 (non-ischemic delated cardiomyopathy), 부정맥 (arrhythmia), 죽상 경화증 (atherosclerosis), HIV-관련 만성 혈관 질환 (HIV-associated chronic vascular disease), 및 폐 고혈압 (pulmonary hypertension); 또는

b) 심근경색 (myocardial infarction) 또는 심근허혈 (myocardial ischemia)에 의한 것인 방법.

청구항 18

제 15 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 흡입에 의해 환자에게 투여되는 방법.

청구항 19

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 대상 개체에게 매주, 격월 또는 매월 투여되는 방법.

청구항 20

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 치료적 유효량의 추가 치료제를 대상 개체에 투여하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 21

제 20 항의 방법에 있어서, 상기 추가 치료제는 면역 억제제인 방법.

청구항 22

제 21 항의 방법에 있어서, 상기 면역 억제제는 칼시뉴린 억제제 (calcineurin inhibitor), 항증식제 (antiproliferative agent), mTOR 억제제 (mTOR inhibito) 및/또는 스테로이드 (steroids)인 방법.

청구항 23

제 22 항의 방법에 있어서, 상기 칼시뉴린 억제제는 타크로리무스 (tacrolimus) 또는 사이클로스포린 (cyclosporine)이고; 상기 항증식제는 마이코페놀레이트 (mycophenolate)이며; 상기 mTOR 억제제는 시롤리무스 (sirolimus)이고, 및/또는 상기 스테로이드는 프레드니손 (prednisone), 하이드로코르티손 (hydrocortisone) 또는 코르티손 (cortisone)인 방법.

청구항 24

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 개체는 인간인 방법.

청구항 25

개체에서 장애를 치료 또는 억제하는데 사용하기 위한 조성물로서, 상기 조성물은 세포외 기질로부터 유래된 치료적 유효량의 분리된 나노소포를 포함하며, 상기 나노소포는 인터루킨-33 (IL-33) 및 리실 산화효소 (lysyl oxidase)를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이고, 상기 장애는 a) 장기 또는 조직의 섬유증; b) 고형 장기이식 거부; 또는 c) 심근 경색 (myocardial infarction)이 아닌 심장병이다.

청구항 26

제 25 항의 조성물에 있어서, 추가 치료제를 더 포함하는 조성물.

청구항 27

제 26 항의 조성물에 있어서, 상기 추가 치료제는 면역 억제제인 조성물.

청구항 28

제 27 항의 조성물에 있어서, 상기 면역 억제제는 칼시뉴린 억제제 (calcineurin inhibitor), 항증식제 (antiproliferative agent), mTOR 억제제 (mTOR inhibito) 및/또는 스테로이드 (steroids)인 조성물.

청구항 29

제 28 항의 조성물에 있어서, 상기 칼시뉴린 억제제는 타크로리무스 (tacrolimus) 또는 사이클로스포린 (cyclosporine)이고; 상기 항증식제는 마이코페놀레이트 (mycophenolate)이며; 상기 mTOR 억제제는 시롤리무스 (sirolimus)이고, 및/또는 상기 스테로이드는 프레드니손 (prednisone), 하이드로코르티손 (hydrocortisone) 또는 코르티손 (cortisone)인 조성물.

청구항 30

하기의 단계를 포함하는, 근원세포 분화를 증가시키는 방법: 근원세포를 세포외 기질로부터 유래된 유효량의 분리된 나노소포와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 나노소포는 인터루킨 (IL)-33 및 리실 옥시다제를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이다.

청구항 31

제 30 항의 방법에 있어서, 상기 근원세포는 시험관 내의 세포인 방법.

청구항 32

제 30 항 또는 제 31 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 포유동물의 세포외 기질인 방법.

청구항 33

제 32 항의 방법에 있어서, 상기 포유동물의 세포외 기질은 인간의 세포외 기질인 방법.

청구항 34

제 30 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 식도 조직, 방광, 소장 점막하층, 진피, 탯줄, 심낭, 심장 조직 또는 골격근으로부터 유래된 것인 방법.

청구항 35

제 30 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 miR-145 및/또는 miR-181을 포함하는 방법.

청구항 36

제 30 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 근원세포는 포유동물 개체의 세포인 방법.

청구항 37

제 36 항의 방법에 있어서, 상기 포유동물 개체는 인간인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2018년 5월 3일자로 출원된 미국 가출원 번호 62/666,624의 우선권을 주장하며, 이는 본 명세서에 참조로 통합된다.

[0003] 정부 지원에 대한 서술

[0004] 본 발명은 국립 보건원 보조금 번호 AR073527 및 HL12248로 수여되는 정부의 지원금을 받아 이루어졌으며, 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 가지고 있다.

[0005] 본 발명은 a) 장기 또는 조직의 섬유증, b) 고형 장기 이식 거부 및 c) 심장 질환의 치료를 위한, 인터루킨-33 (IL-33)을 포함하는 막-결합 나노소포 (MBV)의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0006] 심장 질환 또는 심장 손상은 섬유증을 유발하여 심근 경색, 심장 기능 상실 및 심부전 (HF)을 초래한다. 심근 허혈 (MI) 후의 대치 섬유화 (replacement fibrosis)는 손상된 심근세포가 섬유아세포 및 이와 관련된 과도한 세포외 기질 (ECM)로 대체됨에 따라 발생한다 (Travers et al., *Circulation research* 118, 1021-1040 (2016)). 반응성 간질 섬유증 (reactive interstitial fibrosis)은 미세혈관 및 국소심근 주변 부위에 영향을 미치며 심장이식 (heart transplant, HTx)후의 만성 동종이식 거부 (chronic allograft rejection, CR)에 기여한다. CR은 이식 후 11년 이내에 50% 이상의 이식편 손실을 유발한다 (Libby and Pober, *Immunity* 14, 387-397 (2001)). 과도한 염증은 불리한 심장 리모델링 및 HF로의 진행과 관련이 있다. 많은 실험적 연구에 의하면 MI 또는 HTx 후의 염증을 적시에 해결하면 면역 기반 섬유증의 발생과 진행을 예방할 수 있다 (Frangogiannis, *Nature Reviews Cardiology* 11, 255 (2014); Suthahar, *Current Heart Failure Reports* 14, 235-250 (2017)). 그러나, MI 후 심장 손상 또는 HTx 후 허혈-재관류 손상 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 및 면역 매개 공격 (immune-mediated attack)으로 인한 섬유증을 예방하거나 역전시킬 수 있는 효과적 치료 방법은 없는 현실이다.

[0007] 포유류의 세포외 기질 (extracellular matrix, ECM)로 구성된 생물학적 스캐폴드 (biologic scaffolds)는 의료용 메쉬 (surgical mesh) 재료, 국소 상처 치료용 분말 및 하이드로젤로서 개발되었다. 이들은 대동맥 및 승모판 교체 (Gerdisch et al., *J. of thoracic and cardiovascular surgery* 148, 1370-1378 (2014); Brown et

al., *The Annals of thoracic surgery* 91, 416-423 (2011)) 및 선천성 심장 결함 개선 (Scholl et al., *World Journal for Pediatric and Congenital Heart* Surgery 1, 132-136 (2010))을 포함한 다수의 임상 적용을 위해, 그리고 Fallot의 4 징후 (tetralogy of Fallot, TOF)의 1차 수리 중 천연 폐동맥판 (native pulmonary valve)을 증가시키기 위한 심장 패치 (Dharmapuram et al., *World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery* 8, 174-181 (2017))로서 승인되었다. ECM 하이드로젤은 심근의 내인성 복구를 직접적으로 촉진하는 것으로 나타났으며 (Ungerleider & Christman; *Stem Cells Transl Med* 3, 1090-1099 (2014); Hernandez & Christman, *JACC Basic Transl Sci* 2, 212-226 (2017); Wassenaar *et al.*, *J Am Coll Cardiol* 67, 1074-1086 (2016)) 현재 심근 경색 후 심장 조직의 복구를 촉진하기 위한 심장내 주사에 대한 1상 임상 시험을 수행 중이다 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02305602). 이러한 ECM 기반 물질은 일반적으로 기원이 이종이며 (xenogeneic), 진피, 방광 또는 소장 점막하층 (small intestinal submucosa, SIS) 같은 근원조직 (source tissue)을 이용한 세포제거술 (decellularization)로 제조된다 (Keane et al., *Methods* 84, 25-34 (2015)). 이종의 ECM 스캐폴드 (xenogeneic ECM scaffolds)는 불리한 선천성 또는 적응성 면역 반응을 유발하지 않으며, 실제로 항-염증 반응과 선천성 및 적응성 면역 반응의 회복을 지원한다 (Huleihel *et al.*, in *Seminars in Immunology*, 39:2-13 (2017)). 이러한 자연 발생적인 생체 물질의 사용은 일반적으로 부위에 적합한 기능적 조직의 적어도 부분적 복원, 즉 "건설적 리모델링 (constructive remodeling)" 이라고 하는 프로세스와 관련이 있다 (Martinez et al., *F1000Prime Rep* 6:13 (2014)). 논쟁의 여지가 있지만, 다운스트림 기능 리모델링 결과의 주요 결정 요인은 ECM 바이오 스캐폴드에 대한 초기 선천성 면역 반응이다 (Brown, et al., *Acta Biomater*, 8:978-987 (2012)). ECM 바이오 스캐폴드 또는 그 분해 산물은 전 염증성 M1 유사대식세포 (pro-inflammatory M1-like macrophage) 및 Th1 T 세포 표현형에서 프로-리모델링 M2 유사 대식세포 (pro-remodeling M2-like macrophage) 및 Th2 (T helper Type 2) 세포로의 전환을 촉진하여 조직 복구를 지시하는 것으로 나타났다 (Huleihel, *et al.Seminars in Immunology*, 29:2-13(2017)). 많은 연구에 따르면, 대식세포 활성화 상태의 적절한 시간 전환이 골격근 (Kuswanto *et al.*, *Immunity* 44, 355-367 (2016); Serrels *et al.*, *Sci. Signal.* 10, 508 (2017)) 및 심혈관계 (Oboki et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 18581-18586 (2010); Townsend et al., *Journal of Experimental Medicine* 191, 1069-1076 (2000))를 포함한 수많은 해부학적 부위에서 흉터조직 형성보다는 조직 리모델링 및 상처 치유 과정을 촉진하는데 필요하다는 것을 보여주었다. 이러한 전환은 면역 억제가 아니라 국소적인 대식세포 표현형 (local macrophage phenotype)의 표현형 변화를 촉진하는 면역 조절의 건설적 형태이다 (Oliveira et al., *PloS one* 8, e66538 (2013); Reing et al., *Biomaterials* 31, 8626-8633 (2010)). 그러나, 이전에는 ECM의 어떤 구성 요소가 상기 기능을 가지고 있는지는 알려지지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체에서 장애를 치료하거나 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체에서 장애를 치료하거나 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 상기 장애는 a) 장기 또는 조직의 섬유증; b) 고형 장기 이식 거부; 또는 c) 심근 경색 또는 심근 허혈이 아닌 심장 질환이다. 이러한 방법은 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체를 선택하는 단계 및 세포외 기질로부터 유래된 유리된 나노소포를 상기 개체에 치료적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 나노소포는 인터루킨-33 (IL-33) 및 리실 산화효소 (lysyl oxidase)를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이다.

[0010] 추가적인 구체예에서, 근원세포 분화 (myoblast differentiation)를 증가시키는 방법을 개시한다. 이러한 방법은 근원세포를 세포외 기질에서 유래된 유효량의 유리된 나노소포와 접촉시키는 단계를 포함하며 여기서 상기 나노소포는 인터루킨-33 (IL-33) 및 리실 산화효소 (lysyl oxidase)를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이다.

[0011] 일부 비 제한적인 실시예에서, 상기 나노소포는 개체의 대식세포에서 CD68 및 CD-11b의 발현을 유지한다.

[0012] 상기 및 다른 특징 및 이점은 첨부된 도면을 참조하여 진행되는 여러 실시 예에 대한 다음의 상세한 설명으로

더욱 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] **도 1a-1e: ECM 바이오 스캐폴드에서 분리된 MBV는 전장 (full-length)의 IL-33을 포함한다. a,** 사이토카인 어레이. 탈세포화된 WT 마우스의 장 (n=3) 또는 탈세포화된 IL-33$^{-/-}$ 마우스의 장 (n=3)에서 분리된 MBV 사이토카인 카고 (cargo)를 R&D 시스템의 키트 (Mouse XL Cytokine Array Kit)를 이용하여 분석하였다. 상기 어레이에는 중복으로 스폿된 111 개의 사이토카인들이 포함되어 있다. 박스형 영역은 IL-33 스팟의 위치를 나타낸다. **b,** 탈세포화된 WT 또는 IL33$^{-/-}$ 마우스의 장으로부터 분리된 MBV에서 가장 높은 발현 수준을 가지는 15개 사이토카인 정량의 그래픽 표현. **c,** 탈세포화된 WT 마우스 장에서 분리된 MBV의 투과 전자 현미경 영상. 화살표는 MBV를 가리킨다. **d,** 3 개의 탈세포화된 WT 또는 IL33$^{-/-}$ 마우스 장으로부터 분리된 MBV에서 IL-33 발현 수준에 대한 면역 블롯 분석. **e,** 실험실에서 생산된 돼지 방광 매트릭스 (UBM), 소장 점막하층 (SIS), 진피 및 심장 근육 ECM, 그리고 상업적으로 이용 가능한 3 개의 생물학적 스캐폴드 등가물들 (ACELL® MATRISTEM™ (porcine urinary bladder), BD® XENOMATRIX™ (porcine dermis), and COOK BIOTECH® BIODESIGN™)에서 분리된 MBV에서 IL-33 발현 수준에 대한 면역 블롯 분석.

도 2a-2e: ECM에 저장된 전장 IL-33은 MBV의 루멘에 통합되어 단백질 분해로부터 보호된다. a, MBV는 UV 흡광도 280 nm에서 용출된 분획을 지속적으로 모니터링하면서 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 이용하여 분획화 하였다. 그 결과, 30 개의 500 μl 분획을 얻었다. 별도의 실험에서, MBV를 먼저 Triton®X-100으로 용해한 후 SEC를 이용하여 분획화 하였다. 두 UV 크로마토그램의 오버레이는 손상되지 않은 MBV가 더 무거운 분획에서 용리된 반면, 용해된 MBV의 분자 성분은 주로 더 가벼운 분획에서 용리되었음을 보여준다. **b,** 크로마토그래피된 온전한 MBV (상단 패널) 또는 용해된 MBV (하단 패널)로부터 용출된 분획을 지시된 대로 모으고 IL-33에 대한 면역 블롯으로 분석하였다. **c,** 크로마토그래피된 온전한 MBV의 풀링된 6-8 분획들을 투과 전자 현미경으로 이미지화하였다. **d,** MBV 표면 단백질을 표지하기 위해 온전한 MBV의 풀링된 6-8 분획들을 직접 비오티닐화 시키거나, Triton®X-100 으로 먼저 용해시킨 후 MBV 추출물을 비오티닐화시켜 내강 및 표면 단백질을 표지하였다. 스트렙트아비딘 풀다운 후 분리된 단백질 (SA)과 스트렙트아비딘 비드에 결합하지 않은 단백질을 나타내는 결합되지 않은 분획 (unbound)에 IL-33이 존재하는지를 면역 블롯으로 분석하였다. 화살표는 MBV를 가리킨다. **e,** 단백분해효소 K 보호 분석. 크로마토그래피된 온전한 MBV의 풀링된 6-8 분획들에 Triton® X-100의 부재 또는 존재하에 표시된 농도의 단백분해효소 K를 처리하였다. 샘플들을 IL-33에 대한 면역 블롯으로 분석하였다.

도 3a-3d: 내강 IL-33을 포함하는 MBV는 비정준 (non-canonical) ST2 독립 경로를 통해 프로-리모델링 대식세포 표현형 (F4/80^{+}iNOS^{-}Arg^{+})을 활성화 시킨다. a,b, WT (**a**) 또는 ST2$^{-/-}$ 마우스 (**b**)로부터 수확한 골수 유래 대식세포 (BMDM)를 처리하지 않거나 (대조군) 24시간 동안 아래의 실험 항목으로 처리하였다: IFN+LPS, IL-4, IL-33, 탈세포화된 WT 마우스 장에서 분리한 MBV (WT MBV), 탈세포화된 IL-33$^{-/-}$ 마우스 장에서 분리한 MBV (IL-33$^{-/-}$ MBV), 또는 돼지 소장 점막하층에서 분리한 MBV (SIS MBV). 세포들은 F4/80 (대식세포 마커), iNos (M1 마커), 또는 Arg1 (M2 마커)로 면역 표지되었다. **c,** iNOS 면역 표지의 정량화는 WT 및 ST2$^{-/-}$ BMDM 모두에서 음성 대조군 (IL-4 처리)과 비교하여 IFNγ+LPS 또는 IL-33$^{-/-}$ 마우스로부터 분리된 MBV로 처리한 후 iNOS 발현이 유의하게 증가함을 보여주었다 (**: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$ (음성 대조군과 비교하여), 에러 바는 SEM을 가리킨다, n=3). **d,** 아르기나제 면역 표지의 정량화는 WT 및 ST2$^{-/-}$ BMDM 모두에서 음성 대조군 (IFNγ+LPS)과 비교하여 IL-4 또는 WT 마우스로부터 분리된 MBV로 처리한 후 아르기나제 발현이 유의하게 증가함을 보여주었다 (**: $p < 0.01$ (음성 대조군과 비교하여), 에러 바는 SEM을 가리킨다, n=3).

도 4a-4b: IL-33을 포함하는 MBV는 Stat6 인산화와 무관하게 Arg1 발현을 상향 조절한다. a,b, WT 또는 ST2$^{-/-}$ 마우스에서 수확한 골수 유래 대식세포 (BMDM)에 아무 처리도 하지 않거나 (ctrl), IL-4, IL-33, 탈세포화된 WT 마우스 장에서 분리한 MBV (WT MBV) 또는 탈세포화된 IL-33$^{-/-}$ 마우스 장에서 분리한 MBV (IL-33$^{-/-}$ MBV)로 24시간 (**a**) 또는 30분 동안 (**b**) 처리하였다. 세포 용해물은 아르기나제-1 및 ST2 발현 (**a**) 및 Stat6의 인산화 (**b**)에 대한 면역 블롯으로 분석하였다.

도 5a-5b: WT MBV로 처리된 대식세포의 분비물은 전구세포에 대해 근원성이다. a, b, C_2C_{12} 근원세포를 꽉 차도

록 배양한 후 증식 배지, 분화 배지 또는 분극화 및 MBV 처리된 대식세포로 조절된 배지로 처리하였다. 세포들을 분화시키고 근절 미오신 (sarcomeric myosin)에 대해 면역 표지 하였다.

도 6a-6d: 이식편 IL-33의 완전한 부재는 만성 거부 관련 섬유증 및 혈관 병증을 증가시켰다. a-d, IL-33^{+}Bm12 (*il33*$^{+/+}$ Bm12) 또는 IL-33 결핍 Bm12 (*il33*$^{-/-}$ Bm12) 이식편을 IL-33을 발현하는 (WTB6) 또는 결핍된 (*il33*$^{-/-}$ B6 수용자, n=6/그룹) C57BL/6 (B6)에 이식하였다. 수술 후 (POD) 90-100 일에 이식편을 수확하고, H&E (**a, b**) 및 메이슨 트리크롬 (Masson's Trichrome) (**a, b**) 으로 염색한 후 평가하였다. 나이브 (naive) *il33*$^{-/-}$ Bm12의 심장은 대조군으로 염색되었다. (**c**) 혈관 폐색 및 (**d**) 섬유증 영역에 대한 백분율은 NEARCYTE 소프트웨어로 정량화하였다. "*"는 *il33*$^{+/+}$ Bm12 그룹과 WTB6 그룹에서 유의한 차이를 나타내며 *P* 값은 일원 분산 분석 (one-way analysis of variance) (ANOVA)으로 구하였다, *P<0.01, **P<0.005.

도 7a-7d: 이식편 IL-33의 완전한 부재는 심장 이식 후 초기에 국소 염증성 골수 세포를 증가시켰다. a-d, 야생형 (WT) IL-33^{+}Bm12 및 IL-33-결핍 녹아웃 (KO) Bm12 이식편을 WT B6 수용자에 이식하였다 (n=4-5/그룹). 수술 후 (POD) 3일에 이식편 침윤 백혈구를 유세포 분석으로 평가하였다. 나이브 Bm12 마우스 심장으로부터 분리된 백혈구를 기준 대조군으로서 포함시켰다 (대조군; n=4). **a.** 각 그룹의 대표적인 도트 플롯은 CD45^{+} 부모 게이트 (parent gate)에서 발견되는 CD11b^{+} CD11c^{+} 세포의 빈도를 나타낸다. **b.** CD11b^{+} CD11c^{+}-게이트 세포의 대표적인 도트 플롯은 증가된 CD11c^{+} 세포가 주로 MHCII^{hi} 단핵구 유래 수지상세포 (monoDC) 및 CD11c^{hi} 염증성 대식세포임을 보여준다. 화살표는 게이트된 세포가 시작된 모집단을 나타낸다. **c-d.** CD11b^{+} CD11c^{lo}-게이트 세포의 대표적인 도트 플롯은 IL-33 부재시 심장 이식편이 Ly6c^{hi} MHCII^{hi} 서브세트를 포함하는 전 염증성 F4-80^{+} 대식세포의 빈도를 증가시켰음을 보여준다. *P* 값은 일원 분산 분석 (ANOVA)으로 구하였다, *P<0.05.

도 8a-8d: IL33^{+} MBV의 투여는 이식 후 초기 전염증성 침윤성 골수세포의 생성을 제한한다. a-d, 야생형 (WT) IL-33^{+}, IL-33-결핍 녹아웃 (KO) Bm12 이식편 또는 하이드로젤에서 WT IL-33^{+} MBV로 처리된 IL-33-결핍 KO Bm12 이식편 (IL33 (Hydrogel))을 WT B6 수용자 (WT; n=4-6/그룹)에 이식하였다. 수술 후 (POD) 3 일 에 이식편 침윤 백혈구 및 비장 세포를 유세포 분석으로 평가하였다. 나이브 Bm12 마우스 심장 및 비장의 백혈구도 기준 대조군으로서 포함하였다 (대조군; n=3-9).대표적인 도트 플롯은 CD45.2^{+} 계통$^{-}$ Ly6G^{-} 게이트 (**a**) 에서 단핵구 유래 수지상 세포 (DC), CD45.2^{+} 계통$^{-}$ Ly6G^{-} CD11c^{-} CD11b^{+} 게이트 (**b**) 에서 대식세포 서브세트 및 이식편 침윤 및 수용 비장세포 (**c-d**)의 빈도 (%)를 나타낸다. 도면은 대식세포 서브세트 (**d**)의 DC (**c**) 변화에 대한 요약된 통계를 보여준다. 데이타에 보이는 *P* 값은 일원 분산 분석 (ANOVA)으로 구하였다, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005, ****P<0.001.

도 9a-9b: 섬유증 치료. IPF 환자 및 연령 일치 대조군으로부터 체외 이식된 폐의 인간 폐 섬유아세포 (n=2). (**a**) 처리 전에 Col1, Col3 및 ACTA2의 발현 수준을 결정하였다. **b)** 섬유아세포는 다른 기원의 매트릭스-결합 나노소포 (MBV)로 처리하였다: 탈세포화된 돼지 방광 매트릭스 (pUBM ECM), 탈세포화된 돼지 폐 (pLung) 및 인간 폐 조직 (hLung); 다른 농도: 1x10^{9} 및 3x10^{9} 입자/ml. 48시간 처리 후, 세포를 수집하고 RNA를 분리하여, 노화 및 섬유성 마커 전 사체 발현을 qRT-PCR로 분석하였다. * p<0.5, **p<0.01, *** p<0.001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] ECM 스캐폴드 물질의 분해 및 생체 활성 성분을 포함하는 "매트릭스 결합 나노소포" 또는 "MBV"라고도 하는 나노소포의 후속적 방출은 회복 및 항-염증 M2 대식세포 표현형의 활성화를 초래한다. MBV는 ECM의 콜라겐 네트워크 내에 내장된 나노 미터 크기의 막형 소포이며 생물학적 활성 신호 분자 (microRNA 및 단백질)를 분해 및 변성으로부터 보호한다. ECM 바이오 스캐폴드와 거기에 상주하는 MBV는 M2와 같은 프로-리모델링 표현형을 향해 대식세포를 활성화시킬 수 있다. 이들 MBV는 침윤하는 수용 골수세포 집단을 표적화 하거나 고형 장기 이식 후 동종 이식 섬유성 질환을 억제하는데 사용될 수 있다는 것이 본원에 개시되어 있다. 개시된 방법은 고형 장기 이식 후 동종 이식 섬유성 질환을 예방 및/또는 치료할 수 있다.

[0015] MBV가 핵외 인터루킨-33 (IL-33)의 풍부한 공급원이라는 것이 본원에 개시되어있다. IL-33은 기질세포의 핵에서 발견되며 일반적으로 알라민 (alarmin)으로 간주되는 IL-1 패밀리의 구성원이거나, IL-33 수용체인 ST2를 통해

면역 세포를 활성화하기 위해 조직 손상 후 방출되는 자기 유래 분자 (self-derived molecule) 이다 (Wainwrightet al., *Tissue Engineering Part C: Methods* 16, 525-532 (2009)). IL-33은 $ST2^{+}$ 조절 T 세포 (Treg)를 자극하여 심장 이식 후 이식편 생존을 촉진한다 (Wainwrightet al., *Tissue Engineering Part C: Methods* 16, 525-532 (2009); BΦinget al., *Journal of Extracellular Vesicles* 3, 23430 (2014). 세포내 IL-33 단백질은 IL-33 N- 말단을 통한 염색질 또는 신호 전달 분자와의 상호 작용을 통해 유전자 발현을 조절한다 (Jong et al., *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20, 342-350 (2016)). ECM 내에 안정적으로 저장되고 MBV 로의 통합에 의해 단백질 분해 절단으로부터 보호되는 IL-33은 특성화되지 않은 비정준 ST2-독립 경로를 통한 M2 대식세포 활성화의 강력한 매개체라는 것이 본원에 개시되어 있다.

[0016] $il33^{-/-}$가 아닌 $il33^{+/+}$ 마우스 조직 ECM으로부터 분리된 MBV는 $st2^{-/-}$ 대식세포를 복구적 프로-리모델링 M2 활성화 상태로 되도록 한다. $IL33^{+}$ MBV의 이러한 능력은 잘 특성화된 IL-4/IL-13-매개 M2 대식세포 분화경로와 구별되며, $IL33^{+}$ MBV는 Stat6 인산화와 무관하게 M2-유사 대식세포를 생성한다. 더욱이, 마우스 심장 이식 모델에서, IL-33이 결핍된 이식은 M1-유사 대식세포 및 단핵구-유래 DC를 포함하는 전염증성 골수세포에 의한 조기 이식편 침윤의 현저한 증가를 보인다. IL-33이 결핍된 심장 이식 후에 $IL-33^{+}$ MBV를 투여하면 이식편에서 전염증성 골수세포의 빈도가 현저히 감소하였다. 따라서, 이에 한정되지는 않지만, 심장 이식과 같은 고체 장기 이식 후의 $IL33^{+}$ MBV 전달은 급성 또는 만성 이식 거부와 같은 거부 동안 골수 활성화를 억제 및/또는 예방할 수 있다.

[0017] 또한, MBV는 국소 염증을 제어하고 손상 후 연조직 복구 또는 동종 고형 장기 이식과 관련된 수술 절차를 지원하는 데 사용할 수 있다. MBV의 사용은 IL-33이 골수세포에서 ST2에 독립적인 유전자 발현을 유도할 수 있도록 한다. 결과적으로, 상기 치료법은 외상성 또는 허혈성 손상 부위에서 골수성 구획을 전형적인 전염증성 및 유해한 서브 세트 (예를 들면, M1 대식세포, 염증성 단핵구 및 염증성 단핵구-유래 수지상 세포)로부터 벗어나 유익한 복구 또는 조절 서브 세트 (예를 들면, M2 대식세포 및 $Ly6c^{lo}$ 단핵구)로 이동시킴으로써 후속 섬유성 질환을 제한할 수 있다. 이러한 기법은 또한 국소 골수세포의 유사한 변형을 통해 결함 부위의 연조직 및 근육 복구를 지원한다.

[0018] 매트릭스 결합 나노소포 (MBVs)는 ECM의 섬유 네트워크 내에 포매된다. 이러한 나노 입자들은 ECM-스캐폴드 제조공정 중에 산물이 분해 및 변성되지 않도록 보호한다. 엑소좀은 체액 및 세포 배양 상청액에서 거의 독점적으로 확인된 미세소포이다. MBV와 엑소좀은 구별된다는 것이 입증되었다. MBV는 예를 들어 세제 및/또는 효소 분해에 내성이 있고 다른 마이크로 RNA의 클러스터를 포함하며 miR-145가 풍부하기에 다른 미세소포들과는 구별된다. 본원에 개시된 바와 같이, MBV는 세포 생존에 영향을 미치고 치유 반응을 조절하여 신경 기능을 보존하거나 회복시킨다. MBV는 RGC 생존, 축삭 성장 및 조직 리모델링을 차별적으로 조절하는 것으로 밝혀졌다.

[0019] *용어*

[0020] 용어 및 방법에 대한 하기 설명은 본 명세서 내용을 더 잘 설명하고 본 개시 내용의 실행에서 당업자를 안내하기 위해 제공된다. 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 달리 명시하지 않는 한 하나 이상의 것을 의미한다. 예를 들어, "세포를 포함하는"이라는 용어는 단일 또는 복수의 세포를 포함하고 "적어도 하나의 세포를 포함하는"이라는 문구와 동등한 것으로 간주된다. 용어 "또는"은 문맥상 달리 명시하지 않는 한, 언급된 대체 요소의 단일 요소 또는 둘 이상의 요소의 조합을 의미한다. 본원에 사용된 "구성하다 (comprises)"는 "포함한다 (includes)"를 의미한다. 따라서, "A 또는 B로 구성되는 (comprising A or B)"은 추가 요소를 제외하지 않고 "A, B, 또는 A 및 B를 포함한다 (including A, B, or A and B)"를 의미한다. 본원에 언급된 GenBank® 수탁 번호 (Accession Nos.) 날짜는 적어도 빠르면 2015년 9월 16일부터 사용 가능한 시퀀스이다. 여기에 인용된 모든 참고 문헌, 특허 출원 및 간행물, GenBank® 수탁 번호는 본 명세서에 참조로 통합된다. 본 명세서의 다양한 실시예의 검토를 용이하게 하기 위해, 특정 용어에 대한 설명이 다음과 같이 제공된다:

[0021] **동물:** 예를 들어 포유류와 조류를 포함하는 범주인 살아있는 다세포 척추동물 유기체. 상기 포유류라는 용어는 인간 및 비인간 포유류를 모두 포함한다. 유사하게, 용어 "개체 (subject)"는 인간 및 수의학적 개체를 모두 포함한다.

[0022] **생체에 적합한 (Biocompatible) 물질:** 포유류 개체에 이식되었을 때 상기 개체에 부작용을 일으키지 않는 모든 물질. 생체에 적합한 물질은 개인에게 도입시 의도된 기능을 수행할 수 있으며, 해당 개인에게 독성이나 해를 끼치지 않으며, 상기 개체에서 물질의 면역학적 거부를 유도하지도 않는다.

[0023] **심장병 또는 심장질환 (Cardiac disease or disorder):** 심혈관계에 부정적인 영향을 미치는 질병 또는 장애. 상기 용어는 또한 급성 관상동맥 증후군, 심근 경색, 심근 허혈, 만성 안정형 협심증, 불안정 협심증, 혈관 성형술, 뇌졸중, 일과성 허혈 발작, 파행 및 혈관 폐색과 같은 심혈관계의 사건을 지칭한다. 따라서 심장병 및 심장질환은 급성 관상 동맥 증후군, 심근 경색, 심근 허혈, 만성 안정형 협심증, 불안정 협심증, 혈관 성형술, 일과성 허혈 발작, 허혈-재관류 손상, 파행, 혈관 폐색, 동맥 경화증, 심부전, 만성 심부전, 급성 비대상성 심부전, 심장 비대, 심장 섬유증, 대동맥판증, 대동맥 또는 승모판 협착증, 심근증, 심방세동, 심장 부정맥 및 심낭 질환 등을 포함한다.

[0024] **심장기능장애 (Cardiac dysfunction):** 심장의 펌핑 기능 장애. 여기에는 예를 들어, 수축 장애, 이완 능력 장애 (확장기능 장애라고도 한다), 심장 판막의 비정상적 또는 부적절한 기능, 심장 근육 질환 (심근증이라고도 한다), 심장 근육에 대한 부적절한 혈액 공급을 특징으로 하는 협심증 및 심근 경색과 같은 질병, 아밀로이드증 및 혈색소 침착증과 같은 침윤성 질환, 전신성 또는 국소 비대 (일부 심근증 또는 전신성 고혈압에서 발생할 수 있다), 및 심실 간의 비정상적 소통 (예를 들어, 심방중격 결손증) 등이 포함된다. 자세한 사항은 하기 문헌 참조: Braunwald, Heart Disease: a Textbook of Cardiovascular Medicine, 5th edition 1997, WB Saunders Company, Philadelphia PA (hereinafter Braunwald).

[0025] **심근증 (Cardiomyopathy):** 심근 (심장 근육)의 모든 질병 또는 기능 장애. 여기에는 염증성, 대사성, 독성, 침윤성, 섬유 형성성, 혈액학적, 유전적이거나 기원이 알려지지 않은 심근증 등이 포함된다. 이들은 일반적으로 임상 및 병리학적 특성에 따라 세 그룹으로 분류된다:

[0026] (1) **확장성 심근증 (dilated cardiomyopathy)**, 심장 비대 및 한쪽 또는 양쪽 심실의 심수축 기능 (systolic function) 장애를 특징으로 하는 증후군;

[0027] (2) **비후성 심근증 (hypertrophic cardiomyopathy)**, 본원에서 비후성 심근증은 (a) 심실벽 또는 심실중격의 두께의 전체적 또는 지역적 증가, 또는 (b) 유전적 질환, 고혈압 또는 심장 판막 기능 장애에서 발생할 수 있는 심실벽 또는 심실중격의 두께의 전체적 또는 지역적 증가에 대한 감수성 증가로 정의한다; 또는

[0028] (3) **제한성 및 침윤성 심근증 (restrictive and infiltrative cardiomyopathies)**, 우세한 임상적 특징이 일반적으로 심장의 이완 능력 장애 (이완기 장애)이며, 종종 아밀로이드 섬유, 철 또는 당 지질과 같은 이물질로 심장 근육이 침윤되는 것을 특징으로 하는 질병군. 하기 문헌 참조: Wynne and Braunwald, The Cardiomyopathies and Myocarditises, Chapter 41 in Braunwald.

[0029] **농축 (Enriched):** 혼합물에 있는 나노소포와 같은 관심 성분의 양의 해당 혼합물의 다른 원하지 않는 성분의 양에 대한 비율을 증가시키는 공정.

[0030] **세포외 기질 (extracellular matrix, ECM): 구조** 단백질, 특수 단백질, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸 및 조직내 세포를 둘러싸고 지지하는 성장 인자를 포함 하나 이에 제한되지 않는 구조적 및 기능적 생체 분자 및/또는 생체 거대 분자의 복합 혼합물로서, 달리 명시되지 않는 한 무세포성이다. ECM 제제는 "탈세포화"되었거나 또는 "무세포성"으로 간주될 수 있으며, 이는 세포들이 본원에 기술되고 당 업계에 공지된 공정을 통해 근원 조직으로부터 제거되었음을 의미한다. "ECM-유래 나노소포", "매트릭스 결합 나노소포", "MBV" 또는 "ECM으로부터 유래된 나노소포"와 같은 "ECM-유래 물질"은 천연 ECM 또는 ECM이 배양된 세포에 의해 생성되는 시험관 소스로부터 제조된다. ECM-유래 나노소포는 아래에 정의되어 있다.

