

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7548567号
(P7548567)

(45)発行日 令和6年9月10日(2024.9.10)

(24)登録日 令和6年9月2日(2024.9.2)

(51)国際特許分類	F I		
A 6 1 K 35/42 (2015.01)	A 6 1 K 35/42	Z N A	
A 6 1 K 35/22 (2015.01)	A 6 1 K 35/22		
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20		
A 6 1 K 38/44 (2006.01)	A 6 1 K 38/44		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1	
請求項の数 20 (全70頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2020-560900(P2020-560900)	(73)特許権者	504279968
(86)(22)出願日	令和1年5月3日(2019.5.3)		ユニバーシティ オブ ピッツバーグ -
(65)公表番号	特表2021-523103(P2021-523103 A)		オブ ザ コモンウェルス システム オブ
(43)公表日	令和3年9月2日(2021.9.2)		ハイヤー エデュケーション
(86)国際出願番号	PCT/US2019/030547		アメリカ合衆国 1 5 2 6 0 ペンシルバ
(87)国際公開番号	WO2019/213482		ニア州,ピッツバーグ,サッカレイ ア
(87)国際公開日	令和1年11月7日(2019.11.7)		ヴェニュー 1 3 0 , ガードナー スティ
審査請求日	令和4年4月19日(2022.4.19)		ール カンファレンス センター ファー
(31)優先権主張番号	62/666,624	(74)代理人	100078282
(32)優先日	平成30年5月3日(2018.5.3)		弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74)代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 I L - 3 3 を含有するマトリックス結合型小胞 (M B V S) およびそれらの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

障害を有するまたは有するリスクがある対象における前記障害を処置または阻害するための方法において使用するための、細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞を含む組成物であって、前記方法が、

前記障害を有するまたは有するリスクがある対象を選択するステップと、

前記対象に、前記組成物を投与するステップであって、前記ナノ小胞がインターロイキン (I L) - 3 3 を含有し、リシルオキシダーゼを含み、前記ナノ小胞が、 a) C D 6 3 も C D 8 1 も発現しないか、または b) C D 6 3 ^{1 0} C D 8 1 ^{1 0} であり、前記細胞外マトリックスが、膀胱または肺に由来する、ステップと

を含み、

それにより、前記対象における前記障害が処置または阻害され、前記障害が肺線維症である、組成物。

【請求項 2】

前記細胞外マトリックスが、哺乳動物細胞外マトリックスである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記哺乳動物細胞外マトリックスが、ヒト細胞外マトリックスである、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記細胞外マトリックスが、ブタ脱細胞化膀胱マトリックス (U B M)であるか、または前記細胞外マトリックスが、ブタ脱細胞化肺 (p L u n g)、またはヒト肺組織に由来する、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記ナノ小胞が、m i R - 1 4 5 および / または m i R - 1 8 1 を含む、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記組成物が、静脈内に投与されるものである、請求項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記肺線維症が、間質性肺線維症である、請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記組成物が、前記対象に吸入によって投与されるものである、請求項 1 ~ 5、または 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記組成物が、前記対象に毎週、月 2 回、または毎月投与されるものである、請求項 1 から 8 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記方法が、前記対象に追加的な治療剤の治療有効量を投与するステップをさらに含む、請求項 1 から 9 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記追加的な治療剤が、免疫抑制剤である、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、抗増殖剤、m T O R 阻害剤、および / またはステロイドである、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記カルシニューリン阻害剤が、タクロリムスまたはシクロスポリンであり、前記抗増殖剤が、ミコフェノール酸であり、前記 m T O R 阻害剤が、シロリムスであり、および / または前記ステロイドが、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはコルチゾンである、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記対象がヒトである、請求項 1 から 13 までのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

対象における障害の処置または阻害に使用するための組成物であって、細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の治療有効量を含み、前記ナノ小胞が、インターロイキン (I L) - 3 3 を含有し、リシルオキシダーゼを含み、前記ナノ小胞が、a) C D 6 3 も C D 8 1 も発現しないか、または b) C D 6 3 ^{1 0} C D 8 1 ^{1 0} であり、前記障害が肺線維症であり、前記細胞外マトリックスが、膀胱または肺に由来する、組成物。

【請求項 16】

追加的な治療剤をさらに含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記追加的な治療剤が、免疫抑制剤である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、抗増殖剤、m T O R 阻害剤、および / またはステロイドである、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記カルシニューリン阻害剤が、タクロリムスまたはシクロスポリンであり、前記抗増殖剤が、ミコフェノール酸であり、前記 m T O R 阻害剤が、シロリムスであり、および / または前記ステロイドが、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはコルチゾンである、

10

20

30

40

50

請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記肺線維症が、間質性肺線維症である、請求項 15 から 19 までのいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願との相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、3018年5月3日出願の米国仮出願第62/666,624号の利益を主張するものである。

10

政府支援に関する記載

【0002】

本発明は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health) から付与された grant no. AR073527 および HL122489 の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に関して一定の権利を有する。

【0003】

本発明は、a) 臓器または組織の線維症、b) 実質臓器移植片拒絶、および c) 心疾患を処置するための、インターロイキン (IL) - 33 を含有する膜結合型ナノ小胞 (MBV) の使用に関連する。

【背景技術】

20

【0004】

心疾患または傷害により線維症が引き起こされ、その結果、心筋硬直、機能喪失、および心不全 (HF) が生じる。損傷を受けた心筋細胞 (cardiac myocyte) が線維芽細胞および付随する過剰な細胞外マトリックス (ECM) に置き換えられると心筋虚血 (MI) 後の置換性線維症が生じる (Travers et al., Circulation research 118, 1021-1040 (2016))。反応性間質性線維症は、微小血管系の周囲の領域および局所心筋層に影響を及ぼし、心臓移植 (HTx) 後の慢性同種異系移植片拒絶 (CR) に寄与する。CRにより、移植後11年以内に50%を超える移植片の喪失が引き起こされる (Libby and Pober, Immunity 14, 387-397 (2001))。過剰な炎症が有害な心臓リモデリングおよびHFへの進行に関係付けられている。多数の実験研究により、MIまたはHTx後の炎症を適時に消散させることが、免疫により駆動される線維症の発生および進行の防止に役立ち得ることが示されている (Frangogiannis, Nature Reviews Cardiology 11, 255 (2014); Suthahar, Current Heart Failure Reports 14, 235-250 (2017))。しかし、MIまたは虚血再灌流傷害 (IRI) 後の心臓傷害およびHTx後の免疫媒介性攻撃に起因する線維症を防止するまたは逆転させるために利用可能な有効な治療モダリティは存在しない。

30

【0005】

哺乳動物細胞外マトリックス (ECM) で構成される生物学的足場が、外科用メッシュ材料、局部的創傷ケア用の粉末、およびハイドロゲルとして開発されており、それらは全て、大動脈および僧帽弁置換術 (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))、先天性心臓欠損の再構成 (Scholl et al., World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery 1, 132-136 (2010))、およびファロー四徴症 (TOF) の一次修復中のネイティブな肺動脈弁を強化するための心臓パッチとして (Dharmapuram et al., World Journal for Pediatric and Congenital

40

50

tal Heart Surgery 8, 174 - 181 (2017))を含めた多数の臨床的適用に関して承認されている。ECMハイドロゲルは、心筋層の内因性修復を直接促進することが示されており(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))、現在、心筋梗塞後の心臓組織の修復を容易にするための心臓内注射に関する第I相臨床試験において調査中である(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02305602)。これらのECMに基づく材料は、最も一般的には、異種起源のものであり、とりわけ真皮、膀胱または小腸粘膜下組織(SIS)などの、供給源組織の脱細胞化によって調製される(Keane et al., Methods 84, 25 - 34 (2015))。異種ECM足場は、有害な自然免疫応答も適応免疫応答も引き出さず、実際には、抗炎症性および修復性の自然免疫応答および適応免疫応答を支持する(Huleihel et al., in Seminars in Immunology, 39:2 - 13 (2017))。これらの天然に存在するバイオマテリアルの使用には、一般には、「構造的リモデリング」と称されるプロセスである、機能的な、部位に適した組織の少なくとも部分的な再建が伴う(Martinez et al., F1000 Prime Rep 6:13 (2014))。ほぼ間違いなく、下流の機能的リモデリング転帰の主要な決定因子は、ECM生体足場(bioscaffold)に対する初期の自然免疫応答である(Brown, et al., Acta Biomater, 8:978 - 987 (2012))。ECM生体足場、またはECM生体足場の分解生成物は、炎症促進性M1様マクロファージおよびTh1 T細胞表現型からリモデリング促進性M2様マクロファージおよびTヘルパー2型(Th2)細胞応答への変換を促進することによって組織修復を方向付けることが示されている(Huleihel, et al., Seminars in Immunology, 29:2 - 13 (2017))。多数の研究により、骨格筋(Kuswanto et al., Immunity 44, 355 - 367 (2016); Serrels et al., Sci. Signal. 10, 508 (2017))、および心臓血管系(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))を含めた多数の解剖学的部位において癒痕組織形成ではなく組織リモデリングおよび創傷治癒プロセスを促進するためには、マクロファージの活性化状態への変換が適当な時になされることが必要であることが示されている。この変換は免疫抑制ではなく、局所マクロファージ表現型の表現型変化を促進する免疫調節の構築的形態である(Oliveira et al., PLoS one 8, e66538 (2013); Reing et al., Biomaterials 31, 8626 - 8633 (2010))。しかし、ECMのどの成分がこの機能を有するのかは以前には分かっていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【文献】Travers et al., Circulation research 118, 1021 - 1040 (2016)