[0031] **섬유증 관련 질환 또는 섬유성 질환 (fibrosis-related disease or fibrotic disease):** 섬유증이 일차적인 병리학적 근거, 결과 또는 증상인 질환 또는 장애이다. 섬유화 또는 흉터 형성은 염증이 있거나 손상된 조직 내부 및 주변에 섬유성 결합조직 (콜라겐 및 피브로넥틴과 같은 세포외 기질 (ECM)의 구성 요소)의 과도한 축적으로 정의되며, 이는 영구적인 흉터, 장기 기능 부전 및 궁극적으로 사망으로 이어질 수 있다. 정상적 조직 복구는 조직 손상이 심각하거나 반복적이거나 또는 상처 치유 반응 자체가 조절이 안 되는 경우 점진적으로 비가역적인 섬유화 반응으로 발전할 수 있다.

[0032] 섬유증 관련 질환은 예를 들어, 켈로이드 및 비대성 흉터와 같은 피부 병리학적 흉터; 간 또는 담낭의 경화과 같은 경변증; 심장 섬유증; 간 섬유증; 신장 섬유증; 폐 섬유증; 골수 섬유증; 류마티스성 심장병; 경화성 복막염; 사구체 경화증, 피부 경화증, 종격 섬유증, 후복막 섬유증 및 힘줄 및 연골의 섬유증 등을 포함한다. 예를 들면 몇 가지의 유전된 유전적 장애; 지속적인 감염; 독소, 자극제 또는 연기에 대한 반복적 노출; 만성적인 자가면역 염증; 이식에서 사소한 인간 백혈구 항원의 불일치; 심근 경색증; 높은 혈청 콜레스테롤; 비만; 제대로 조절되지 않은 당뇨병과 고혈압 등이 포함된다. 섬유증은 조직 손상에 의해 유발될 수도 있다. 그러나 초기 사

건과는 관계없이, 모든 섬유성 질환에 공통적인 특징은 섬유성 조직 재형성의 핵심 매개체인 ECM-생성 근섬유아세포의 활성화이다. 본 명세서에 사용된 용어인 "조직 손상"은 조직 내에서 또는 조직에 변화가 발생하도록 조직에 가해진 임의의 손상 또는 변형을 의미한다. 조직 손상에는 심장 조직 손상 또는 폐 조직 손상이 포함된다. 당업자는 심장 조직 손상이 심장 압박 또는 심장 과부하로 인해 발생할 수 있음을 쉽게 인식할 것이다. 일반적으로, 본 명세서에서 제공되는 방법 및 조성물을 요구하는 개체는 심장병 또는 심장질환 또는 심장 섬유증 같은 섬유증 관련 질환이 발생할 위험이 증가하도록 심장 압박이 증가된 대상체를 포함한다. 심장 섬유증으로 이어질 수 있는 상태로는 비대성 심근증, 사르코이드증, 심근염, 만성 신부전, 독성 심근병증, 수술-매개 허혈 재관류 손상, 급성 및 만성 장기 거부, 노화, 만성 고혈압, 비-허혈성 부정맥 확장성 심근증, 죽상 경화증, HIV-관련 심혈관 질환, 폐고혈압 등이 포함되나 이에 국한되지는 않는다. 폐 섬유증으로 이어질 수 있는 상태로는 류마티스 관절염 및 쇼그렌증후군과 같은 자가면역 질환, 위식도 역류질환 (gastroesophageal reflux disease, GERD), 사르코이드증, 담배 흡연, 석면 또는 실리카 노출, 암석 및 금속 먼지 노출, 바이러스 감염, 방사선 및 특정 약물에 대한 노출 등이 포함되나 이에 국한되지는 않는다.

[0033] **이식편대숙주질환 (Graft-Versus-Host Disease, G): 이식** 수혜자의 조직에 대해 기증된, 면역학적 능력이 있는 림프구의 반응이 있는 골수 또는 기타 조직 이식에서 보이는 흔하고 심각한 합병증이다. GVHD는 관련된 또는 관련없는 기증자의 줄기세포를 사용하거나 포함하는 이식시 나타날 수 있는 합병증이다.

[0034] GVHD에는 급성 및 만성 두 종류가 있다. 급성 GVHD는 이식 후 첫 3개월 이내에 나타난다. 급성 GVHD의 징후로는 손과 발의 붉은 피부 발진, 심해지면 피부가 벗겨지거나 물집이 생기면서 퍼지는 피부 발진이 있다. 급성 GVHD는 또한 위와 장에 영향을 미칠 수 있으며, 이 경우 경련, 메스꺼움 및 설사가 나타난다. 피부와 눈의 황변 (황달)은 급성 GVHD가 간에 영향을 미쳤음을 나타낸다. 만성 GVHD는 심각한 정도에 따라 등급이 매겨진다: 1단계/등급 (stage/grade)은 경미한 것이고; 4단계/등급은 심각한 것이다. 만성 GVHD는 이식 후 3개월 또는 그 이후에 발생한다. 만성 GVHD의 증상은 급성 GVHD의 증상과 유사하지만, 또한 만성 GVHD는 눈의 점액선, 입의 타액선, 위 내벽과 내장을 윤활하는 샘에도 영향을 미칠 수 있다.

[0035] **심장 (Heart):** 혈액을 순환시키는 동물의 근육 기관. 포유류에서 심장은 우심방, 우심실, 좌심방, 좌심실의 4개의 방으로 구성된다. 우심방과 좌심방은 심방중격에 의해 서로 분리되고 우심실과 좌심실은 심실중격에 의해 서로 분리된다. 우심방과 우심실은 삼첨판에 의해 서로 분리되고, 좌심방과 좌심실은 승모판에 의해 서로 분리된다.

[0036] 심장의 4개 방의 벽은 작동 근육 또는 심근과 결합 조직으로 구성된다. 심근은 심근 세포로 구성되며, 이는 본 명세서에서 심장 세포, 심장 근육 세포, 심근 세포 및/또는 심장 섬유로도 지칭 될 수 있다. 심근 세포는 피험 개체로부터 분리되어 시험관 내에서 성장할 수 있다. 공동 (cavity)에 가장 가까운 심근의 내층을 심내막이라고 하고 심근의 외층을 심외막이라 한다. 좌심실 공동은 부분적으로 심실중격과 좌심실 자유벽 (left ventricular free wall)에 의해 경계가 지정된다. 좌심실 자유벽은 전벽 (anterior wall), 후벽 (posterior wall) 및 측벽 (lateral wall)과 같은 영역으로 나뉘거나, 또는 정점 (apex, 심방에서 가장 먼 좌심실의 끝) 및 기저부 (base, 심방에 가장 가까운 좌심실의 일부)로 나뉜다. 정점의 (apical) 및 기저부의 (basal) 라는 용어는 심장의 해당 영역을 나타내는 형용사들이다.

[0037] 수술 중 심장의 주된 역할은 피험 개체의 조직과 세포의 대사 요구를 충족시키기 위해 충분한 산소화된 혈액을 펌핑하는 것이다. 심장은 심장주기 (*cardiac cycle*)라고 하는 수축과 이완의 리드미컬하고 고도로 조정된 주기로 이 작업을 수행한다. 간단히 말해서, 심장주기는 크게 두 범주로 나눌 수 있다: 심실 수축기 (ventricular *systole*), 심실이 수축하는 심장주기의 단계; 및 심실 확장기 (ventricular *diastole*), 심실이 이완되는 심장주기의 단계. 하기 문헌 참조: Opie, Chapter 12 in Braunwald for a detailed discussion. 본 명세서에서 사용된 용어 수축기 (systole) 및 확장기 (diastole)는 문맥상 달리 명확하게 명시하지 않는 한 심실 수축기 및 확장기를 의미한다.

[0038] 건강한 정상적 순환에서 우심방은 정맥을 통해 신체에서 실질적으로 산소가 제거된 혈액을 받는다. 확장기에서는 우심방이 수축하고 혈액은 삼첨판을 통해 우심실로 흐른다. 우심실은 혈액으로 채워진 후 수축된다 (수축기). 수축력은 삼첨판을 닫히게 하고 폐동맥 판막을 통해 혈액을 폐동맥으로 밀어 넣는다. 그런 다음 혈액은 폐로 이동하여 이산화탄소를 방출하고 산소를 흡수한다. 산소화된 혈액은 폐정맥을 통해 심장으로 돌아가 좌심방으로 들어간다. 확장기에서는 좌심방이 수축하고 혈액이 승모판을 통해 좌심실로 흐른다. 좌심실은 혈액으로 채워진 후 우심실의 수축과 거의 동시에 수축한다. 수축력은 승모판을 닫히게 하고 혈액이 대동맥판을 통해 대동맥으로 들어가도록 한다. 산소화된 혈액은 대동맥으로부터 신체의 모든 조직으로 순환하여 세포에 산소를 전달

한다. 산소가 제거된 혈액은 정맥을 통해 우심방으로 돌아온다.

[0039] 좌심실의 공동에는 전방 및 후방 유두근 (*papillary muscles*)으로 알려진, 심실 심근의 두 개의 크고 본질적으로 원뿔 모양의 연장(extensions)이 존재한다. 이들은 건삭 (*chordae tendineae* or chordae)이라고 하는 실 모양의 확장을 통해 승모판의 심실 표면에 연결된다. 유두근과 건삭의 중요한 역할 중 하나는 심실 수축 동안 승모판이 닫힌 상태를 유지하는 것이다. 이들의 또 다른 중요한 역할은 심장의 수축력을 향상시키는 것이다. 마찬가지로, 우심실에도 삼첨판을 묶고 수축력을 향상시키는 유두근과 건삭이 있다.

[0040] 유전되거나 후천적인 질병 과정 및/또는 정상적인 노화로 인해 심장 근육은 수축기나 이완기 또는 둘 모두에서 기능 장애를 일으킬 수 있다. 수축기의 기능 장애를 수축기 기능이상 (*systolic dysfunction*)이라 하고, 이완기의 기능 장애를 이완기 기능이상 (*diastolic dysfunction*)이라고 한다. 하기 문헌 참조: Opie Chapter 12, and Colucci et al., Chapter 13 in Braunwald for a detailed discussion.

[0041] 유전되거나 후천적인 질병 과정 및/또는 정상적인 노화로 인해 하나 이상의 심장 판막이 기능 장애를 일으킬 수 있다. 판막 기능 장애 (*Valvular dysfunction*)는 일반적으로 크게 두 가지 범주로 나뉜다: 협착 (*stenosis*), 본 명세서에서 협착은 정상적으로 작동되는 밸브가 실질적으로 개방되는 심장주기 동안 상기 밸브가 불완전하게 개방되는 것으로 정의된다; 및 부전 (*insufficiency*), 본 명세서에서 부전은 정상적으로 작동되는 밸브가 실질적으로 폐쇄되는 심장주기 동안 상기 밸브가 불완전하게 폐쇄되는 것으로 정의된다. 판막 기능 장애는 또한 승모판막 탈출증 (*mitral valve prolapse*)으로 알려진 상태를 포함하며, 여기서 승모판막 소엽은 심실 수축 동안 좌심방으로 뒤로 빠져나간다. 이러한 상태는 승모판막의 경증, 중등도 또는 중증의 부전과 관련될 수 있다.

[0042] 판막 협착은 일반적으로 판막이 열렸을 때 판막을 가로지르는 압력 구배를 특징으로 한다. 판막 부전은 일반적으로 밸브가 닫혔을 때 역행 ("역방향") 흐름이 특징이다. 예를 들어, 승모판 협착은 심실 확장기 끝 부근의 승모판막을 가로지르는 압력 구배를 특징으로 한다 (중등도 승모판 협착의 전형적인 예로서, 15 mm Hg의 압력 구배에 대해 좌심실의 5 mm Hg 이완기 압력, 좌심방의 20 mm Hg 이완기 압력). 또 다른 예로서, 승모판 부전은 심실 수축기 동안 좌심실에서 좌심방으로 혈액의 "역방향" 흐름을 특징으로 한다.

[0043] **심부전 (heart failure):** 피험 개체의 조직과 세포의 대사 요구를 충족시키기 위해 충분한 산소화된 혈액을 공급하는 심장 기능의 불능. 이는 폐 또는 전신 정맥의 울혈 (congestion)과 같은 순환 울혈 (circulatory congestion)을 동반할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 심부전이라는 용어는 임의의 원인으로 인한 심부전을 포함하며, 예를 들어 "울혈성 심부전 (congestive heart failure)", "전방 심부전 (forward heart failure)", "후방 심부전 (backward heart failure)", "고박출성 심부전 (high output heart failure)" 및 "저박출성 심부전 (low output heart failure)" 등을 포함한다. 하기 문헌 참조: Chapters 13-17 in Braunwald for a detailed discussion.

[0044] **억제 (Inhibiting):** 질병 또는 장애를 감소시키는 것. 질병 또는 장애의 억제는 질병 또는 장애의 하나 이상의 징후 또는 증상을 감소시킬 수 있다.

[0045] **인터루킨 (interleukin, IL)-33:** IL-1α, IL-1β, IL-1Ra 및 IL-18을 포함한 다른 IL-1 사이토카인에 기술된 보존된 구조 유형인 분자 β-트레포일 구조에 부분적으로 기초하여 결정된 사이토카인 IL-1 수퍼패밀리의 한 구성원. 이 구조에서 β-트레포일의 12개 β-가닥은 4 개의 β-가닥 단위의 3 개의 유사 반복으로 배열되며, 이 중 첫 번째와 마지막 β-가닥은 6가닥 β-배럴에서 역평행이고, 각 반복의 두 번째 및 세 번째 β-가닥은 β-배럴 위에 있는 β-헤어핀을 형성한다. IL-33은 고친화성 수용체 패밀리 구성원인 ST2에 결합한다. IL-33은 헬퍼 T 세포, 비만 세포, 호산구 및 호염기구를 유도하여 2형 사이토카인을 생성하도록 한다. 인간 IL-33에 대한 예시적인 아미노산 서열은 GENBANK® 수탁번호 NP_001186569.1, NP_001186570.1, NP_001300973.1, NP_001300974.1 및 NP_001300975.1에 제공되며, 이들은 모두 2018년 4월 5일 자로 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0046] **분리된 (isolated): "분리된"** 생물학적 구성 요소 (예: 핵산, 단백질 세포 또는 나노소포)는 상기 구성 요소가 자연적으로 발생된 유기체의 세포 또는 ECM의 다른 생물학적 구성 요소로부터 실질적으로 분리되거나 정제된 것이다. "분리된" 핵산 및 단백질에는 표준 정제 방법으로 정제된 핵산 및 단백질이 포함된다. 분리된 나노소포는 ECM의 섬유질 물질로부터 제거된다. 상기 용어는 또한 숙주 세포에서 재조합 발현에 의해 제조된 핵산 및 단백질 그리고 화학적으로 합성된 핵산을 포함한다.

[0047] **리실 산화효소 (lysyl oxidase, Lox): 콜라겐과** 엘라스틴 전구체의 리신 잔기에서 알데히드의 형성을 촉매하는 구리 의존성 효소. 이러한 알데히드는 반응성이 높고, 다른 리실 산화효소 유래 알데히드 잔기 또는 변형되지

않은 리신 잔기와 자발적인 화학 반응을 일으킨다. 그 결과, 생체 내에서 콜라겐과 엘라스틴의 교차결합(cross-linking)을 초래하며, 이는 콜라겐 섬유의 안정화와 성숙한 엘라스틴의 완전성과 탄력성에 역할을 한다. 복잡한 가교는 콜라겐 (3 개의 리신 잔기에서 유래된 피리디놀린), 그리고 구조가 다른 엘라스틴 (4 개의 리신 잔기에서 파생된 데스모신)에서 형성된다. Lox 효소를 암호화하는 유전자는 다양한 유기체에서 복제되었다 (Hamalainen et al., Genomics 11:508, 1991; Trackman et al., Biochemistry 29:4863, 1990; incorporated herein by reference). 인간 리실 산화효소 서열의 잔기 153-417 및 잔기 201-417이 촉매 기능에 중요한 것으로 나타났다. LoxL1, LoxL2, LoxL3 및 LoxL4라는 4 개의 Lox 유사 이소폼 (Lox-like isoforms)이 존재한다.

[0048] **대식세포 (macrophage):** 세포 파편, 이물질, 미생물 및 암세포를 식균하고 분해하는 백혈구의 일종. 식균 작용에 대한 역할 외에도 이러한 세포는 림프구와 같은 면역 세포를 포함한 다른 세포를 리쿠르트하고 영향을 미친다는 점에서 발생, 조직 유지 및 복구, 선천성 및 적응성 면역 모두에서 중요한 역할을 한다. 대식세포는 M1 및 M2로 언급되는 표현형을 포함하여 많은 표현형으로 존재할 수 있다. 주로 염증 촉진 기능 (pro-inflammatory function)을 수행하는 대식세포를 M1 대식세포 ((CD86+/CD68+))라고 하는 반면, 염증을 감소시키고 조직 복구를 촉구 및 조절하는 대식세포를 M2 대식세포 ((CD206+/CD68+))라고 한다. 대식세포의 다양한 표현형을 식별하는 마커는 종마다 다르다. 대식세포의 표현형은 M1과 M2의 극단 사이에 있는 스펙트럼으로 표현된다는 점에 유의해야 한다. F4/80 (부착 G 단백질 결합 수용체인 E1 (ADGRE) 유전자에 의해 인코딩됨)은 대식세포 마커이다 (GENBANK® 수탁번호 NP_001243181.1, April 6, 2018 및 NP_001965, March 5, 2018; 이들은 모두 본 명세서에 참조로 포함된다). 나노소포는 피험 개체의 대식세포 상에서 CD68 및 CD-11b의 발현을 유지한다는 것이 본원에 개시되어 있다.

[0049] **마이크로 RNA (MicroRNA):** 전형적으로 표적 mRNA의 번역을 억제함으로써 유전자 발현을 전사후 조절하는, 길이가 약 17 내지 약 25개 뉴클레오티드 염기인 작은 비-코딩 RNA. 마이크로 RNA는 더 많은 양의 특정 마이크로 RNA가 더 낮은 수준의 표적 유전자 발현과 연관되도록 음성 조절자로 기능할 수 있다. 마이크로 RNAs에는 1차 miRNAs (pri-miRNAs), 미성숙 miRNAs (pre-miRNAs), 및 성숙 miRNAs의 세 가지 형태가 있다. 1차 miRNA는 약 수백 염기에서 1 kb를 초과하는 스템-루프 구조화된 전사체로 표현된다. 상기 1차 miRNA 전사체는 스템 루프의 기저부 근처에서 스템의 두 가닥을 절단하는 Drosha라 하는 RNase II 엔도뉴클레아제에 의해 핵에서 절단된다. Drosha는 엇갈린 절단으로 RNA 듀플렉스를 절단하여 3' 끝에 5' 인산염과 2 개의 뉴클레오티드 오버행을 남긴다. 절단 산물인 미성숙 miRNA (pre-miRNA)는 폴드 백 (fold-back) 방식으로 형성된 헤어핀 구조와 함께 약 60 내지 약 110 개의 뉴클레오티드 길이를 가진다. 미성숙 miRNA는 Ran-GTP 및 Exportin-5에 의해 핵에서 세포질로 운반된다. 미성숙 miRNA는 Dicer라고 하는 다른 RNase II 엔도뉴클레아제에 의해 세포질에서 추가로 처리된다. Dicer는 5' 인산염과 3' 오버행을 인식하고 스템-루프 접합부에서 루프를 절단하여 miRNA 듀플렉스를 형성하도록 한다. 상기 miRNA 듀플렉스는 RISC (RNA-induced silencing complex)에 결합하며, 여기서 안티센스 가닥은 우선적으로 분해되고 센스 가닥인 성숙한 miRNA는 RISC를 표적 부위로 보낸다. 성숙 miRNA는 miRNA의 생물학적 활성 형태이며 길이가 약 17 ~ 약 25 개 뉴클레오티드인 miRNA이다.

[0050] **근원세포 (myoblast):** 다른 근원세포와 융합하지 않고 근섬유를 형성하며, 기존의 근섬유와 융합하지 않는 근육세포.

[0051] 나노소포 **(nanovesicle):** 직경이 약 10 내지 약 1,000 nm 인 나노 입자인 세포외 소포. 나노소포는 다른 분자들 사이에서 생물학적으로 활성인 신호 분자 (예 : 마이크로 RNA, 단백질)를 운반하는 지질 막에 결합된 입자이다. 일반적으로, 나노소포는 지질 이중층에 의해 제한되며, 상기 생물학적 분자는 이중층에 동봉되고/되거나 매립될 수 있다. 따라서 나노소포는 원형질막으로 둘러싸인 루멘을 포함한다. 상이한 유형의 소포는 직경, 세포내 기원, 밀도, 모양, 침강 속도, 지질 조성, 단백질 마커, 핵산 함량 및 기원, 예를 들어 세포외 기질 또는 분비물에 기초하여 구별이 가능하다. 나노소포는 ECM 유래의 매트릭스 결합 나노소포 (상기 내용 참조), 단백질 함량 및/또는 miR 함량과 같은 그 기원으로 확인할 수 있다.

[0052] "엑소좀 (**exosome**)"은 세포에 의해 분비되는 막성 소포이며 그 직경 범위는 10 ~ 150 nm 이다. 일반적으로, 후기 엔도좀 (late endosomes) 또는 다소포체 (multivesicular bodies)는 제한된 엔도좀 막에서 이러한 밀폐된 소포로 소포의 내향 출아 (inward budding) 및 절단에 의해 형성되는 내루멘성 소포들을 포함한다. 이러한 내루멘성 소포들은 원형질막과의 융합시 엑소사이토시스 동안 다소포체의 루멘으로부터 세포외 환경으로, 전형적으로 혈액, 뇌척수액 또는 타액과 같은 체액으로 방출된다. 엑소좀은 세포막의 한 부분이 침투하여 세포 내로 유입될 때 세포 내에서 생성된다. 더 작은 소포로 분해되어 궁극적으로 세포에서 배출되는 내재화된 세그먼트는 단백질과 mRNA 및 miRNA와 같은 RNA 분자를 포함한다. 혈장 유래 엑소좀에는 리보솜 RNA가 거의 없다. 세포외 기질 유래 엑소좀은 특정 miRNA 및 단백질 성분을 포함하며 혈액, 소변, 타액, 정액 및 뇌척수액과 같은 거의

모든 체액에 존재하는 것으로 나타났다. 엑소좀은 CD11c 및 CD63을 발현할 수 있으므로 $CD11c^+$ 및 $CD63^+$ 일 수 있다. 엑소좀은 표면에 높은 수준의 리실 산화효소를 가지지 않는다.

[0053] "**ECM에서 유래된 나노소포**", "**매트릭스 결합 나노소포**", "**MBV**" 또는 "**ECM 유래** 나노소포"는 모두 세포외 매트릭스에 존재하는 10 nm-1000 nm 크기 범위의 동일한 막 결합 입자들을 의미하며, 세포 행동에 영향을 미치는 단백질, 지질, 핵산, 성장 인자 및 사이토카인과 같은 생물학적 활성 신호 분자들을 포함한다. 상기 용어들은 상호교환 사용이 가능하며 동일한 소포들을 나타낸다. 이러한 MBV들은 ECM 내에 포매되고 결합되며, 표면에만 부착되지는 않는다. 이러한 MBV들은 동결 해동 및 펩신, 엘라스타제, 히알루로니다제, 프로테이나제 K 및 콜라게나제와 같은 프로테아제에 의한 분해 및 세제에 의한 분해와 같은 가혹한 분리 조건에 저항성을 가진다. 일반적으로, 이러한 MBV들은 특히 miR-145 및 선택적으로 miR-181, miR-143 및 miR-125가 풍부하다. 이러한 MBV들은 CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, 거의 감지할 수 없는 수준으로 상기 마커들을 발현한다 ($CD63^{lo}CD81^{lo}$). MBV는 표면에 리실 산화효소 (Lox)를 포함하고 있다. ECM은 조직에서 얻거나 배양중인 세포에서 생성하거나 또는 상업적 공급처에서 구입할 수 있다. MBV는 엑소좀과는 구별된다.

[0054] **장기 거부 또는 이식 거부 (organ rejection or transplant rejection)**: 수혜자에 의해 발현되는 활성 면역 반응으로 인한 장기의 기능적 및 구조적 악화로서 장기 기능 장애의 비면역학적 원인과는 무관하다.

[0055] **약학적으로 허용가능한 담체 (pharmaceutically acceptable carriers): 본** 발명에서 사용된 약학적으로 허용가능한 담체는 통상적인 것이다. 하기 문헌에 본원에 개시된 융합 단백질의 약학적 전달에 적합한 조성물 및 제형이 기재되어 있다: Remington 's *Pharmaceutical Sciences*, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975).

[0056] 일반적으로 담체의 성질은 사용되는 특정 투여 방식에 따라 달라진다. 예를 들어, 비경구 제형은 일반적으로 운반 수단 (vehicle)으로서 물, 생리 식염수, 평형염액 (balanced salt solutions), 수성 덱스트로스, 글리세롤 등과 같은 약학적 및 생리학적으로 허용가능한 유체를 포함하는 주사 가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물 (예를 들어, 분말, 알약, 정제 또는 캡슐 형태)을 위한 통상적인 무독성 고체 담체는 예를 들어 약학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분 또는 마그네슘 스테아레이트를 포함할 수 있다. 생물학적으로 중립적인 담체에 더하여, 투여되는 약학적 조성물은 습윤제 또는 유화제, 보존제 및 pH 완충제 등과 같은 소량의 무독성 보조 물질, 예를 들어 아세트산 나트륨 또는 소르비탄 모노라우레이트를 함유할 수 있다.

[0057] **약제 (pharmaceutical agent)**: 대상 개체 또는 세포에 적절하게 투여될 때 원하는 치료 또는 예방 효과를 유도할 수 있는 화합물 또는 조성물. "배양 (incubating)"은 약물이 세포와 상호작용하기에 충분한 시간을 포함한다. "접촉 (contacting)"은 세포와 함께 고체 또는 액체 형태의 작용제, 예컨대 엑소좀, miRNA 또는 miRNA를 코딩하는 핵산을 배양하는 것을 포함한다.

[0058] **폴리뉴클레오타이드 (polynucleotide)**: 임의의 길이의 핵산 서열 (선형 서열과 같은). 따라서, 폴리뉴클레오타이드에는 올리고뉴클레오타이드와, 염색체에서 발견되는 유전자 서열이 또한 포함된다. "올리고뉴클레오타이드"는 자연적인 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 복수의 결합된 뉴클레오타이드이다. 올리고뉴클레오타이드는 6 내지 300개 뉴클레오타이드 길이인 폴리뉴클레오타이드이다. 올리고뉴클레오타이드 유사체는 올리고뉴클레오타이드와 유사하게 기능하지만 비천연적으로 발생하는 부분을 갖는 모이어티를 지칭한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 유사체는 변형된 당 모이어티 또는 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오타이드와 같은 당간 연결 (inter-sugar linkages)과 같은 비-천연 발생 부분을 포함할 수 있다. 자연적으로 발생한 폴리뉴클레오타이드의 기능적 유사체는 RNA 또는 DNA에 결합할 수 있으며 펩티드 핵산 (PNA) 분자를 포함한다.

[0059] **정제된 (purified)**: "정제된"이라는 용어는 절대적인 순도를 요구하지 않고 오히려 상대적인 용어로 의도된 것이다. 따라서, 예를 들어, 정제된 핵산 분자 제제는 상기 핵산이 세포내 자연환경의 핵산보다 순도가 높은 제제이다. 예를 들어, 핵산 제제는 핵산이 제제의 총 단백질 함량의 50% 이상이 되도록 정제된다. 유사하게, 정제된 엑소좀 제제는 미세소포 및 엑소좀이 있는 세포를 포함하는 환경에서보다 엑소좀이 더 순수한 제제이다. 정제된 핵산 또는 엑소좀 집단은 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100% 순도를 가지며, 기타 핵산 또는 세포 성분이 포함되지 않는다.

[0060] **질병의 예방 또는 치료 (preventing or treating a disease): 질병의** "예방"은 예를 들어 녹내장과 같은 질병에 걸리기 쉬운 것으로 알려진 사람에서 질병의 발병을 억제하는 것을 의미한다. 알려진 소인 (predisposition)을 가진 사람의 예로는 가족 중 질병의 병력이 있거나 피험자가 질병에 걸리기 쉬운 요인에 노출된 사람이다. "치료"는 질병 또는 병리학적 상태가 발병하기 시작한 후의 징후 또는 증상을 개선하는 치료적 개입을

의미한다.

[0061] ST2: 인터루킨 1 수용체 패밀리의 일원. ST2는 ILR1RL1으로도 알려져 있으며 세포내 TIR 도메인의 기능에 기초하여 톨-유사수용체 수퍼패밀리 (Toll-like receptor superfamily)의 구성원이지만, 그의 세포외 영역은 면역글로불린 도메인으로 구성된다. ST2 단백질에는 두 가지 동형 단백질 (isoforms)이 있으며 심장 질환의 진행과 직접적으로 관련이 있다: 가용성 형태 (가용성 ST2 또는 sST2라고 함) 및 막 결합 수용체 형태 (ST2 수용체 또는 ST2L이라고 함). 심근이 신장되면 ST2 유전자가 상향 조절되어 순환하는 가용성 ST2의 농도가 증가한다. ST2의 리간드가 IL-33이다.

[0062] IL-33이 ST2 수용체에 결합하면 허혈성 사건과 같은 심장 질환이나 손상에 반응하여 심장 보호 효과가 나타나 심장 기능이 보존된다. 이러한 심장 보호 IL-33 신호는 IL-33에 결합하여 ST2 수용체에서 심장 보호 신호를 무력화시키는 가용성 ST2 수준에 의해 균형을 이루게 된다. 결과적으로, 높은 수준의 가용성 ST2가 존재할 때 심장은 더 큰 스트레스를 받는다.

[0063] **개체 (subject):** 인간이 아닌 영장류, 마우스, 토끼, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류 및 파충류와 같은 포유류 및 비 포유류와 같은 모든 척추동물을 포함한 인간 및 비인간 동물. 기재된 방법의 많은 구체예에서, 상기 개체는 인간이다.

[0064] **치료적 유효량 (therapeutically effective amount): 치료** 대상 개체에서 원하는 효과를 얻기에 충분한 MBV와 같은 특정 물질의 양. 대상 개체에 투여될 때, 원하는 시험관내 효과를 달성하는 것으로 나타난 표적 조직 농도 (예를 들어, 뼈)를 달성 할 투여량이 일반적으로 사용될 것이다.

[0065] **이식 (transplantation): 한** 피험 개체로부터 다른 피험 개체로, 한 피험 개체로부터 동일한 피험 개체의 다른 부분으로, 또는 한 피험 개체로부터 동일한 피험 개체의 동일한 부분으로 조직, 세포 또는 기관 또는 이의 일부의 전이. 한 구현예에서, 심장, 신장, 피부, 췌장 또는 폐와 같은 고형 장기의 이식은 한 피험 개체로부터 고형 장기를 제거하고 다른 피험 개체로 고형 장기를 도입하는 것을 포함한다.

[0066] 동종 이식 (allogeneic transplant) 또는 이종 이식 (heterologous transplant)은 한 개체에서 다른 개체로 이식하는 것이며, 여기서 상기 개체들은 두 개체에서 서열이 동일하지 않은 하나 이상의 유전자좌에 유전자를 가지고 있다. 동종 이식은 유 전적으로 다른, 동일한 종의 두 개체간에 또는 서로 다른 두 종의 개체간에 이루어질 수 있다. 자가 이식 (autologous transplant)은 동일한 개체의 한 부위에서 다른 부위로 조직, 세포 또는 이의 일부를 이식하거나, 유전적으로 동일한 두 개체의 한 개체에서 다른 개체로 조직 또는 이의 일부를 이식하는 것이다. "이식"은 이를 필요로하는 피험 개체에게 생체 적합성 기질을 배치하는 것이다.

[0067] **치료 (Treating, Treatment, 및 Therapy): 경감**, 완화, 증상 감소 또는 환자가 상태를 더 견딜 수 있도록 만들어주거나, 퇴화 또는 감쇠의 속도를 늦추거나, 퇴화의 최종점을 덜 쇠약하게 만들거나, 피험 개체의 신체적 또는 정신적 웰빙 (well-being)을 개선하거나 시력을 향상시키는 것과 같은 객관적 또는 주관적 매개 변수를 포함하는, 손상, 병적 이상 또는 상태의 완화 또는 개선에 있어 성공이나 성공의 징후. 치료는 객관적 또는 주관적 매개 변수에 의해 평가될 수 있다; 여기에는 신체 검사, 신경 학적 검사 또는 정신과적 평가의 결과가 포함된다.

[0068] 달리 설명되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본원이 속하는 기술 분야의 통상의 업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 단수 용어인 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 달리 명시하지 않는 한, 복수의 대상을 포함한다. 유사하게, "또는"이라는 단어는 문맥상 달리 명시하지 않는 한, "and"를 포함하도록 의도된다. 따라서, "A 또는 B로 구성되는 (comprising A or B)"은 A 또는 B, 또는 A 및 B를 포함하는 것을 의미한다. 핵산 또는 폴리펩티드에 대해 제공된 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기 및 모든 분자량 또는 분자 질량 값은 근사치이며 설명을 위해 제공된 것임을 추가로 이해해야 한다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동일한 방법 및 물질이 본 명세서의 개시 내용의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질들은 하기에 기재된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고 문헌은 그 전체가 참조로 포함된다. 달리 명시되지 않는 한, "약 (about)"은 5% 이내이다. 상충되는 경우, 용어 설명을 포함하여 본 명세서가 우선한다. 또한, 재료, 방법 및 예는 예시일 뿐이며 제한하려는 의도가 아니다.

[0069] *세포외 기질 (ECM)에서 유래된 나노소포*

[0070] ECM에서 유래된 나노소포 (매트릭스 결합 나노소포, MBVs 라고도 함)는 PCT 공개 번호 WO 2017/151862에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 나노소포가 세포외 기질에 포매되어 있음이 개시되어 있다. 이러한 MBV는 분리가 가능하며 생물학적으로 활성이다. 따라서, 이러한 MBV는 단독으로 또는 다른 ECM과 함께 치료 목

적으로 사용될 수 있다. 이러한 MBV는 단독으로 또는 다른 ECM과 함께 생물학적 스캐폴드에서 사용될 수 있다. MBV는 IL-33을 함유하며, 심장병 및 심장 질환, 섬유성 질환 및 장애를 치료하는 데 사용된다는 것이 본원에 개시되어 있다. 일부 비제한적 예에서, 나노소포는 피험 개체의 대식세포에서 CD68 및 CD-11b의 발현을 유지시킨다.

[0071] 세포외 기질은 포유류 조직내 세포를 둘러싸고 지지하는 구조 단백질, 특수 단백질, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸 및 성장 인자를 포함하나 이에 제한되지 않는 구조적 및 기능적 생체 분자 및/또는 생체 거대 분자의 복잡한 혼합물이며, 달리 명시되지 않는 한, 무세포성이다. 일반적으로 알려진 MBV는 모든 유형의 세포외 기질 (ECM)에 포매되어 있으며 여기에서 분리될 수 있다. 따라서, MBV는 ECM 표면에 분리 가능하게 존재하지 않으며 엑소좀이 아니다.

[0072] 세포외 매트릭스는 예를 들어 미국 특허 번호 4,902,508; 4,956,178; 5,281,422; 5,352,463; 5,372,821; 5,554,389; 5,573,784; 5,645,860; 5,771,969; 5,753,267; 5,762,966; 5,866,414; 6,099,567; 6,485,723; 6,576,265; 6,579,538; 6,696,270; 6,783,776; 6,793,939; 6,849,273; 6,852,339; 6,861,074; 6,887,495; 6,890,562; 6,890,563; 6,890,564; 및 6,893,666에 개시되어 있으며; 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 그러나, ECM은 임의의 조직 또는 임의의 시험관 내 공급원으로부터 생성될 수 있으며, 여기서 ECM은 배양된 세포에 의해 생성되며 천연 ECM의 하나 이상의 중합체 성분 (구성 성분)을 포함한다. ECM 제제는 "탈세포화"되었거나 또는 "무세포성"으로 간주될 수 있으며, 이는 세포가 원천 조직 또는 배양에서 제거되었음을 의미한다.

[0073] 일부 구체예에서, ECM은 척추동물, 예를 들어 인간, 원숭이, 돼지, 소, 양 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 포유류 척추동물로부터 분리된다. ECM은 방광, 장, 간, 심장, 식도, 비장, 위 및 진피를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 장기 또는 조직에서 유래할 수 있다. 특정 비제한적 예에서, 세포외 기질은 식도 조직, 방광, 소장 점막하층, 진피, 탯줄, 심낭, 심장 조직 또는 골격근으로부터 분리된다. ECM은 예를 들어 점막하층, 상피 기저막, 고유층 (tunica propria) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 장기로부터 수득된 임의의 부분 또는 조직을 포함할 수 있다. 비제한적인 일 구체예에서, ECM은 방광으로부터 분리된다. ECM은 종양 조직에서 생성될 수 있다.

[0074] ECM은 기저막을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 다른 비제한적 구체예에서, ECM은 기저막의 적어도 일부를 포함한다. ECM 물질은 모세혈관 내피세포 또는 섬유세포와 같은 원래 조직을 구성하는 일부 세포성 요소를 보유하거나 보유하지 않을 수 있다. 일부 구체예에서, ECM은 기저막 표면 및 비-기저막 표면 모두를 포함한다.

[0075] 비제한적 일 구체예에서, ECM은 돼지 방광으로부터 수확된다 (방광 매트릭스 또는 UBM으로도 알려짐). 간단히 말해서, ECM은 돼지와 같은 포유류에서 방광 조직을 제거하고 지방 조직을 포함한 잔여 외부 결합 조직을 잘라내어 준비한다. 모든 잔여 소변은 수돗물로 반복 세척하여 제거한다. 조직은 먼저 상피 제거 용액 (deepithelializing solution), 예를 들어 고장성 식염수 (hypertonic saline, e.g. 1.0 N saline)에 제한없이 10분 내지 4시간 동안 담금으로써 박리된다. 고장성 식염수에 노출되면 기저막에서 상피 세포가 제거된다. 선택적으로 칼슘 킬레이트제 (calcium chelating agent)가 식염수에 첨가될 수 있다. 초기 박리 후 남은 조직은 상피 기저막 및 상피 기저막 바깥쪽의 조직층을 포함한다. 비교적 연약한 상피 기저막은 내강 표면의 기계적 마모에 의해 손상되고 제거된다. 다음으로 이 조직을 대부분의 바깥쪽 조직을 제거하지만 상피 기저막과 고유층 (tunica propria)은 유지하기 위해 추가 처리한다. 외부 장막 (outer serosal), 외막 (adventitial), 점막근층 (tunica muscularis mucosa), 점막하층 (tunica submucosa) 및 대부분의 점막근 (muscularis mucosa)은 기계적 마모 (mechanical abrasion) 또는 효소 처리 (예: 트립신 또는 콜라게나아제 사용)의 조합에 의해 남아있는 상피가 제거된 조직에서 제거되고 이어서 수화 및 마모된다. 이러한 조직의 기계적 제거는 예를 들어 Adson-Brown 겸자 및 Metzenbaum 가위를 사용하여 장간막 조직 (mesenteric tissues)을 제거하고, 축축한 거즈로 감싼 메스 손잡이 또는 다른 단단한 물체로 세로로 닦는 동작을 통해 근층 (tunica muscularis)과 점막하층 (tunica submucosa)을 닦아내어 수행된다. 절단 블레이드 (cutting blades)를 포함하는 자동화된 로봇식 절차, 레이저 및 다른 조직 분리 방법도 또한 고려된다. 이러한 조직이 제거된 후, 생성된 ECM은 주로 상피 기저막 (epithelial basement membrane)과 그 밑의 고유층 (tunica propria)으로 구성된다.

[0076] 다른 구체예에서, ECM은 장막 (tunica serosa) 및 근층 (tunica muscularis) 모두를 포함하는 외층을 제거하기 위해 메스 손잡이 및 습윤 거즈를 이용한 세로 와이핑 동작을 사용하여 돼지 방광 조직을 마멸시킴으로써 제조된다. 조직 분절의 외전 (eversion) 후, 점막하층의 내강 부분은 동일한 와이핑 동작을 사용하여 하부 조직에서 박리된다. 이때, 점막하층의 천공을 방지하기 위해 주의를 기울여야 한다. 이러한 조직이 제거된 후, 생성된

ECM은 주로 점막하층으로 구성된다 (미국 특허 제 9,277,999의 도 2 참조, 이는 본원에 참조로서 포함된다.).

[0077] ECM은 또한 분말로도 제조가 가능하다. 이러한 분말은 본원에 그 전체가 참조로 포함된 하기 문헌 (Gilbert *et al.*, Biomaterials 26 (2005) 1431-1435)의 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, UBM 시트를 동결 건조한 후 잘게 잘라 액체 질소에 담근다. 그런 다음 급속 냉동된 재료를 분쇄하고, 그 입자들을 회전식 나이프밀 (rotary knife mill)에 넣어 ECM을 분말화시킨다. 유사하게, ECM 조직내에 NaCl을 침전시켜 재료를 균일한 크기의 입자로 만들고, 이를 급속 냉동, 동결 건조 및 분말화시킨다. 될 수 있습니다.

[0078] 비제한적인 일 구체예에서, ECM은 소장 점막하층 또는 SIS로부터 유래된다. 상업적으로 이용 가능한 제제로는 SURGISIS™, SURGISIS-ES™, STRATASIS™ 및 STRATASIS-ES™ (Cook Urological Inc.; Indianapolis, Ind.) 및 GRAFTPATCH™ (Organogenesis Inc.; Canton Mass.) 등이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 또 다른 비제한적 구체예에서, ECM은 진피로부터 유래된다. 상업적으로 이용 가능한 제제로는 PELVICOL™ (유럽에서 PERMACOL™로 판매됨; Bard, Covington, Ga.), REPLIFORM™ (Microvasive; Boston, Mass.) 및 ALLODERM™ (LifeCell; Branchburg, N.J.) 등이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 또 다른 구체예에서, ECM은 방광으로부터 유래된다. 상업적으로 이용 가능한 제제로는 UBM (ACell Corporation; Jessup, Md.)가 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

[0079] MBV는 하기에 개시된 방법을 사용하여 세포외 기질로부터 이끌어낼 (방출) 수 있다. 일부 구체예에서, ECM은 펩신, 콜라게나제, 엘라스타제, 히알루로니다제 또는 프로테이나제 K와 같은 효소로 분해되고, MBV가 분리된다. 다른 구체예에서, MBV는 글리신 HCL, 시트르산 및 수산화 암모늄 용액을 사용한 pH의 변화; EDTA와 EGTA와 같은 킬레이트제의 사용; 염화칼륨 (KCl), 염화나트륨, 염화마그네슘, 요오드화나트륨, 티오시안산 나트륨과 같은 염을 사용함에 따른 이온 강도 및/또는 무질서 영향 (chaotropic effects); 또는 ECM을 구아니딘 HCl 또는 우레아와 같은 변성 조건에 노출시킴으로써 ECM으로부터 방출되고 분리된다.

[0080] 특정 예에서, MBV는 펩신, 엘라스타제, 히알루로니다제, 프로테이나제 K, 염 용액 또는 콜라게나제와 같은 효소로 ECM을 분해한 후 제조된다. ECM은 동결 해동되거나 (freeze-thawed) 기계적 분해 (mechanical degradation)의 대상이 될 수 있다.

[0081] 공개된 MBV는 IL-33을 포함한다. 일부 구체예에서, CD63 및/또는 CD81의 발현은 MBV에서 검출되지 않는다. 따라서, MBV는 CD63 및/또는 CD81을 발현하지 않는다. 특정 예에서 CD63과 CD81은 모두 나노소포에서 검출되지 않는다. 다른 구체예에서, MBV는 웨스턴 블롯에 의해 검출 가능한, 간신히 검출 가능한 수준의 CD63 및 CD81을 포함한다. 이러한 MBV는 $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이다. 당업자는 예를 들어 CD63 및 CD81에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 인 MBV를 쉽게 확인할 수 있다. 이러한 마커의 낮은 수준은 FACS (fluorescent activated cell sorting) 및 형광 표지된 항체를 사용하여 설정하여 CD63 및 CD81의 소량 및 다량에 대한 임계값을 결정할 수 있다. 개시된 MBV는 생물학적 유체에 존재하기 때문에 ECM의 표면에 일시적으로 부착될 수 있는 엑소좀과 같은 나노소포와 다르다.

[0082] MBV는 리실 산화효소 (Lox)를 포함한다. 일반적으로 ECM에서 유래된 나노소포는 Lox 함량이 엑소좀보다 높다. Lox는 MBV 표면에서 발현된다. 나노-LC MS/MS 단백질체 분석은 Lox 단백질을 검출하는데 사용할 수 있다. Lox의 정량화는 상기에 기재한 대로 수행이 가능하다 (Hill RC, et al., Mol Cell Proteomics. 2015; 14(4):961-73).

[0083] 특정 구체예에서, MBV는 하나 이상의 miRNA를 포함한다. 특정 비제한적 예에서, MBV는 miR-143, miR-145 및 miR-181 중 1개, 2개 또는 3개 모두를 포함한다. MiR-143, miR-145 및 miR-181은 당 업계에 공지되어 있다.

[0084] 상기 miR-145의 핵산 서열은 MiRbase 수탁 번호 MI0000461 (본원에 참조로 포함됨)에서 제공된다. 상기 miR-145의 핵산 서열은 CACCUUGUCCUCACGGUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCUUAGAUGCUAAGAUGGGGAUUCCUGGAAAUACUGUUCUUGAGGUCAUGGUU (서열 번호 1)이다. 상기 miR-181의 핵산 서열은 MiRbase 수탁 번호 MI0000269 (본원에 참조로 포함됨)에서 제공된다. 상기 miR-181의 핵산 서열은 AGAAGGGCUAUCAGGCCAGCCUUCAGAGGACUCCAAGGAACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUUUGGGAUUUGAAAAAACCACUGACCGUUGACUGUACCUUGGGGUCCUUA (서열 번호 2)이다. 상기 miR-143의 핵산 서열은 NCBI 수탁 번호 NR_029684.1 (2018년 3월 30일, 본원에 참조로 포함됨)에서 제공된다. 상기 miR-143의 핵산 서열은 GCGCAGCGCC CUGUCUCCCA GCCUGAGGUG CAGUGCUGCA UCUCUGGUCA GUUGGGAGUC UGAGAUGAAG CACUGUAGCU CAGGAAGAGA GAAGUUGUUC UGCAGC (서열 번호 3)이다.

[0085] 일부 구체예에서, 투여 후, MBV는 대상 개체의 대식세포상에서 CD68 및 CD-11b의 발현을 유지시킨다. 개시된 실

험적 연구에서, 나노소포 처리된 대식세포는 주로 M2 표현형을 나타내는 F4/80+Fizz1+ 이다. 따라서, 일부 구예에서, 대식세포는 M2 표현형을 유지한다.

[0086] 본원에 개시된 MBV는 약학적 전달을 위한 조성물로 제형화될 수 있고, 바이오스캐폴드 및 장치에 사용될 수 있다. MBV는 PCT 공개 번호 WO 2017/151862에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0087] *ECM으로부터 MBVs의 분리*

[0088] MBV를 생산하기 위하여, ECM은 모든 관심있는 세포에 의해 생산되거나 상업적 공급원으로부터 활용될 수 있다(상기 참조). MBV는 치료 대상 개체와 동일한 종 또는 다른 종에서 생산될 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 방법은 ECM을 효소로 분해하여 분해된 ECM을 생성하는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, ECM은 펩신, 엘라스타제, 히알루로니다제, 콜라게나제, 메탈로프로테이나제 및/또는 프로테이나제 K 중 하나 이상의 효소로 분해된다. 특정 비제한적 예에서, ECM은 엘라스타제 및/또는 메탈로프로테이나제만으로 분해된다. 다른 비제한적 예에서, ECM은 콜라게나제 및/또는 트립신 및/또는 프로테이나제 K로 분해되지 않는다. 다른 구체예에서, ECM은 세제로 처리된다. 추가 구체예에서, 본 발명의 방법은 효소의 사용을 포함하지 않는다. 특정 비제한적 예에서, 본 발명의 방법은 MBV를 분리하기 위해 염화칼륨과 같은 염과 같은 무질서 유발제 (chaotropic agents) 또는 이온 강도 (ionic strength)를 사용한다. 추가 구체예에서, ECM은 MBV의 분리 이전에 MBV의 내용물이 증가되도록 조작될 수 있다.

[0089] 일부 구체예에서, ECM은 효소로 분해된다. ECM은 약 12시간 내지 약 48시간, 예컨대 약 12시간 내지 약 36시간 동안 효소로 분해될 수 있다. ECM은 약 12시간, 약 24시간, 약 36시간 또는 약 48시간 동안 효소로 분해될 수 있다. 하나의 특정 비제한적 예에서, ECM은 실온에서 효소로 분해된다. 그러나 상기 분해는 약 4℃ 또는 약 4℃에서 25℃ 사이의 온도에서 수행될 수 있다. 일반적으로 ECM은 콜라겐 섬유를 제거하기에 충분한 시간과 온도에서 효소로 분해된다. 분해 과정은 조직 소스 (tissue source)에 따라 달라질 수 있다. 선택적으로, ECM은 효소로 분해되기 전 또는 후에 냉동 및 해동 과정으로 처리된다. ECM은 이온성 및/또는 비이온성 세제를 포함하는 세제로 처리될 수 있다.

[0090] 분해된 ECM은 원심분리 등으로 처리되어 섬유소가 없는 상청액을 분리한다. 일부 구체예에서, 분해된 ECM은 예를 들어 제 1 단계 동안 약 300 g 내지 약 1000 g에서 원심분리된다. 따라서, 분해된 ECM은 약 400 g 내지 약 750 g, 예컨대 약 400 g, 약 450 g, 약 500 g 또는 약 600 g에서 원심분리될 수 있다. 상기 원심분리는 약 10분 내지 약 15분, 예를 들어 약 10분 내지 약 12분, 예컨대 약 10분, 약 11분, 약 12분, 약 14분, 약 14분, 또는 약 15분 동안 수행할 수 있다. 분해된 ECM을 포함하는 상등액을 수확한다.

[0091] MBV는 Lox를 포함한다. 일부 구체예에서, 이러한 MBV를 분리하는 방법은 엘라스타제 및/또는 메탈로프로테나제로 세포외 기질을 분해하여 분해된 세포 외 기질을 생성하는 단계; 상기 분해된 세포외 기질을 원심분리하여 콜라겐 섬유 잔여물을 제거하여 섬유가 없는 상등액을 생성하는 단계; 상기 섬유가 없는 상등액을 원심분리하여 고형 물질을 분리하는 단계; 및 상기 고형 물질을 담체에 현탁시키는 단계를 포함한다.

[0092] 일부 구체예에서, 상기 분해된 ECM은 두 번째 단계로 약 2,000 g 내지 약 3,000 g로 원심분리될 수 있다. 따라서, 상기 분해된 ECM은 약 2,500 g 내지 약 3,000 g로 구체적으로 약 2,000 g, 2,500 g, 2,750 g 또는 3,000 g로 원심분리될 수 있다. 상기 원심분리는 약 20분 내지 약 30분, 예를 들어 약 20분 내지 약 25분, 예를 들어 약 20분, 약 21분, 약 22분, 약 23분, 약 24분, 약 25분, 약 26분, 약 27분, 약 28분, 약 29분 또는 약 30분 동안 수행한다. 상기 원심분리를 통해, 분해된 ECM을 포함하는 상등액을 얻는다.

[0093] 추가 구체예에서, 상기 분해된 ECM은 세 번째 단계로 약 10,000 g 내지 약 15,000 g로 원심분리될 수 있다. 따라서, 상기 분해된 ECM은 약 10,000 g 내지 약 12,500 g로 구체적으로 약 10,000 g, 11,000 g 또는 12,000 g로 원심분리될 수 있다. 상기 원심분리는 약 25분 내지 약 40분, 예를 들어 약 25분 내지 약 30분, 예를 들어 약 25분, 약 26분, 약 27분, 약 28분, 약 29분, 약 30분, 약 31분, 약 32분, 약 33분, 약 34분, 약 35분, 약 36분, 약 37분, 약 38분, 약 39분 또는 약 40분 동안 수행한다. 상기 원심분리를 통해, 분해된 ECM을 포함하는 상등액을 얻는다.

[0094] 이러한 원심분리 단계 중 하나, 둘 또는 셋 모두를 독립적으로 사용할 수 있다. 일부 구체예에서, 3 원심분리 단계들이 모두 사용된다. 상기 원심분리 단계는 2, 3, 4 또는 5회 반복할 수 있다. 한 구체예에서, 모든 3 원심분리 단계들은 3회 반복된다.

[0095] 일부 구체예에서, 상기 분해된 ECM은 약 500 g에서 약 10분 동안 원심분리되고, 약 2,500 g에서 약 20분 동안 원심분리되고/되거나 약 10,000 g에서 약 30분 동안 원심분리된다. 상기 세 단계 모두와 같은 이러한 단계(들)

는 2, 3, 4 또는 5회 반복된다. 따라서, 하나의 비제한적 예에서, 분해된 ECM은 약 500 g에서 약 10분 동안 원심분리되고, 약 2,500 g에서 약 20분 동안 원심분리되고, 약 10,000 g에서 약 30분 동안 원심분리된다. 이러한 세 단계 원심분리는 세 번 반복된다. 따라서, 섬유질이 없는 상등액이 생성된다.

[0096] 그런 다음 상기 섬유소가 없는 상등액을 원심분리하여 MBV를 분리한다. 일부 구체예에서, 상기 섬유소-프리 상등액은 약 100,000 g 내지 약 150,000 g에서 원심분리된다. 따라서, 상기 섬유소-프리 상등액은 약 100,000 g 내지 약 125,000 g, 예컨대 약 100,000 g, 약 105,000 g, 약 110,000 g, 약 115,000 g 또는 약 120,000 g에서 원심분리된다. 상기 원심분리는 약 60분 내지 약 90분, 예를 들어 약 70분 내지 약 80분, 예를 들어 약 60분, 약 65분, 약 70분, 약 75분, 약 80분, 약 85분 또는 약 90분 동안 수행한다. 비제한적인 일 예에서, 상기 섬유소-프리 상등액은 약 70분 동안 약 100,000 g에서 원심분리된다. 상기 원심분리를 통해 고체 물질, 즉 MBV가 수집된다. 그런 다음 이러한 MBV는 버퍼와 같은 모든 담체에 재현탁될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0097] 추가 구체예에서 ECM은 효소로 분해되지 않는다. 이러한 방법에서 ECM은 인산염 완충 식염수 (phosphate buffered saline)와 같은 등장성 식염수 용액 (isotonic saline solution)에 현탁된다. 그런 다음 염의 최종 농도가 약 0.1 M 이상이 되도록 염을 상기 현탁액에 첨가한다. 상기 농도는 최대 약 3 M, 예를 들어 약 0.1 M 내지 약 3 M, 또는 약 0.1 M 내지 약 2 M 일 수 있다. 구체적으로 상기 염 농도는 예를 들어 약 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 0.7 M, 0.6 M, 0.7 M, 0.8 M., 0.9 M, 1.0 M, 1.1 M, 1.2 M, 1.3 M, 1.4 M, 1.5 M, 1.6 M, 1.7 M, 1.8 M, 1.9 M, 또는 2 M 일 수 있다. 일부 비제한적 구체예에서, 상기 염은 염화칼륨, 염화나트륨 또는 염화마그네슘이다. 다른 구체예에서, 상기 염은 염화나트륨, 염화마그네슘, 요오드화나트륨, 티오시안산 나트륨, 나트륨염, 리튬염, 세슘염 또는 칼슘염이다.

[0098] 일부 구체예에서, ECM은 약 10분 내지 약 2시간, 예컨대 약 15분 내지 약 1시간, 약 30분 내지 약 1시간, 또는 약 45분 내지 약 1시간 동안 염 용액에 현탁된다. ECM은 약 15분, 20분, 25분, 30분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분, 60분, 65분, 70분, 75분, 80분, 85분, 90분, 95분, 100분, 105분, 110분, 115분 또는 120분 동안 염 용액에 현탁될 수 있다. 상기 ECM은 약 4℃ 내지 약 50℃의 온도에서, 구체적으로 약 4℃ 내지 약 25℃ 또는 약 4℃ 내지 약 37℃의 온도에서 염 용액에 현탁될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 비제한적인 예에서 상기 ECM은 약 4℃ 에서 염 용액에 현탁된다. 다른 특정 비제한적 예에서 상기 ECM은 약 22℃ 또는 약 25℃ (실온)에서 염 용액에 현탁된다. 추가의 비제한적 예에서, 상기 ECM은 약 37℃ 에서 염 용액에 현탁된다.

[0099] 일부 구체예에서, 상기 방법은 약 0.4 M 이상의 염 농도에서 세포외 기질을 배양하는 단계; 분해된 세포외 기질을 원심분리하여 콜라겐 섬유 잔여물을 제거하고 상등액을 분리하는 단계; 상기 상등액을 원심분리하여 고체 물질을 분리하는 단계; 및 담체에 상기 고체 물질을 현탁시켜 세포외 기질로부터 MBV를 분리하는 단계를 포함한다.

[0100] 염 용액에서 배양 후, 상기 ECM을 원심분리하여 콜라겐 섬유를 제거한다. 일부 구체예에서, 분해된 ECM은 또한 약 2000 g 내지 약 5000 g에서 원심분리 될 수 있다. 따라서, 상기 분해된 ECM은 약 2,500 g 내지 약 4,500 g, 예를 들어 약 2,500 g, 약 3,000 g, 약 3,500 g, 약 4,000 g 또는 약 4,500 g에서 원심분리 될 수 있다. 하나의 특정 비제한적 예에서, 상기 원심분리는 약 3,500 g에서 수행된다. 상기 원심분리는 약 20 내지 약 40 분, 예를 들어 약 25 내지 약 35 분, 약 20 분, 약 21 분, 약 22 분, 약 23 분, 약 24 분, 약 25 분, 약 26 분, 약 27 분, 약 28 분, 약 29 분, 약 30 분, 약 31 분, 약 32 분, 약 33 분, 약 34 분 또는 약 35 분 동안 수행된다. 상기 원심분리를 통해 상등액을 얻는다.

[0101] 추가 구체예에서, 상기 상등액은 세 번째 단계로 약 100,000 g 내지 약 150,000 g에서 원심분리 될 수 있다. 따라서, 상기 분해된 ECM은 약 100,000 g 내지 약 125,000 g, 예를 들어 약 100,000 g, 110,000 g 또는 120,000 g에서 원심분리 될 수 있다. 상기 원심분리는 약 30 분 내지 약 2.5 시간, 예를 들어 약 1시간 내지 약 3시간 동안, 예를 들어 약 30 분, 약 45 분, 약 60 분, 약 90 분 또는 약 120 분 (2시간) 동안 수행된다. 상기 원심분리로 얻은 고체 물질을 완충 식염수와 같은 용액에 현탁시켜 MBV를 분리한다.

[0102] 또 다른 구체예에서, ECM은 이에 제한되지는 않지만 인산염 완충 식염수 (phosphate buffered saline)와 같은 등장성 식염수 용액 (isotonic saline solution)에 현탁된다. 원심분리 또는 다른 방법들을 사용하여 큰 입자를 제거할 수 있다 (하기 참조). 그 후 한외여과 (ultrafiltration)를 사용하여 ECM으로부터 MBV를 분리한다. 이때, MBV 입자의 크기는 약 10 nm 내지 약 10,000 nm, 약 10 nm 내지 약 1,000 nm, 예컨대 약 10 nm 내지 약 300 nm 이다.

[0103] 특정한 비제한적 예에서, 상기 등장성 완충 식염수 용액은 약 0.164 mM의 총 염 농도 및 약 7.2 내지 약 7.4의

pH를 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 등장성 완충 식염수 용액은 0.002 M KCl 내지 약 0.164 M KCL, 예컨대 약 0.0027 M KCl (인산염 완충 식염수 중 KCL의 농도)을 포함한다. 상기 현탁액은 초원심분리로 처리된다.

[0104] 등장성 완충 염 용액에서 배양한 후, 상기 ECM을 원심분리하여 콜라겐 섬유를 제거한다. 일부 구체예에서, 분해된 ECM은 또한 약 2000 g 내지 약 5000 g에서 원심분리 될 수 있다. 따라서, 상기 분해된 ECM은 약 2,500 g 내지 약 4,500 g, 예를 들어 약 2,500 g, 약 3,000 g, 약 3,500 g, 약 4,000 g 또는 약 4,500 g에서 원심분리 될 수 있다. 하나의 특정 비제한적 예에서, 상기 원심분리는 약 3,500 g에서 수행된다. 상기 원심분리는 약 20 내지 약 40 분, 예를 들어 약 25 내지 약 35 분, 약 20 분, 약 21 분, 약 22 분, 약 23 분, 약 24 분, 약 25 분, 약 26 분, 약 27 분, 약 28 분, 약 29 분, 약 30 분, 약 31 분, 약 32 분, 약 33 분, 약 34 분 또는 약 35 분 동안 수행된다.

[0105] 현탁액에서 큰 분자량의 물질들을 제거하는데 미세여과 (microfiltration) 및 원심분리, 또는 그 둘의 조합을 사용할 수 있다. 한 구체예에서, 200 nm가 넘는 큰 크기의 분자 물질은 미세여과를 사용하여 제거된다. 다른 구체예에서, 큰 크기의 물질은 원심분리를 사용하여 제거된다. 세 번째 구체예에서, 미세여과 및 초원심분리 모두를 큰 분자량의 물질을 제거하기 위해 사용된다. 큰 분자량 물질, 예를 들어 약 10,000 nm 초과, 약 1,000 nm 초과, 약 500 nm 초과 또는 약 300 nm 초과 물질들이 상기 현탁 된 ECM으로부터 제거된다.

[0106] 미세여과를 위한 용출액 또는 상등액은 한외여과를 거친다. 따라서, 약 10,000 nm 미만, 약 1,000 nm 미만, 약 500 nm 미만 또는 약 300 nm 미만의 입자를 포함하는 용출액이 수집되고 이용된다. 상기 용출액은 분자량 컷오프 (MWCO)가 3,000 ~ 100,000인 멤브레인을 사용하여 한외여과 된다. 실시예에서는 100,000 MWCO 멤브레인이 사용되었다.

[0107] ***대상 개체를 치료하는 방법***

[0108] 본원에 개시된 방법은 IL-33을 함유하는 MBV의 치료적 유효량을 대상 개체에게 투여함으로써 대상 개체를 치료하고 대상 개체에서 질환 또는 장애를 억제하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 질환 또는 장애를 예방한다.

[0109] 비제한적인 일 구체예에서, 상기 질환 또는 장애는 기관 또는 조직의 섬유증이다. 예를 들어, 상기 섬유증은 간경화, 폐 섬유증, 심장 섬유증, 종격동 섬유증, 관절 섬유증, 골수 섬유증, 신성 전신성 섬유증, 켈로이드 섬유증, 경피증 섬유증, 신장 섬유증, 림프 조직 섬유증, 동맥 섬유증, 모세혈관 섬유증, 혈관 섬유증 또는 췌장 섬유증이다. 한 구현예에서, 상기 섬유증은 폐 섬유증이다. 상기 섬유증은 특발성 폐 섬유증, 질병 또는 환경 독소 노출로 인한 폐 섬유증, 또는 방사선 유발 폐 섬유증을 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 섬유증은 심장 섬유증이다. 심장 섬유증에는 반응성 간질섬유증, 대치섬유화, 침윤성 섬유증 또는 심내막심근 섬유증이 포함될 수 있다. 한 구체예에서, 상기 섬유증은 급성 또는 만성 장기거부와 관련이 있다. 예를 들어, 한 구체예에서, 상기 섬유증은 이식된 심장의 급성 또는 만성 거부와 관련된 심장 섬유증이다.

[0110] 다른 비제한적 구체예에서, 상기 질환 또는 장애는 심장병 또는 심장 질환이다. 한 구체예에서, 상기 질환 또는 장애는 심근경색이 아닌 심장병 또는 심장 질환이다. 다른 구체예에서, 상기 심장병 또는 심장 질환은 심근 허혈이 아닌 심장병 또는 심장 질환이다. 또 다른 구체예에서, 상기 심장병 또는 심장 질환은 심근 경색 또는 심근 허혈이 아닌 심장병 또는 심장 질환이다. 한 구체예에서, 상기 질환 또는 장애는 심근 경색 또는 심근 허혈이다. 한 구체예에서, 상기 심장병 또는 심장 질환은 심근 경색, 심근 허혈, 급성 관상동맥 증후군, 만성 안정 협심증, 불안정 협심증, 혈관 성형술, 일과성 허혈 발작, 허혈-재관류 손상, 파행, 혈관 폐색, 동맥 경화증, 심부전, 만성 심부전, 급성 비대상성 심부전, 심장 비대, 대동맥 판막 질환, 대동맥 또는 승모판 협착증, 심근증, 심방세동, 심장 부정맥 및 심낭 질환 등으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 상기 심장병 또는 심장 질환은 급성 관상동맥 증후군, 만성 안정 협심증, 불안정 협심증, 혈관 성형술, 일과성 허혈 발작, 허혈-재관류 손상, 파행, 혈관 폐색, 동맥 경화증, 심부전, 만성 심부전, 급성 비대상성 심부전, 심장 비대, 대동맥 판막 질환, 대동맥 또는 승모판 협착증, 심근증, 심방세동, 심장 부정맥 및 심낭 질환 등으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 구체예에서, 상기 질환은 급성 관상동맥 증후군, 만성 안정 협심증, 불안정 협심증, 혈관 성형술, 일시적 허혈 발작, 파행, 혈관 폐색, 동맥 경화증, 심부전, 심장 비대 및 심근증 등으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 구체예에서, 상기 질환은 심근 경색, 심근 허혈, 급성 관상동맥 증후군, 만성 안정 협심증, 불안정 협심증, 혈관 성형술, 일과성 허혈 발작, 파행, 혈관 폐색, 동맥 경화증, 심부전, 심장 비대 및 심근증 등으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0111] 또 다른 비제한적 구체예에서, 상기 질병 또는 장애는 고형 장기 이식 거부이다. 한 구체예에서, 이식된 고형

장기는 간, 신장, 심장, 피부, 폐, 췌장 또는 장이다. 한 구체예에서, 이식된 고형 장기는 폐이다. 다른 구체예에서, 이식된 고형 장기는 심장이다. 한 구체예에서, 상기 이식 거부는 만성 장기 이식 거부이다. 다른 구체예에서, 상기 이식 거부는 급성 장기 이식 거부이다.

[0112] 또 다른 비제한적 구체예에서, 상기 질환 또는 장애는 이식된 조직, 예를 들어 심장 판막, 혈관, 뼈, 각막 또는 얼굴, 손 또는 손가락을 포함하는 혼합 조직 동종 이식편의 거부이다.

[0113] 심장병 또는 심장 질환, 고형 장기 이식 거부 또는 장기 또는 조직의 섬유증과 같은 질환 또는 장애를 갖고 있거나 발병할 위험이 있는 대상 개체는 막 결합 ST2를 통해 IL-33 신호를 증가시켜 치료할 수 있다. 미국 특허 출원 제 2008/0003199 A1 참조. 상기 문헌은 본원에 참조로 포함된다. MBV는 IL-33을 포함하므로 이러한 피험 개체에게 사용될 수 있음이 본원에 개시되어 있다. 막에 캡슐화된 IL-33을 포함하는 MBV의 사용은 IL-33이 ST2 수용체에 결합하는 것을 방지하고 전염증성 키나제 캐스케이드 (pro-inflammatory kinase cascade)의 유도를 완화시킨다. 일부 비제한적 예에서, 나노소포는 피험 개체의 대식세포에서 CD68 및 CD-11b의 발현을 유지시킨다.

[0114] IL-33은 MBV의 내강 내에 안정적으로 존재한다. MBV 내에 캡슐화된 IL-33은 MBV의 세포 흡수 후 고전적인 ST2 수용체 신호 전달 경로를 우회하여 면역 세포의 분화 및/또는 기능을 지시한다.

[0115] 일부 구체예에서, 심장병 또는 심장 장애를 갖고 있거나 발병할 위험이 있다고 진단된 (본원에서 제공된 방법 및/또는 당 업계에 공지된 방법으로) 대상 개체는 본원에 개시된 방법을 사용하여 치료될 수 있다. 상기에서 후자 그룹에는 심혈관 이상을 겪을 위험성이 있는 개체들이 포함된다. 더 많은 구체예에서, 상기 심장병은 심근경색 또는 심근 허혈이 아니다. 다른 구체예에서, 상기 장애는 심장 섬유증 및/또는 심부전이다. 한 구체예에서, 상기 장애는 심부전이다.

[0116] 상기 방법 및 조성물은 모든 심장 질환 또는 장애의 급성, 만성 및 예방적 치료에 사용된다. 본원에 사용된 바와 같이, 급성 치료는 현재 특정 질환 또는 장애, 예컨대 허혈성 질환을 가진 대상 개체의 치료를 의미한다. 예방적 치료는 질병 또는 장애를 가질 위험이 있지만 현재는 질병 또는 장애의 증상을 갖거나 경험하지 않고 있는 대상 개체의 치료를 의미한다. 만일 치료가 필요한 대상 개체가 특정 심장 질환 또는 장애를 갖고 있다면, 심장 질환 또는 장애를 치료한다는 것은 상기 질환 또는 장애 또는 상기 질환 또는 장애로부터 발생하는 하나 이상의 증상을 개선, 감소 또는 제거하는 것을 의미한다. 만일 치료가 필요한 대상 개체가 심장 질환 또는 장애가 발생할 위험이 있는 경우라면, 상기 대상 개체를 치료한다는 것은 상기 대상 개체에서 질병 또는 장애가 발생할 위험을 줄이는 것을 의미한다.

[0117] 이식편대숙주질환 (graft-versus-host disease, GVHD)을 예방 또는 치료하기 위한 방법이 본원에 개시되어 있다. 따라서, GVHD를 가지고 있거나 또는 GVHD의 발생 위험이 있는 대상 개체를 치료를 위해 선택할 수 있다. GVHD는 급성 또는 만성 일 수 있다.