【文献】Libby and Pober, Immunity 14, 387 - 397 (2001)

【文献】Frangogiannis, Nature Reviews Cardiol ogy 11, 255 (2014)

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0007】

障害を有するまたは有するリスクがある対象における障害を処置または阻害するための方法が開示される。一部の実施形態では、障害は、a) 臓器もしくは組織の線維症；b) 実質臓器移植片拒絶；またはc) 心筋梗塞でも心筋虚血でもない心疾患である。これらの方法は、障害を有するまたは有するリスクがある対象を選択するステップと、対象に、細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の治療有効量を投与するステップとを含み、ここで、ナノ小胞は、インターロイキン(IL)-33を含み、ナノ小胞は、a) CD63もCD81も発現しないか、またはb) CD63¹⁰CD81¹⁰である。

【0008】

追加的な実施形態では、筋芽細胞分化を増大させるための方法が開示される。これらの方法は、筋芽細胞に細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の有効量を接触させるステップを含み、ここで、ナノ小胞は、インターロイキン(IL)-33を含み、リシルオキシダーゼを含み、ナノ小胞は、a) CD63もCD81も発現しないか、またはb) CD63¹⁰CD81¹⁰である。

【0009】

一部の非限定的な例では、ナノ小胞は、対象におけるマクロファージにおいてCD68およびCD11bの発現を維持する。

【0010】

前述のおよび他の特色および利点は、添付図を参照して進めるいくつかの実施形態の以下の詳細な説明からより明白になる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1-1】図1A~1Eは、ECM生体足場から単離されたMBVが全長IL-33を含有することを示す図である。A、サイトカインアレイ。脱細胞化WTマウス腸(n=3)または脱細胞化IL-33^{-/-}マウス腸(n=3)から単離されたMBVのサイトカインカーゴを、R&D systemのMouse XL Cytokine Array Kitを使用して分析した。このアレイは、2連でスポットされた111種のサイトカインを含有する。枠で囲まれた領域は、IL-33スポットの位置を示す。B、脱細胞化WTまたはIL-33^{-/-}マウス腸から単離されたMBVの発現レベルが最も高い15種のサイトカインの定量のグラフ表示である。C、脱細胞化WTマウス腸から単離されたMBVの透過型電子顕微鏡イメージング。矢印はMBVを示す。D、3つの脱細胞化WTマウス腸または3つのIL-33^{-/-}マウス腸から単離されたMBVにおけるIL-33発現レベルの免疫プロット分析。E、実験室で作製されたブタ膀胱マトリックス(UBM)、小腸粘膜下組織(SIS)、真皮、および心筋ECMおよび3種の市販の生物学的足場等価物：ACELL(登録商標)MATRIX(商標)(ブタ膀胱)、BD(登録商標)XENMATRIX(商標)(ブタ真皮)、およびCOOK BIOTECH(登録商標)BIODESIGN(商標)から単離されたMBVにおけるIL-33発現レベルの免疫プロット分析。

【図1-2】同上。

【図1-3】同上。

【0012】

【図2-1】図2A~2Eは、ECM内に貯蔵される全長IL-33が、MBVの内腔に組み入れられることによりタンパク質分解から保護されることを示す図である。A、MBVを分子ふるいクロマトグラフィー(SEC)によって分画し、溶出画分を280nmにおけるUV吸光度によって連続的にモニタリングした。500μlの画分を30個収集した。別の実験において、MBVをまず、TRITON(登録商標)X-100を用いて溶解させ、次いで、SECによって分画した。2つのUVクロマトグラムの上層レイは、インタクトなMBVはより重い画分に溶出し、一方、溶解したMBVの分子成分は主により軽い画分に溶出したことを示す。B、クロマトグラフィーにかけたインタクトなMB

10

20

30

40

50

V (上のパネル) または溶解したMBV (下のパネル) からの溶出画分を、示されている通りプールし、IL-33について免疫プロットによって分析した。C、クロマトグラフィーにかけたインタクトなMBVのプール画分6~8を透過型電子顕微鏡検査によってイメージングした。D) インタクトなMBVのプール画分6~8を、直接ビオチン化してMBV表面タンパク質を標識したか、または、まずTRITON (登録商標) X-100を用いて溶解させ、MBV抽出物をビオチン化して内腔および表面タンパク質を標識した。ストレプトアビジンプルダウン (SA) 後に単離されたタンパク質、およびストレプトアビジンビーズに結合しなかったタンパク質を表す結合していない画分 (非結合) をIL-33の存在について免疫プロットによって分析した。矢印はMBVを示す。E、プロテイナーゼK保護アッセイ。クロマトグラフィーにかけたインタクトなMBVのプール画分6~8を、TRITON (登録商標) X-100の非存在下または存在下で、示されている濃度のプロテイナーゼKで処理した。試料をIL-33について免疫プロットによって分析した。

10

【図2-2】同上。

【図2-3】同上。

【0013】

【図3-1】図3A~3Dは、内腔IL-33を含有するMBVが、リモデリング促進性マクロファージ表現型 ($F4/80^+ iNOS^- Arg^+$) を非標準ST2非依存性経路によって活性化することを示す図である。a、b、WTマウス (A) またはST2^{-/-}マウス (B) から回収した骨髄由来マクロファージ (BMDM) を、無処理のままにした (対照) か、または以下の試験物を用いて24時間にわたって処理した: IFN + LPS、IL-4、IL-33、脱細胞化WTマウス腸から単離されたMBV (WT MBV)、脱細胞化IL-33^{-/-}マウス腸から単離されたMBV (IL-33^{-/-} MBV)、またはブタ小腸粘膜下組織から単離されたMBV (SIS MBV)。細胞をF4/80 (マクロファージマーカー)、iNOS (M1マーカー)、またはArg1 (M2マーカー) で免疫標識した。C、iNOS免疫標識の定量により、WT BMDMおよびST2^{-/-} BMDMのどちらにおいても、IFN + LPSまたはIL-33^{-/-}マウスから単離されたMBVを用いた処理後に、陰性対照 (IL-4による処理) と比較してiNOS発現の有意な増加が示された (陰性対照と比較して、**は $p < 0.01$ を示し、*は $p < 0.05$ を示し、エラーバーはSEMを表す、 $n = 3$)。D、アルギナーゼ免疫標識の定量により、WT BMDMおよびST2^{-/-} BMDMのどちらにおいても、IL-4またはWTマウスから単離されたMBVを用いた処理後に、陰性対照 (IFN + LPS) と比較してアルギナーゼ発現の有意な増加が示される (陰性対照と比較して、**は $p < 0.01$ を示し、エラーバーはSEMを表す、 $n = 3$)。

20

30

【図3-2】同上。

【図3-3】同上。

【0014】

【図4】図4A~4Bは、IL-33を含有するMBVがStatt6リン酸化非依存的にArg1発現を上方調節することを示す図である。A、B、WTマウスまたはST2^{-/-}マウスから回収した骨髄由来マクロファージ (BMDM) を無処理のままにした (対照) か、または、IL-4、IL-33、脱細胞化WTマウス腸から単離されたMBV (WT MBV)、もしくは脱細胞化IL-33^{-/-}マウス腸から単離されたMBV (IL-33^{-/-} MBV) を用いて24時間 (A) もしくは30分間 (B) 刺激した。細胞溶解物をアルギナーゼ-1およびST2発現 (A) およびStatt6のリン酸化 (B) について免疫プロットによって分析した。

40

【0015】

【図5-1】図5A~5Bは、WT MBVで処理したマクロファージからの分泌物が前駆細胞に関して筋原性であることを示す図である。A、B、C2C12筋芽細胞を集密にするまで培養し、増殖培地、分化培地、または極性化し、MBVで処理したマクロファージによって条件付けた培地で処理した。細胞を分化させ、サルコメアミオシン (sarco