[0118] 일부 구체예에서, 고형 장기 이식과 같은 이식된 장기의 수용자인 대상 개체가 치료된다. 이식된 장기의 예로는 신장, 피부, 간, 혼합 조직 동종 이식편 (CTA; 얼굴, 손, 사지, 음경 등을 포함) 또는 심장을 포함한 고체 장기 이식물이 포함된다. 신장 이식은 고형 장기 이식의 약 60%, 간 이식은 21%, 심장 이식은 8%, 폐 이식은 4%를 차지하며, 나머지 7%는 췌장과 장과 같은 다른 장기 이식이다. (OPTN/SRTR 연례 보고서 2004). 장기의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 심장, 간, 신장, 췌장, 폐 및 소장과 같은 실질 기관 (parenchymal organs)을 포함한다. 그러나 본원에 개시된 방법은 심장 판막, 혈관, 피부, 뼈 및 각막의 이식에도 적용 가능하다. 따라서, 모든 유형의 장기 이식을 받은 대상 개체를 치료를 위해 선택할 수 있다. 상기 이식은 고형 장기 이식일 수 있다. 상기 고형 장기는 심장일 수 있다. MBV는 이식시에 또는 이식 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 후에 투여될 수 있다. 일부 비제한적 예에서, MBV는 이식물에 직접 투여될 수 있다.

[0119] 본원에는 고형 장기 이식의 급성 또는 만성 거부와 같은 거부를 억제하는 방법이 개시되어 있다. 본 발명의 억제제에 의해 억제되는 거부의 유형은 특별히 제한되지는 않지만, 실제 이식 의학에서 문제가 되는 급성 거부일 수 있다. 이러한 거부 반응은 동종 이식편이 조직 적합성을 결정하는 MHC (major histocompatibility complex)의 차이로 인해 외래 항원으로 인식되어 수용자의 세포독성 T 세포와 헬퍼 T 세포의 활성화를 통해 공격받는 병리학적 상태이다. 급성 거부 반응은 일반적으로 이식 후 3개월 이내에 발생한다. 그러나 거부 반응은 이식 3개월 이상 후에 동종 이식 조직으로의 세포 침윤으로 인식될 수도 있다. 본원에 개시된 방법은 이식 3개월 이내 또는 이식 3개월 후를 포함하여 이식 후 언제든지 사용할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 손상을 억제함으로써 이식된 장기의 생존력을 개선한다.

[0120] 추가 구체예에서, 대상 개체는 섬유증 관련 질환을 갖고 있거나 가질 위험이 있다. 본원에서는 치료적 유효량의

MBV를 사용하여 섬유증을 감소시키는 방법도 제공된다. 이러한 방법은 시험관 내 또는 생체 내에서 수행될 수 있다. 본원에 사용된 "접촉"이라는 용어는 MBV와 같은 제제를 하나 이상의 세포와 직접 상호 작용하도록 배치하거나, 결과적으로 하나 이상의 세포가 어떤 방식으로 영향을 받도록 간접적으로 배치하는 것을 의미한다. 상기 방법을 생체 내에서 수행하는 경우, 대상 개체에 MB가 섬유증을 감소시키는데 효과적인 양으로 투여된다. 추가 구체예에서, 본원에 개시된 방법은 섬유증을 가진 조직 또는 기관에 고유한 해부학적으로 적절한 세포들을 증가시킨다.

[0121] 심장 섬유증의 경우, 대상 개체에 섬유증을 감소시키고/감소시키거나 심장 근육 세포를 증가시키는데 효과적인 양으로 MBV를 투여한다. 천연 세포의 성장 또는 섬유증 감소를 평가하는 방법은 당업자에게는 용이하고 명백할 것이다. 따라서, 섬유증 관련 질환을 가지고 있거나 발병할 위험성이 있는 피험 개체는 MBV를 투여하여 치료할 수 있다. 특정 비제한적 구체예에서, 섬유증을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 상기 섬유증은 간경화, 폐 섬유증, 심장 섬유증, 종격동 섬유증, 관절 섬유증, 골수 섬유증, 신성 전신성 섬유증, 켈로이드 섬유증, 경피증 섬유증, 신장 섬유증, 림프 조직 섬유증, 동맥 섬유증, 모세혈관 섬유증, 혈관 섬유증 또는 췌장 섬유증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 비제한적 구체예에서, 상기 장애는 간질성 폐 섬유증 또는 직업적 노출에 의해 유도된 섬유증과 같은 폐 섬유증이다.

[0122] 일부 구체예에서, 폐의 치료를 위해, MBV를 포함하는 조성물이 흡입 제제를 사용하여 투여될 수 있다. 이러한 흡입 제제에는 에어로졸, 미립자 등이 포함될 수 있다. 일반적으로, 흡입을 위한 입자의 크기는 약물이 흡수를 위해 폐의 폐포 영역에 도달하기 위해 약 1 μm 이하이다. 그러나 폐에서의 배치 영역을 조절하기 위해 상기 입자 크기는 변경될 수 있다. 따라서, 호흡 세기관지 및 공기 공간에 침착시키기 위해 더 큰 입자들 (예: 직경 약 1 내지 약 5 μm)이 사용될 수 있다.

[0123] 흡입에 의한 투여를 위해, 상기 조성물은 적합한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적절한 가스를 사용하여 가압된 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공함으로써 투여 단위를 결정할 수 있다. 흡입기 (inhaler) 또는 주입기 (insufflator)에서 사용하기 위한 캡슐 및 카트리지는 화합물의 분말 혼합물과 락토오스 또는 전분과 같은 적합한 분말 베이스를 함유하여 제형화될 수 있다.

[0124] 다른 구체예에서, 치료 유효량의 추가 제제, 예컨대 항염증제, 기관지 확장제, 효소, 거담제, 류코트리엔 길항제, 류코트리엔 형성 억제제 또는 비만 세포 안정화제가 MBV와 함께 투여된다. 이들은 단일 제형에서와 같이 동시에 또는 순차적으로 투여 될 수 있다.

[0125] 치료 효과는 당업자에게 공지된 방법으로 폐기능을 모니터링함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 치료 전, 치료 중 또는 치료 후에 다양한 측정 가능한 폐기능의 매개변수들을 고려할 수 있다. 폐기능은 흡기 유량, 호기 유량 및 폐 부피를 포함하되 이에 제한되지 않는 여러 물리적으로 측정 가능한 폐의 작용 중 하나를 테스트하여 모니터링할 수 있다. 이러한 매개 변수 중 하나 이상에서 수학 공식 및 통계적 방법에 의해 결정된 통계적으로 유의미한 증가는 치료의 효능을 나타낸다.

[0126] 임상에서 가장 일반적으로 사용되는 폐기능을 측정하는 방법은 특정 매개 변수를 측정하기 위해 흡기 및 호기 조작의 시간 측정을 포함한다. 예를 들어, FVC는 깊은 초기 들이마심 후 환자가 내쉬는 총 부피를 리터 단위로 측정한다. 이러한 매개 변수는 FEV1과 함께 평가할 때 기관지 수축을 정량적으로 평가할 수 있도록 한다. FVC 또는 FEV1에서 당업자에게 잘 알려진 수학 공식에 의해 결정된 통계적으로 유의한 증가는 기관지 수축의 감소를 반영하고, 치료가 효과적임을 나타낸다.

[0127] 노력성 폐활량 (forced vital capacity) 결정의 문제점은 노력성 폐활량 (즉, 최대 흡기에서 최대 호기까지의 강제 호기) 조작이 주로 기술에 의존한다는 것이다. 즉, 주어진 피험 개체는 일련의 연속적 FVC 조작 동안 다른 FVC 값을 생성할 수 있다. 강제 호기 과정의 중간 부분에서 결정되는 FEF 25-75 또는 노력성 호기유량 (forced expiratory flow)은 FVC보다 기술에 덜 의존하는 경향이 있다. 유사하게, FEV1은 FVC보다 기술에 덜 의존하는 경향이 있다. 따라서, FEF 25-75 또는 FEV1에서 당업자에게 잘 알려진 수학 공식에 의해 결정된 통계적으로 유의한 증가는 기관지 수축의 감소를 반영하며, 치료가 효과적임을 나타낸다.

[0128] 폐기능의 지표로서 호기된 공기의 양을 측정하는 것 외에도 호기 주기의 다른 부분에 대해 측정된 분당 리터 단위의 유량은 환자의 폐기능 상태를 결정하는 데 유용할 수 있다. 특히, 최대 노력형 호기 (forced maximal exhalation) 중에 분당 리터로 얻어지는 최고 송풍량 (airflow rate)인 최대 호기유량 (peak expiratory flo

w)은 천식 및 기타 호흡기 질환 환자의 종합적 폐기능과 관련이 있다. 따라서, 당업자에게 잘 알려진 수학 공식에 의해 결정된, 투여 후 최대 호기유량의 통계적으로 유의한 증가는 치료가 효과적임을 나타낸다.

[0129] 일부 구체예에서, 이미 진단을 받았고 심장 질환 또는 장애 또는 섬유증 관련 질환 또는 이식 거부를 치료를 위한 또 다른 치료제로 치료 과정에 있는 대상 개체가 치료를 위해 선택된다. 상기 치료제는 화학적 또는 생물학적 제제일 수 있고 또한 식이 및/또는 운동과 같은 비-약물치료일 수도 있다. 일부 구체예에서, 상기 치료제 (심장 질환 또는 장애용)는 C-반응성 단백질 (CRP) 수준을 낮추는 치료제를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 치료제 (심장 질환 또는 장애용)는 스타틴 (statin)을 포함한다. 추가 구체예에서, 1 mg/L 이상의 CRP 수준을 갖는 개체가 치료를 위해 선택된다. 상기 치료제는 예를 들어, 이식 거부 치료시 사용되는 면역 억제제일 수 있다. 섬유증 관련 질환에 대한 치료는 예를 들어, 항염증제 또는 면역 억제제의 사용일 수 있다.

[0130] 일부 구체예에서, 예를 들어 심근 경색증과 같은 초기 (1차) 심혈관 사건이 있거나 혈관 성형술을 받은 개체가 개시된 방법으로 치료하기 위해 선택된다. 초기 심혈관 사건을 경험한 개체는 두 번째 (2차) 심혈관 사건을 경험할 위험성이 높다. 일부 구체예에서, 피험 개체는 일차 심혈관 사건을 갖지 않았지만 하나 이상의 위험 인자를 가지고 있기 때문에 심혈관 사건을 경험을 가질 위험이 높다. 일차 심혈관 사건에 대한 위험 인자의 예로는 고지혈증, 비만, 당뇨병, 고혈압, 고혈압 전단계, 전신 염증 마커의 상승된 수준, 연령, 심혈관 사건의 가족력 및 흡연 등이 있다. 심혈관 사건에 대한 위험 정도는 개체가 갖는 위험 인자의 정도 또는 심각도에 따라 다르다. 위험 인자의 존재 및 심각도를 기반으로 대상 개체에서의 심혈관 사건 위험을 평가하기 위해 위험 차트 및 예측 알고리즘을 사용할 수 있다. 그러한 예 중 하나가 프레이밍햄 심장 연구 위험 예측 점수 (Framingham Heart Study risk prediction score)이다. 피험 개체에서 10년간 계산된 프레이밍햄 심장 연구 위험 점수가 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20% 또는 그 이상 초과하는 경우 상기 개체에서 심혈관 사건이 발생할 위험이 높다. 피험 개체에서 심혈관 사건의 위험을 평가하는 또 다른 방법은 CRP와 같은 전신 염증 마커의 수준을 측정하여 프레이밍햄 심장 연구 위험 점수에 통합한 글로벌 위험 점수 (global risk score)이다. 피험 개체에서 심혈관 사건의 위험을 평가하는 다른 방법은 관상동맥 칼슘 스캔 (coronary calcium scanning), 심장 자기공명 영상 (cardiac magnetic resonance imaging) 및/또는 자기공명 혈관 조영술 (magnetic resonance angiography)을 포함한다. 일부 구체예에서, 개시된 방법으로 치료하기 위해 선택된 대상 개체는 일차 심혈관 사건을 가지고 있으며, 하나 이상의 다른 위험 인자를 가지고 있다. 다른 구체예에서, 대상 개체는 지질 수준을 감소시키기 위해 스타틴 요법을 받고 있다. 다른 구체예에서, 대상 개체는 건강한 지질 수준을 갖고 있다 (즉, 대상 개체는 고지혈증을 갖지 않는다). 따라서, 한 구체예에서, 환자에게 심장 질환 또는 장애가 발생할 위험을 예방하거나 감소시키기 위해 본 발명의 방법에 따라 MBV가 투여된다. 즉, MBV는 심장 질환이나 장애에 대한 예방책으로 환자에게 투여된다. 이러한 경우, 환자는 심장 질환 또는 장애에 대한 하나 이상의 위험 인자를 보이기 때문에 예방 조치가 필요하다; 그러나, 환자는 아직 심장 질환 또는 장애의 진단에 필요한 모든 증상을 진단받거나 나타내지 않았다. 일부 구체예에서, 뇌졸중을 앓고 있거나 앓았던 피험 개체가 치료를 위해 선택된다. 뇌졸중 (본 명세서에서 허혈성 뇌졸중 및/또는 뇌혈관 허혈이라고도 함)은 24시간 이상 지속되는 증상과 함께 급격히 발생하는 뇌 기능의 국소적 또는 전체적인 장애라는 임상 징후로 세계보건기구에 의해 정의된다. 뇌졸중은 또한 혈관 기원의 영향 외에 명백한 원인이 없는 사망과도 관련되어 있다. 뇌졸중은 일반적으로 뇌로 가는 혈관 또는 뇌 내부의 혈관이 막히거나 폐색되어 발생한다. 완전 폐색으로 뇌 순환이 정지되면 몇 초 내에 신경 전기 활동 (neuronal electrical activity)이 중단된다. 에너지 상태 및 이온 항상성의 악화, 고 에너지 인산염의 고갈, 막 이온 펌프의 장애, 세포 칼륨의 유출, 염화나트륨 및 물의 유입 및 막 탈분극 등이 폐색 발생 몇 분 이내에 일어난다. 폐색이 5 ~ 10 분 이상 지속되면 돌이킬 수 없는 손상이 발생한다. 그러나 불완전한 허혈의 경우 결과를 평가하기가 어려우며 주로 잔류 관류 및 산소 가용성에 따라 달라진다. 대뇌 혈관의 혈전성 폐색 후 허혈은 거의 완전하지 않다. 일부 잔류 관류는 일반적으로 부수적인 혈류 및 국소 관류 압력에 따라 허혈성 영역에서 지속된다. 본원에 개시된 방법은 뇌졸중 치료에 사용된다.

[0131] 허혈성 사건은 혈관계의 어느 곳에서나 발생할 수 있지만, 경동맥 분기 (carotid artery bifurcation) 및 내경동맥 (internal carotid artery)의 기원은 대뇌 허혈을 초래하는 대뇌 혈관의 혈전 폐색이 발생하는 가장 빈번한 부위이다. 협착증 (stenosis)이나 혈전증 (thrombosis)으로 인한 혈류 감소 증상은 중뇌 동맥 질환으로 인한 증상과 유사하다. 안동맥 (ophthalmic artery)을 통과하는 흐름은 종종 일과성 흑암시 (amaurosis fugax) 또는 일시적인 단안 실명 (monocular blindness)을 일으킬 정도로 충분히 영향을 받는다. 심한 양측 내경동맥 협착증 (bilateral internal carotid artery stenosis)은 대뇌 반구의 관류저하 (cerebral hemispheric hypoperfusion)를 초래할 수 있다. 이는 급성 허혈성 반구에 동측성인 급성 두통으로 나타난다. 전교통동맥 (anterior communicating artery)의 원위에 있는 하나의 전대뇌동맥 (anterior cerebral artery)의 허혈로 인한 혈류의 폐색 또는 감소는 반대쪽 다리 및 드물게는 근위 팔에서 운동 및 피질 감각 증상을 유발한다. 전대뇌

동맥의 폐색 또는 저관류 (underperfusion)의 다른 징후 (manifestations)로는 근접시상 전두엽 (parasagittal frontal lobe) 손상으로 인한 보행실조증 (gait ataxia)과 요실금 (urinary incontinence)이 포함된다. 자발적 대화 (spontaneous speech) 감소로 나타나는 언어 장애 (language disturbance)는 정신운동 활동의 일반화된 저하를 동반할 수 있다.

[0132] 뇌졸중을 앓고 있는 피험 개체는 경험한 증상 및/또는 CT 및 MR 영상과 같은 중재적 및 비중재적 진단 도구를 포함하는 건강검진에 의해 진단된다. 뇌졸중이 있는 피험 개체는 다음 증상 중 하나 이상을 나타낼 수 있다: 마비, 쇠약, 감각 및/또는 시력 감소, 무감각, 저림, 실어증 (예: 말하기 어려움 또는 불분명한 발음, 읽기 또는 쓰기 어려움), 실인증 (예: 감각 자극을 인식하거나 식별할 수 없음), 기억 상실, 조정 장애, 무기력, 졸음 또는 무의식, 방광 또는 장 조절 부족 및 인지기능 저하 (예: 치매, 제한된 주의력, 집중력 저하). 의료 영상 기법을 사용하여 뇌졸중을 앓고있는 피험 개체를 경색이 있는 피험 개체 또는 뇌에 출혈이 있는 피험 개체로 식별할 수 있다.

[0133] 제공된 조성물 및 방법은 뇌졸중을 경험한 환자에게 사용되거나 뇌졸중을 예방하기 위해 예방적으로 사용될 수 있다. 단기의 예방적 치료는 시술의 결과로 발생하는 허혈 사건으로 인한 손상을 감소시키기 위해 색전 방출, 혈압 강하 또는 뇌로의 혈류 감소 위험이 있는 외과적 또는 진단적 수술을 받은 피험 개체에게 권고된다. 장기적 또는 만성적 예방 치료는 뇌로의 혈류 감소로 이어질 수 있는 심장 질환 또는 뇌 혈관계에 직접적인 영향을 미치는 질환을 가진 대상 개체에 권고된다. 예방적 치료는 위에서 설명한 바와 같이, 허혈성 뇌졸중의 위험이 있는 피험 개체를 위한 것이다. 피험 개체가 뇌졸중을 경험한 경우, 치료에는 급성 치료가 포함될 수 있다. 뇌졸중을 가진 개체에 대한 급성 치료는 상태의 증상이 시작될 때 또는 발병 48시간 이내, 바람직하게는 24시간 이내, 보다 바람직하게는 12시간 이내, 더욱 바람직하게는 6시간 이내, 더욱더 바람직하게는 발병 1, 2 또는 3 시간 이내, 또는 진단 즉시 또는 의료진이 뇌졸중 발생을 의심할 때 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 의미한다.

[0134] 또 다른 구체예에서, 대상 개체는 심근 경색증을 가지고 있거나 심근 경색증을 앓을 위험이 있는 개체일 수 있다. "심근 경색증 가지는"이라는 것은 대상 개체가 현재 심근 경색증을 앓고 있거나 겪고 있다는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 투여는 심혈관 사건 또는 심장 질환 또는 장애의 진단 또는 의심 후, 예를 들어 14일 이내와 같이 나중에, 또는 48시간 이내 (의심되거나 제때 진단되는 경우)에 수행한다. 즉시 투여는 또한 심혈관 사건 또는 심장 질환 또는 장애의 진단 또는 의심 후 15, 20, 30, 40 또는 50 분 이내, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20 또는 22시간 이내 또는 1일 또는 2일 이내의 투여를 포함한다. 또 다른 구체예에서, IL-33을 함유하는 MBV는 심혈관 사건 또는 심장 질환 또는 장애의 진단 또는 의심 시점 또는 그 직후에 시작하여 며칠, 1주 또는 몇 주 (예를 들어, 1, 2, 3 또는 4 주) 동안 투여 될 수 있다.

[0135] 심근 경색의 진단을 위한 다수의 실험실 시험법들이 당 업계에 잘 알려져 있다. 일반적으로 상기 시험법들은 네 가지 주요 범주로 나눌 수 있다: (1) 조직 괴사 및 염증의 비특이적 지수, (2) 심전도 (electrocardiograms), (3) 혈청 효소의 변화 (즉, 크레아틴 포스포키나제 수준) 및 (4) 심장 영상. 당 업자라면 피험 개체가 심근 경색을 앓고 있는지, 그 위험성이 있는지, 또는 앓았는지 결정하기 위해 전술한 임의의 시험법을 쉽게 적용할 수 있다.

[0136] 피험 개체는 심부전이 있을 수 있다. 심부전은 심장 박동 장애를 공통으로 하는 다양한 병인의 임상 증후군이며, 심장이 대사 조직의 요구에 상응하는 혈액을 펌프하지 못하거나 상승한 충만압 (filling pressure)에서만 그렇게 하는 것이 특징이다.

[0137] 또 다른 구체예에서, 대상 개체는 심장 비대 (cardiac hypertrophy)를 갖는다. 이 상태는 명백한 선행 원인이 없이는 일반적으로 확장되지 않는 챔버의 좌심실 비대 (left ventricular hypertrophy)를 특징으로 한다. 현재의 진단 방법으로는 심전도 (electrocardiogram)와 심장 초음파 (echocardiogram)가 있다. 그러나 많은 환자는 증상이 없으며, 알려진 질환을 가진 환자의 친척일 수 있다. 불행하게도, 이 질병의 첫 번째 증상은 갑작스런 죽음일 수 있으며, 종종 신체 활동 중 또는 후에 어린이와 청년에게서 자주 발생한다.

[0138] 또 다른 구체예에서, 대상 개체는 심장 질환 또는 장애 또는 이의 위험에 대한 마커의 수준이 증가되어 있다. 상기 마커는 예를 들어 콜레스테롤, 저밀도 지단백 콜레스테롤 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 또는 전신 염증의 마커 일 수 있다. 마커의 상승된 수준 (들)은 건강한 피험 개체 집단 (예를 들어, 심장 질환 또는 장애의 징후 및 증상이 없는 인간 피험자)에서의 평균보다 높은 수준이다. 상기 마커가 CRP 인 경우, CRP 수준이 1 이상 (>1)이면 상승된 수준으로 간주한다.

[0139] 섬유증이 있는 피험 개체를 선택할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 대상 개체는 간경변증, 폐 섬유증, 심장 섬유증, 종격동 섬유증, 관절 섬유증, 골수 섬유증, 신원성 전신 섬유증, 켈로이드 섬유증, 경피증 섬유증, 신장 섬유증, 림프조직 섬유증, 동맥 섬유증, 미세혈과 섬유증, 혈관 섬유증 또는 췌장 섬유증으로 진단 받았다. 실리카, 석면, 베릴륨, 석탄 먼지 또는 보크사이트를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 무기 입자에 노출되었거나 노출될 위험이 있는 개체를 치료를 위해 선택할 수 있다. 간질성 폐 섬유증이 있는 개체를 치료를 위해 선택할 수 있다. 심장 섬유증이 있는 개체를 치료를 위해 선택할 수 있다. 개시된 방법은 대상 개체에서 섬유증을 치료하거나 억제하기 위해 사용될 수 있다.

[0140] 약학적 조성물은 MBV 및 선택적으로 하나 이상의 추가 제제를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 대상 개체에게 투여하기 위해, 또는 질병 진행을 지연, 예방, 발병 위험 감소, 치료 또는 감소시키기 위해 다양한 방식으로 제형화될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 또한 초기 병변의 전이를 방지할 수 있도록 제형화될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 심장내 투여와 같은 국소 투여용으로 제제화된다. 국소 투여는 또한 피험 개체에게 이식하기 전 및/또는 후에 이식편에 대한 것일 수 있다. MBV는 비경구 투여, 예를 들어 정맥내, 복강내, 근육내, 피내, 복강내, 흉골내 또는 관절내 주사 또는 주입, 또는 설하, 경구, 국소, 비강내 또는 점막 투여, 또는 폐 흡입을 포함하는 임의의 경로로 투여될 수 있다. 적절한 투여 경로는 의사가 선택할 수 있다. MBV를 포함하는 약학적 조성물은 인간 또는 수의학에 사용하기 위해 제형화되는, 국소 사용 및 전신 사용 모두를 위해 제형화 될 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 주사 또는 카테터에 의해 투여될 수 있다. 투여는 정맥내 또는 근육내 투여일 수 있다.

[0141] 개시된 조성물은 1회 또는 반복적으로 투여될 수 있다. 개시된 조성물은 국소 또는 전신적으로 투여될 수 있다. 개시된 조성물은 점적 주입, 피하 주사, 국소 투여 또는 임의의 다른 경로와 같은 정맥내 주사를 통해, 한 달에 1회 내지 수회, 예를 들어, 주 2회, 주 1회, 2주에 1회 또는 4주에 1회 투여될 수 있다. 매일, 격주, 매주, 격월 또는 매월과 같이 정의된 시간 간격으로 여러 치료가 계획될 수 있다. 투여 일정은, 예를 들어, 1주일에 2회 또는 1주일에 1회의 투여 간격을 2주에 1회, 3주에 1회 또는 4주에 1회로 연장함으로써 조정할 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 이식 후 장기의 기능 및/또는 혈액 검사 값의 변화를 모니터링하는 것을 포함한다. 상기 조성물은 장기 이식 전, 장기 이식시 또는 장기 이식 후에 대상 개체에게 투여될 수 있다. 투여는 예를 들어, 대상 개체의 특정 연령에 또는 고형 장기 이식을 받은 후 질병의 억제 또는 예방이 필요할 때마다 시작할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 조성물은 전형적으로 인간 개체를 치료하는데 사용될 것이지만, 다른 영장류, 개, 고양이, 말 및 소와 같은 다른 척추동물에서 유사하거나 동일한 질병을 치료하는데 사용될 수도 있다. 적절한 투여 방식은 각 피험 개체에 대해 개별적으로 의사에 의해 가장 잘 결정될 수 있다. 약학적으로 허용되는 다양한 담체 및 이들의 제형은 하기의 표준 제형 논문에 기술되어 있다: *Remington's Pharmaceutical Sciences* by E. W. Martin. See also Wang, Y. J. and Hanson, M. A., *Journal of Parenteral Science and Technology*, Technical Report No. 10, Supp. 42: 2S, 1988. 상기 약학적 조성물의 제형 (dosage form)은 선택된 투여 방식에 의해 결정된다. 일부 구체예에서, 상기 대상 개체는 인간이고 MBV는 인간 조직으로부터 유래된다.

[0142] 일부 구체예에서, 영향을 받는 영역 또는 심장 이식물과 같은 관심 조직의 세포에 국소투여 될 때, 본 발명의 조성물은 근육세포 증식을 증가시키고/거나 염증을 감소시킨다.

[0143] MBV (ECM 유래 나노소포)가 주사 또는 주입을 위한 비경구 조성물로서 제공되는 경우, 일반적으로 수성 담체, 예를 들어 pH 약 3.0 내지 약 8.0, 바람직하게는 약 3.5 내지 약 7.4, 예컨대 약 7.2 내지 약 7.4의 등장성 완충액에 현탁된다. 유용한 완충액에는 구연산염-구연산, 인산나트륨-인산 및 아세트산염-아세트산 완충액 등이 포함된다.

[0144] 저장소 또는 "데포" 형태의 서방형 제제 (slow release preparation)를 사용하면 치료적 유효량의 제제가 주사 또는 전달 후 수 시간 또는 수일에 걸쳐 혈류로 전달될 수 있다. 서방형 조성물의 적합한 예는 적합한 중합체 재료 (예를 들어, 성형품 형태의 반투과성 폴리머 매트릭스, 즉 필름 또는 마이크로캡슐), 적합한 소수성 재료 (예를 들어, 허용 가능한 오일의 유탁액) 또는 이온 교환 수지, 및 난용성 유도체 (예를 들어, 난용성 염)를 포함한다. 서방형 제형은 경구, 직장, 비경구, 낭내, 질내, 복강내, 국소 (분말, 연고, 젤, 점적 또는 경피 패치에 의해), 협측, 또는 경구 또는 비강 스프레이로 투여될 수 있다. 약학적 조성물은 생분해성 중합체 및/또는 다당류 젤리화 및/또는 생체접착성 중합체, 양친매성 중합체, 입자의 계면 특성을 변형시키는 제제 및 약리학적 활성물질을 포함하는 입자 형태일 수 있다. 이러한 조성물은 활성 물질의 제어된 방출을 허용하는 특정 생체적합성 특징을 나타낸다. 미국 특허 제 5,700,486 참조.

[0145] 본원에 개시된 방법에 유용한 약학적으로 허용되는 담체 및 부형제는 통상적인 것이다. 예를 들어, 비경구 제형

은 일반적으로 물, 생리 식염수, 기타 평형염액 (balanced salt solutions), 수성 덱스트로스, 글리세롤 등과 같은 약학적 및 생리학적으로 허용되는 유체 전달체인 주사 가능한 유체를 포함한다. 포함될 수 있는 부형제는 예를 들어 인간 혈청 알부민 또는 혈장제제와 같은 단백질이다. 필요한 경우, 투여될 약학적 조성물은 또한 소량의 무독성 보조 물질, 예를 들어 습윤제 또는 유화제, 보존제 및 pH 완충제, 소듐아세테이트 또는 소르비탄 모노라우레이트를 함유할 수 있다. 이러한 제형을 제조하는 실제 방법은 당업자에게 공지되어 있거나 명백하다.

[0146] 투여되는 MBV의 양은 치료받는 피험 개체, 질병의 중증도 및 투여 형태에 따라 다르며 처방 임상의의 판단에 맡기는 것이 가장 좋다. 이러한 범위 내에서, 투여될 제형은 치료되는 대상 개체에서 원하는 효과를 달성하는 데 효과적인 양의 MBV를 포함한다.

[0147] 정확한 용량은 특정 분획의 효능, 연령, 체중, 성별 및 피험 개체의 생리적 상태에 기초하여 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 적합한 농도는 약 1 ng/ml - 100 gr/ml를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0148] 치료가 필요한 개체를 치료하기 위한 본 발명의 방법은 추가적 치료제의 사용을 포함할 수 있다. MBV를 포함하는 조성물은 또한 추가적 치료제를 포함할 수 있다. 이러한 추가적 치료제는 항지질제, 항염증제, 항혈전제, 섬유소 용해제, 항혈소판제, 직접 트롬빈 억제제, 당단백질 IIb/IIIa 수용체 억제제, 세포부착분자에 결합하고 백혈구가 그러한 분자에 부착하는 능력을 억제하는 제제 (예: 항세포부착분자 항체), 알파-아드레날린 작동성 차단제, 베타-아드레날린 작동성 차단제, 사이클로옥시게나제-2 억제제, 안지오텐신 시스템 억제제, 항부정맥제, 칼슘 채널 차단제, 이뇨제, 강심제, 혈관 확장제, 혈관 수축제, 티아졸리딘디온, 칸나비노이드-1 수용체 차단제, 면역 억제제 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0149] 항지질제는 총 콜레스테롤을 감소시키고, LDLC를 감소시키며, 트리글리세라이드를 감소시키고/거나 HDLC를 증가시키는 제제이다. 항지질제는 스타틴, 비-스타틴 항지질제 및 이들의 조합을 포함한다. 스타틴은 인간의 총 콜레스테롤, LDLC 및 트리글리세라이드 수준을 낮추는 데 효과적인 것으로 밝혀진 약물이다. 스타틴은 콜레스테롤 합성 단계에서 작용한다. HMG-CoA 환원효소 유전자의 억제를 통해 세포에서 합성되는 콜레스테롤의 양을 줄임으로써 스타틴은 간세포에 의한 LDLC 흡수의 증가로 이어지는 일련의 사이클을 유도한다. LDLC 섭취가 증가하면 혈중 총 콜레스테롤과 LDLC 수치가 감소한다. 두 인자의 낮은 혈중 농도는 죽상 동맥경화증과 심장병의 위험을 낮추는 것과 관련이 있으며, 스타틴은 죽상 동맥경화증의 질병률 (morbidity) 및 사망률 (mortality)을 줄이기 위해 널리 사용된다.

[0150] 스타틴의 예로는 심바스타틴 (Zocor®), 로바스타틴 (Mevacor®), 프라바스타틴 (Pravachol®), 플루바스타틴 (Lescol®), 아토르바스타틴 (Lipitor®), 세리바스타틴 (Baycol®), 로수바스타틴 (Crestor ®), 피티바스타틴 및 하기 문헌들에 기재된 많은 기타 제제가 포함되나 이에 제한되지는 않는다: 미국 특허 제 No. 4,444,784; 4,231,938; 4,346,227; 4,739,073; 5,273,995; 5,622,985; 5,135,935; 5,356,896; 4,920,109; 5,286,895; 5,262,435; 5,260,332; 5,317,031; 5,283,256; 5,256,689; 5,182,298; 5,369,125; 5,302,604; 5,166,171; 5,202,327; 5,276,021; 5,196,440; 5,091,386; 5,091,378; 4,904,646; 5,385,932; 5,250,435; 5,132,312; 5,130,306; 5,116,870; 5,112,857, 5,102,911; 5,098,931; 5,081,136; 5,025,000; 5,021,453; 5,017,716; 5,001,144; 5,001,128; 4,997,837; 4,996,234; 4,994,494; 4,992,429; 4,970,231; 4,968,693; 4,963,538; 4,957,940; 4,950,675; 4,946,864; 4,946,860; 4,940,800; 4,940,727; 4,939,143; 4,929,620; 4,923,861; 4,906,657; 4,906,624; 및 4,897,402.

[0151] 인간에게 사용하도록 이미 승인된 스타틴의 예로는 아토르바스타틴, 세리바스타틴, 플루바스타틴, 프라바스타틴, 심바스타틴 및 로수바스타틴이 있다. 하기 참고 문헌은 HMG-CoA 환원효소 억제제에 대한 추가 정보를 제공한다: Drugs and Therapy Perspectives (May 12, 1997), 9: 1-6; Chong (1997) Pharmacotherapy 17:1157-1177; Kellick (1997) Formulary 32: 352; Kathawala (1991) Medicinal Research Reviews, 11: 121-146; Jahng (1995) Drugs of the Future 20: 387-404, 및 Current Opinion in Lipidology, (1997), 8, 362-368. 주목할 만한 또 다른 스타틴 약물은 하기 문헌에 기재되어 있는 화합물 3a (S-4522) 이다: Watanabe (1997) Bioorganic and Medicinal Chemistry 5: 437-444.