50

meric myososin) について免疫標識した。

【図5-2】同上。

【0016】

【図6-1】図6A~6Dは、移植片IL-33が全く存在しないことにより、慢性拒絶に関連する線維症および血管症の増加がもたらされることを示す図である。A~D、IL-33⁺Bm12 (i133⁺/⁺Bm12) またはIL-33欠損Bm12 (i133⁻/⁻Bm12) 移植片を、C57BL/6 (B6) IL-33発現レシピエント (WT B6) またはC57BL/6 (B6) IL-33欠損レシピエント (i133⁻/⁻B6) に移植した (n=6/群)。術後 (POD) 90~100日目に移植片を回収し、H&E (A、B)、マツソントリクローム (A、B) 後に評価した。ナイーブi133⁻/⁻Bm12心臓を対照として染色した。(C)血管閉塞および(D)線維化領域のパーセンテージをNEARCYTEソフトウェアによって定量した。「*」はi133⁺/⁺Bm12群をWT B6群と比べた有意差を示し、P値を一元配置分散分析 (ANOVA) によって生成し、*P<0.01、**P<0.005であった。

10

【図6-2】同上。

【0017】

【図7】図7A~7Dは、移植片IL-33が全く存在しないことにより、心臓移植後初期に局所的な炎症性骨髄細胞が増加したことを示す図である。A~D、野生型 (WT) IL-33⁺Bm12移植片およびIL-33欠損ノックアウト (KO) Bm12移植片をWT B6レシピエントに移植した (n=4~5/群)。術後 (POD) 3日目に、移植片浸潤性白血球 (leukocyte) をフローサイトメトリー分析によって評価した。ナイーブBm12マウスの心臓から単離された白血球をベースライン対照として含めた (対照; n=4)。A.各群からの代表的なドットプロットは、CD45⁺親ゲーティングにおいて見いだされたCD11b⁺CD11c⁺細胞の頻度を示す。B. CD11b⁺CD11c⁺でゲーティングされた細胞からの代表的なドットプロットは、増加したCD11c⁺細胞が主にMHCII^{hi}単球由来樹状細胞 (monodc) およびCD11c^{hi}炎症性マクロファージであることを示す。矢印は、ゲーティングされた細胞が由来する親集団を示す。C~D. CD11b⁺CD11c^{lo}でゲーティングされた細胞からの代表的なドットプロットは、IL-33の非存在下では、心臓移植片におけるLy6c^{hi}MHCII^{hi}サブセットを含めた炎症促進性F4-80⁺マクロファージの頻度が増加したことを示す。P値を一元配置分散分析 (ANOVA) によって生成し、*P<0.05であった。

20

30

【0018】

【図8-1】図8A~8Dは、IL33⁺MBVの投与により移植後初期の炎症促進性浸潤性骨髄細胞の生成が制限されることを示す図である。A~D、野生型 (WT) IL-33⁺Bm12移植片、IL-33欠損ノックアウト (KO) Bm12移植片を単独で、または、ハイドロゲル中、WT IL-33⁺MBVで処理したIL-33欠損KO Bm12移植片 (IL33 (ハイドロゲル)) をWT B6レシピエント (WT; n=4~6/群) に移植した。術後 (POD) 3日目に、移植片浸潤性白血球および脾細胞をフローサイトメトリー分析によって評価した。ナイーブBm12マウスの心臓および脾臓由来の白血球もベースライン対照として含めた (対照; n=3~9)。代表的なドットプロットはCD45⁺Lineage⁻Ly6G⁻ゲーティングにおける単球由来樹状細胞 (DC) (A) およびCD45⁺Lineage⁻Ly6G⁻CD11c⁻CD11b⁺ゲーティングにおけるマクロファージサブセット (B) ならびに移植片浸潤性およびレシピエント脾細胞 (C~D) の頻度 (%) を示す。図は、マクロファージサブセット (D) のDC (C) の変化についての統計値の概要を示す。示されているデータのP値は一元配置分散分析 (ANOVA) によって生成したものであり、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005、****P<0.001であった。

40

【図8-2】同上。

【図8-3】同上。

50

【図 8 - 4】同上。

【0019】

【図 9 - 1】図 9 A ~ 9 B は、線維症の処置について示すグラフである。IPF 患者および年齢を釣り合わせた対照 ($n = 2$) から外植された肺由来のヒト肺線維芽細胞。(A) 処理前に Col 1、Col 3、および ACTA 2 の発現レベルを決定した。(B) 線維芽細胞を、起源が異なるマトリックス結合型ナノ小胞 (MBV) : プタ脱細胞化膀胱マトリックス (pUBM ECM)、プタ脱細胞化肺 (pLung) およびヒト肺組織 (hLung) を用い、異なる用量: 1 ml 当たり粒子 1×10^9 個および 3×10^9 個で処理した。48 時間の処理後に、細胞を収集し、老化および線維症マーカー転写物の発現について qRT-PCR によって分析するために RNA を単離した。* $p < 0.5$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

10

【図 9 - 2】同上。

【発明を実施するための形態】

【0020】

配列表

添付の配列表に列挙されている核酸配列およびアミノ酸配列は、37C.F.R. 1.822 において定義されている通り、ヌクレオチド塩基については標準の文字略語、およびアミノ酸については 3 文字コードを使用して示されている。各核酸配列の一方の鎖のみが示されているが、示されている鎖へのいずれの言及にも相補鎖が含まれると理解されたい。配列表は ASCII テキストファイル [7123 - 100723 - 02 sequencing .txt, 2019 年 5 月 2 日, 4.0 kb] として提出され、参照により本明細書に組み込まれる。添付の配列表中:

20

配列番号 1 ~ 3 は miRNA 配列である。

【0021】

ECM 足場材料の分解、およびその後の、「マトリックス結合型ナノ小胞」または「MBV」とも称される、生物活性成分を有するナノ小胞の放出の結果、修復性および抗炎症性 M2 マクロファージ表現型の活性化がもたらされる。MBV は、ECM のコラーゲンネットワークに埋め込まれており、生物学的に活性なシグナル伝達分子 (マイクロ RNA およびタンパク質) を分解および変性から保護する、ナノメートルサイズの膜様小胞である。ECM 生体足場およびそれらの中に存在する MBV は、マクロファージを M2 様リモデリング促進性表現型に活性化し得る。これらの MBV を、浸潤性レシピエント骨髄細胞集団を標的とし、および / または実質臓器移植後の同種異系移植片による線維性疾患を阻害するために使用することができることが本明細書に開示される。開示される方法は、実質臓器移植後の同種異系移植片による線維性疾患を防止および / または処置することができる。

30

【0022】

MBV が核外インターロイキン - 33 (IL - 33) の豊富な供給源であることが本明細書に開示される。IL - 33 は、一般には間質細胞の核に見いだされ、一般に、IL - 33 受容体である ST2 を介して免疫細胞を活性化するために組織損傷後に放出されるアラミンまたは自己由来分子とみなされる、IL - 1 ファミリーメンバーである (Wainwright et al., Tissue Engineering Part C: Methods 16, 525 - 532 (2009))。IL - 33 は、ST2⁺ 調節性 T 細胞 (Treg) を刺激することによって心臓移植後の移植片生存を促進する (Wainwright et al., Tissue Engineering Part C: Methods 16, 525 - 532 (2009); Boeing et al., Journal of Extracellular Vesicles 3, 23430 (2014))。細胞内 IL - 33 タンパク質は、IL - 33 の N 末端を介したクロマチンまたはシグナル伝達分子との相互作用を通じて遺伝子発現をモジュレートすることが示唆されている (Jong et al., Journal of Cellular and Molecular Medicine 20, 342 - 350 (2016))

40

50

)。ECM内に安定に貯蔵され、MBVに組み入れられることによってタンパク質分解性の切断から保護されているIL-33は、特徴付けられていない非標準ST2非依存性経路を通じたM2マクロファージの活性化の強力なメディエーターであることが本明細書に開示される。

【0023】

IL33^{+/+}マウス組織ECMから単離されたMBVはst2^{-/-}マクロファージの活性化を修復性リモデリング促進性M2活性化状態に向けるが、IL33^{-/-}マウス組織ECMから単離されたMBVはst2^{-/-}マクロファージの活性化を修復性リモデリング促進性M2活性化状態に向けない。IL33⁺MBVはStat6リン酸化非依存的にM2様マクロファージを生成するので、このIL33⁺MBVの能力は、よく特徴付けられたIL-4/IL-13媒介性M2マクロファージ分化経路とは別個のものである。さらに、マウス心臓移植モデルにおいて、IL-33が欠損した移植片ではM1様マクロファージおよび単球由来DCを含めた炎症促進性骨髄細胞による初期の移植片浸潤の有意な増加が示された。IL-33欠損心臓移植片の移植後にIL-33⁺MBVを投与することにより、移植片中の炎症促進性骨髄細胞の頻度が大きく減少した。したがって、これだけに限定されないが、心臓移植などの実質臓器移植後のIL33⁺MBV送達により、急性または慢性移植片拒絶などの拒絶の間の骨髄活性化を阻害および/または防止することができる。

10

【0024】

さらに、MBVを使用して、傷害または同種異系実質臓器移植を伴う外科手技後の局所炎症を制御し、軟部組織修復を支持することができる。MBVを使用することで、IL-33による骨髄細胞におけるST2非依存性遺伝子発現の誘導が可能になる。結果として、この治療により、外傷または虚血性傷害の部位において骨髄性区画を典型的な炎症促進性の有害なサブセット(M1マクロファージ、炎症性単球、および炎症性単球由来樹状細胞)から離し、有益な修復性または調節性サブセット(すなわち、M2マクロファージおよびLy6c^{low}単球)にシフトさせることによってその後の線維性疾患を制限することができる。この技術では、局所的骨髄細胞の同様の改変によって欠陥部位における軟部組織および筋肉修復も支持される。

20

【0025】

マトリックス結合型ナノ小胞(MBV)は、ECMの線維状ネットワークに埋め込まれている。これらのナノ粒子は、それらのカーゴをECM足場製造プロセス中の分解および変性から遮蔽する。エキソソームは、以前に体液および細胞培養上清中でほぼ排他的に同定された微小胞である。MBVとエキソソームは別個であることが実証されている。MBVは、例えば、界面活性剤および/または酵素による消化に対して抵抗性であり、異なるマイクロRNAのクラスターを含有し、また、miR-145に富むので、他の微小胞とは異なる。MBVは、エキソソームなどの他の微小胞では見いだされる特徴的な表面タンパク質を有さない。本明細書に開示される通り、MBVは、細胞の生存に影響を及ぼし、治癒応答をモジュレートして、神経機能を保存するまたは回復させる。MBVがRGC生存、軸索成長、および組織リモデリングを示差的に調節することが開示される。

30

用語

40

【0026】

以下の用語および方法の説明は、本開示をよりよく記載するため、および本開示の実施に関して当業者をガイドするために提示する。「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という単数形は、文脈により明確に別段の規定がなされない限り、1つまたは1つより多くを指す。例えば、「1つの(a)細胞を含む」という用語は、単一の細胞または複数の細胞を含み、「少なくとも1つの細胞を含む」という句と等価であるとみなされる。「または(or)」という用語は、文脈によりそうでないことが明白に示されない限り、示されている要素の選択肢のうちの単一の要素または2つもしくはそれよりも多くの要素の組合せを指す。本明細書で使用される場合、「含む(comprises)」は、「含む(includes)」を意味する。したがって、「AまたはB

50

を含む (comprising A or B)」は、追加的な要素を排除することなく、「A、B、またはAとBを含む (including A, B, or A and B)」を意味する。本明細書で言及される GENBANK (登録商標) 受託番号の日付は、少なくとも早ければ 2015 年 9 月 16 日に入手可能な配列である。本明細書において引用されている参考文献、特許出願および刊行物、ならびに GENBANK (登録商標) 受託番号は全て参照により組み込まれる。本開示の種々の実施形態の精査を容易にするために、以下の特定の用語の説明を提示する。

【0027】

動物：例えば、哺乳動物および鳥類を含むカテゴリーである、生きている多細胞脊椎動物生物体。哺乳動物という用語は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物のどちらも含む。同様に、「対象」という用語は、ヒトおよび動物対象のどちらも含む。

10

【0028】

生体適合性：哺乳動物対象に埋め込まれた場合に対象において有害な応答を惹起しない任意の材料。生体適合性材料は、個体に導入されるとその意図された機能を果たすことができ、その個体に対して毒性でも傷害性でもなく、対象において材料に対する免疫学的拒絶を誘導することもない。

【0029】

心疾患または障害：心臓血管系に負の影響を及ぼす疾患または障害。この用語はまた、急性冠状動脈症候群、心筋梗塞、心筋虚血、慢性安定狭心症、不安定狭心症、血管形成術、脳卒中、一過性脳虚血発作、跛行および血管閉塞などの心血管イベントを指すことも意図されている。したがって、心疾患および障害は、急性冠状動脈症候群、心筋梗塞、心筋虚血、慢性安定狭心症、不安定狭心症、血管形成術、一過性脳虚血発作、虚血性再灌流傷害、跛行、血管閉塞、動脈硬化症、心不全、慢性心不全、急性非代償性心不全、心肥大、心臓線維症、大動脈弁疾患、大動脈弁または僧帽弁狭窄症 (aortic or mitral valve stenosis)、心筋症、心房細動、心不整脈 (heart arrhythmia)、および心膜疾患を含み得る。

20

【0030】

心機能不全：心臓のポンプ機能のあらゆる機能障害。心機能不全は、例えば、収縮性の機能障害、弛緩能力の機能障害 (時には拡張機能不全と称される)、心臓の弁機能の異常または不適正、心臓筋肉 (heart muscle) の疾患 (時には心筋症と称される)、心臓筋肉への不十分な血液供給を特徴とする狭心症および心筋梗塞などの疾患、アミロイドーシスおよびヘモクロマトーシスなどの浸潤性疾患、全体的または限局的な肥厚 (例えば、ある種の心筋症または全身性高血圧症において生じ得るものなど)、ならびに心腔間の異常な伝達 (例えば、心房中隔欠損) を含む。さらなる考察に関しては、Braunwald, Heart Disease: a Textbook of Cardiovascular Medicine, 5th edition 1997, WB Saunders Company, Philadelphia PA (以下 Braunwald) を参照されたい。

30

【0031】

心筋症：心筋層 (心臓筋肉) のあらゆる疾患または機能不全。心筋症は、起源が炎症性、代謝的、毒性、浸潤性、線維形成性、血液学的、遺伝学的、または不明のものであり得る。心筋症は、主に臨床的および病理学的特徴に基づいて一般に 3 つの群に分類される：

40

(1) 心臓の肥大および心室の一方または両方の収縮機能障害を特徴とする症候群である拡張型心筋症；

(2) (a) 心室壁もしくは心室中隔のいずれかの厚さの全体的もしくは限局的な増加、または (b) 例えば、遺伝子疾患、高血圧症、もしくは心臓弁機能不全において起こり得る心室壁もしくは心室中隔のいずれかの厚さの全体的もしくは限局的な増加のしやすさの増加と本明細書で定義される肥大型心筋症；または

(3) 優性の臨床的特色が通常心臓の弛緩能力の機能障害 (拡張機能不全) であり、多くの場合、心臓筋肉へのアミロイド線維、鉄、または糖脂質などの外来物質の浸潤を特徴

50

とする疾患の群である拘束型心筋症および浸潤性心筋症。

【0032】

Wynne and Braunwald, The Cardiomyopathies and Myocarditis, Chapter 41 in Braunwaldを参照されたい。

【0033】

富化：混合物中に存在するナノ小胞などの目的の成分の量のその混合物中の他の望ましくない成分の量に対する比率が富化プロセス後に富化プロセス前と比較して高くなるプロセス。

【0034】

細胞外マトリックス（ECM）：これだけに限定されないが、組織内の細胞を囲み、支持し、また、別段の指定のない限り無細胞性である、構造タンパク質、特殊タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、および成長因子を含めた、構造的かつ機能的な生体分子および/または生体高分子の複雑な混合物。ECM調製物は「脱細胞化された」または「無細胞性」であるとみなすことができ、細胞が、本明細書に記載されており、当技術分野で公知のプロセスによって供給源組織から取り出されたものであることを意味する。「ECM由来ナノ小胞」、「マトリックス結合型ナノ小胞」、「MBV」または「ECMに由来するナノ小胞」などの「ECM由来材料」とは、天然のECMから調製されたか、またはECMが培養細胞によって産生される*in vitro*供給源から調製されたナノ小胞である。ECM由来ナノ小胞は下で定義されている。