[0152] 비-스타틴 항지질제는 피브린산 유도체 (피브레이트), 담즙산 격리제 또는 수지, 니코틴산 제제, 콜레스테롤 흡수 억제제, 아실-코엔자임 A, 콜레스테롤 아실 전이효소 (ACAT) 억제제, 콜레스테릴 에스테르 전이단백질 (CETP) 억제제, LDL 수용체 길항제, 파르네소이드 X 수용체 (FXR) 길항제, 스테롤 조절 결합단백질 절단 활성화 단백질 (SCAP) 활성화제, 마이크로솜 트리글리세라이드 전달 단백질 (MTP) 억제제, 스쿠알렌 신타제 억제제 및 퍼옥시좀 증식 활성화 수용체 (PPAR) 작용제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 피브린산 유도체의 예에는 젬피브로질 (Lopid®), 페노피브레이트 (Tricor®), 클로피브레이트 (Atromid®) 및 베자피브레이트가 포함되나

이에 제한되지는 않는다. 담즙산 격리제 또는 수지의 예에는 콜레세벨람 (WelChol®), 콜레스 티라민 (Questran ® 또는 Prevalite®) 및 콜레스티폴 (Colestid®), DMD-504, GT-102279, HBS-107 및 S-8921이 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 니코틴산 제제의 예로는 니아신 및 프로부콜이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 콜레스테롤 흡수 억제제의 예에는 에제티미브 (Zetia®)가 포함되나 이에 제한되지는 않는다. ACAT 억제제의 예로는 아바시미브, CI-976 (Parke Davis), CP-113818 (Pfizer), PD-138142-15 (Parke Davis), FF1394, 및 하기 문헌들에 기재된 많은 기타 제제가 포함되나 이에 제한되지는 않는다: 미국 특허 제 6,204,278; 6,165,984; 6,127,403; 6,063,806; 6,040,339; 5,880,147; 5,621,010; 5,597,835; 5,576,335; 5,321,031; 5,238,935; 5,180,717; 5,149,709, 및 5,124,337. CETP 억제제의 예로는 토세트라핍, CP-529414, CETi-1, JTT-705, 및 하기 문헌들에 기재된 많은 기타 제제가 포함되나 이에 제한되지는 않는다: 미국 특허 제 6,727,277; 6,723,753; 6,723,752; 6,710,089; 6,699,898; 6,696,472; 6,696,435; 6,683,099; 6,677,382; 6,677,380; 6,677,379; 6,677,375; 6,677,353; 6,677,341; 6,605,624; 6,586,448; 6,521,607; 6,482,862; 6,479,552; 6,476,075; 6,476,057; 6,462,092; 6,458,852; 6,458,851; 6,458,850; 6,458,849; 6,458,803; 6,455,519; 6,451,830; 6,451,823; 6,448,295; 및 5,512,548. FXR 길항제의 한 예는 구굴스테론이다. SCAP 활성제의 한 예는 GW532 (GlaxoSmithKline)이다. MTP 억제제의 예로는 임플리타파이드 및 R-103757을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 스쿠알렌 신타제 억제제의 예로는 자라고지산 (zaragozic acid)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. PPAR 작용제의 예로는 GW-409544, GW-501516 및 LY-510929를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0153] 항염증제는 알클로페낙 (Alclofenac), 알클로메타손 디프로피오네이트 (Alclometasone Dipropionate), 알제스톤 아세토나이드 (Algestone Acetonide), 알파-아밀라제 (Alpha Amylase), 암시나팔 (Amcinafal), 암시나파이드 (Amcinafide), 소듐 암페낙 (Amfenac Sodium), 아미프릴로즈 하이드로클로라이드 (Amiprilose Hydrochloride), 아나킨라 (Anakinra), 아니롤락 (Anirolac), 아니트라자펜 (Anitrazafen), 아파존 (Apazone), 디소듐 발사라자이드 (Balsalazide Disodium), 벤다작 (Bendazac), 베녹사프로펜 (Benoxaprofen), 벤지다민 하이드로클로라이드 (Benzydamine Hydrochloride), 브로멜라인 (Bromelains), 브로페라몰 (Broperamole), 부데소나이드 (Budesonide), 카프로펜 (Carprofen), 시클로프로펜 (Cicloprofen), 신타존 (Cintazone), 클리프로펜 (Cliprofen), 클로베타솔 프로피오네이트 (Clobetasol Propionate), 클로베타손 부티레이트 (Clobetasone Butyrate), 클로피락 (Clopirac), 클로티카손 프로피오네이트 (Cloticasone Propionate), 코르메타손 아세테이트 (Cormethasone Acetate), 코르토독손 (Cortodoxone), 데플라자코트 (Deflazacort), 데소나이드 (Desonide), 데속시메타손 (Desoximetasone), 덱사메타손 (Dexamethasone), 디프로피오네이트 (Dipropionate), 포타슘 디클로페낙 (Diclofenac Potassium), 소듐 디클로페낙 (Diclofenac Sodium), 디플로라손 디아세테이트 (Diflorasone Diacetate), 소듐 디플루미돈 (Diflumidone Sodium), 디플루니살 (Diflunisal), 디플루프레드네이트 (Difluprednate), 디프타론 (Diftalone), 디메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide), 드록시노나이드 (Drocinonide), 엔드리손 (Endrysone), 엔리모밥 (Enlimomab), 소듐 에놀리캄 (Enolicam Sodium), 에피리졸 (Epirizole), 에토돌락 (Etodolac), 에토페나메이트 (Etofenamate), 펠비낙 (Felbinac), 페나몰 (Fenamole), 펜부펜 (Fenbufen), 펜클로페낙 (Fenclofenac), 펜클로락 (Fenclorac), 펜도살 (Fendosal), 펜피팔론 (Fenpipalone), 펜티아작 (Fentiazac), 플라잘론 (Flazalone), 플루아자코트 (Fluazacort), 플루페나믹산 (Flufenamic Acid), 플루미졸 (Flumizole), 플루니솔라이드 아세테이트 (Flunisolide Acetate), 플루닉신 (Flunixin), 플루닉신 메글루민 (Flunixin Meglumine), 부틸 플루코르틴 (Fluocortin Butyl), 플루오로메톨론 아세테이트 (Fluorometholone Acetate), 플루쿠아존 (Fluquazone), 플루비프로펜 (Flurbiprofen), 플루레토펜 (Fluretofen), 플루티카손 프로피오네이트 (Fluticasone Propionate), 퓨라프로펜 (Furaprofen), 퓨로부펜 (Furobufen), 할시노나이드 (Halcinonide), 할로베타솔 프로피오네이트 (Halobetasol Propionate), 할로프레돈 아세테이트 (Halopredone Acetate), 이부페낙 (Ibufenac), 이부프로펜 (Ibuprofen), 알루미늄 이부프로펜 (Ibuprofen Aluminum), 피코놀 이부프로펜 (Ibuprofen Piconol), 일로니답 (Ilonidap), 인도메타신 (Indomethacin), 소듐 인도메타신 (Indomethacin Sodium), 인도프로펜 (Indoprofen), 인독솔 (Indoxole), 인트라졸 (Intrazole), 이소플루프레돈 아세테이트 (Isoflupredone Acetate), 이소제팍 (Isoxepac), 이속시캄 (Isoxicam), 케토프로펜 (Ketoprofen), 로페미졸 하이드로클로라이드 (Lofemizole Hydrochloride), 로목시캄 (Lomoxicam), 로테프레드놀 에타보네이트 (Loteprednol Etabonate), 소듐 메클로페나메이트 (Meclofenamate Sodium), 메클로페나믹산 (Meclofenamic Acid), 메클로리손 디부티레이트 (Meclorisone Dibutyrate), 메페나믹산 (Mefenamic Acid), 메살라민 (Mesalamine), 메세클라존 (Meseclazone), 메틸프레드니솔론 술레프타네이트 (Methylprednisolone Suleptanate), 모니플루메이트 (Morniflumate), 나부메톤 (Nabumetone), 나프록센 (Naproxen), 소듐 나프록센 (Naproxen Sodium), 나프록솔 (Naproxol), 니마존 (Nimazone), 소듐 올살라진 (Olsalazine Sodium), 오르고테인 (Orgotein), 오르파녹신 (Orpanoxin), 옥사프로진 (Oxaprozin), 옥시펜부타

존 (Oxyphenbutazone), 파라닐린 하이드로클로라이드 (Paranyline Hydrochloride), 펜토산 소듐 폴리설페이트 (Pentosan Polysulfate Sodium), 펜부타존 소듐 글리세레이트 (Phenbutazone Sodium Glycerate), 피르페니돈 (Pirfenidone), 피록시캄 (Piroxicam), 피록시캄 신나메이트 (Piroxicam Cinnamate), 피록시캄 올라민 (Piroxicam Olamine), 피프로펜 (Pirprofen), 프레드나제이트 (Prednazate), 프리펠론 (Prifelone), 프로돌릭산 (Prodolic Acid), 프로쿠아존 (Proquazone), 프록사졸 (Proxazole), 프록사졸 시트레이트 (Proxazole Citrate), 리멕솔론 (Rimexolone), 로마자리트 (Romazarit), 살콜렉스 (Salcolex), 살나세딘 (Salnacedin), 살사레이트 (Salsalate), 살리실레이트 (Salycilates), 상귀나리움 클로라이드 (ahnguinarium Chloride), 세클라존 (Seclazone), 세르메타신 (Sermetacin), 수독시캄 (Sudoxicam), 술린닥 (Sulindac), 수프로펜 (Suprofen), 탈메타신 (Talmetacin), 탈니플루메이트 (Talniflumate), 탈로살레이트 (Talosalate), 테부펠론 (Tebufelone), 테니답 (Tenidap), 소듐 테니답 (Tenidap Sodium), 테녹시캄 (Tenoxicam), 테시캄 (Tesicam), 테시마이드 (Tesimide), 테트리다민 (Tetrydamine), 티오피낙 (Tiopinac), 틱소코르톨 피발레이트 (Tixocortol Pivalate), 톨메틴 (Tolmetin), 소듐 톨메틴 (Tolmetin Sodium), 트리클로나이드 (Triclonide), 트리플루미데이트 (Triflumidate), 지도메타신 (Zidometacin), 글루코코르티코이드 (Glucocorticoids) 및 소듐 조메피락 (Zomepirac Sodium)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0154] 항혈전제 및/또는 섬유소 용해제는 조직 플라스미노겐 활성화제 (예를 들어, Activase®, Alteplase®) (비활성 플라스미노겐에서 플라스민으로의 전환을 촉매함)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이는 프리칼리크레닌 (prekallikrein), 키니노젠 (kininogens), 팩터 XII, XIIIa, 플라즈미노겐 프로액티베이터 (plasminogen proactivator) 및 TPA (tissue plasminogen activator), 스트렙토키나제 (Streptokinase), 유로키나제 (Urokinase), APSAC (Anisoylated Plasminogen-Streptokinase Activator Complex), 프로-유로키나제 (Pro-Urokinase, (Pro-UK), rTPA (Activase®, Alteplase®; r은 재조합을 나타냄), rPro-UK, 아보키나제 (Abbokinase), 에미나제 (Eminase), 스렙타제 아나그렐라이드 하이드로클로라이드 (Sreptase Anagrelide Hydrochloride), 비발리루덴 (Bivalirudin), 소듐 달테파린 (Dalteparin Sodium), 소듐 다나파로이드 (Danaparoid Sodium), 다족시벤 하이드로클로라이드 (Dazoxiben Hydrochloride), 에페가트란 설페이트 (Efegatran Sulfate), 소듐 에녹사파린 (Enoxaparin Sodium), 이페트로반 (Ifetroban), 소듐 이페트로반 (Ifetroban Sodium), 소듐 틴자파린 (Tinzaparin Sodium), 레타플라제 (retaplase), 트리페나그렐 (Trifenagrel), 와파린 (Warfarin), 덱스트란 (Dextrans), 아미노카프록산 (aminocaproic acid, Amicar®) 및 트라넥사믹산 (tranexamic acid, Amstat®)등의 상호 작용을 통해 발생할 수 있다.

[0155] 항혈소판제는 클로프리도그렐 (Clopridogrel), 설핀피라존 (Sulfinpyrazone), 아스피린 (Aspirin), 디피리다몰 (Dipyridamole), 클로피브레이트 (Clofibrate), 피리디놀 가바메이트 (Pyridinol Carbamate), PGE, 글루카곤 (Glucagon), 항 세로토닌 약물 (Antiserotonin drugs), 카페인 (Caffeine), 테오필린 펜톡시필린 (Theophyllin Pentoxifyllin), 티클로피딘 (Ticlopidine) 및 아나그렐라이드 (Anagrelide)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 직접 트롬빈 억제제에는 히루딘 (hirudin), 히루젠 (hirugen), 히룰로그 (hirulog), 아가트로반 (agatroban), PPACK 및 트롬빈 앱타머 (thrombin aptamers)가 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 당단백질 IIb/IIIa 수용체 억제제는 항체 및 비 항체 모두일 수 있으며, ReoPro® (abcixamab), 라미피반 (lamifiban) 및 티로피반 (tirofiban)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 세포부착분자에 결합하고 백혈구가 이러한 분자에 부착하는 능력을 억제하는 제제는 폴리펩타이드 제제 (polypeptide agents)를 포함한다. 이러한 폴리펩타이드는 통상적인 방법에 따라 제조된 다클론 및 단일클론 항체들이 포함한다. 이러한 항체들은 이미 당 업계에 공지되어 있으며 여기에는 항-ICAM 1 항체 및 이러한 기타 항체들이 포함된다.

[0156] 알파-아드레날린 작동성 차단제의 예로는 독사조신 (doxazocin), 프라조신 (prazocin), 탐술로신 (tamsulosin) 및 타라조신 (tarazosin)이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 베타-아드레날린 작동성 수용체 차단제는 협심증 (angina pectoris), 고혈압 (hypertension) 및 심부정맥 (cardiac arrhythmias)에서 카테콜아민의 심혈관 효과를 길항하는 약물 종류이다. 베타-아드레날린 작동성 수용체 차단제는 아테놀롤 (atenolol), 아세부톨롤 (acebutolol), 알프레놀롤 (alprenolol), 베푸놀롤 (befunolol), 베타솔롤 (betaxolol), 부니트롤롤 (bunitrolol), 카르테올롤 (carteolol), 셀리프롤롤 (celiprolol), 히드록살롤 (hydroxalol), 인데놀롤 (indenolol), 라베탈롤 (labetalol), 레보부놀롤 (levobunolol), 메핀돌롤 (mepindolol), 메티프라놀 (methypranol), 메틴돌 (metindol), 메토프롤롤 (metoprolol), 메트리조라놀롤 (metrizoranolol), 옥스프레놀롤 (oxprenolol), 핀돌롤 (pindolol), 프로프라놀롤 (propranolol), 프락톨롤 (practolol), 소탈롤나돌롤 (sotalolnadolol), 티프레놀롤 (tiprenolol), 토말롤롤 (tomalolol), 티몰롤 (timolol), 부프라놀롤 (bupranolol), 펜부톨롤 (penbutolol), 트리메프라놀 (trimepranol), 2-(3-(1,1-디메틸에틸)-아미노-2-히드록시프로폭시)-3- 피리덴카르보니트릴 HCl, 1-부틸아미노-3-(2,5-디클로로페녹시)-2-프로판올, 1-이소프로필아미

노-3-(4-(2-시클로프로필메톡시에틸)페녹시)-2-프로판올, 3-이소프로필 아미노-1-(7-메틸린단-4-일옥시)-2-부탄올, 2-(3-t-부틸아미노-2-히드록시-프로필티오)-4-(5-카르바모일-2-티에닐)티아졸, 7-(2-히드록시-3-t-부틸아민프로폭시) 프탈라이드 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 상기 확인된 화합물들은 이성질체 혼합물로서, 또는 각각의 좌선성 (levorotating) 또는 우선성 (dextrorotating) 형태로서 사용될 수 있다.

[0157] 선택적 COX-2 억제제는 당 업계에 공지되어 있으며 이들을 이용할 수 있다. 여기에는 하기 문헌에 기재되어 있는 F COX-2 억제제들이 포함되나 이에 제한되지는 않는다: 미국 특허 제 5,521,213; 5,536,752; 5,550,142; 5,552,422; 5,604,253; 5,604,260; 5,639,780; 5,677,318; 5,691,374; 5,698,584; 5,710,140; 5,733,909; 5,789,413; 5,817,700; 5,849,943; 5,861,419; 5,922,742; 5,925,631; 및 5,643,933. 상기 확인된 다수의 COX-2 억제제들은 선택적 COX-2 억제제의 전구 약물이며 생체 내에서 활성형 및 선택적 COX-2 억제제로 전환되어 작용을 발휘한다. 상기 확인된 COX-2 억제제 전구 약물들로부터 형성된 활성형 및 선택적 COX-2 억제제들은 하기 문헌에 기재되어 있다: PCT 공개번호 제 WO 95/00501, PCT 공개번호 제 WO 95/18799, 및 미국 특허 제 5,474,995.

[0158] 안지오텐신 시스템 억제제는 안지오텐신 II의 기능, 합성 또는 이화 작용을 방해하는 작용제이다. 이러한 제제에는 안지오텐신 전환효소 (angiotensin-converting enzyme, ACE) 억제제, 안지오텐신 II 길항제, 안지오텐신 II 수용체 길항제, 안지오텐신 II의 이화작용을 활성화시키는 제제 및 안지오텐신 II가 궁극적으로 파생되는 안지오텐신 I의 합성을 방지하는 제제가 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 화합물의 예로는 항체 (예: 레닌 (renin)에 대한 항체), 아미노산 및 이의 유사체 (더 큰 분자에 결합된 것들을 포함), 펩타이드 (안지오텐신 및 안지오텐신 I의 펩타이드 유사체 포함), 프로-레닌 (pro-renin) 관련 유사체 등이 포함된다. 가장 강력하고 유용한 레닌-안지오텐신 시스템 억제제 중에는 레닌 억제제, ACE 억제제 및 안지오텐신 II 길항제 등이 있다.

[0159] 안지오텐신 II 길항제는 안지오텐신 II 수용체에 결합하여 그 활성을 방해함으로써 안지오텐신 II의 활성을 방해하는 화합물이다. 안지오텐신 II 길항제는 잘 알려져 있으며 펩티드 화합물 및 비 펩티드 화합물을 포함한다. 대부분의 안지오텐신 II 길항제는 8번 위치의 페닐알라닌을 다른 아미노산으로 대체하여 작용제 활성이 약화된 약간 변형된 동족체들 (congeners)이다. 안정성은 생체 내에서 변성을 늦추는 다른 대체에 의해 향상될 수 있다. 안지오텐신 II 수용체 길항제의 예로는 하기 제제들을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 칸데사르탄 (Candesartan, Alacand), 이르베사르탄 (IRBESARTAN®, Avapro), 로사르탄 (Losartan, COZAARS®), 텔미사르탄 (Telmisartan, MICARDIS®), 및 발사르탄 (Valsartan, DIOVAN®). 안지오텐신 II 길항제의 다른 예는 다음과 같다: 펩티드 화합물 (예, 사랄라신 (saralasin), [(Sar^{1})(Val^{5})(Ala^{8})]○kangiotensin-(1-8)안지오텐신-2-온 (미국 특허 제 5,087,634); 2-N-부틸-4-클로로-1-(2-클로로벤질) 이미다졸-5-아세트산을 포함하는 이미다졸 아세테이트 유도체 (Long et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247(1), 1-7 (1988)); 4, 5, 6, 7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridine-6-carboxylic acid and analog derivatives (미국 특허 제 4,816,463); N2-테트라졸 베타-글루쿠로나이드 유사체 (미국 특허 제 5,085,992); 치환된 피롤, 피라졸 및 트리아졸 (미국 특허 제 5,081,127); 페놀 및 1,3-이미다졸과 같은 헤테로사이클릭 유도체 (미국 특허 제 5,073,566); 이미다조-융합 7-멤버 링 헤테로사이클 (미국 특허 제 5,064,825); 펩티드 (미국 특허 제 4,772,684); 안지오텐신 II에 대한 항체 (미국 특허 제 4,302,386); 및 비페닐-메틸 치환된 이미다졸과 같은 아랄킬 이미다졸 화합물 (유럽 특허 제 253,310, 1988년 1월 20일); ES8891 (N-모폴리노아세틸-(-1-나프틸)-L-알라닐-(4, 티아졸릴)-L-알라닐 (35, 45)-4-아미노-3-하이드록시-5-사이클로-헥사펜타노일-N-헥실아미드, Sankyo Company, Ltd., Tokyo, Japan); SKF108566 (E-알파-2-[2-부틸-1-(카르복시페닐)메틸]1H-이미다졸-5-일[메틸란]-2-티오펜네프로판산, Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, PA); 로사르탄 (Losartan®, DUP753/MK954, DuPont Merck Pharmaceutical Company); 레미키린 (Remikirin, RO42-5892, F. Hoffman LaRoche AG); A_2 작용제 (Marion Merrill Dow) 및 특정 비-펩티드 헤테로사이클 (G.D.Searle and Company).

[0160] 안지오텐신 전환 효소 (ACE)는 안지오텐신 I에서 안지오텐신 II 로의 전환을 촉매하는 효소이다. ACE 억제제는 아미노산 및 그 유도체, 디펩티드 및 트리펩티드를 포함하는 펩티드, 그리고 ACE의 활성을 억제함으로써 레닌-안지오텐신 시스템에 개입하여 혈압 상승 물질인 안지오텐신 II의 형성을 감소시키거나 제거하는, ACE에 대한 항체를 포함한다. ACE 억제제는 고혈압, 울혈성 심부전, 심근 경색 및 신장 질환을 치료하기 위해 의학적으로 사용된다. ACE 억제제로서 유용한 것으로 알려진 화합물의 부류로는 다음과 같은 것들이 있다: 캅토프릴 (미국 특허 제 4,105,776) 및 조페노프릴 (미국 특허 제 4,316,906)과 같은 아실머캅토 및 머캅토알카노일 프롤린; 에날라프릴 (미국 특허 제 4,374,829), 리시노프릴 (미국 특허 제 4,374,829), 퀴나프릴 (미국 특허 제 4,344,949), 라미프릴 (미국 특허 제 4,587,258) 및 페린도프릴 (미국 특허 제 4,508,729)과 같은 카르복시알킬 디펩티드; 실라자프릴 (미국 특허 제 4,512,924) 및 베나자프릴 (미국 특허 제 4,410,520)과 같은 카복시알

킬 디펩티드 모방체; 및 포시노프릴 (미국 특허 제 4,337,201) 및 트란돌로프릴과 같은 포스피닐알카노일 프롤린.

[0161] 레닌 억제제는 레닌의 활성을 방해하는 화합물이다. 레닌 억제제에는 아미노산 및 이의 유도체, 펩티드 및 이의 유도체, 레닌에 대한 항체가 포함된다. 미국 특허의 대상인 레닌 억제제의 예로는 다음과 같은 것들이 있다: 펩티드의 우레아 유도체

[0162] (미국 특허 제 No. 5,116,835); 비펩티드 결합으로 연결된 아미노산 (미국 특허 제 5,114,937); 디펩티드 및 트리펩티드 유도체 (미국 특허 제 5,106,835); 아미노산 및 그 유도체 (미국 특허 제 5,104,869 및 5,095,119); 디올 설폰아마이드 및 설피닐 (미국 특허 제 5,098,924); 변형된 펩티드 (미국 특허 제 5,095,006); 펩티딜 베타-아미노아실 아미노디올 카바메이트 (미국 특허 제 5,089,471); 피롤리미다졸론 (미국 특허 제 5,075,451); 펩티드를 함유하는 플루오린 및 클로린 스타틴 또는 스타톤 (미국 특허 제 5,066,643); 펩티딜 아미노디올 (미국 특허 제 5,063,208 및 4,845,079); N-몰폴리노 유도체 (미국 특허 제 5,055,466); 펩스타틴 유도체 (미국 특허 제 4,980,283); N-헤테로사이클릭 알콜 (미국 특허 제 4,885,292); 레닌에 대한 단클론 항체 (미국 특허 제 4,780,401); 및 많은 다른 펩티드와 그 유사체 (미국 특허 제 5,071,837; 5,064,965; 5,063,207; 5,036,054; 5,036,053, 5,034,512, 및 4,894,437).

[0163] 칼슘 채널 차단제는 고혈압, 협심증 및 심장 부정맥과 같은 여러 심혈관 질환을 포함한 다양한 질병의 제어에 중요한 치료 가치를 갖는 화학적으로 다양한 종류의 화합물이다 (Fleckenstein, *Cir. Res.* v. 52, (suppl. 1), p. 13-16 (1983); Fleckenstein, *Experimental Facts and Therapeutic Prospects*, John Wiley, New York (1983); McCall, D., *Curr Pract Cardiol*, v. 10, p. 1-11 (1985)). 칼슘 채널 차단제는 세포의 칼슘 채널을 조절하여 칼슘이 세포로 들어가는 것을 방지하거나 늦추는 이질적 약물 그룹이다 (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company, Eaton, Pa., p. 963 (1995)). 현재 이용 가능한 대부분의 칼슘 채널 차단제 및 본 발명에 따른 유용한 약물들은 하기와 같은 3 개의 주요 화학적 약물 그룹 중 하나에 속한다: 니페디핀 (nifedipine)과 같은 디하이드로피리딘 (dihydropyridines), 베라파밀 (verapamil)과 같은 페닐알킬아민 (henyl alkyl amines) 및 딜티아젬 (diltiazem)과 같은 벤조티아제핀 (benzothiazepines). 본 발명에 따른 유용한 다른 칼슘 채널 차단제로는 아미논 (aminone), 암로디핀 (amlodipine), 벤시클란 (bencyclane), 펠로디핀 (felodipine), 펜딜린 (fendiline), 플루나리진 (flunarizine), 이스라디핀 (isradipine), 니카르디핀 (nicardipine), 니모디핀 (nimodipine), 퍼헥실렌 (perhexylene), 갈로파밀 (gallopamil), 티아파밀 (tiapamil) 및 티아파밀 유사체 (예: 1993RO-11-2933), 페닐로인 (phenyloin), 바르비투르산염 (barbiturates), 펩티드 디노르핀 (peptides dynorphin), 오메가-코노톡신 (omega-conotoxin) 및 오메가-아가 톡신 (omega-agatoxin) 등 및/또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염 등이 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

[0164] 이뇨제는 탄산탈수효소 억제제 (carbonic anhydrase inhibitors), 루프 이뇨제 (loop diuretics), 칼륨보존 이뇨제 (potassium-sparing diuretics), 티아자이드 (thiazides) 및 관련된 이뇨제를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 혈관 확장제는 관상동맥 혈관 확장제 (coronary vasodilators) 및 말초혈관 확장제 (peripheral vasodilators)를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 혈관 수축제 (vasopressors)는 혈관 수축 및/ 또는 혈압 상승을 일으키는 약제이다. 혈관 수축제는 도파민 (dopamine), 에페드린 (ephedrine), 에피네프린 (epinephrine), 메톡사민 HCl (methoxamine HCl, Vasoxyl®), 페닐에프린 (phenylephrine), 페닐에프린 HCl (phenylephrine HCl, Neo-Synephrine®) 및 메타라미놀 (metaraminol)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 티아졸리딘디온 (thiazolidinediones)에는 로시글레타존 (rosigletazone, Avandia®), 피오글리타존 (pioglitazone, Actos®), 트로글리타존 (troglitazone, Rezulin) 등이 포함되나 이에 제한되지는 않는다.

[0165] 면역 억제제 (immunosuppressive agents)는 스테로이드 (steroids), 칼시뉴린 억제제 (calcineurin inhibitors), 항증식제 (anti-proliferative agents), 생물학적 제제 (biologics) 및 단클론 또는 다클론 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 생물학적 제제는 재조합 또는 합성된 펩티드 및 단백질 및 합성된 형태의 핵산을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 스테로이드는 코르티코스테로이드 (corticosteroid) 일 수 있다. 코르티코스테로이드의 예로는 프레드니손 (prednisone), 하이드로코르티손 (hydrocortisone) 및 메틸프레드니손 (methylprednisone)이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 칼시뉴린 억제제 (calcineurin inhibitors)의 예로는 타크로리무스 (Tacrolimus), FK506, 아드바그래프트 (Advagraft®), 프로그라프 (Prograf®), 엔바수스 (Envarsus XR®), 헤코리아 (Hecoria®), 아스타그라프 (Astagraf XL®), 사이클로스포린 (cyclosporine), 세큐아S (CequaS®), 네오랄 (Neoral®), 레스타시스 (Restasis®), 피메크롤리무스 (pimecrolimus®), 샌드이뮨 (Sandimmune®), 프로토픽 (Protopic®), 젠그라프트 (Gengraft®) 및 엘리델 (Elidel®) 등이 포함되나 이에

제한되지는 않는다. 단클론 항체의 예로는 항-CD3 항체 (Muromonab-CD3, Orthoclone® OKT3, Visilizumab (Nuvion®)), 항-CD52 (Altemtuzumab (Campath®-1H)), 항-CD25 (Basiliximab (Simulect®)), 항-CD20 (Rituximab (Rituxan®), Obinutuzumab (Gazyva®), Ocrelizumab (Ocrevus®)), 항-보체 단백질 (Eculizumab (Soliris®)), 항-공통자극 분자 (Bleselumab, Lulizumab®) 및 항-사이토카인 또는 사이토카인 수용체 (Tocilizumab (Actemra®), Ustekinumab (Stelara®), Canakinumab (Ilaris®), Secukinumab (Cosentyx®), Siltuximab (Sylvant®), Brodalumab (Siliq®), Ixekizumab (Taltz®), Sarilumab (Kevazra®), Guselkumab (Tremfya®), 및 Tildrakizumab (Ilumya®)) 등이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 다클론 항체의 예로는 항-흉선세포 글로불린-말 (anti-thymocyte globulin-equine, Atgam®) 및 (anti-thymocyte globulin-rabbit, RATG thymoglobulin), 다클론 인간 IgG 면역글로불린 (IVIG, Bivigam®, Carimune®, Cutaquig®) 등이 포함되나 이에 제한되지 않습니다. 생물학적 단백질의 예로는 가용성 CTLA-4-Ig (abatacept®), C1-에스테라제 억제제 (C1-INH, Cinryze®, Haegarda®), IL-1 또는 IL-1R 길항제 (Anakinra, Kineret®), Rilonacept (Arcalyst®) 및 Streptococcus pyogenes 의 IgG 분해 효소(IdeS) 등이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 항증식제 또는 항대사제에는 미코페놀레이트 모페틸 (mycophenolate mofetil), 소듐 미코페놀레이트 (mycophenolate sodium), 아자티오 프린 (azathioprine), 사이클로포스파마이드 (cyclophosphamide), 라파마이신 (rapamycin), 시롤리무스 (sirolimus, Rapamune®), 에베롤리무스 (Everolimus, Afinitor®) 등이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 다른 면역 억제제로는 설파살라진 (sulfasalazine), 아줄피딘 (azulfidine), 메톡살렌 (methoxsalen) 및 탈리도마이드 (thalidomide) 등이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 일부 구체예에서, 면역억제제는 칼시뉴린 억제제, 항증식제, mTOR 억제제 및/또는 스테로이드이다. 특정 비제한적 예에서, 칼시뉴린 억제제는 타크롤리무스 (tacrolimus) 또는 사이클로스포린 (cyclosporine)이고; 항증식제는 마이코페놀레이트 (mycophenolate)이며; mTOR 억제제는 시롤리무스 (sirolimus)이고/이거나 스테로이드는 프레드니손 (prednisone), 하이드로코르티손 (hydrocortisone) 또는 코르티손 (cortisone)이다.

[0166] 본원에서 제공된 방법은 또한 식이 요법 및/또는 운동과 같은 다른 요법의 사용을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 요법은 MBV를 사용한 치료에 추가된다. 본원에 사용된 "공동-투여 (co-administering)"는 단일 조성물의 혼합물로서 둘 이상의 치료제들 (예를 들어, MBV 및 두번째 치료제)을 동시에 또는 순차적으로, 그리고 일부 구체예에서 상기 화합물들이 추가적 또는 상승 효과를 발휘할 수 있도록 시간상으로 충분히 근접하여 투여하는 것을 의미한다. 다른 구체예에서, 상기 치료제들은 동시에 투여된다. 또 다른 구체예에서, 하나의 치료제는 또 다른 치료제의 투여 이전 또는 이후에 투여된다.

[0167] 투여되는 MBV의 용량은 치료적으로 효과적이며 투여 경로를 포함한 여러 요인에 기초하여 숙련된 임상의가 결정할 수 있다. 일부 구체예에서, MBV의 농도는 ml 당 약 1 X 10^5 내지 약 1 X 10^{12}, 예를 들어 ml 당 1 X 10^6 내지 약 1 X 10^{11}, ml 당 약 1 X 10^7 내지 약 1 X 10^{11}, 또는 ml 당 약 1 X 10^8 내지 약 1 x 10^{10} 이다. 국소 투여되는 일부 비제한적 예에서, 상기 농도는 ml 당 약 1 X 10^8 내지 약 1 X 10^{10}, 예를 들어 ml 당 약 1 X 10^8, ml 당 약 5 X 10^8, ml 당 약 1 X 10^9, ml 당 약 5 X 10^9, 또는 ml 당 약 1 X 10^{10} 이다. 국소 투여시는 그 사이트에 적합한 용량으로 투여한다. 예시적인 비 제한적 용량은 유리체에서는 0.1 ml; 이식 부위 표면에 펴 바르는 경우에는 1.0 ml, 긴 피부 절개 부위의 가장자리에 주사하는 경우에는 1.5 ml; 전체 공동이 약 1.40 mm^3인 뇌졸중 공동에 주입하는 경우에는 0.15 ml 이다. 위치에 대한 적절한 용량은 당업자라면 쉽게 알 수 있다. 일반적으로 상기 용량은 치료에 효과적이며 관심 부위에 손상을 유발하지 않는다.

[0168] 일반적으로, 활성 화합물 또는 제제의 투여량은 1 일 약 0.01 mg/kg 내지 1000 mg/kg 일 수 있다. 경구 투여의 경우 1-5 mg/kg, 5-50 mg/kg 또는 50-100 mg/kg 범위의 양을 하루에 한 번 또는 여러 번 투여할 수 있다. 정맥 투여와 같은 다른 형태의 투여의 경우, 저용량으로 투여할 수 있다. 적용된 초기 용량에서 인간 개체의 반응이 불충분한 경우, 환자 내성이 허용하는 범위까지 더 높은 용량 (또는 다른 더 국소화된 전달 경로에 의해 효과적으로 더 높은 용량)이 사용될 수 있다. 화합물의 적절한 전신 수준을 달성하기 위해 하루에 여러 번 투여될 수 있다.

[0169] 투여시, 약학적 제제는 약학적으로 허용되는 양으로, 약학적으로 허용되는 조성물로서 적용된다. 이러한 제제는 통상적으로 염, 완충제, 방부제, 호환성 담체 및 선택적으로 다른 치료제를 함유할 수 있다. 약물로 사용되는 경우, 염은 약학적으로 허용되는 것이어야 하며, 약학적으로 허용되지 않는 염은 그의 약학적으로 허용되는 염을 제조하는데 사용될 수 있으며 이는 본 발명의 범주에서 배제되지 않는다. 이러한 약리학적 및 약학적으로 허용되는 염은 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말레 산, 아세트산, 살리실산, 시트르산, 포름산, 말론산,

숙신산 등의 산으로부터 제조된 것을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 또한, 약학적으로 허용되는 염은 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염과 같은 알칼리 금속염 또는 알칼리 토염 (lkaline earth salts)으로 제조될 수 있다. 하기 문헌 참조: 미국 출원 공개 제 2008/0003199, IL-33 in the treatment and diagnosis of diseases and disorders. 이는 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0170] **근원세포 분화를 증가시키는 방법**

[0171] 본원에는 근원세포 분화를 증가시키는 방법도 개시되어 있다. 이러한 방법은 근원세포를 세포외 기질로부터 유래된 유효량의 분리된 나노소포와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 나노소포는 인터루킨 (IL)-33 및 리실 옥시다제를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이다. 상기 근원세포는 생체내 또는 시험관내의 세포이다.

[0172] 근육세포 결정, 분화 및 다핵 융합체 (multinucleated syncytia)로의 융합 과정인 근발생 (myogenesis)은 손상 후의 정상적인 근육 발달과 조직 재생에 필수적이다.

[0173] 일부 구체예에서, 경색 후 심장기능 장애 (postinfarction cardiac dysfunction)의 영향을 제한하기 위한 치료는 손상된 좌심실로의 세포 (근세포 또는 줄기세포) 이식을 포함한다. 이식된 세포들은 심장 수축에 참여하여 좌심실 박출율 (ventricular ejection fraction)을 증가시킨다. 심근내 이식 (intramyocardial grafting)에는 많은 수의 잠재적 수축 세포 (potentially contractile cells)들이 필요하다. 따라서, 본원에 개시된 방법은 심장 또는 골격근 이식편으로 사용하기에 적합한 세포 집단을 확장할 수 있다.

[0174] **예시적 구체예**

[0175] 제 1 항. 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체에서 장애를 치료하거나 억제하는 방법으로서 하기의 단계를 포함하는 방법: 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체를 선택하는 단계; 및 세포외 기질로부터 유래된 분리된 나노소포를 상기 개체에 치료적으로 유효한 양으로 투여하는 단계, 여기서 상기 나노소포는 인터루킨-33 (IL-33) 및 리실 산화효소 (lysyl oxidase)를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이고, 상기 장애는 a) 장기 또는 조직의 섬유증; b) 고형 장기 이식 거부; 또는 c) 심근 경색 또는 심근 허혈이 아닌 심장 질환이다.