【0035】

線維症関連疾患または線維性疾患：線維症が主な病理的基礎、結果または症状である疾患または障害。線維症、または瘢痕は、恒久的な瘢痕、臓器機能不良、および最終的には死亡に至る恐れがある、炎症を起こしたまたは損傷を受けた組織およびその周囲への線維状結合組織（コラーゲンおよびフィブロネクチンなどの細胞外マトリックス（ECM）の成分）の過剰な蓄積によって定義される。正常な組織修復は、組織傷害が重症もしくは反復性である場合、または創傷治癒応答自体が調節不全になった場合、次第に不可逆的な線維性応答に進展し得る。線維症関連疾患としては、例えば、ケロイドおよび肥厚性瘢痕などの皮膚の病理的瘢痕；肝臓または胆嚢の硬変症などの硬変症；心臓線維症；肝線維症；腎線維症；肺線維症；骨髄線維症；リウマチ性心臓病；硬化性腹膜炎；糸球体硬化症、強皮症、縦隔線維症、後腹膜線維症、ならびに腱および軟骨の線維症が挙げられる。線維症は、いくつかの因子の結果であり得る。例としては、ほんの数例として、遺伝性遺伝障害；持続感染；毒素、刺激物質または煙への反復的曝露；慢性自己免疫性炎症；移植におけるマイナーヒト白血球抗原ミスマッチ；心筋梗塞；高血清コレステロール；肥満症；および制御が不十分な糖尿病が挙げられ、また、高血圧症線維症は組織傷害によっても誘発され得る。しかし、開始イベントにかかわらず、全ての線維性疾患に共通する特色は、線維性組織リモデリングの重要なメディエーターである、ECMを産生する筋線維芽細胞の活性化である。本明細書で使用される場合、「組織傷害」は、組織内または組織に変化が生じるような組織のあらゆる損傷または組織に課される変形を指す。組織傷害は、心臓組織傷害または肺組織傷害を含む。心臓組織傷害が心臓の変形または心臓の過負荷に起因し得ることが当業者には容易に認識されよう。したがって、一般に、本明細書に提示される方法および組成物を必要とする対象は、心臓の変形が増大し、したがって、心疾患もしくは障害または心臓線維症などの線維症関連疾患が発生するリスクが増加している対象を含む。心臓線維症に至る恐れがある状態としては、これだけに限定されないが、肥大型心筋症、サルコイドーシス、心筋炎、慢性腎不全、中毒性心筋症、外科手術媒介性虚血再灌流傷害、急性および慢性臓器拒絶、老化、慢性高血圧症、非虚血性拡張型心筋症、不整脈、アテローム性動脈硬化症、HIV関連心血管疾患、肺高血圧症が挙げられる。肺線維症に至る恐れがある状態としては、これだけに限定されないが、関節リウマチおよびシェーグレン症候群などの自己免疫疾患、胃食道逆流性疾患（GERD）、サルコイドーシス、喫煙、アスベストまたはシリカへの曝露、岩および金属塵への曝露、ウイルス感染、放射線へ

10

20

30

40

50

の曝露、およびある特定の医薬が挙げられる。

【0036】

移植片対宿主病（GVHD）：供与された免疫学的にコンピテントなリンパ球が移植レシピエントの独自の組織に対して反応する、骨髄または他の組織移植の一般的な重篤な併発症。GVHDは、血縁ドナーまたは非血縁ドナーのいずれか由来の幹細胞を使用するまたは含有するあらゆる移植の可能性のある併発症である。

【0037】

GVHDには、急性および慢性の2種類がある。急性GVHDは、移植後最初の3カ月以内に現れる。急性GVHDの徴候としては、手および足における赤みがかった皮膚皮疹が挙げられ、これは、拡散し、より重症になる可能性があり、皮膚剥離または皮膚水疱を伴う。急性GVHDは胃および腸にも影響を及ぼす可能性があり、その場合、痙攣、悪心、および下痢が存在する。皮膚および眼の黄変（黄疸）により、急性GVHDが肝臓に影響を及ぼしていることが示される。慢性GVHDは、その重症度によって順位付けられる：ステージ/グレード1は軽度であり、ステージ/グレード4は重症である。慢性GVHDは、移植の3カ月後またはそれよりも後に発生する。慢性GVHDの症状は急性GVHDのものと同様であるが、さらに、慢性GVHDは、眼の粘液腺、口腔内の唾液腺、および胃の内側および腸を滑らかにする腺にも影響を及ぼす可能性がある。

【0038】

心臓：血液を循環させる、動物の筋肉質の臓器。哺乳動物では、心臓は、4つの房室：右心房、右心室、左心房、左心室で構成される。右心房と左心房は心房中隔によって互いに分離されており、右心室と左心室は心室中隔によって互いに分離されている。右心房と右心室は三尖弁によって互いに分離されている。左心房と左心室は僧帽弁によって互いに分離されている。

【0039】

心臓の4つの房室の壁は、作業筋または心筋層、および結合組織で構成される。心筋層は、本明細書では心臓細胞（cardiac cell）、心筋細胞（cardiac myocyte）、心筋細胞（cardiomyocyte）および/または心筋線維（cardiac fiber）とも称され得る心筋細胞（myocardial cell）で構成される。心筋細胞を対象から単離し、in vitroで成長させることができる。腔に最も近い心筋層の内層は心内膜と称され、心筋層の外層は心外膜と称される。左心室内腔は一部が心室中隔および左心室自由壁と結合している。左心室自由壁は、時には、前壁、後壁および側壁；または心尖部（左心室の先端、心房から最も遠い）および心基部（左心室の心房に最も近い部分）などの領域に分けられる。心尖部の（apical）および心基部の（basal）は心臓の対応する領域を指す形容詞である。

【0040】

動作に関しては、心臓の主要な役割は、対象における組織および細胞の代謝的必要性に見合うように、酸素を含む血液を十分に送り込むことである。心臓は、この課題を心周期と称される律動的かつ高度に調和した収縮と弛緩の周期で実現する。簡潔にするために、心周期を2つの広範なカテゴリー：心室が収縮する心周期の相である心室収縮期；および心室が弛緩する心周期の相である心室拡張期に分けることができる。詳細な考察に関してはOpie, Chapter 12 in Braunwaldを参照されたい。本明細書で使用される場合、収縮期および拡張期という用語は、文脈により明確に別段の規定がなされない限り、心室収縮期および拡張期を指すものとする。

【0041】

健康な間の正常な循環では、右心房は静脈を介して体からの実質的に酸素が除かれた血液を受ける。拡張期には、右心房が収縮し、血液が三尖弁を通過して右心室中に流れ込む。右心室が血液で満たされ、次いで、収縮する（収縮期）。収縮期の力により三尖弁が閉じ、それにより血液が肺動脈弁を通過して肺動脈中に流れ込む。次いで、血液が肺に行き、そこで二酸化炭素を放出し、酸素を取り込む。酸素を含む血液が肺静脈を介して心臓に戻り、左心房に入る。拡張期には、左心房が収縮し、血液が僧帽弁を通過して左心室中に流れ込

10

20

30

40

50

む。左心室が血液で満たされ、次いで、収縮し、右心室が実質的に同時に収縮する。収縮の力により僧帽弁が閉じ、それにより、血液が大動脈弁を通過して大動脈中に流れ込む。大動脈から、酸素を含む血液が体内の全ての組織に循環し、そこで酸素が細胞に送達される。次いで、酸素が除かれた血液が静脈を介して右心房に戻る。

【0042】

左心室の腔内には、前乳頭筋および後乳頭筋として公知の心室心筋層の大きな基本的に円錐形の伸長が2つ存在する。これらは、腱索または腱と称される系様伸長を介して僧帽弁の心室の表面に接続されている。乳頭筋および腱の1つの重要な役割は、心室収縮期中に僧帽弁が閉じたままであることを確実にすることである。別の重要な役割は、心臓の収縮の力を増大させることである。同様に、右心室は乳頭筋および腱を有し、これらは三尖弁を繋ぎ止め、収縮の力を増大させる。

10

【0043】

遺伝性または後天性の疾患過程および/または正常な老化に起因して、心臓筋肉には、収縮期または拡張期のいずれか、またはその両方に機能不全が発生する可能性がある。収縮期の機能不全は収縮機能不全と称される。拡張期の機能不全は拡張機能不全と称される。詳細な考察に関してはOpie Chapter 12、およびColucci et al., Chapter 13 in Braunwaldを参照されたい。

【0044】

遺伝性または後天性の疾患過程および/または正常な老化に起因して、心臓弁の1つまたは複数に機能不全が発生する可能性がある。弁の機能不全は、一般に以下の2つの広範なカテゴリーに入る：狭窄、これは、本明細書では、心周期のうち正常に動作する弁が実質的に開いている時の弁の開きが不完全であることと定義される；閉鎖不全、これは、本明細書では、心周期のうち正常に動作する弁が実質的に閉じている時の弁の閉まりが不完全であることと定義される。弁の機能不全は、心室収縮期中に僧帽弁小葉が後方に逸脱して左心房中に入る、僧帽弁逸脱症として公知の状態も含む。この状態は、軽度、中等度、または重度の僧帽弁閉鎖不全に関連し得る。

20

【0045】

弁狭窄は、一般には、弁が開いた時の弁にわたる圧力勾配を特徴とする。弁閉鎖不全は、一般には、弁が閉じた時の逆行（「後方」）流を特徴とする。例えば、僧帽弁狭窄症（mitral stenosis）は、心室拡張期の終わり間近の僧帽弁にわたる圧力勾配を特徴とする（中等度の僧帽弁狭窄症の典型的な例として、左心室内の拡張期圧5 mm Hg、左心房内の拡張期圧20 mm Hg、15 mm Hgの圧力勾配）。別の例として、僧帽弁閉鎖不全は、心室収縮期中の血液の左心室から左心房への「後方」流を特徴とする。