[0176] 제 2 항. 제 1 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 포유동물의 세포외 기질인 방법.

[0177] 제 3 항. 제 2 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 인간의 세포외 기질인 방법.

[0178] 제 4 항. 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 식도 조직, 방광, 소장 점막하층, 진피, 탯줄, 심낭, 심장 조직 또는 골격근으로부터 유래된 것인 방법.

[0179] 제 5 항. 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 miR-145 및/또는 miR-181을 포함하는 방법.

[0180] 제 6 항. 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 장애는 고형 장기이식 거부이고, 상기 대상 개체는 이식된 고형 장기의 수용자인 방법.

[0181] 제 7 항. 제 6 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 이식된 고형장기에 투여되는 방법.

[0182] 제 8 항. 제 7 항의 방법에 있어서, 상기 이식된 고형장기가 심장인 방법.

[0183] 제 9 항. 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 장애가 심장병인 방법.

[0184] 제 10 항. 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 심장병은 심부전 (heart failure) 또는 심장 허혈 (cardiac ischemia)인 방법.

[0185] 제 11 항. 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 심장병은 급성 관상동맥 증후군 (acute coronary syndrome), 만성 안정형 협심증 (chronic stable angina pectoris), 불안정 협심증 (unstable angina pectoris), 혈관 성형술 (angioplasty), 일과성 허혈 발작 (transient ischemic attack), 파행 (claudication(s)), 혈관 폐색 (vascular occlusion(s)), 동맥 경화증 (arteriosclerosis), 심부전 (heart failure), 만성 심부전 (chronic heart failure), 급성 비대상성 심부전 (acute decompensated heart failure), 심장 비대 (cardiac hypertrophy), 심장 섬유증 (cardiac fibrosis), 대동맥판증 (aortic valve disease), 대동맥 또는 승모판 협착증 (aortic or mitral valve stenosis), 심근증 (cardiomyopathy), 심방세

동 (atrial fibrillation), 심장 부정맥 (heart arrhythmia) 및 심낭 질환 (pericardial disease) 등을 포함하는 방법.

[0186] 제 12 항. 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기

[0187] 나노소포가 정맥내로 투여되는 방법.

[0188] 제 13 항. 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 장애가 장기 또는 조직의 섬유증인 방법.

[0189] 제 14 항. 제 13 항의 방법에 있어서, 상기 섬유증이 간경변 (cirrhosis of the liver), 폐 섬유증 (pulmonary fibrosis), 심장 섬유증 (cardiac fibrosis), 종격 섬유증 (mediastinal fibrosis), 관절섬유화 (arthrofibrosis), 골수 섬유증 (myelofibrosis), 신원성 전신 섬유증 (nephrogenic systemic fibrosis), 켈로이드 섬유증 (keloid fibrosis), 경피증 섬유증 (scleroderma fibrosis), 신장 섬유증 (renal fibrosis), 림프조직 섬유증 (lymphatic tissue fibrosis), 동맥 섬유증 (arterial fibrosis), 모세혈관 섬유증 (capillary fibrosis), 혈관 섬유증 (vascular fibrosis), 또는 췌장 섬유증 (pancreatic fibrosis)인 방법.

[0190] 제 15 항. 제 14 항의 방법에 있어서, 상기 섬유증이 폐 섬유증인 방법.

[0191] 제 16 항. 제 14 항의 방법에 있어서, 상기 섬유증이 심장 섬유증인 방법.

[0192] 제 17 항. 제 16 항의 방법에 있어서, 상기 심장 섬유증은

[0193] a) 비대성 심근증 (hypertrophic cardiomyopathies), 사르코이드증 (sarcoidosis), 만성 신부전 (chronic renal insufficiency), 독성 심근증 (toxic cardiomyopathies), 허혈-재관류 손상 (ischemia-reperfusion injury), 급성 장기 거부 (acute organ rejection), 만성 장기 거부 (chronic organ rejection), 노화 (aging), 만성 고혈압 (chronic hypertension), 비-허혈성 확장성 심근증 (non-ischemic delated cardiomyopathy), 부정맥 (arrhythmia), 죽상 경화증 (atherosclerosis), HIV-관련 만성 혈관 질환 (HIV-associated chronic vascular disease), 및 폐 고혈압 (pulmonary hypertension); 또는

[0194] b) 심근경색 (myocardial infarction) 또는 심근허혈 (myocardial ischemia)에 의한 것인 방법.

[0195] 제 18 항. 제 15 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 흡입에 의해 환자에게 투여되는 방법.

[0196] 제 19 항. 제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 대상 개체에게 매주, 격월 또는 매월 투여되는 방법.

[0197] 제 20 항. 제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 치료적 유효량의 추가 치료제를 대상 개체에 투여하는 단계를 더 포함하는 방법.

[0198] 제 21 항. 제 20 항의 방법에 있어서, 상기 추가 치료제는 면역 억제제인 방법.

[0199] 제 22 항. 제 21 항의 방법에 있어서, 상기 면역 억제제는 칼시뉴린 억제제 (calcineurin inhibitor), 항증식제 (antiproliferative agent), mTOR 억제제 (mTOR inhibito) 및/또는 스테로이드 (steroids)인 방법.

[0200] 제 23 항. 제 22 항의 방법에 있어서, 상기 칼시뉴린 억제제는 타크로리무스 (tacrolimus) 또는 사이클로스포린 (cyclosporine)이고; 상기 항증식제는 마이코페놀레이트 (mycophenolate)이며; 상기 mTOR 억제제는 시롤리무스 (sirolimus)이고, 및/또는 상기 스테로이드는 프레드니손 (prednisone), 하이드로코르티손 (hydrocortisone) 또는 코르티손 (cortisone)인 방법.

[0201] 제 24 항. 제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 개체는 인간인 방법.

[0202] 제 25 항. 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체에서 장애를 치료하거나 억제하는 방법으로서 하기의 단계를 포함하는 방법: 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체를 선택하는 단계; 및 세포외 기질로부터 유래된 분리된 나노소포를 상기 개체에 치료적으로 유효한 양으로 투여하는 단계, 여기서 상기 나노소포는 인터루킨-33 (IL-33) 및 리실 산화효소 (lysyl oxidase)를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이고, 상기 장애는 장기 또는 조직의 섬유증이다.

[0203] 제 26 항. 제 25 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 포유동물의 세포외 기질인 방법.

[0204] 제 27 항. 제 26 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 인간의 세포외 기질인 방법.

[0205] 제 28 항. 제 25 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 식도 조직, 방광, 소장 점막하층, 진피, 탯줄, 심낭, 심장 조직 또는 골격근으로부터 유래된 것인 방법.

[0206] 제 29 항. 제 25 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 miR-145 및/또는 miR-181을 포함하는 방법.

[0207] 제 30 항. 제 25 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 섬유증이 간경변 (cirrhosis of the liver), 폐 섬유증 (pulmonary fibrosis), 심장 섬유증 (cardiac fibrosis), 종격 섬유증 (mediastinal fibrosis), 관절섬유화 (arthrofibrosis), 골수 섬유증 (myelofibrosis), 신원성 전신 섬유증 (nephrogenic systemic fibrosis), 켈로이드 섬유증 (keloid fibrosis), 경피증 섬유증 (scleroderma fibrosis), 신장 섬유증 (renal fibrosis), 림프조직 섬유증 (lymphatic tissue fibrosis), 동맥 섬유증 (arterial fibrosis), 모세혈관 섬유증 (capillary fibrosis), 혈관 섬유증 (vascular fibrosis), 또는 췌장 섬유증 (pancreatic fibrosis)인 방법.

[0208] 제 31 항. 제 30 항의 방법에 있어서, 상기 섬유증이 폐 섬유증인 방법.

[0209] 제 32 항. 제 30 항의 방법에 있어서, 상기 섬유증이 심장 섬유증인 방법.

[0210] 제 33 항. 제 32 항의 방법에 있어서, 상기 심장 섬유증은

[0211] a) 비대성 심근증 (hypertrophic cardiomyopathies), 사르코이드증 (sarcoidosis), 만성 신부전 (chronic renal insufficiency), 독성 심근증 (toxic cardiomyopathies), 허혈-재관류 손상 (ischemia-reperfusion injury), 급성 장기 거부 (acute organ rejection), 만성 장기 거부 (chronic organ rejection), 노화 (aging), 만성 고혈압 (chronic hypertension), 비-허혈성 확장성 심근증 (non-ischemic delated cardiomyopathy), 부정맥 (arrhythmia), 죽상 경화증 (atherosclerosis), HIV-관련 만성 혈관 질환 (HIV-associated chronic vascular disease), 및 폐 고혈압 (pulmonary hypertension); 또는

[0212] b) 심근경색 (myocardial infarction) 또는 심근허혈 (myocardial ischemia)에 의한 것인 방법.

[0213] 제 33.1 항. 제 33 항의 방법에 있어서, 상기 심장 섬유증이 급성 장기 거부에 의한 것인 방법.

[0214] 제 33.2 항. 제 33 항의 방법에 있어서, 상기 심장 섬유증이 만성 장기 거부에 의한 것인 방법.

[0215] 제 34 항. 제 25 항 내지 제 33.2 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 환자에게 흡입 또는 정맥 투여에 의해 투여되는 방법.

[0216] 제 35 항. 제 25 항 내지 제 33.2 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 대상 개체에게 매주, 격월 또는 매월 투여되는 방법.

[0217] 제 36 항. 제 25 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 치료적 유효량의 추가 치료제를 대상 개체에 투여하는 단계를 더 포함하는 방법.

[0218] 제 37 항. 제 36 항의 방법에 있어서, 상기 추가 치료제는 면역 억제제인 방법.

[0219] 제 38 항. 제 37 항의 방법에 있어서, 상기 면역 억제제는 칼시뉴린 억제제 (calcineurin inhibitor), 항증식제 (antiproliferative agent), mTOR 억제제 (mTOR inhibito) 및/또는 스테로이드 (steroids)인 방법.

[0220] 제 39 항. 제 38 항의 방법에 있어서, 상기 칼시뉴린 억제제는 타크로리무스 (tacrolimus) 또는 사이클로스포린 (cyclosporine)이고; 상기 항증식제는 마이코페놀레이트 (mycophenolate)이며; 상기 mTOR 억제제는 시롤리무스 (sirolimus)이고, 및/또는 상기 스테로이드는 프레드니손 (prednisone), 하이드로코르티손 (hydrocortisone) 또는 코르티손 (cortisone)인 방법.

[0221] 제 40 항. 제 25 항 내지 제 39 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 개체는 인간인 방법.

[0222] 제 41 항. 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체에서 장애를 치료하거나 억제하는 방법으로서 하기의 단계를 포함하는 방법: 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체를 선택하는 단계; 및 세포외 기질로부터 유래된 분리된 나노소포를 상기 개체에 치료적으로 유효한 양으로 투여하는 단계, 여기서 상기 나노소포는 인터루킨-33 (IL-33) 및 리실 산화효소 (lysyl oxidase)를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이고, 상기 장애는 고형 장기이식 거부이다.

[0223] 제 42 항. 제 41 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 포유동물의 세포외 기질인 방법.

[0224] 제 43 항. 제 42 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 인간의 세포외 기질인 방법.

[0225] 제 44 항. 제 41 항 내지 제 43 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 식도 조직, 방광, 소장 점막하층, 진피, 탯줄, 심낭, 심장 조직 또는 골격근으로부터 유래된 것인 방법.

[0226] 제 45 항. 제 41 항 내지 제 43 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 miR-145 및/또는 miR-181을 포함하는 방법.

[0227] 제 46 항. 제 41 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 이식된 고형 장기에 투여되는 방법.

[0228] 제 47 항. 제 46 항의 방법에 있어서, 상기 이식된 고형 장기는 심장인 방법.

[0229] 제 47.1 항. 제 46 항의 방법에 있어서, 상기 이식된 고형 장기는 폐, 신장 또는 간인 방법.

[0230] 제 48 항. 제 41 항 내지 제 47.1 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 정맥내로 투여되는 방법.

[0231] 제 49 항. 제 41 항 내지 제 46 항 및 제 47.1 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 흡입에 의해 투여되는 방법.

[0232] 제 50 항. 제 41 항 내지 제 49 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 대상 개체에게 매주, 격월 또는 매월 투여되는 방법.

[0233] 제 51 항. 제 41 항 내지 제 50 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 치료적 유효량의 추가 치료제를 대상 개체에 투여하는 단계를 더 포함하는 방법.

[0234] 제 52 항. 제 51 항의 방법에 있어서, 상기 추가 치료제는 면역 억제제인 방법.

[0235] 제 53 항. 제 51 항의 방법에 있어서, 상기 면역 억제제는 칼시뉴린 억제제 (calcineurin inhibitor), 항증식제 (antiproliferative agent), mTOR 억제제 (mTOR inhibito) 및/또는 스테로이드 (steroids)인 방법.

[0236] 제 54 항. 제 53 항의 방법에 있어서, 상기 칼시뉴린 억제제는 타크로리무스 (tacrolimus) 또는 사이클로스포린 (cyclosporine)이고; 상기 항증식제는 마이코페놀레이트 (mycophenolate)이며; 상기 mTOR 억제제는 시롤리무스 (sirolimus)이고, 및/또는 상기 스테로이드는 프레드니손 (prednisone), 하이드로코르티손 (hydrocortisone) 또는 코르티손 (cortisone)인 방법.

[0237] 제 55 항. 제 41 항 내지 제 54 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 개체는 인간인 방법.

[0238] 제 55.1 항. 제 41 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 고형 장기이식 거부는 급성 거부인 방법.

[0239] 제 55.2 항. 제 41 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 고형 장기이식 거부는 만성 거부인 방법.

[0240] 제 56 항. 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체에서 장애를 치료하거나 억제하는 방법으로서 하기의 단계를 포함하는 방법: 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체를 선택하는 단계; 및 세포외 기질로부터 유래된 분리된 나노소포를 상기 개체에 치료적으로 유효한 양으로 투여하는 단계, 여기서 상기 나노소포는 인터루킨-33 (IL-33) 및 리실 산화효소 (lysyl oxidase)를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이고, 상기 장애는 심근 경색이나 심근 허혈이 아닌 심장 질환이다.

[0241] 제 57 항. 제 56 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 포유동물의 세포외 기질인 방법.

[0242] 제 58 항. 제 57 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 인간의 세포외 기질인 방법.

[0243] 제 59 항. 제 56 항 내지 제 58 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 식도 조직, 방광, 소장 점막하층, 진피, 탯줄, 심낭, 심장 조직 또는 골격근으로부터 유래된 것인 방법.

[0244] 제 60 항. 제 55 항 내지 제 58 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 miR-145 및/또는 miR-181을 포함하는 방법.

[0245] 제 61 항. 제 55 항 내지 제 60 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 심장병은 심부전 (heart failure) 또는 심장 허혈 (cardiac ischemia)인 방법.

[0246] 제 62 항. 제 56 항 내지 제 60 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 심장병은 급성 관상동맥 증후군 (acute coronary syndrome), 만성 안정형 협심증 (chronic stable angina pectoris), 불안정 협심증 (unstable angina pectoris), 혈관 성형술 (angioplasty), 일과성 허혈 발작 (transient ischemic attack), 파행 (claudication(s)), 혈관 폐색 (vascular occlusion(s)), 동맥 경화증 (arteriosclerosis), 심부전 (heart failure), 만성 심부전 (chronic heart failure), 급성 비대상성 심부전 (acute decompensated heart failure), 심장 비대 (cardiac hypertrophy), 심장 섬유증 (cardiac fibrosis), 대동맥판증 (aortic valve disease), 대동맥 또는 승모판 협착증 (aortic or mitral valve stenosis), 심근증 (cardiomyopathy), 심방세동 (atrial fibrillation), 심장 부정맥 (heart arrhythmia) 및 심낭 질환 (pericardial disease) 등을 포함하는 방법.

[0247] 제 63 항. 제 55 항 내지 제 62 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 정맥내로 투여되는 방법.

[0248] 제 64 항. 제 55 항 내지 제 62 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 대상 개체에게 매주, 격월 또는 매월 투여되는 방법.

[0249] 제 65 항. 제 55 항 내지 제 64 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 치료적 유효량의 추가 치료제를 대상 개체에 투여하는 단계를 더 포함하는 방법.

[0250] 제 66 항. 제 55 항 내지 제 65 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 개체는 인간인 방법.

[0251] 제 66.1 항. 제 55 항 내지 제 66 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 심장병은 심부전인 방법.

[0252] 제 66.2 항. 제 55 항 내지 제 66 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 심장병은 심근증 (cardiomyopathy)인 방법.

[0253] 제 66.3 항. 제 55 항 내지 제 66 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 심장병은 허혈-재관류 손상 (ischemic-reperfusion injury)인 방법.

[0254] 제 67 항. 개체에서 장애를 치료 또는 억제하는데 사용하기 위한 조성물로서, 상기 조성물은 세포외 기질로부터 유래된 치료적 유효량의 분리된 나노소포를 포함하며, 상기 나노소포는 인터루킨-33 (IL-33) 및 리실 산화효소 (lysyl oxidase)를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이고, 상기 장애는 a) 장기 또는 조직의 섬유증; b) 고형 장기이식 거부; 또는 c) 심근 경색이나 심근 허혈이 아닌 심장병이다.

[0255] 제 68 항. 제 67 항의 조성물에 있어서, 상기 세포외 기질은 포유동물의 세포외 기질인 조성물.

[0256] 제 69 항. 제 67 항의 조성물에 있어서, 상기 세포외 기질은 인간의 세포외 기질인 조성물.

[0257] 제 70 항. 제 67 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항의 조성물에 있어서, 상기 세포외 기질은 식도 조직, 방광, 소장 점막하층, 진피, 탯줄, 심낭, 심장 조직 또는 골격근으로부터 유래된 것인 조성물.

[0258] 제 71 항. 제 67 항 내지 제 70 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 miR-145 및/또는 miR-181을 포함하는 조성물.

[0259] 제 72 항. 제 67 항 내지 제 71 항 중 어느 한 항의 조성물에 있어서, 상기 장애는 고형 장기이식 거부이고, 상기 대상 개체는 이식된 고형 장기의 수용자인 조성물.

[0260] 제 73 항. 제 70 항의 조성물에 있어서, 상기 나노소포는 이식된 고형장기에 투여되도록 제형화되는 조성물.

[0261] 제 74 항. 제 73 항의 조성물에 있어서, 상기 이식된 고형장기가 심장인 조성물.

[0262] 제 75 항. 제 65 항 내지 제 71 항 중 어느 한 항의 조성물에 있어서, 상기 장애가 심장병인 조성물.

[0263] 제 76 항. 제 75 항의 조성물에 있어서, 상기 심장병은 심부전 (heart failure) 또는 심장 허혈 (cardiac ischemia)인 조성물.

[0264] 제 77 항. 제 75 항의 조성물에 있어서, 상기 심장병은 급성 관상동맥 증후군 (acute coronary syndrome), 만성 안정형 협심증 (chronic stable angina pectoris), 불안정 협심증 (unstable angina pectoris), 혈관 성형

술 (angioplasty), 일과성 허혈 발작 (transient ischemic attack), 파행 (claudication(s)), 혈관 폐색 (vascular occlusion(s)), 동맥 경화증 (arteriosclerosis), 심부전 (heart failure), 만성 심부전 (chronic heart failure), 급성 비대상성 심부전 (acute decompensated heart failure), 심장 비대 (cardiac hypertrophy), 심장 섬유증 (cardiac fibrosis), 대동맥판증 (aortic valve disease), 대동맥 또는 승모판 협착증 (aortic or mitral valve stenosis), 심근증 (cardiomyopathy), 심방세동 (atrial fibrillation), 심장 부정맥 (heart arrhythmia) 및 심낭 질환 (pericardial disease) 등을 포함하는 조성물.

[0265] 제 78 항. 제 67 항 내지 제 77 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 정맥내로 투여되는 조성물.

[0266] 제 79 항. 제 67 항 내지 제 71 항 중 어느 한 항의 조성물에 있어서, 상기 장애가 장기 또는 조직의 섬유증인 조성물.

[0267] 제 80 항. 제 79 항의 조성물에 있어서, 상기 섬유증이 간경변 (cirrhosis of the liver), 폐 섬유증 (pulmonary fibrosis), 심장 섬유증 (cardiac fibrosis), 종격 섬유증 (mediastinal fibrosis), 관절섬유화 (arthrofibrosis), 골수 섬유증 (myelofibrosis), 신원성 전신 섬유증 (nephrogenic systemic fibrosis), 켈로이드 섬유증 (keloid fibrosis), 경피증 섬유증 (scleroderma fibrosis), 신장 섬유증 (renal fibrosis), 림프 조직 섬유증 (lymphatic tissue fibrosis), 동맥 섬유증 (arterial fibrosis), 모세혈관 섬유증 (capillary fibrosis), 혈관 섬유증 (vascular fibrosis), 또는 췌장 섬유증 (pancreatic fibrosis)인 조성물.

[0268] 제 81 항. 제 80 항의 조성물에 있어서, 상기 섬유증이 폐 섬유증인 조성물.

[0269] 제 82 항. 제 80 항의 조성물에 있어서, 상기 섬유증이 심장 섬유증인 조성물.

[0270] 제 83 항. 제 82 항의 조성물에 있어서, 상기 심장 섬유증은

[0271] a) 비대성 심근증 (hypertrophic cardiomyopathies), 사르코이드증 (sarcoidosis), 만성 신부전 (chronic renal insufficiency), 독성 심근증 (toxic cardiomyopathies), 허혈-재관류 손상 (ischemia-reperfusion injury), 급성 장기 거부 (acute organ rejection), 만성 장기 거부 (chronic organ rejection), 노화 (aging), 만성 고혈압 (chronic hypertension), 비-허혈성 확장성 심근증 (non-ischemic delated cardiomyopathy), 부정맥 (arrhythmia), 죽상 경화증 (atherosclerosis), HIV-관련 만성 혈관 질환 (HIV-associated chronic vascular disease), 및 폐 고혈압 (pulmonary hypertension); 또는

[0272] b) 심근경색 (myocardial infarction) 또는 심근허혈 (myocardial ischemia)에 의한 것인 조성물.

[0273] 제 83 항. 제 67 항 내지 제 81 항 중 어느 한 항의 조성물에 있어서, 상기 나노소포는 흡입에 의해 환자에게 투여되는 조성물.

[0274] 제 84 항. 제 67 항 내지 제 83 항 중 어느 한 항의 조성물에 있어서, 상기 나노소포는 대상 개체에게 매주, 격월 또는 매월 투여되는 조성물.

[0275] 제 85 항. 제 67 항 내지 제 84 항 중 어느 한 항의 조성물에 있어서, 치료적 유효량의 추가 치료제를 더 포함하는 조성물.

[0276] 제 86 항. 제 85 항의 조성물에 있어서, 상기 추가 치료제는 면역 억제제인 조성물.

[0277] 제 87 항. 제 86 항의 조성물에 있어서, 상기 면역 억제제는 칼시뉴린 억제제 (calcineurin inhibitor), 항증식제 (antiproliferative agent), mTOR 억제제 (mTOR inhibito) 및/또는 스테로이드 (steroids)인 조성물.

[0278] 제 88 항. 제 87 항의 조성물에 있어서, 상기 칼시뉴린 억제제는 타크로리무스 (tacrolimus) 또는 사이클로스포린 (cyclosporine)이고; 상기 항증식제는 마이코페놀레이트 (mycophenolate)이며; 상기 mTOR 억제제는 시롤리무스 (sirolimus)이고, 및/또는 상기 스테로이드는 프레드니손 (prednisone), 하이드로코르티손 (hydrocortisone) 또는 코르티손 (cortisone)인 조성물.

[0279] 제 89 항. 제 67 항 내지 제 88 항 중 어느 한 항의 조성물에 있어서, 상기 개체는 인간인 조성물.

[0280] 제 90 항. 하기의 단계를 포함하는, 근원세포 분화를 증가시키는 방법: 근원세포를 세포외 기질로부터 유래된 유효량의 분리된 나노소포와 접촉시키는 단계, 여기서 상기 나노소포는 인터루킨 (IL)-33 및 리실 옥시다제를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이다.

[0281] 제 91 항. 제 90 항의 방법에 있어서, 상기 근원세포는 시험관 내의 세포인 방법.

[0282] 제 92 항. 제 90 항 또는 제 91 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 포유동물의 세포외 기질인 방법.

[0283] 제 93 항. 제 92 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 인간의 세포외 기질인 방법.

[0284] 제 94 항. 제 90 항 내지 제 93 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 식도 조직, 방광, 소장 점막하층, 진피, 탯줄, 심낭, 심장 조직 또는 골격근으로부터 유래된 것인 방법.

[0285] 제 95 항. 제 90 항 내지 제 94 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 miR-145 및/또는 miR-181을 포함하는 방법.

[0286] 제 96 항. 제 90 항 내지 제 95 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 근원세포는 포유동물 개체의 세포인 방법.

[0287] 제 97 항. 제 96 항의 방법에 있어서, 상기 포유동물 개체는 인간인 방법.

[0288] 제 98 항. 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체에서 장애를 치료하거나 억제하는 방법으로서 하기의 단계를 포함하는 방법: 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 개체를 선택하는 단계; 및 세포외 기질로부터 유래된 분리된 나노소포를 상기 개체에 치료적으로 유효한 양으로 투여하는 단계, 여기서 상기 나노소포는 인터루킨-33 (IL-33) 및 리실 산화효소 (lysyl oxidase)를 포함하며, 또한 상기 나노소포는 a) CD63 또는 CD81을 발현하지 않거나, b) $CD63^{lo}CD81^{lo}$ 이고, 상기 장애는 심근 경색이나 심근 허혈이다.

[0289] 제 99 항. 제 98 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 포유동물의 세포외 기질인 방법.

[0290] 제 100 항. 제 99 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 인간의 세포외 기질인 방법.

[0291] 제 101 항. 제 98 항 내지 제 100 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 세포외 기질은 식도 조직, 방광, 소장 점막하층, 진피, 탯줄, 심낭, 심장 조직 또는 골격근으로부터 유래된 것인 방법.

[0292] 제 102 항. 제 98 항 내지 제 101 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포가 miR-145 및/또는 miR-181을 포함하는 방법.

[0293] 제 103 항. 제 98 항 내지 제 102 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 장애는 심근 허혈인 방법.

[0294] 제 104 항. 제 98 항 내지 제 102 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 장애는 심근 경색인 방법.

[0295] 제 105 항. 제 98 항 내지 제 104 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 정맥내로 투여되는 방법.

[0296] 제 106 항. 제 98 항 내지 제 105 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 나노소포는 대상 개체에게 매주, 격월 또는 매월 투여되는 방법.

[0297] 제 107 항. 제 98 항 내지 제 106 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 치료적 유효량의 추가 치료제를 대상 개체에 투여하는 단계를 더 포함하는 방법.

[0298] 제 108 항. 제 98 항 내지 제 107 항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 개체는 인간인 방법.

[0299] 본 개시 내용은 다음의 비-제한적 실시예에서 설명된다.

[0300] **실시예**

[0301] 심근 허혈 (myocardial ischemia)은 손상된 심근세포가 섬유아세포 및 연관된 과도한 세포외 기질 (ECM)로 대체된 후 섬유증을 유발하여 심근 경직 (myocardial stiffness)과 심부전 (heart failure)을 증가시킨다. 섬유증 (fibrosis)은 또한 만성 심장 동종이식 거부반응 (chronic heart allograft rejection)에 기여하여 이식 후 11년 (Tx) 내에 이식편의 50% 이상 (>50%)의 손실을 유발한다. 심장 손상 후의 섬유증을 예방하거나 되돌릴 수 있는 치료방법은 없다.

[0302] 면역 억제제는 동종이식 섬유증을 유발하는 병원성 리모델링 과정에 대해 효과가 없다. IL-33은 기질세포 (stromal cells)의 핵에서 발견되며 일반적으로 알라민 (alarmin)으로 간주되는 IL-1 패밀리 구성원이거나 IL-33 수용체인 ST2를 통해 면역세포를 활성화하기 위해 조직 손상 후 방출되는 자가 유래 분자 (self-derived molecule)이다. 새로운 증거는 IL33이 ST2+ 조절 T 세포 (Treg)를 자극하여 심혈관 및 골격근 복구를 촉진한다

는 것을 나타낸다. 그러나 조직 복구를 촉진하기 위해 IL-33을 사용하는 이전에 기술된 방법은 전적으로 가용성 IL-33 사이토카인의 사용에 의존하며, 이는 ST2를 발현하는 수많은 세포를 감안할 때 표적을 벗어난 효과를 가질 수 있다. IL-33을 전달하기 위한 새로운 방법 및 IL-33이 심장 질환과 같지만 이에 제한되지는 않는 질환에서 역할을 하는 다양한 상태에 대한 새로운 치료 방법에 대한 필요성이 있다.

[0303] ECM-스캐폴드는 심장 치료를 포함한 수많은 임상 응용 분야에서 FDA 승인을 받았다. 심근 경색 후에 ECM 하이드로젤의 심장내 주사의 사용을 조사하는 1 상 연구가 현재 진행중이지만, ECM이 심장조직 리모델링을 지시하는 메커니즘은 부분적으로만 이해된다. ECM-스캐폴드 내에 포매된 매트릭스 결합 나노소포 (MBV)가 핵외 인터루킨-33 (IL-33)의 풍부한 공급원이라는 것이 본원에 개시되어 있다. IL-33은 기질세포 (stromal cells)의 핵에서 발견되며 일반적으로 면역계에 세포 손상을 경고하는 알라민 (alarmin)으로 간주되어 IL-33 수용체인 ST2를 포함하는 염증 촉진성 매개체 (pro-inflammatory mediators)를 생성한다. 증거에 따르면 IL-33은 특히 심장 스트레스 후의 IL-33 유도가 개선된 결과와 상관관계가 있는 심혈관 질환 모델에서 조직 복구의 촉매자로서 기능할 수 있다. IL-33은 ECM 내에 안정적으로 저장되고 MBV에 통합됨으로써 비활성화로부터 보호되는 것으로 확인되었다. *IL33*$^{-/-}$ 마우스 조직이 아닌 IL33$^{+/+}$ 마우스 조직으로부터 유래된 MBV는 *ST2*$^{-/-}$ 대식세포를 분화시켜 복구적 프로-리모델링 M2 표현형을 나타내도록 하며, MBV에 연관된 IL-33은 비정준 ST2 독립 경로 (non-canonical ST2-independent pathway)를 통해 대식세포 활성화를 조절한다. ECM-MBV의 필수 구성요소 (integral component)인 IL-33의 발견은 면역 기반 병리적 섬유증 (immune-driven pathological fibrosis)의 조절 기전에 대한 이해를 제공한다. ECM-스캐폴드는 심장 회복에 사용될 수 있다.

[0304] **실시예 1**

[0305] **ECM 바이오스캐폴드에서 분리된 매트릭스 결합 나노소포는 전장 (full length) IL-33을 포함한다.**

[0306] ECM 바이오스캐폴드로부터 MBV의 분리 및 miRNA 카고의 특성화는 하기 문헌에 기재되어 있다 (Huleihel et al., *Sci Adv* 2, e1600502 (2016); Huleihel et al., *Tissue Eng Part A* 23, 1283-1294 (2017)). MBV와 관련된 단백질 신호전달 분자를 확인하기 위해, R&D 시스템의 키트 (Mouse XL Cytokine Array Kit)를 사용하여 탈세포화된 (decellularized) 야생형 (*wt*) 마우스 소장 또는 탈세포화된 *il33*$^{-/-}$ 마우스 소장에서 분리된 MBV로 예비 사이토카인 (preliminary cytokine), 케모카인 및 성장인자 스크리닝을 수행하였다 (도 1a). MBV에서 가장 높은 발현 수준을 가진 단백질의 정량은 IL-33이 *il33*$^{-/-}$ 마우스 (IL33^{-} MBV)에서 분리된 MBV에 비해 *wt* 마우스 (IL33^{+} MBV)에서 분리된 MBV에서 분리된 MBV에 존재하는 다른 단백질의 발현 차이를 최소화하면서 고도로 발현되는 것을 보여 준다 (도 1b). 또한, 탈세포화된 야생형 마우스 장에서 분리된 MBV의 투과전자현미경 영상은 이러한 소포의 직경이 약 100 nm임을 보여준다 (도 1c). 사이토카인 검색 결과는 MBV와 관련된 IL-33이 단백질의 전장 (full-length, 32kDa) 형태이며 (도 1d) 절단 산물이 아니라는 것을 보여주는 면역 블롯 분석에 의해 추가로 검증되었다 (Lefrançais et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 1673-1678 (2012); Cayrol et al., *Nature immunology* 19, 375 (2018)). MBV 내 전장 IL-33 발현의 존재는 이어 임상 응용 분야에서 일반적으로 사용되는 ECM 수술 메쉬에서 관찰되었으며, 여기에는 실험실에서 생산되고 상업적으로 이용 가능한 방광 매트릭스 (UBM) 및 ACELL® MATRISTEM™; 소장 점막하층 (SIS) 및 Cook Biotech® BIODESIGN™; 진피 및 BD® XENMATRIX™; 및 심장 ECM 등이 포함된다 (도 1e). 결과는 실험실에서 생산된 스캐폴드가 각각의 상업적으로 이용 가능한 대응물에 비해 유사한 IL-33 발현 수준을 가짐을 보여 주었으며, 이는 이러한 결과가 실험실 제조 프로토콜의 인위적 결과가 아님을 나타낸다.

[0307] **실시예 2**

[0308] **IL-33은MBV의 내강 내에 저장되어 단백질 분해로부터 보호된다.**

[0309] 검출된 IL-33이 MBV 분리 공정의 오염물이 아님을 확인하기 위하여, 280 nm에서 UV 흡광도에 의해 용출된 분획들을 지속적으로 모니터링하면서 세파로즈 수지 (Sepharose® CL-2B resin) 를 사용한 크기배제 크로마토그래피 (size exclusion chromatography, SEC)로 MBV를 추가로 정제하였다 (도 2a). 면역 블롯 분석을 통해 무거운 MBV 분획에 IL-33가 존재함을 확인하였다(도 2b, *상부 판넬*). 별도의 실험에서, MBV를 먼저 1% 트리톤®X-100으로 용해시키고 추출물은 SEC로 분석하였다. 그 결과, 용해된 MBV의 분자 성분은 UV 크로마토그램 (도 2a)의 이동과 면역 블롯 분석 (도 2b, 하부 판넬)에 의해 결정된 더 가벼운 분획에서 용출되었다. 또한, 풀링된 분획 6-8의 투과 전자 현미경 영상은 소포가 이러한 분획에 존재함을 보여준다 (도 2c). 이러한 결과는 IL-33이 MBV 분리물의 가용성 오염물이 아니라 MBV와 관련이 있음을 나타낸다. 다음으로, IL-33이 MBV의 표면막에 존재하는지

또는 내강 내에 저장되었는지를 확인하였다. 풀링된 분획 6-8의 MBV를 NHS-LC-비오틴으로 비오틴화하였다. 설포네이트 그룹은 비오틴이 지질막을 투과하는 것을 방지하여 외부 표면단백질만 표지되도록 한다 (Diaz et al., *Scientific reports* 6, 37975 (2016)). 비오틴화시킨 후, MBV를 용해시키고 스트렙트아비딘 풀다운 분석 (streptavidin pull down assay)을 수행하여 결합되지 않은 내강 성분으로부터 표면 단백질들을 분류하였다. 면역 블롯 분석 결과는 IL-33이 결합되지 않은 분획에만 존재하고 스트렙트아비딘 (SA) 비드에 의해 풀다운되지 않음을 보여준다 (도 2d). 별도의 실험에서, MBV를 먼저 1% 트리톤®X-100으로 용해시킨 후 비오틴화시켰다. MBV의 표면 및 내강 성분 모두를 비오틴화시켰다. 스트렙트아비딘 풀다운 후의 면역 블롯 분석 결과는 IL-33이 SA 비드와 관련이 있음을 보여준다 (도 2d). 누적된 이러한 데이터는 IL-33이 MBV의 루멘 내에 저장됨을 시사한다. 이러한 결과를 확인하기 위해, 프로테이나제 K 보호 분석을 수행하였다. 풀링된 분획 6-8의 MBV를 1% 트리톤® X-100의 부재 또는 존재하에서 37℃에서 30 분 동안 증가하는 농도의 프로테이나제 K와 함께 배양하였다. 면역 블롯 분석에서 볼 수 있듯이 (도 2e), 트리톤® X-100이 없는 경우 IL-33은 프로테이나제 K에 의해 분해되지 않았다. 그러나 트리톤® X-100 존재시에는 트리톤® X-100에 의해 MBV 막이 투과화되고 이는 IL-33을 접근 가능하게 하여 프로테이나제 K에 민감하게 만들어 결국 IL-33은 분해되었다 (도 2e). 이러한 결과는 MBV에 관련된 IL-33이 단백질 분해로부터 보호되는 소포 막의 내강에 존재함을 확인시켜 주었다.