30

【0046】

心不全：心臓が対象における組織および細胞の代謝的必要性に見合うように酸素を含む血液を十分に供給することができないこと。これには、肺静脈または体静脈における鬱血などの循環鬱血が伴う。本明細書で使用される場合、心不全という用語は、あらゆる原因による心不全を包含し、本明細書では、例えば「鬱血性心不全」、「前方心不全」、「後方心不全」、「高拍出性心不全」、「低拍出性心不全」などの用語を包含するものとする。詳細な考察に関してはChapters 13 - 17 in Braunwaldを参照されたい。

40

【0047】

障害：疾患または障害などの低減。疾患または障害の障害により、疾患または障害の1つまたは複数の徴候または症状が減少し得る。

【0048】

インターロイキン（IL）-33：IL-1、IL-1、IL-1RaおよびIL-18を含めた他のIL-1サイトカインに関して記載されている保存された構造型である分子 - トレフォイル構造に一部基づいて決定されるサイトカインのIL-1スーパーファミリーのメンバーである。この構造では、 - トレフォイルの12本の鎖が、4つの鎖単位であるシュードリピート3つに配置され、そのうちの第1の鎖と最後の鎖

50

は6鎖 - バレル中の逆平行の板であり、一方、各リピートの第2の鎖と第3の鎖は - バレルの頂上に位置する - ヘアピンを形成する。IL-33は、高親和性受容体ファミリーメンバーST2に結合する。IL-33は、ヘルパーT細胞、肥満細胞、好酸球および好塩基球を誘導して2型サイトカインを産生させる。ヒトIL-33の例示的なアミノ酸配列は、2018年4月5日に入手可能な全て参照により本明細書に組み込まれるGENBANK(登録商標)受託番号NP_001186569.1、NP_001186570.1、NP_001300973.1、NP_001300974.1、およびNP_001300975.1に提示される。

【0049】

単離された: 「単離された」生物学的成分(例えば、核酸、タンパク質、細胞、またはナノ小胞など)は、生物体の細胞内またはECM内の、天然に存在する成分である他の生物学的成分から実質的に分離または精製されている。「単離された」核酸およびタンパク質は、標準の精製方法によって精製された核酸およびタンパク質を含む。単離されたナノ小胞は、ECMの線維状物質から取り出されている。この用語は、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質ならびに化学的に合成された核酸も包含する。

【0050】

リシルオキシダーゼ(Lox): コラーゲンおよびエラスチン前駆体のリシン残基からのアルデヒドの形成を触媒する銅依存性酵素。これらのアルデヒドは、高度に反応性であり、他のリシルオキシダーゼ由来アルデヒド残基と、または修飾されていないリシン残基との自発的な化学反応を受ける。in vivoでは、これにより、コラーゲンおよびエラスチンの架橋結合がもたらされ、これは、コラーゲン原線維の安定化において、ならびに成熟エラスチンの完全性および弾性に関して役割を果たす。構造が異なる複雑な架橋結合がコラーゲンにおいて(3つのリシン残基に由来するピリジノリン)およびエラスチンにおいて(4つのリシン残基に由来するデスモシン)形成される。Lox酵素をコードする遺伝子が種々の生物体からクローニングされている(Hamalainen et al., Genomics 11: 508, 1991; Trackman et al., Biochemistry 29: 4863, 1990; 参照により本明細書に組み込まれる)。ヒトリシルオキシダーゼの配列の残基153~417および残基201~417は、触媒機能のために重要であることが示されている。LoxL1、LoxL2、LoxL3およびLoxL4と称される4つのLox様アイソフォームがある。

【0051】

マクロファージ: 細胞デブリ、外来物質、微生物、およびがん細胞を貪食し、分解する白血球(white blood cell)の一種。これらの細胞は、ファゴサイトーシスにおけるそれらの役割に加えて、発達、組織の維持および修復において、ならびに、リンパ球などの免疫細胞を含めた他の細胞を動員し、それらに影響を及ぼすという点で、自然免疫および適応免疫の両方において重要な役割を果たす。マクロファージは、M1およびM2と称されている表現型を含めた多くの表現型で存在し得る。主に炎症促進性機能を果たすマクロファージはM1マクロファージ(CD86+/CD68+)と称され、一方、炎症を低減し、また、組織修復を刺激し、調節するマクロファージはM2マクロファージ(CD206+/CD68+)と称される。マクロファージの種々の表現型を同定するマーカーは種間で様々である。マクロファージ表現型は、M1およびM2の両極端の間にわたる一連のもの(spectrum)によって表されることに留意するべきである。F4/80(接着Gタンパク質共役型受容体E1(ADGRE)遺伝子によってコード)はマクロファージマーカーである。どちらも参照により本明細書に組み込まれるGENBANK(登録商標)受託番号NP_001243181.1、2018年4月6日およびNP_001965、2018年3月5日を参照されたい。ナノ小胞は対象におけるマクロファージにおいてCD68およびCD11bの発現を維持することが本明細書に開示される。

【0052】

10

20

30

40

50

マイクロRNA：一般には標的mRNAの翻訳を抑制することによって遺伝子発現を転写後調節する約17～約25ヌクレオチド塩基長の小さな非コードRNA。miRNAは、負の調節因子として機能し得、したがって、特定のmiRNAの量が多いことは標的遺伝子発現のレベルが低いことと相関する。miRNAには、一次miRNA (pri-miRNA)、未熟miRNA (pre-miRNA)、および成熟miRNAという3つの形態が存在する。一次miRNA (pri-miRNA)は、約数百塩基から1 kbを超えるまでのステムループ構造化された転写物として発現される。pri-miRNA転写物は、核において、ステムループの基部付近のステムの両鎖を切断するドロージャと称されるRNase IIIエンドヌクレアーゼによって切断される。ドロージャは、RNA 2重鎖を互い違いに切断し、5'リン酸および3'末端の2ヌクレオチド突出を残す。切断産物である未熟miRNA (pre-miRNA)は、約60～約110ヌクレオチド長であり、フォールドバック様式で形成されたヘアピン構造を有する。pre-miRNAはRan-GTPおよびエクスポートン-5によって核から細胞質に輸送される。pre-miRNAは細胞質においてダイサーと称される別のRNase IIIエンドヌクレアーゼによってさらにプロセシングされる。ダイサーは、5'リン酸および3'突出を認識し、ステムループ接合部でループを切断してmiRNA 2重鎖を形成する。miRNA 2重鎖がRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に結合し、そこでアンチセンス鎖が優先的に分解され、センス鎖成熟miRNAはRISCをその標的部位に向ける。成熟miRNAはmiRNAの生物学的に活性な形態であり、約17～約25ヌクレオチド長である。

10

20

【0053】

筋芽細胞：他の筋芽細胞と融合して筋原線維を形成しておらず、既存の筋原線維にも融合していない筋肉細胞。

【0054】

ナノ小胞：直径約10～約1,000 nmのナノ粒子である細胞外小胞。ナノ小胞は、他の分子の中でも生物学的に活性なシグナル伝達分子 (例えば、マイクロRNA、タンパク質) を運搬する脂質膜結合型粒子である。一般に、ナノ小胞は、脂質二重層により限定され、生体分子を二重層に封入する、および/または二重層に包埋することができる。したがって、ナノ小胞は、原形質膜で囲まれた内腔を含む。異なる型の小胞は、直径、細胞内起源、密度、形状、沈降速度、脂質組成、タンパク質マーカー、核酸含有量および細胞外マトリックス由来であるかまたは分泌されたものであるかなどの起源に基づいて区別することができる。ナノ小胞は、例えば、ECM由来のマトリックス結合型ナノ小胞 (上記を参照されたい) など、その起源、タンパク質含有量および/またはmiRNA含有量によって同定することができる。

30

【0055】

「エキソソーム」は、細胞により分泌される膜様小胞であり、直径10から150 nmまでにわたる。一般に、後期エンドソームまたは多胞体は、限定されたエンドソーム膜からこれらの封入された小胞中への小胞の内向き出芽および切断によって形成された内腔内小胞を含有する。次いで、原形質膜と融合すると、エキソサイトーシスの間にこれらの内腔内小胞が多胞体内腔から細胞外の環境、一般には血液、脳脊髄液または唾液などの体液中に放出される。膜のセグメントが陥入し、エンドサイトーシスによって取り込まれると、エキソソームが細胞内に生じる。より小さな小胞に分解され、最終的に細胞から吐き出される内部移行したセグメントは、タンパク質ならびにmRNAおよびmiRNAなどのRNA分子を含有する。血漿由来のエキソソームはリボソームRNAをほとんど欠く。細胞外マトリックスに由来するエキソソームは、特定のmiRNAおよびタンパク質成分を含み、事実上、血液、尿、唾液、精液、および脳脊髄液などのあらゆる体液中に存在することが示されている。エキソソームは、CD11cおよびCD63を発現し得、したがって、CD11c⁺およびCD63⁺であり得る。エキソソームは表面に高レベルのlyslオキシダーゼを有さない。

40

【0056】

50

「ECMに由来するナノ小胞」、「マトリックス結合型ナノ小胞」、「MBV」または「ECM由来ナノ小胞」は全て同じ膜結合型粒子を指し、当該粒子は、サイズが10nm~1000nmにわたり、細胞外マトリックスに存在し、細胞挙動に影響を及ぼすタンパク質、脂質、核酸、成長因子およびサイトカインなどの生物学的に活性なシグナル伝達分子を含有する。この用語は、互換的であり、同じ小胞を指す。これらのMBVは、ECMに埋め込まれ、それに結合しており、単に表面に付着しているのではない。これらのMBVは、凍結融解、ならびにペプシン、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、プロテイナーゼK、およびコラゲナーゼなどのプロテアーゼによる消化、ならびに界面活性剤による消化などの厳しい単離条件に対して抵抗性である。一般に、これらのMBVは、とりわけ、miR-145、ならびに必要に応じてmiR-181、miR-143、およびmiR-125が富化されている。これらのMBVは、CD63もCD81も発現しないか、またはこれらのマーカーをわずかに検出可能なレベルで発現する(CD63^{low}CD81^{low})。MBVは、表面にlys1オキシダーゼ(Lox)を含有する。ECMは、組織由来のECMであってもよく、培養下で細胞に産生させることもでき、商業的な供給源から購入することもできる。MBVはエキソソームとは別個のものである。

10

【0057】

臓器拒絶または移植片拒絶：レシピエントによって発現される活性な免疫応答に起因するものであり、臓器機能不全の非免疫学的原因とは無関係である、臓器の機能的および構造的劣化。

【0058】

薬学的に許容される担体：本発明において有用な薬学的に許容される担体は従来のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)には、本明細書において開示される融合タンパク質の薬学的送達に適した組成物および製剤が記載されている。

20

【0059】

一般に、担体の性質は、使用される特定の投与形式に依存する。例えば、非経口製剤は、通常、水、生理的食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロス、グリセロールなどの薬学的かつ生理的に許容される流体をビヒクルとして含む注射液を含む。固体組成物(例えば、散剤、丸剤、錠剤、またはカプセル剤の形態)に関しては、従来は無毒性固体担体は、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムを含み得る。投与される医薬組成物は、生物学的に中性の担体に加えて、微量の無毒性補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートなどを含有し得る。

30

【0060】

医薬品：対象または細胞に適正に投与された場合に所望の治療効果または予防効果をもたらすことができる化学化合物または組成物。「インキュベートすること」は、薬物が細胞と相互作用するのに十分な時間を含む。「接触させること」は、エキソソーム、miRNA、またはmiRNAをコードする核酸などの作用物質を固体または液体の形態で細胞と一緒にインキュベートすることを含む。

40

【0061】

ポリヌクレオチド：任意の長さの核酸配列(例えば、直鎖状配列など)。したがって、ポリヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドを含み、染色体内に見いだされる遺伝子配列も含む。「オリゴヌクレオチド」は、ネイティブなリン酸ジエステル結合によって結合した、複数の結合したヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、6ヌクレオチド長から300ヌクレオチド長間のポリヌクレオチドである。オリゴヌクレオチド類似体は、オリゴヌクレオチドと同様に機能するが、天然には存在しない部分を有する部分を指す。例えば、オリゴヌクレオチド類似体は、例えば、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドなど、変更された糖部分または糖間連結などの天然に存在しない部分を含有し得る。天然に存在するポリヌクレオチドの機能的な類似体は、RNAまたはDNAに結合し得、

50

ペプチド核酸 (P N A) 分子を含む。

【 0 0 6 2 】

精製された：「精製された」という用語は、絶対的な純度を求めるものではなく、相対語として意図されている。したがって、例えば、精製された核酸分子調製物とは、その調製物中の言及された核酸 (the nucleic) が、細胞内のその天然の環境下にある核酸 (the nucleic) よりも純度が高いものである。例えば、核酸の調製物は、核酸がその調製物の総タンパク質含有量の少なくとも 5 0 % になるように精製される。同様に、精製されたエキソソーム調製物とは、その調製物中のエキソソームが、微小胞およびエキソソームが存在する細胞を含む環境下にあるエキソソームよりも純度が高いものである。核酸またはエキソソームの精製された集団は、それぞれ純度が約 9 0 % よりも高い、約 9 1 % よりも高い、約 9 2 % よりも高い、約 9 3 % よりも高い、約 9 4 % よりも高い、約 9 5 % よりも高い、約 9 6 % よりも高い、約 9 7 % よりも高い、約 9 8 % よりも高い、約 9 9 % よりも高いもしくは 1 0 0 % である、または他の核酸もしくは細胞成分を含まない。

10

【 0 0 6 3 】

疾患の防止または処置：疾患の「防止」は、例えば、緑内障などの疾患の素因を有することが分かっている人における疾患の発生を阻害することを指す。素因を有することが分かっている人の例は、家族内に病歴がある人、または対象に状態の素因を与える因子に曝露されてきた人である。「処置」は、疾患または病的状態が発生し始めた後にその徴候または症状を好転させる治療介入を指す。

20

【 0 0 6 4 】

S T 2：インターロイキン 1 受容体ファミリーのメンバー。S T 2 は、I L R 1 R L 1 としても公知であり、また、細胞内 T I R ドメインの機能に基づいて T o l l 様受容体スーパーファミリーのメンバーでもあるが、細胞外領域は免疫グロブリンドメインで構成される。

【 0 0 6 5 】

S T 2 タンパク質は、2 つのアイソフォームを有し、心疾患の進行に直接関係付けられる：可溶性の形態 (可溶性 S T 2 または s S T 2 と称される) および膜に結合した受容体の形態 (S T 2 受容体または S T 2 L と称される)。心筋層が伸びると、S T 2 遺伝子が上方調節され、それにより、循環可溶性 S T 2 の濃度が上昇する。S T 2 のリガンドは I L - 3 3 である。

30

【 0 0 6 6 】

虚血性イベントなどの心疾患または傷害に応答して I L - 3 3 が S T 2 受容体に結合すると、心保護効果が引き出され、その結果、心機能の保存がもたらされる。この心保護的 I L - 3 3 シグナルは、I L - 3 3 に結合して I L - 3 3 を心保護的シグナル伝達のために S T 2 受容体に対して利用できないようにする可溶性 S T 2 のレベルと相殺される。結果として、心臓は高レベルの可溶性 S T 2 の存在下ではより大きなストレスにさらされる。

【 0 0 6 7 】

対象：非ヒト霊長類、マウス、ウサギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、およびは虫類などの哺乳動物および非哺乳動物などの全ての脊椎動物を含めたヒトおよび非ヒト動物。当該記載の方法の多くの実施形態では、対象はヒトである。

40

【 0 0 6 8 】

治療有効量：処置される対象において所望の効果を実現するのに十分な、M B V などの特定の物質の量。対象に投与する場合、所望の i n v i t r o 効果を実現されることが示されている標的組織中濃度 (例えば、骨中) が実現される投与量が一般に使用される。

【 0 0 6 9 】

移植：組織、細胞、または臓器、またはその一部を、1 対象から別の対象に、1 対象から同じ対象の別の部分に、または 1 対象から同じ対象の同じ部分に移動させること。一実施形態では、心臓、腎臓、皮膚、膵臓または肺などの実質臓器の移植は、実質臓器を 1 対象から取り出し、その実質臓器を別の対象に導入することを伴う。

50

【 0 0 7 0 】

同種移植または異種移植は、1個体から別の個体への移植であり、これらの個体は、1つまたは複数の遺伝子座に、2個体における配列が同一ではない遺伝子を有する。同種移植は、遺伝学的に異なる同じ種の2個体間、または2つの異なる種の個体間で行うことができる。自己移植は、同じ個体内の1つの場所から別の場所への組織、細胞、もしくはその一部の移植、または、2個体が遺伝学的に同一の場合の1個体から別の個体への組織もしくはその一部の移植である。

【 0 0 7 1 】

「移植」は、生体適合性基材を、それを必要とする対象内に配置することである。

【 0 0 7 2 】

処置すること、処置、および治療：症状の軽減、寛解、減少、または状態が患者により許容されるものになること、変性もしくは衰退の速度が遅くなること、変性の最終点により消耗性が低いものになること、対象の身体的もしくは精神的ウェルビーイングが改善されること、または視覚が改善されることなどの任意の客観的または主観的パラメーターを含めた、傷害、病状または状態の減弱または好転に関する任意の成功または成功の兆候。処置は、身体検査、神経学的検査、または精神医学的評価の結果を含めた客観的または主観的パラメーターによって評価することができる。