[0310] **실시예 3**

[0311] **IL33^{+} MBV는 비정준 ST2 독립 경로 (non-canonical ST2-independent pathway)를 통해 프로-리모델링 대식세포 표현형을 활성화시킨다.**

[0312] IL-33^{+} 또는 IL-33^{-} MBV가 골수성 세포 (myeloid cells)에 미치는 영향에 대한 광범위한 기계론적 시험을 시험관 내에서 수행하였다. MBV의 내강 내에 있는 IL-33의 위치를 감안하면, 동족 ST2 수용체에 대한 결합을 방해하는 IL-33의 캡슐화는 ST2에 독립적인 전달 메커니즘의 존재를 시사한다. 상기 시나리오를 조사하기 위해, B6 *wt* (도 3a) 또는 *st2*$^{-/-}$ 마우스 (도 3b)에서 분리된 골수 유래 대식세포 (BMDM)를 인터페론-γ (IFN-γ) 및 리포폴리사카라이드 (LPS)로 자극하여 M1-유사 대식세포 표현형 및 인터루킨-4 (IL-4)를 유도하고, 또한 M2-유사 표현형, 재조합 IL-33, 탈세포화된 *wt* (IL33^{+} MBV) 또는 *il33*$^{-/-}$ (IL33^{-} MBV) 마우스 장에서 분리된 MBV 또는 돼지 소장 점막하층 (SIS MBV)에서 분리된 MBV를 유도하였다. 그 결과, 대식세포가 IL-4에 자극된 (M2) 세포의 발현 패턴과 유사하게 SIS MBV 및 IL33^{+} MBV에 반응하여 아르기나제 1 (Arg-1)을 발현하였다 (도 3a, 3d). 반대로, IL33^{-} MBV는 iNOS의 발현을 유도하였지만 Arg-1의 발현은 유도하지 않았다 (도 3a, 3c). 유사한 효과가 *st2*$^{-/-}$ 마우스에서 분리된 대식세포에서도 관찰되었다. 구체적으로, IL33^{-} MBV가 아닌 IL33^{+} MBV는 *st2*$^{-/-}$ 대식세포를 활성화해 복구적 프로-리모델링 M2-유사 표현형으로 유도하였다 (도 3b, 3c, 3d). IL33^{-} MBV가 아닌 IL33^{+} MBV로 대식세포를 자극하면 Arg-1 발현의 상향 조절이 유도된다는 면역 표지 분석의 결과는 웨스턴 블롯 분석에 의해 다시 확인되었다 (도 4a). 또한, IL33^{+} MBV가 STAT6 인산화와 무관하게 M2 대식세포를 활성화하기 때문에 Arg-1 발현을 유도하는 IL33^{+} MBV의 능력은 잘 특성화된 IL-4/IL-13에 매개되는 M2 대식세포 분화경로와는 구별되는 것으로 나타났다 (도 4b). 이러한 데이터는 MBV에 관련된 IL-33이 특성화되지 않은, 비정준 ST2 독립 경로를 통해 대식세포의 활성화를 조절한다는 것을 보여준다.

[0313] **실시예 4**

[0314] **대식세포 분비물에 노출된 골격근 전구세포 (skeletal muscle progenitor cells)의 근발생 (myogenesis) 평가**

[0315] 다른 방식으로 활성화된 M2 대식세포와 관련된 분비체 (secretome) 는 골격근 근원세포 (skeletal muscle myoblasts[41,42])에 대해 근원성 (myogenic)이라는 것이 밝혀졌다. 이전에, 본 발명자들은 ECM 처리된 대식세포에 의해 조절된 배지가 C_2C_{12} 근원세포[43]의 근관 (myotube) 형성과 근절 미오신 (sarcomeric myosin) 발현을 촉진한다는 것을 보여주었다. 현재의 연구는 IL33^{-} MBV가 아닌 IL33^{+} MBV로 자극된 대식세포에 의해 조절된 배지가 IL-4에 의해 유도된 M2 유사 대식세포에 대한 생물학적 활성과 유사하게 C_2C_{12} 근원세포의 근관 형성을 촉진했다는 유사한 결과를 보여준다 (도 5a, b).

[0316] **실시예 5**

[0317] **실시예 1-4를 위한 재료 및 방법**

[0318] *마우스 장의 탈세포화 (decellularization):* 성체 야생형 (wt) B6 마우스 또는 성체 IL-33$^{-/-}$ B6 마우스로부터 신선한 소장을 얻었다. 상기 소장을 PBS로 세척하여 모든 장 내용물을 완전히 제거하고 즉시 탈세포화를 위해 각 장에서 1.5 cm 길이의 단편을 얻었다. 샘플은 상기에서 설명한대로 탈세포화되었다 (*Oliveira AC, et al. PLoS ONE. 2013;8(6):e66538*). 간략히 설명하면, 샘플을 먼저 연속적인 약한 교반하에 72시간 동안 5 M NaCl에 담갔다. 탈세포화 용액은 24시간마다 교체하였다. 마우스 장 ECM을 동결건조하고 #40 메쉬 스크린이 있는 와일리밀 (Wiley Mill)을 사용하여 미립자로 갈았다.

[0319] *진피 ECM의 준비:* 진피 ECM은 상기에 설명한대로 준비되었다 (*Reing JE, et al. Biomaterials. 2010; 31(33):8626-33*). 간략히 설명하면, 출하 체중 (~110 kg)의 돼지 (Tissue Source Inc.)에서 전체 두께의 피부를 채취하고 기계적 박리에 의해 피하 지방과 표피를 제거하였다. 상기 조직을 0.25% 트립신 (Thermo Fisher Scientific)으로 6 시간 동안, 70% 에탄올로 10 시간 동안, 3% H_2O_2로 15 분 동안, 1% 트리톤®X-100이 포함된 0.26% EDTA/0.69% 트리스 (Sigma-Aldrich)로 6 시간 동안 처리하고, 추가 16 시간 동안 용액을 교체한 후 0.1% 과아세트산/4% 에탄올 (Rochester Midland)로 2 시간 동안 처리하였다. 마지막 단계 후 물과 PBS로 교대로 세척하였다. 모든 화학적 노출은 300 rpm의 회전 진탕기 (orbital shaker)에서 교반하에 수행하였다. 이후 진피 ECM을 동결건조하고 #40 메쉬 스크린이 있는 와일리밀 (Wiley Mill)을 사용하여 미립자로 갈았다.

[0320] *방광 매트릭스 (UBM) 준비:* UBM은 상기에 설명한대로 준비되었다 (*Mase VJ, et al. Orthopedics. 2010; 33(7):511*). 출하 체중 (market-weight)의 돼지 (Tissue Source LLC.)로부터 방광을 얻었다. 간략히 설명하면, 장막층 (tunica serosa), 외근육층 (tunica muscularis externa), 점막하층 (tunica submucosa) 및 점막근층 (tunica muscularis mucosa)은 기계적으로 제거되었다. 점막층 (tunica mucosa)의 관강 유로상피 세포 (luminal urothelial cells)는 탈이온수 (deionized water)로 세척하여 기저막 (basement membrane)에서 분리되었다. 나머지 조직은 기저막과 여기에 인접한 점막층의 고유층 (lamina propria)으로 구성되어 있으며 이를 300 rpm에서 2 시간 동안 4% 에탄올과 0.1% 과아세트산에서 교반하여 탈세포화시켰다. 그 후 상기 조직을 PBS와 멸균수로 광범위하게 헹구었다. 그런 다음 UBM을 동결건조하고 #60 메쉬 스크린이 있는 와일리밀 (Wiley Mill)을 사용하여 미립자로 갈았다.

[0321] *소장 점막하층 (small intestinal submucosa, SIS)의 준비:* SIS를 상기에 설명한대로 준비하였다 (*Badylak SF, et al. J Surg Res. 1989; 47(1):74-80*). 간략히 설명하면, 6 개월된 출하체중 (~110 내지 ~120 kg)의 돼지에서 공장 (jejunum)을 수확하여 세로로 분할하였다. 점막층의 표면층은 기계적으로 제거되었다. 마찬가지로, 장막층과 외근육층을 기계적으로 제거하여 점막하층과 점막층의 기저 부분을 남겼다. 상기 조직을 4% 에탄올과 0.1% 과아세트산에서 2 시간 동안 300 rpm으로 교반하여 탈세포화 및 멸균을 수행하였다. 그 후 상기 조직을 PBS와 멸균수로 광범위하게 헹구었다. 그런 다음 SIS를 동결건조하고 #60 메쉬 스크린이 있는 와일리밀 (Wiley Mill)을 사용하여 미립자로 갈았다.

[0322] *심장 ECM의 준비:* 심장 ECM을 상기에 설명한대로 준비하였다 (*Wainwright JM, et al. Tissue Eng Part C Methods. 2010;16(3):525-32*). 간략히 설명하면, 안락사 직후 돼지의 심장을 채취하여 -80℃에서 16 시간 이상 동결하고 해동시켰다. 대동맥에 캐뉼러를 삽입하고, 시약 등급 (1 형)의 물과 2X PBS를 각각 15 분 동안 1 리터/분으로 교대로 관류하였다. 37℃ 에서 0.02% 트립신/0.05% EDTA/0.05% NaN_3, 3% 트리톤®X-100/0.05% EDTA/0.05% NaN_3 및 4% 데옥시콜산으로 연속 관류를 수행하였다 (각 관류는 약 1.2 리터/분으로 2 시간 동안 수행). 마지막으로, 상기 심장에 0.1% 과아세트산/4% EtOH를 1.7 리터/분으로 1 시간 동안 관류하였다. 관류 후, 상기 심장을 1 형 물과 2X PBS로 씻어내어 세포 용해를 돕고, 세포 파편 및 화학 잔류물을 제거하였다. 그런 다음 심장 ECM을 동결건조하고 #60 메쉬 스크린이 있는 와일리밀 (Wiley Mill)을 사용하여 미립자로 갈았다.

[0323] *매트릭스 결합 나노소포 (MBV)의 분리:* MBV는 상기에서 설명한대로 분리되었다 (*Huleihel L, et al. Sci Adv. 2016; 2(6): e1600502*). 간략히 설명하면, 효소로 분해된 ECM을 500 g (10 분), 2500 g (20 분) 및 10,000 g (30 분)에서 연속적으로 원심분리하여 콜라겐 섬유 잔여물을 제거하였다. 상기 각 원심분리 단계는 세 번 반복하여 수행하였다. 섬유가 없는 상등액을 100,000 g (Beckman Coulter Optima L-90K 초원심분리기), 4℃에서 70 분 동안 원심분리하였다. 100,000 g에서 분리된 펠릿을 세척하고 500 μl의 PBS에 현탁시킨 후 0.22 μm 필터 (Millipore)로 여과하였다.

[0324] *사이토카인 항체 어레이:* MBV 내에 저장된 사이토카인을 키트 (Mouse XL Cytokine Array Kit, R&D Systems; Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다. 탈세포화된 WT 마우스 장 (n=3) 또는 탈

세포화된 IL-33$^{-/-}$ 마우스 장 (n=3)에서 분리된 MBV로부터 추출물을 제조하였다. 상기 추출물을 희석하고 어레이 막을 이용하여 밤새 배양하였다. 어레이막을 헹구어 결합되지 않은 단백질을 제거한 후 항체 칵테일과 함께 배양하고 스트렙트아비딘-호스래디쉬 퍼옥시다제 및 화학 발광 검출 시약을 사용하여 발현시켰다. 평균 스폿 픽셀 밀도 (mean spot pixel density)는 이미지 J 소프트웨어 (Image J software)를 사용하여 정량화하였다.

[0325] *투과 전자 현미경 (TEM):* MBV를 탄소 코팅된 그리드에 로드하고 4% 파라포름알데히드에 고정한 후 상기에 설명한대로 TEM 이미징을 수행하였다 (*Huleihel L, et al. Sci Adv. 2016; 2(6): e1600502*). 그리드는 고해상도의 카메라 (Advanced Microscopy Techniques digital camera)가 장착된 JEOL 1210 TEM을 사용하여 80kV에서 이미지화되었다. MBV의 크기는 대표적인 이미지에서 JEOL TEM 소프트웨어를 사용하여 결정되었다.

[0326] *크기배제 크로마토그래피 (SEC):* 상기에 설명한대로 SEC에 의한 MBV의 분획화를 수행하였다 (*Bφing, AN, et al. J Extracellular Vesicles. 2014; 3*(1)). 간략히 설명하면, 15 ml의 세파로즈 CL-2B 수지 (Sigma Aldrich)를 1 cm x 20 cm 크기의 유리 컬럼에 채운 후 세척하고 PBS로 평형화시켰다. 1 ml의 MBV를 상기 컬럼에 로딩하고 용리액으로 PBS를 사용하여 분획들을 즉시 수집하였다 (분획 당 0.3 ml 씩 총 30 개의 분획을 수집). 용출된 분획들은 바이오로직 LP 시스템 (BioRad)을 사용하여 UV 280 nm로 지속적으로 모니터링하였다. MBV를 1% 트리톤®X-100에서 30 분 동안 배양하여 용해된 MBV를 준비한 다음, 상기에서 설명한대로 SEC에 적용하였다.

[0327] *MBV 단백질 비오틴화 (biotinylation):* MBV 단백질의 비오틴화를 상기에서 설명한 방법 (*Diaz G, et al. Sci Rep. 2016;6: 37975*)에 약간의 수정을 가하여 수행하였다. 100 마이크로 그램의 온전한 MBV를 10 mM의 설포-NHS-비오틴 부재 또는 존재하에 실온에서 30 분 동안 배양하였다. 설포-NHS-비오틴에 있는 설폰산기의 존재는 이 시약이 MBV 막을 관통하는 것을 차단한다. 배양 후, 10 kDa MWCO 여과 컬럼을 사용하여 과량의 설포-NHS-비오틴을 제거하고 MBV를 1% 트리톤®X-100으로 용해시켰다. 별도의 실험에서, 100 마이크로 그램의 MBV를 1% 트리톤®X-100으로 용해시켰다. 용해시킨 후 1% 트리톤®X-100 용액을 1X PBS로 교체하였다. MBV 추출물을 10 mM의 설포-NHS-비오틴 부재 또는 존재하에 실온에서 30 분 동안 배양하였다. 배양 후, 10 kDa MWCO 여과 컬럼을 사용하여 과량의 설포-NHS-비오틴을 제거하였다. MBV ± 비오틴 또는 MBV 추출물 ± 비오틴을 1X PBS에서 500 μl로 희석하고 50 μl의 사전 세척된 스트렙트아비딘-세파로스 수지 (Sigma Aldrich)와 함께 배양하였다. 회전형 로커 (orbital rocker)에서 2 시간 동안 실온에서 배양한 후, 상기 스트렙트아비딘-세파로스 수지를 10,000 x g에서 5 분 동안 원심분리하여 펠렛화하였다. 결합되지 않은 분획을 나타내는 상등액을 새로운 튜브로 옮기고 수지를 300 mM NaCl로 5회 세척하였다. 결합된 단백질은 용출 버퍼 (2% SDS, 6 M Urea)와 함께 실온에서 15 분 동안 배양한 후 96℃에서 15 분 동안 배양하여 수지로부터 용출되었다.

[0328] *프로테이나제 K 보호 분석:* 프로테이나제 K 보호 분석을 상기에 설명한대로 수행하였다 (*de Jong OG, et al. J Cell Mol Med. 2016; 20(2): 342-350*). 간략히 설명하면, MBV를 샘플당 20 μl의 최종 부피로, 1% 트리톤®X-100의 부재 또는 존재하에서, PBS 또는 증가하는 농도의 프로테이나제 K를 함유하는 PBS에서, 1 시간 동안 37℃에서 배양하였다. 상기 분석은 10 mM DTT와 함께 20 μl의 95℃ 2X Laemmli 완충액을 첨가하여 중단시켰다.

[0329] *대식세포의 분리 및 활성화:* 쥐 골수에서 유래한 대식세포 (bone marrow-derived macrophages, BMDM)를 상기에 설명한대로 분리하고 특성화하였다 (*Huleihel L, et al. Tissue Eng Part A. 2017;23(21-22):1283-1294*). 간략히 설명하면, 6주 내지 8주령의 C57b1/6 마우스로부터 골수를 수확하였다. 상기 골수에서 수확된 세포를 세척하고 $1X10^6$ 세포/mL로 플레이팅한 후 48시간마다 완전 배지를 변경하면서 대식세포 콜로니 자극인자 (macrophage colony-stimulating factor, MCSF)의 존재하에 7일 동안 대식세포로 분화되도록 하였다. 대식세포는 다음 중 하나로 24 시간 동안 활성화되었다: (1) $M_{IFN\gamma+LPS}$ 표현형 (M1-유사)을 촉진하는 20 ng/mL의 인터페론-γ (IFNγ) 및 100 ng/mL 리포다당류 (lipopolysaccharide, LPS) (Affymetrix eBioscience, Santa Clara, CA; Sigma Aldrich), (2) M_{IL-4} 표현형 (M2-유사)을 촉진하는 20 ng/mL의 인터루킨(IL)-4 (Invitrogen), (3) 100 ng/ml의 IL-33 (Peprotech), 또는 (4) 25 μg/mL의 WT 마우스 MBV, IL-33$^{-/-}$ MBV, 또는 SIS-MBV. 37℃에서 배양 후, 세포를 멸균된 PBS로 세척하고 면역표지를 위해 2% 파라포름알데히드 (PFA)로 고정하였다.

[0330] *대식세포 면역표지:* 비특이적 결합을 방지하기 위하여, 세포를 PBS, 0.1% 트리톤®-X, 0.1% 트윈®-20, 4% 염소 혈청 및 2% 소혈청알부민으로 구성된 차단 용액 (blocking solution)에서 1 시간 동안 실온에서 배양하였다. 그런 다음, 차단 완충액을 제거하고 세포를 하기의 1차 항체 중 하나를 함유하는 용액에서 배양하였다: (1) 판-대식세포 마커로서 1:200으로 희석된 단클론 항-F4/80 (Abcam, Cambridge, MA), (2,3) M1-유사 마커로서 1:100으로 희석된 다클론 항-iNOS (inducible nitric oxide synthase, Abcam, Cambridge, MA), M2-유사 마커로서 1:200으로 희석된 항-아르기나제 1 (Abcam, Cambridge, MA). 상기 세포를 4℃에서 16 시간 동안 배양하고, 1차

항체를 제거한 후 PBS로 세척하였다. 형광단 (fluorophore)이 결합된 2차 항체 (Alexa donkey anti-rabbit 488 또는 donkey anti-rat 488; Invitrogen, Carlsbad, CA) 용액을 실온에서 1 시간 동안 적절한 웰에 첨가하였다. 그런 다음, 항체를 제거하고 상기 세포를 PBS로 세척한 후 핵을 DAPI를 사용하여 대조염색하였다. 사이토카인이 활성화된 대식세포를 사용하여 표준화된 노출 시간 (양성 대조군)을 설정하였고, 이후 모든 그룹에서 일정하게 유지되었다. 세포 프로파일러 (CellProfiler, Broad Institute, Cambridge, MA)를 사용하여 이미지를 정량화하였다. 데이터는 t-테스트 (unpaired Student's *t*-test)를 사용하여 통계적 유의성을 분석하였으며, 이를 통해 처리된 대식세포를 적절한 M0 배지 대조군과 비교하였다. 또는, 다중 비교를 위해 터키의 사후 테스트 (Tukey's *post-hoc* test)를 사용한 일원 분산 분석 (one-way analysis of variance)을 수행하였다. 데이터는 최소 세 번 (N=3)의 평균 ± 표준편차 (mean±standard deviation)로 기록하였다. 0.05 미만의 p값을 보일 때 (p-Values of <0.05) 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0331] *C_2C_{12} 근발생 분석 (myogenesis assay):* 고혈청 배지 (20% 소태아 혈청)는 세포주기 내에서 세포 증식을 유지하고 분화를 억제한다. 반대로, 저혈청 배지 (1% 소태아 혈청, 1% 말 혈청)는 세포주기 출구 (cell-cycle exit)와 근관 형성 (myotube formation)을 유도하여 양성 대조군을 제공한다. 이들은 각각 증식 배지 및 분화 배지라고 한다. 근분화 (myogenic differentiation) 포텐셜은 골격근 근원세포의 융합지수를 조사하여 결정되었다. C_2C_{12} 골격근 근원세포는 약 80% 콘플루언스에 도달할때 까지 증식배지에서 배양되었다. 그런 다음, 배지를 대식세포 상등액 및 증식배지를 50:50 으로 포함하는 처리배지, 또는 증식배지 또는 분화배지의 대조군으로 교체하였다. 5-7 일 후 또는 분화배지 대조군이 근관형성을 나타내었을 때, 세포를 면역 표지하기 위해 2% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 고정된 세포는 이전에 설명된 프로토콜에 따라 실온에서 1 시간 동안 차단되고 항-근절미오신 (anti-sarcomeric myosin) 항체와 함께 배양되었다. 1차 배양 후, 세포를 PBS로 세척하고 1:200으로 희석된 2차 항체 (Alexa Fluor donkey anti-mouse 488 secondary antibody)와 함께 실온에서 1 시간 동안 배양한 후 DAPI로 대조 염색하였다. 자이스 현미경 (Zeiss Axiovert microscope)을 사용하여 각 웰 당 5 개의 20X 필드 이미지를 촬영하였다.

[0332] **실시예 6**

[0333] **이식 거부에서 IL-33 및 MBVs**

[0334] 급성 심장 이식 (HTx) 거부 반응은 일반적으로 동종 항원에 대한 수용자 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 반응을 제어하는 면역억제 요법 (immunosuppressive therapy)으로 방지할 수 있다. 그러나 이러한 면역억제 요법은 만성 심장 이식 거부 (CR)에 대해서는 효과가 없으며, 그로 인한 면역-매개 섬유성 및 혈관 리모델링으로 인해 진행성 심근 기능 장애가 발생하며, 이식 후 약 11년 이내에 대부분의 HTx가 소실된다. 최근의 연구에 따르면 염증성 대식세포, 단핵구 및 단핵구 유래 수지상세포 (DC)와 같은 선천성 면역 세포 (innate immune cells)들이 이식 과정과 관련된 허혈 재관류 손상 (ischemia reperfusion injury, IRI) 후의 손상 관련 분자 패턴 (damage-associated molecular patterns, DAMP)에 대한 그들의 강력한 염증 촉진 반응 (pro-inflammatory responses)으로 인해 CR에서 핵심적인 역할을 한다. 고체 장기는 CR을 시작하고 유지하는 동종 반응 T 세포 (alloreactive T cells)에, 중요한 국소 자극 역할을 하는 수용자 단핵구 및 수용자 단핵구 유래 DC와 함께 빠르게 침윤된다. 따라서, 손상 관련 분자 패턴을 포함하는 자기 분자는 조직 손상 중에 방출되고 선천성 면역 세포에 침투하는 염증 촉진 반응을 자극한다는 것이 분명하다. 그러나 면역 반응을 조절하기 위해 부상 부위에 존재하는 국소 내인성 음성 조절 인자 (local endogenous negative regulators)는 잘 알려져 있지 않다. 기저세포 (stromal cells)의 핵에 격리된 IL-1 패밀리의 구성원인 IL-33은 이러한 면역 조절 특성을 가질 수 있다. 재조합 IL-33의 전달은 조절 T 세포 (Treg)를 전개시켜 심장 이식 후 이식편 생존을 촉진한다. 다양한 장기의 ECM으로부터 분리된 MBV가 풍부하고 안정적인 IL-33의 공급원임이 본원에 개시되어 있다. IL-33은 핵단백질로 인식되었지만, 핵에서 방출되어 면역세포에 영향을 미치는 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본원에 제시된 데이터는 MBV에 있는 IL-33이 시험관내 및 생체내에서 선천적 면역세포 분화를 지시할 수 있는 비-격리 면역 조절 IL-33의 중요한 공급원임을 보여준다.

[0335] **실시예 7**

[0336] **IL-33의 부재에 의한 만성 거부 반응의 증가**

[0337] 시험관내 연구는 IL-33이 대식세포를 면역조절 및 잠재적으로 회복가능한 M2 서브 세트로 변환시키는 강력한 능력을 보여주었다 (도 3a-3c, 도 4a-4b). MBV에 존재하는 것을 포함하여, IL-33이 심장 이식 결과에 미치는 영향을 조사하기 위해 Bm12 마우스의 IL-33이 결핍된 심장 또는 IL-33이 풍부한 심장을 야생형 (WT) C57BL/6 (B6)

마우스에 이식하였다. 이러한 마우스는 핵과 MBV 모두에서 IL-33이 부족하다. Bm12 마우스는 H2-Ab1^{b} 와 3 개의 뉴클레오티드가 다른 H2-Ab1^{bm12} 를 발현하여 WT B6 마우스의 면역 체계에 의해 비-자기로 인식되는 3 개의 아미노산 치환을 초래한다. 이러한 연구에서, IL-33이 결핍된 이식편 (KO) 또는 IL-33이 충분한 Bm12 이식편 (WT)을 B6 수용자에게 이식하고 이식 후 90-100 일에 만성 거부와 관련된 혈관 폐색 및 섬유증의 발생을 평가하였다 (도 6a-6d). 헤마톡실린 및 에오신 (H+E; 도 6a)과 트리크롬 염색 (도 6b)과 컴퓨터 지원 이미지 분석 (computer-aided image analysis) 결과, IL-33이 결핍된 HTx에서 혈관병증 (도 6c)이 크게 증가하였고 근육 섬유가 소실되었다는 것이 확인되었다 (도 6d). 따라서, IL-33의 완전한 부재는 만성 거부 반응의 발달을 증가시킨다는 것이 확인되었다.

[0338] **실시예 8**

[0339] **IL-33^{+} MBV에 의한 이식 후 염증성 골수세포 생성의 제어**

[0340] 기계론적 연구에서, 이식편에서의 IL-33 결핍의 영향과 IL-33^{+} MBV의 회복, 특히 이것이 만성 거부 반응을 조율하는 국소 면역 세포에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다. 이러한 연구에서, 수술 후 3일에 백혈구를 분리하고 유세포 분석 (flow cytometric analysis)으로 평가하였다. 나이브 Bm12 마우스 심장 (나이브 대조군)으로부터 분리된 백혈구를 기준 대조군 (n=4)으로 포함시켰다. 유세포 분석으로부터 대표적인 도트 플롯 (도 7a-7d)들을 생성하였으며 여기에는 통계적 분석이 표시되었다 (P 값은 일원 분산 분석 (ANOVA)에 의해 얻었다, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005, ****P<0.001). IL-33이 결핍된 심장 이식물은 단핵구 유래 수지상 세포 (monoDC) (도 7a-7b: CD45^{+} CD11b^{+} CD11c^{+} F4-80^{lo} MHCII^{hi}) 및 염증성 대식세포 (도 7c-7d; CD45^{+} CD11b^{+} F4-80^{hi} Ly6c^{hi} MHCII^{hi})와 같은 국소 염증성 골수세포 (local inflammatory myeloid cells)의 존재하에서 상당히 증가한 예시된 초기 염증 반응 (early inflammatory response)을 보였다. 염증성 골수세포의 이러한 증가는 IL-33^{+} MBV를 사용한 국소 IL-33의 복원에 의해 교정될 수 있다 (도 8a-8d). 이는 심장 이식편에서 CD11b+ CD11c^{hi} monoDC (도 8a, 8c) 및 CD11b^{+} F4/80^{hi} Ly6c^{hi} 염증성 대식세포 (도 8b, 8d)의 상당한 감소를 통해 입증된다. 전체적으로, 이러한 데이터는 이식 후 이식편에서 염증성 골수세포의 생성을 제어하는 중요한 국소 인자로서 MBV의 IL-33가 작용한다는 것을 나타낸다.

[0341] 국소 염증을 줄이면 조기 거부 및 이후의 만성 거부 반응 발생을 제한할 수 있다. 모든 고형 장기 (심장, 신장, 간, 폐)는 섬유성 질환 및 가속화된 혈관 병증 (vascular pathology)을 포함하는 만성 거부의 형태를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 설치류 고형 이식 모델에서의 연구 결과에 따르면, 다른 고형 장기 이식 직후 국소 IL-33^{+} MBV의 전달은 국소 골수 세포의 염증 능력을 제한하고 이식 결과 개선을 촉진하는 역할을 한다. 허혈 시간 연장 및 고체 장기 이식 후 초기 조직 손상으로 인한 염증은 이식 결과 불량 및 급성 및 만성 거부 반응의 증가와 관련이 있다. 반대로, 선천성 골수 세포에 침투하여 매개되는 염증 반응이 짧은 허혈 시간에 의해 감소/제한되는, 살아있는 기증자 이식물에서 최상의 이식 결과가 관찰된다. 현재의 면역억제제는 주로 이식 후에 사용되며 적응성 면역세포 (T 세포 및 B 세포)를 표적으로 한다. 스테로이드를 제외하고는 상기 면역 억제제는 선천성 면역세포에 대해서는 효과가 없다. 이러한 약물은 일반적으로 거부 반응을 시작하는 선천적 세포에는 강력한 영향을 미치지 않는다. 따라서, 선천성 골수세포를 표적으로 하는 MBV와 적응성 면역세포를 표적으로 하는 면역 억제제의 조합은 매우 효과적인 조합이다.

[0342] **실시예 9**

[0343] **실시예 7-8을 위한 재료 및 방법**

[0344] *동물:* C57BL/6 (B6) 및 Bm12 마우스는 잭슨 연구소 (Jackson Laboratories)에서 구입하였다. *il33*$^{-/-}$ 마우스는 동경대학의 나카에 (S. Nakae, University of Tokyo, Tokyo, Japan)[84] 로 부터 제공받았다. Bm12 x *il33*$^{-/-}$ 마우스는 *il33*$^{-/-}$ 배경의 Bm12 마우스를 6회 역교배하여 제조하였다. *St2*$^{-/-}$ 마우스는 원래 설명된 바와 같이[85] BALB/c 배경에서 제조되었으며, C57BL/6 배경의 마우스를 7회 역교배하여 제조된 마우스를 앤 스펄링 박사 (Dr. Anne Sperling, University of Chicago)로부터 제공받았다. 이 마우스들을 C57BL/6 배경으로 추가로 3회 역교배시켰다. 상기 동물들은 병원체가 없는 특정 시설 (specific pathogen-free facility)에 보관되었다.

[0345] *transplantation 혈관화된 심장 (vascularized heart) 이식:* H2-Ab1b에 3 개의 아미노산 치환이 있는 B6 Bm12

마우스는 야생형 (WT) B6 마우스와 비교하여 만성 거부 마우스 모델에서 심장 이식 기증자로서 일반적으로 사용된다. Bm12 마우스와 IL-33 결핍 B6 마우스를 교배함으로써 만성 거부 반응에서 IL-33의 역할을 정의할 수 있었다. Bm12 또는 Bm12 x *il33*$^{-/-}$ 심장을 C57BL/6 또는 C57BL/6 *il33*$^{-/-}$의 복부에 이소성으로 이식하였다. 간략히 설명하면, 공여자의 심장은 공여자의 상행대동맥 (ascending aorta) 및 폐동맥 (pulmonary artery)으로부터 수용자의 복부대동맥 (abdominal aorta) 및 하대정맥 (inferior vena cava)으로 각각 단측연결 (end-to-side anastomosis)하여 공여자로부터 수용자로 이식되었다. 이식편의 기능은 심장 수축의 복부 촉진에 의해 매일 평가되었다. 일부 실험에서 IL-33^{+} MBV는 돼지 유래 UBM 하이드로젤에서 최종 농도 1 mg/ml MBV로 희석되었다. 이식편의 재관류 후 40 mg의 희석된 MBV를 함유하는 하이드로젤로 이식편을 덮었다. 소화관을 교체하고 하이드로젤의 MBV가 심장 표면에 안정적으로 부착되는 동안 이식된 심장 주위의 정상 위치로 다시 돌아가도록 하였다. 이식편의 기능은 수확일까지 심장 수축의 복부 촉진 (abdominal palpation)으로 매일 확인하였다.

[0346]

[0347] *비장 및 이식편 침윤 백혈구 분리:* 마우스를 마취시키고, 우심실을 빠져나가는 유체가 눈에 보이는 혈액을 포함하지 않을 때까지 좌심실을 통해 PBS+0.5% 헤파린으로 관류시켰다. 비장을 분리하고 기계적 해리 (mechanical dissociation) 및 RBX 용해 후 단일 세포 현탁액을 생성하였다. 그런 다음, 심장을 제거하고 조각으로 자른 후 젠틀한 MACS 분리기 (Miltenyi Biotec)에서 프로그램 E를 사용하여 350 u/ml의 유형 IV 콜라게나제 및 1 ul/ml의 DNAse I을 포함하는 배지를 함유한 젠틀한 MACS C 튜브에서 균질화하였다. 그 후, 40 mm 세포 스트레이너를 사용한 여과를 통해 단일 세포 현탁액을 얻고, 이를 림포라이트-M (Cedarlane) 밀도 구배를 통해 1500 g에서 20분 동안 원심 분리하였다. 중간 단계에서 파스퇴르 피펫 (Pasteur pipette)을 사용하여 세포를 제거하고 세척, 세포 계수 및 분석을 위해 새로운 튜브로 옮겼다.

[0348] *유세포 분석 (Flow Cytometry):* 분리된 비장세포와 이식편 침윤성 백혈구를 열로 불활성화시킨 염소 혈청 (5%)과 함께 배양하여 FcR을 차단하고, 살아 있는/죽은 세포를 구별할 수 있도록 염색한 후, 다양한 조합의 플루오르크롬-접합된 항체들 (BD Bioscience, Biolegend, eBioscience 또는 MD Biosciences)을 사용하여 골수세포 집단을 평가하였다. 데이타는 LSRFortessa 유세포 분석기 (BD, Biosciences)를 사용하여 수집하였으며 FlowJo (버전 10.1, TreeStar)를 사용하여 분석하였다.

[0349] *조직학적 및 면역조직화학적 염색 (Histological and Immunohistochemical staining):* 나이브 마우스 심장 및 심장 이식물을 포르말린으로 고정하고 파라핀에 포매후 4 μm 두께로 절편화시켰다. 상기 절편들을 키고, 이 절편들을 H+E 또는 메이슨 트리크롬 (Masson's Trichrome)으로 표준 프로토콜에 따라 염색하였다. NearCYTE 소프트웨어 (nearctye.org를 통해 인터넷에서 구할 수 있음)를 사용하여 청색 섬유증$^{+}$ 영역 (mm^{2})을 전체 조직 영역 (mm^{2})으로 나눈 후 100을 곱하여 %섬유화 영역 (% Fibrotic Area)을 측정하였다. 동맥 폐색 백분율은 각 심장 샘플의 총 동맥 수와 관련하여 폐색 된 동맥을 수동으로 비교하여 계산하였다.

[0350] **실시예 10**

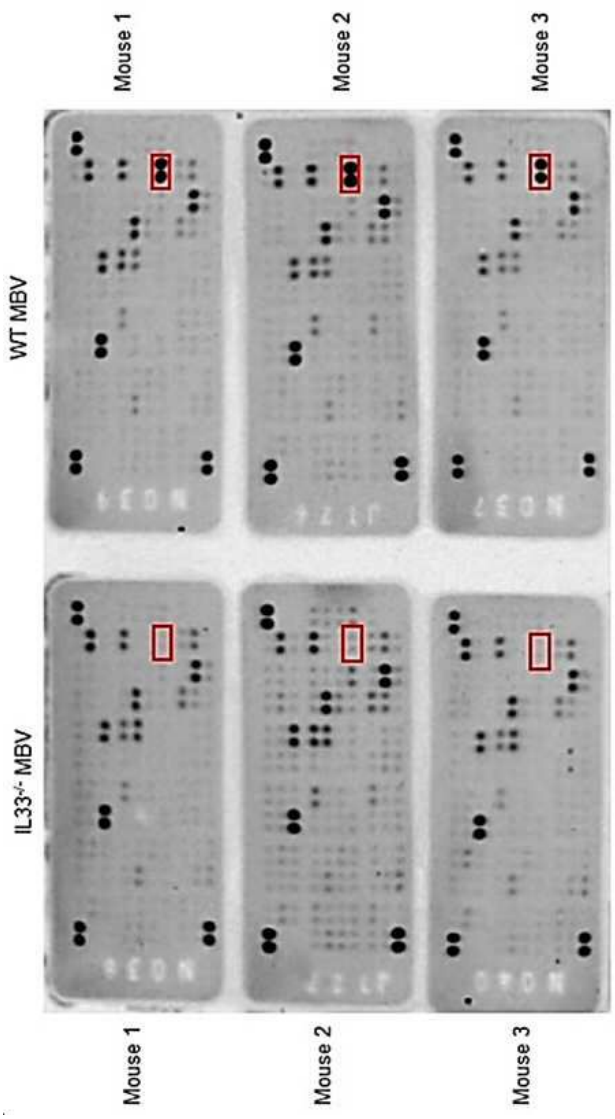
[0351] **섬유증의 치료**

[0352] 인간 폐 섬유아세포는 간질성 폐섬유증 (interstitial pulmonary fibrosis, IPF) 환자 및 연령이 일치하는 정상인 (대조군)의 외식된 폐로부터 분리되었다. 섬유증의 마커인 Col1, Col3, 피브로넥틴 및 ACTA2의 발현 수준은 MBV 처리 전후에 결정되었다. MBV는 돼지의 탈세포화된 방광 기질 (UBM), 돼지의 탈세포화된 폐 (pLung) 및 인간 폐 조직 (hLung) 등 세 가지 다른 근원 조직으로부터 분리되었다. MBV는 두 가지 다른 농도 (1x10^{9} 및 3x10^{9} 입자/ml)로 배양 배지에 첨가되었다. 그 결과, 모든 치료에서 상기 섬유증 마커의 발현 수준이 현저하게 감소하였다. 특히, 탈세포화된 폐에서 분리된 MBV는 더욱 현저한 감소를 유도하였다 (도 9a, 9b). 따라서, MBV의 투여는 폐 및 기타 조직의 섬유증을 감소시키는 치료법으로 사용될 수 있다.

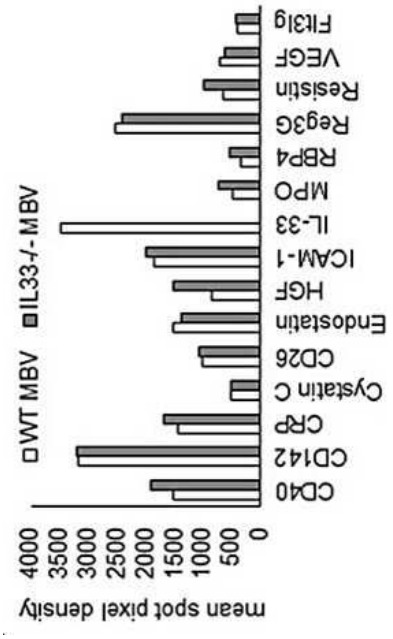
[0353] 기술된 방법 또는 조성물의 정확한 세부 사항은 기술된 발명의 범위를 벗어나지 않고 변경되거나 수정될 수 있다. 이러한 모든 변경 및 수정 사항은 하기의 청구 범위에 포함된다.

도면

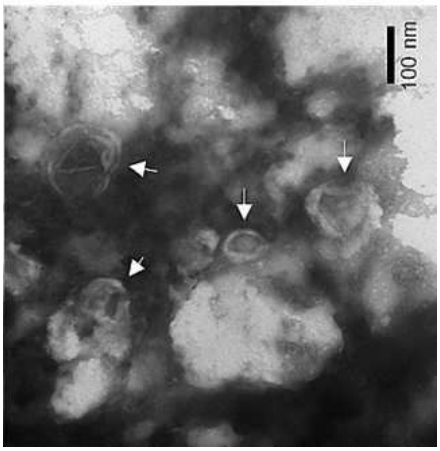
도면1a



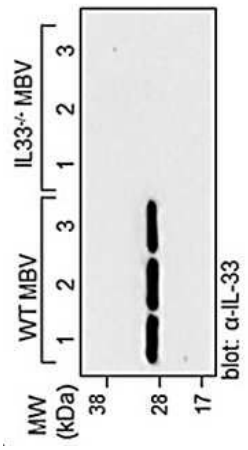
도면1b



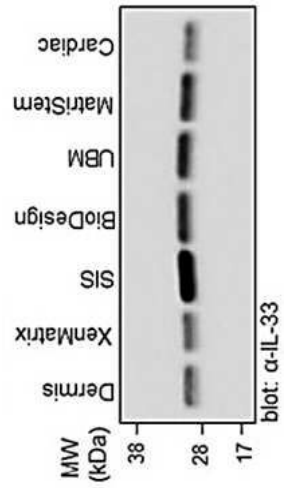
도면1c



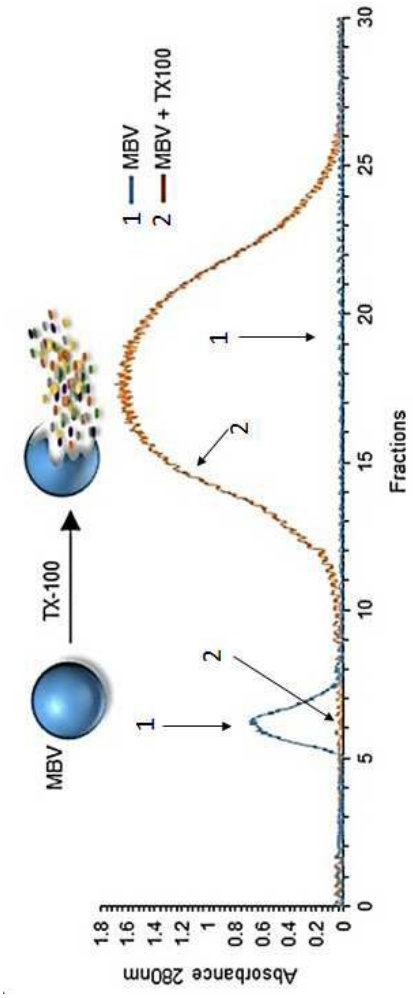
도면1d



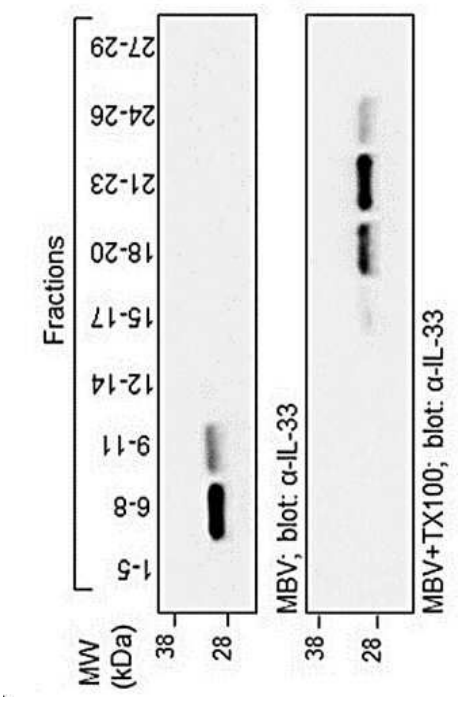
도면1e


MW (kDa)
38
28
17
blot: α-IL-33
Dermis
XenMatrix
SIS
BioDesign
UBM
MatriStem
Cardiac

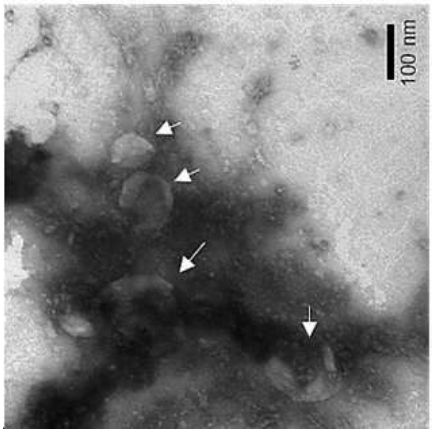
도면2a


Absorbance 280nm
Fractions
1 — MBV
2 — MBV + TX100
MBV
TX-100
1
2

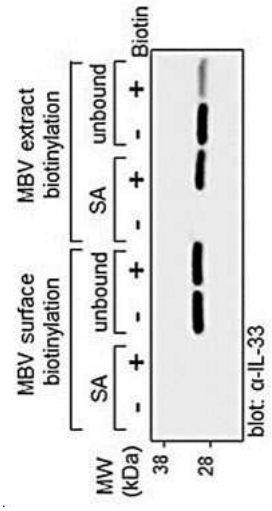
도면2b


Fractions
27-29
24-26
21-23
18-20
15-17
12-14
9-11
6-8
1-5
MW (kDa)
38
28
MBV; blot: α-IL-33
38
28
MBV+TX100; blot: α-IL-33

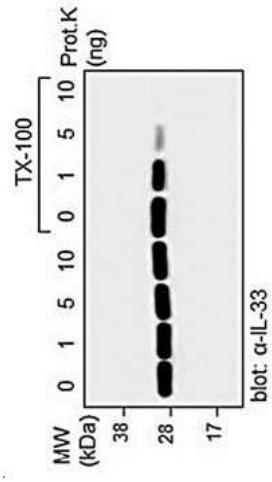
도면2c


100 nm

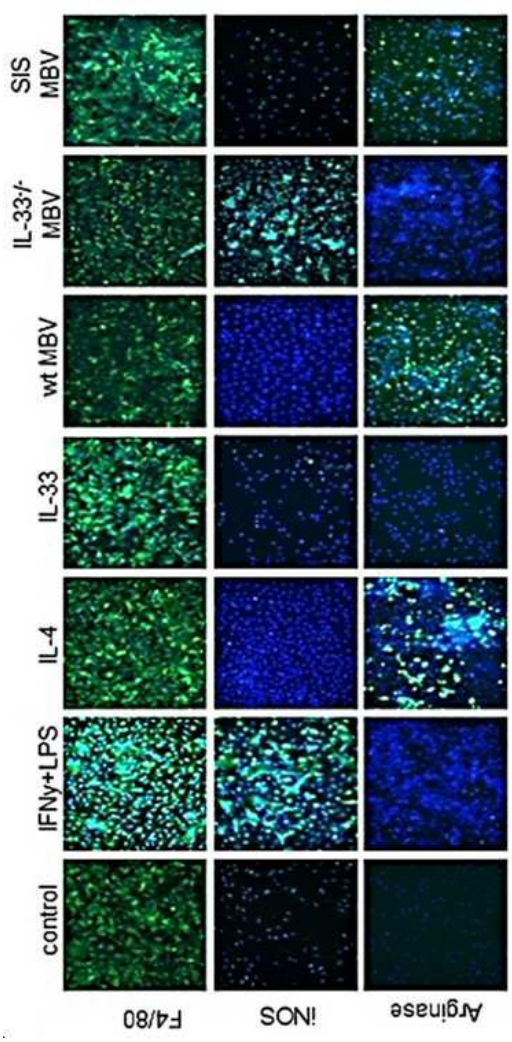
도면2d


MBV surface biotinylation
MBV extract biotinylation
SA
unbound
SA
unbound
Biotin
- + - + - + - +
MW (kDa)
38
28
blot: α-IL-33

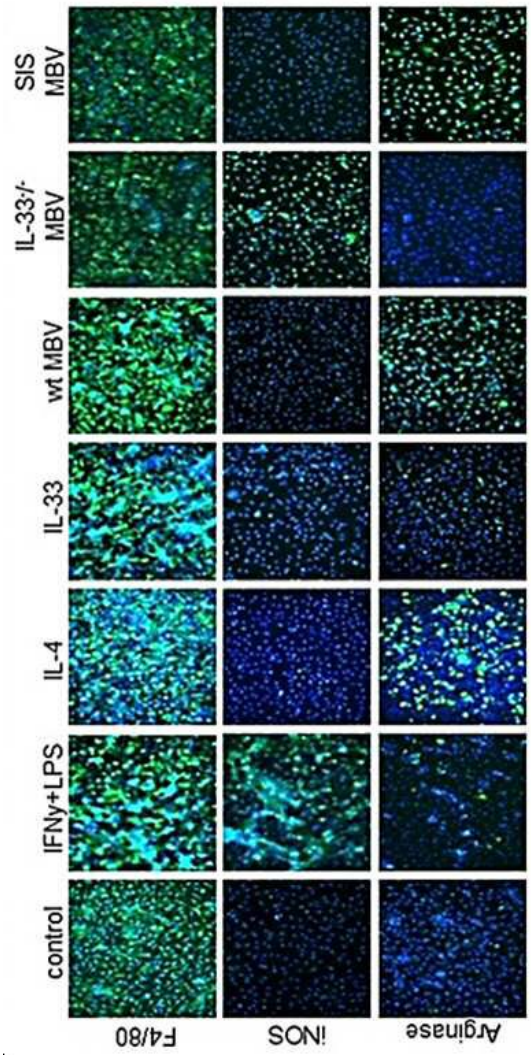
도면2e


TX-100
0 1 5 10 0 1 5 10
Prot.K (ng)
MW (kDa)
38
28
17
blot: α-IL-33

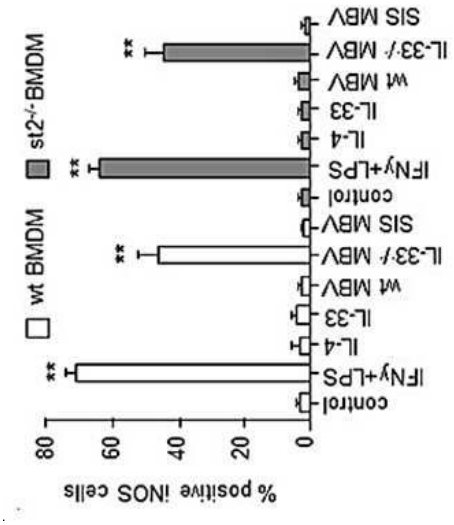
도면3a


SIS MBV
IL-33-/- MBV
wt MBV
IL-33
IL-4
IFNγ+LPS
control
F4/80
iNOS
Arginase

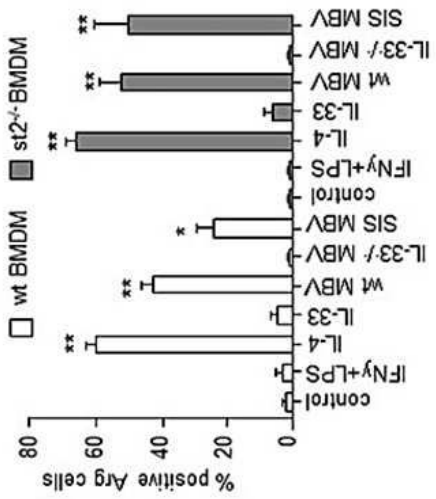
도면3b


SIS MBV
IL-33-/- MBV
wt MBV
IL-33
IL-4
IFNγ+LPS
control
F4/80
iNOS
Arginase

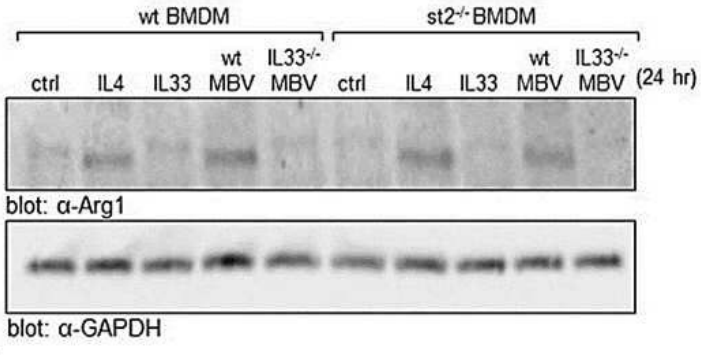
도면3c


% positive iNOS cells
0
20
40
60
80
wt BMDM
sl2-/- BMDM
control
IFNγ+LPS
IL-4
IL-33
wt MBV
IL-33-/- MBV
SIS MBV
**

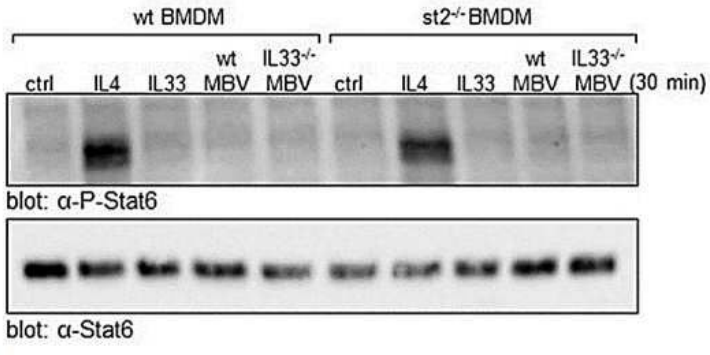
도면3d



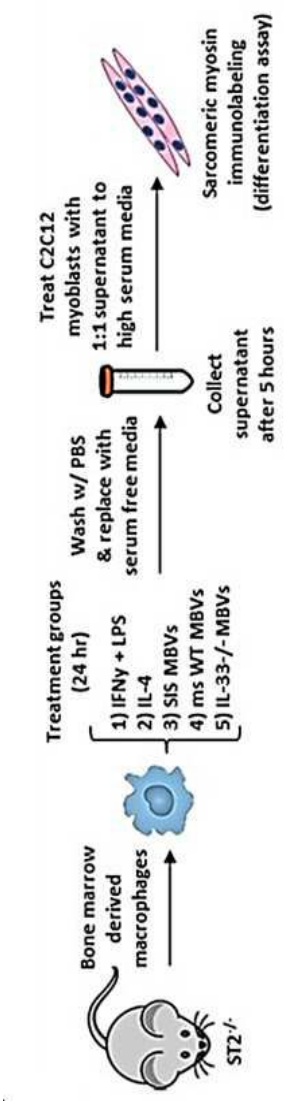
도면4a



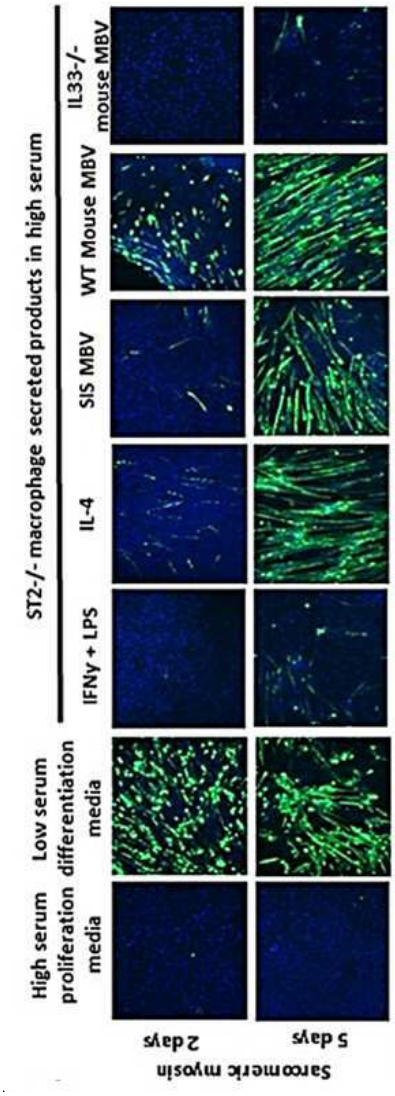
도면4b



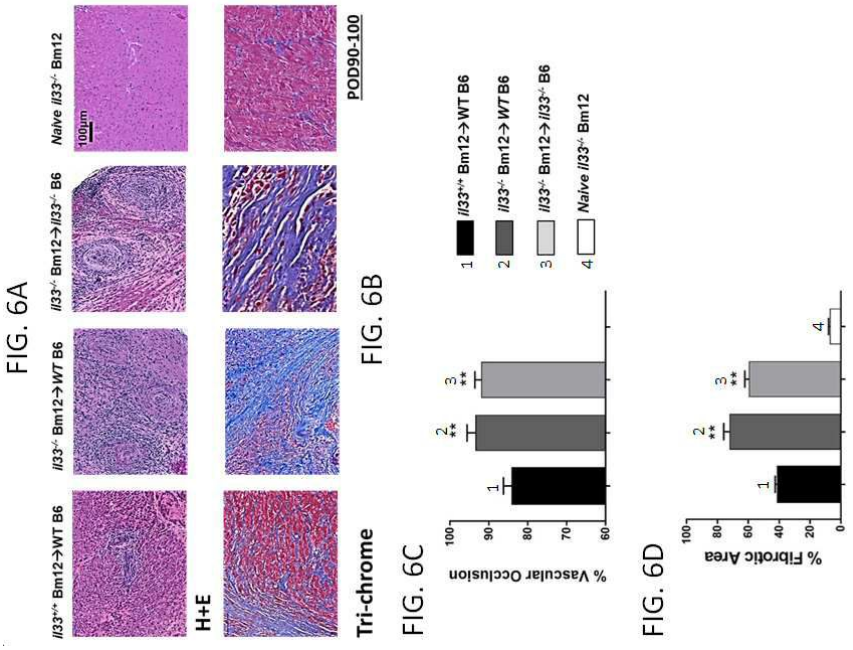
도면5a


Bone marrow derived macrophages
ST2-/-
Treatment groups (24 hr)
1) IFNγ + LPS
2) IL-4
3) SIS MBVs
4) ms WT MBVs
5) IL-33-/- MBVs
Wash w/ PBS & replace with serum free media
Collect supernatant after 5 hours
Treat C2C12 myoblasts with 1:1 supernatant to high serum media
Sarcomeric myosin immunolabeling (differentiation assay)

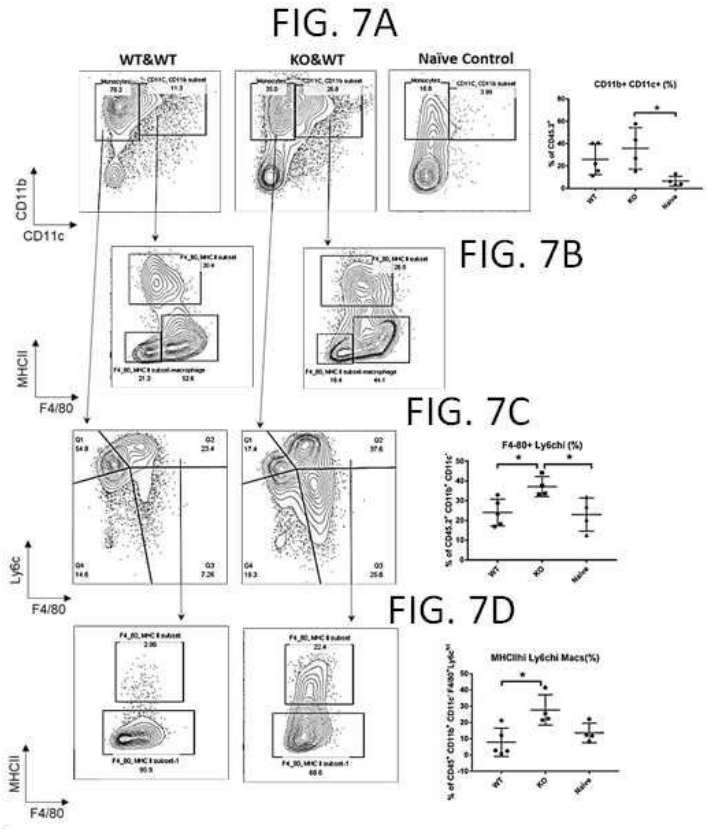
도면5b


ST2-/- macrophage secreted products in high serum
IL33-/- mouse MBV
WT Mouse MBV
SIS MBV
IL-4
IFNγ + LPS
Low serum differentiation media
High serum proliferation media
Sarcomeric myosin
2 days
5 days

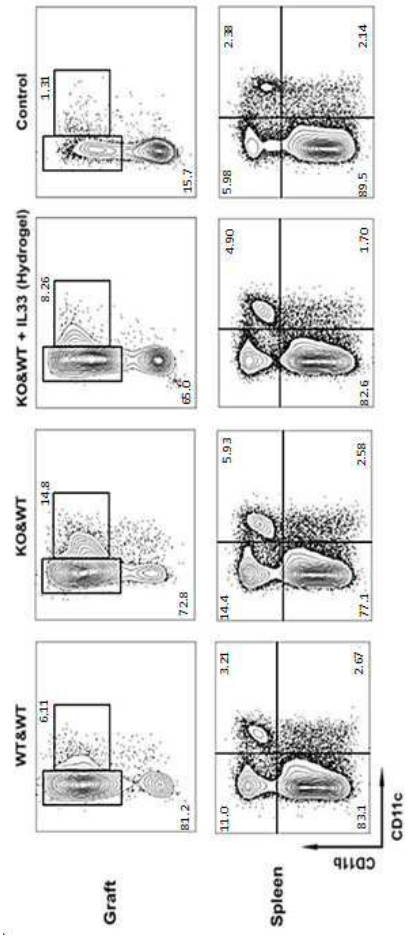
도면6


FIG. 6A
Naive Il33-/- Bm12
Il33-/- Bm12→Il33-/- B6
Il33-/- Bm12→WT B6
Il33+/+ Bm12→WT B6
100μm
H+E
POD90-100
Tri-chrome
FIG. 6B
Il33+/+ Bm12→WT B6
Il33-/- Bm12→WT B6
Il33-/- Bm12→Il33-/- B6
Naive Il33-/- Bm12
% Vascular Occlusion
FIG. 6C
% Fibrotic Area
FIG. 6D

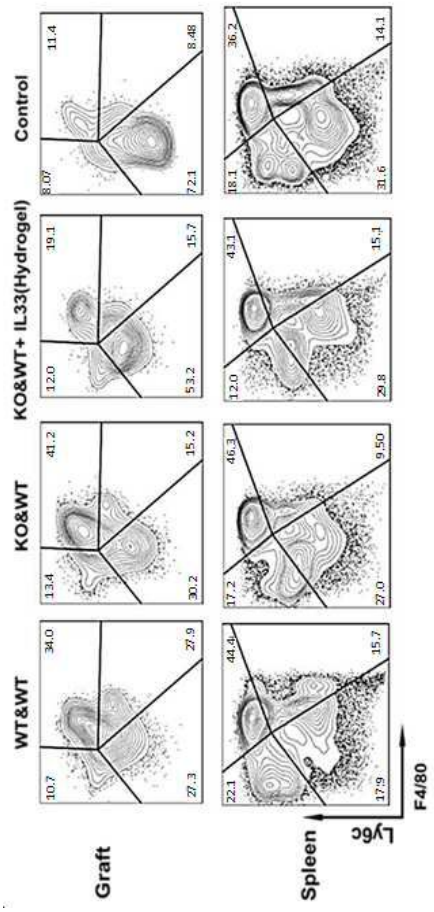
도면7


FIG. 7A
WT&WT
KO&WT
Naïve Control
CD11b
CD11c
CD11b+ CD11c+ (%)
FIG. 7B
MHCII
F4/80
FIG. 7C
Ly6c
F4-80+ Ly6chi (%)
FIG. 7D
MHCIIhi Ly6chi Macs(%)

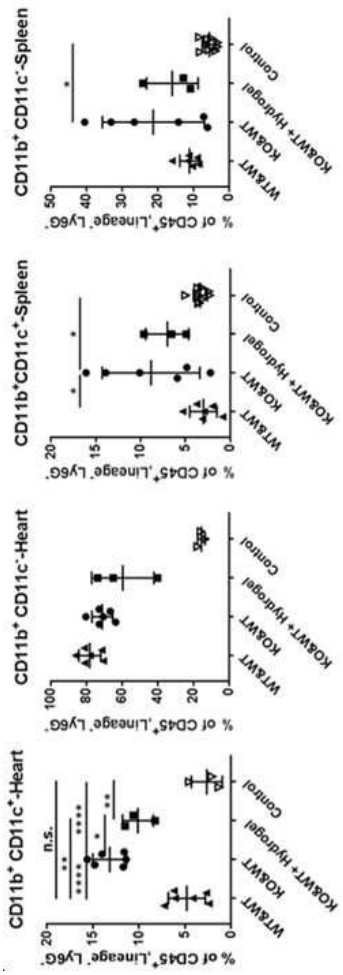
도면8a


Control
KO&WT + IL33 (Hydrogel)
KO&WT
WT&WT
Graft
Spleen
CD11b
CD11c
1.31
15.7
8.26
65.0
14.8
72.8
6.11
81.2
2.38
2.14
5.98
89.5
4.90
1.70
82.6
5.93
2.58
14.4
77.1
3.21
2.67
11.0
83.1

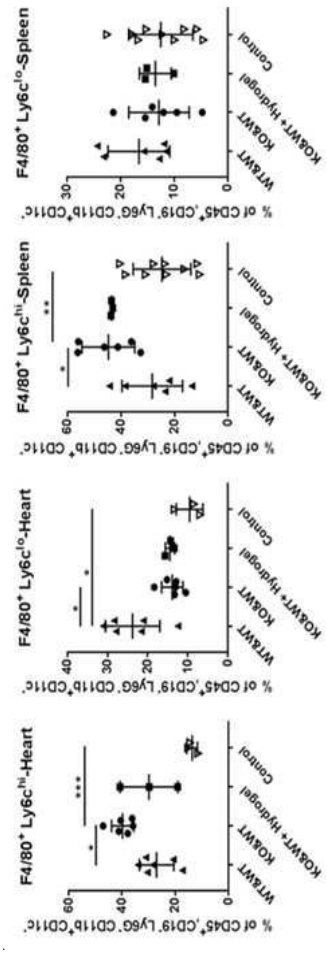
도면8b


WT&WT
KO&WT
KO&WT+ IL33(Hydrogel)
Control
Graft
Spleen
Ly6c
F4/80
10.7
34.0
27.3
27.9
13.4
41.2
30.2
15.2
12.0
19.1
53.2
15.7
8.07
11.4
72.1
8.48
22.1
44.4
17.9
15.7
17.2
46.3
27.0
9.50
12.0
43.1
29.8
15.1
18.1
36.2
31.6
14.1

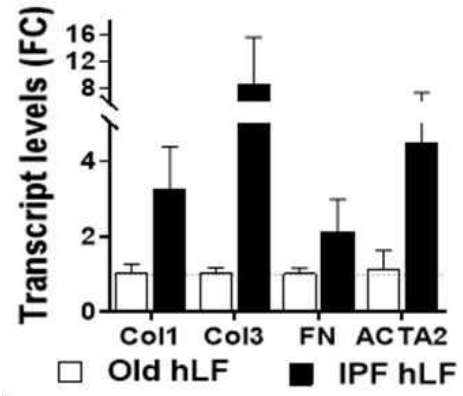
도면8c


CD11b+ CD11c+-Heart
CD11b+ CD11c--Heart
CD11b+CD11c+-Spleen
CD11b+ CD11c--Spleen
% of CD45+,Lineage- Ly6G-
WT&WT
KO&WT
KO&WT+ Hydrogel
Control
n.s.
*
**
***
****

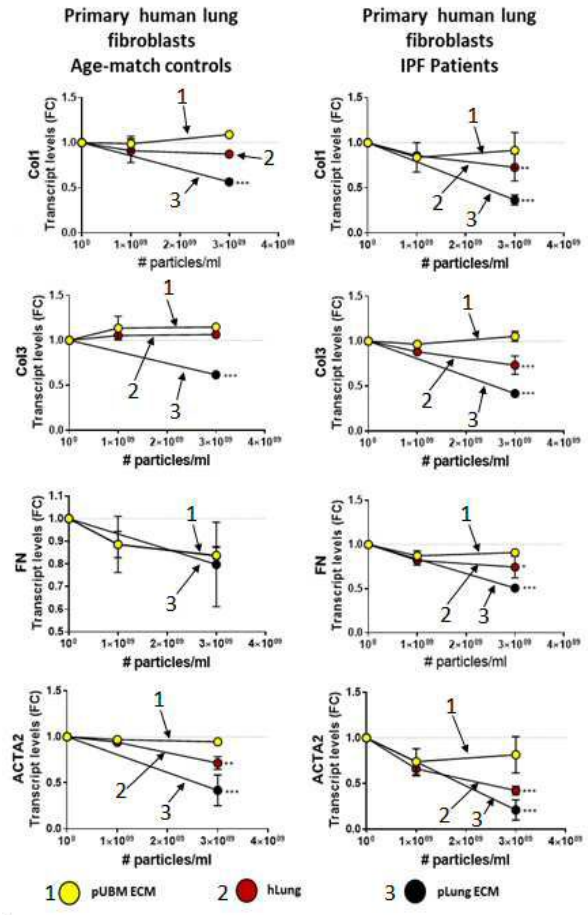
도면8d


F4/80+ Ly6clo-Spleen
F4/80+ Ly6chi-Spleen
F4/80+ Ly6clo-Heart
F4/80+ Ly6chi-Heart
% of CD45+,CD19-,Ly6G-,CD11b+,CD11c-
WT&WT
KO&WT
KO&WT+ Hydrogel
Control

도면9a


Transcript levels (FC)
16
12
8
4
2
0
Col1
Col3
FN
ACTA2
Old hLF
IPF hLF

도면9b



서 열 목 록

<110> University of Pittsburgh - Of the Commonwealth System of Higher Education

Badylak, Stephen F

Hussey, George S

Turnquist, Heth

Dziki, Jenna L

Liu, Quan

Zhang, Zhongqiang

<120> MATRIX BOUND VESICLES (MBVS) CONTAINING IL-33 AND THEIR USE

<130> 2020FPI-10-004/US

<150> 62/666,624

<151> 2018-05-03

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 88

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<

400> 1

caccuugucc ucacggucca guuuucccag gaaucccuua gaugcuaaga uggggauucc 60

uggaaauacu guucuugagg ucaugguu 88

<210> 2

<211> 110

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

agaagggcua ucaggccagc cuucagagga cuccaaggaa cauucaacgc ugucggugag 60

uuugggauuu gaaaaaacca cugaccguug acuguaccuu gggguccuua 110

<210> 3

<211> 106

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gcgcagcgcc cugucuccca gccugaggug cagugcugca ucucugguca guugggaguc 60

ugagaugaag cacuguagcu caggaagaga gaaguuguuc ugcagc 106