【 0 0 7 3 】

特に説明がなければ、本明細書において使用される全ての科学技術用語は、本開示が属する技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という単数の用語は、文脈によりそうでないことが明白に示されない限り、複数の指示対象を包含する。同様に、「または(or)」という単語は、文脈によりそうでないことが明白に示されない限り、「および(and)」を含むものとする。したがって、「AまたはBを含む(comprising A or B)」とは、A、またはB、またはAとBを含むことを意味する。核酸またはポリペプチドに関して示される全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および全ての分子量または分子質量値はおおよそのものであり、説明のために提示されるものであることがさらに理解されるべきである。本明細書に記載のものと同様または同等である方法および材料を本開示の実施または試験に使用することができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書において言及されている全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。別段の指定がない限り、「約」は5パーセント以内である。矛盾する場合は、用語の説明を含めた本明細書が支配するものとする。さらに、材料、方法および実施例は単に例示的なものであり、限定されるものではない。

細胞外マトリックス(ECM)に由来するナノ小胞

【 0 0 7 4 】

ECMに由来するナノ小胞(マトリックス結合型ナノ小胞、MBVとも称される)は、参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2017/151862号に開示されている。ナノ小胞が細胞外マトリックスに包埋されていることが開示されている。これらのMBVは、単離することができ、また、生物学的に活性である。したがって、これらのMBVを治療目的で単独でまたは別のECMと共に使用することができる。これらのMBVを生物学的足場に単独でまたは別のECMと共に使用することができる。MBVはIL-33を含有し、心疾患および障害ならびに線維性疾患および障害の処置に有用であることが本明細書に開示される。一部の非限定的な例では、ナノ小胞は、対象におけるマクロファージにおいてCD68およびCD11bの発現を維持する。

【 0 0 7 5 】

細胞外マトリックスは、これだけに限定されないが、哺乳動物組織内の細胞を囲んで支持し、また、別段の指定のない限り無細胞性である、構造タンパク質、特殊タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、および成長因子を含めた、構造的かつ機能的な生体分子および/または生体高分子の複雑な混合物である。一般に、開示されるMBV

10

20

30

40

50

は、任意の型の細胞外マトリックス（ECM）に包埋されたものであり、その場所から単離することができる。したがって、MBVは、分離可能にECMの表面に存在しているのではなく、また、エキソソームではない。

【0076】

細胞外マトリックスは、例えば、これだけに限定することなく、米国特許第4,902,508号；米国特許第4,956,178号；米国特許第5,281,422号；米国特許第5,352,463号；米国特許第5,372,821号；米国特許第5,554,389号；米国特許第5,573,784号；米国特許第5,645,860号；米国特許第5,771,969号；米国特許第5,753,267号；米国特許第5,762,966号；米国特許第5,866,414号；米国特許第6,099,567号；米国特許第6,485,723号；米国特許第6,576,265号；米国特許第6,579,538号；米国特許第6,696,270号；米国特許第6,783,776号；米国特許第6,793,939号；米国特許第6,849,273号；米国特許第6,852,339号；米国特許第6,861,074号；米国特許第6,887,495号；米国特許第6,890,562号；米国特許第6,890,563号；米国特許第6,890,564号；および米国特許第6,893,666号；そのそれぞれの全体が参照によって組み込まれる）に開示されている。しかし、ECMは、任意の組織から作製することもでき、任意の*in vitro*供給源から作製することもでき、この場合、ECMは培養細胞によって産生され、ネイティブなECMの1つまたは複数のポリマー成分（構成物）を含む。ECM調製物は、「脱細胞化された」または「無細胞性」とであるとみなされ、これは、細胞が供給源組織または培養物から取り出されていることを意味する。

【0077】

一部の実施形態では、ECMを脊椎動物、例えば、これだけに限定されないが、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ヒツジなどを含めた哺乳動物脊椎動物から単離する。ECMは、これだけに限定することなく、膀胱、腸、肝臓、心臓、食道、脾臓、胃および真皮を含めた任意の臓器または組織に由来するものであってよい。特定の非限定的な例では、細胞外マトリックスを食道組織、膀胱、小腸粘膜下組織、真皮、臍帯、心膜、心臓組織、または骨格筋から単離する。ECMは、例えば、これだけに限定することなく、粘膜下組織、上皮基底膜、固有層などを含めた器官から得た任意の部分または組織を含み得る。非限定的な一実施形態では、ECMは膀胱から単離される。ECMは腫瘍組織から作製することができる。

【0078】

ECMは、基底膜を含んでもよく、含まなくてもよい。別の非限定的な実施形態では、ECMは、基底膜の少なくとも一部分を含む。ECM材料は、毛細血管内皮細胞または線維細胞などの元の組織を構成する細胞要素の一部を保持していてもよく、保持していてもよい。一部の実施形態では、ECMは、基底膜表面と非基底膜表面の両方を含有する。

【0079】

非限定的な一実施形態では、ECMはブタ膀胱から回収される（膀胱マトリックスまたはUBMとしても公知）。簡単に述べると、ECMは、ブタなどの哺乳動物から膀胱組織を取り出し、残留している脂肪組織を含めた外側の結合組織を切り落とすことによって調製される。水道水で繰り返し洗浄することによって残留している全ての尿を除去する。まず、組織を、脱上皮溶液、例えば、これだけに限定することなく、高張性食塩水（例えば、1.0Nの食塩水）中に10分から4時間までにわたる期間にわたって浸漬することによって組織を層剥離させる。高張性食塩溶液への曝露により、基礎をなす基底膜から上皮細胞を除去する。必要に応じて、カルシウムキレート剤を食塩溶液に添加することができる。最初の層剥離手順後の残りの組織は上皮基底膜および上皮基底膜に対して反内腔側の組織層を含む。比較的脆弱な上皮基底膜は一定して損傷を受け、これを内腔表面に対する任意の機械的剥離によって除去する。次に、この組織をさらなる処理に供して反内腔側組織の大部分を除去するが上皮基底膜および固有層は維持する。外側漿膜、外膜、筋層粘膜、粘膜下層および粘膜筋板の大部分を残りの上皮除去組織から機械的剥離によってまた

は酵素処理（例えば、トリプシンまたはコラゲナーゼを使用する）、その後の水分付加、および剥離の組合せによって除去する。これらの組織の機械的除去は、例えば、これだけに限定することなく、Adson-BrownピンセットおよびMetzenbaumはさみを用いて腸間膜組織を除去し、筋層および粘膜下層を、スカルペルハンドルまたは湿らせたガーゼに包んだ他の剛体を用いて縦方向に拭う動作を使用して拭いとることによって実現される。切刃、レーザーを伴う自動化ロボット手順および他の組織分離方法も意図されている。これらの組織を除去した後、得られたECMは、主に上皮基底膜および下にある固有層からなる。

【0080】

別の実施形態では、ECMを、ブタ膀胱組織をスカルペルハンドルおよび湿らせたガーゼで縦方向に拭う動作を使用して剥離させて、漿膜および筋層の両方を含む外層を除去することによって調製する。組織セグメントを裏返した後、粘膜の内腔部分を、同じ拭う動作を使用して基礎をなす組織から層剥離させる。粘膜下組織に穴をあけないように注意する。これらの組織を除去した後、得られたECMは主に粘膜下層からなる（参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,277,999号の図2を参照されたい）。

10

【0081】

ECMを粉末として調製することもできる。そのような粉末は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるGilbert et al., Biomaterials 26 (2005) 1431-1435の方法に従って作製することができる。例えば、UBMシートを凍結乾燥させ、次いで、液体窒素中に浸漬させるために切って小さなシートにすることができる。次いで、スナップ凍結材料を、粒子が回転式ナイフミルに入るように十分小さくなるように細かく砕くことができ、それにより、ECMを粉末化する。同様に、ECM組織内でNaClを沈殿させることにより、材料を均一サイズの粒子に砕き、それをスナップ凍結させ、凍結乾燥させ、粉末化することができる。

20

【0082】

非限定的な一実施形態では、ECMは小腸粘膜下組織またはSISに由来する。市販の調製物としては、これだけに限定されないが、SURGISIS（商標）、SURGISIS-ES（商標）、STRATASIS（商標）、およびSTRATASIS-ES（商標）（Cook Urological Inc.; Indianapolis, Ind.）ならびにGRAFTPATCH（商標）（Organogenesis Inc.; Canton Mass.）が挙げられる。別の非限定的な実施形態では、ECMは、真皮に由来する。市販の調製物としては、これだけに限定されないが、PELVICOL（商標）（ヨーロッパではPERMACOL（商標）として販売されている；Bard, Covington, Ga.）、REPLIFORM（商標）（Microvasive; Boston, Mass.）およびALLODERM（商標）（LifeCell; Branchburg, N.J.）が挙げられる。別の実施形態では、ECMは、膀胱に由来する。市販の調製物としては、これだけに限定されないが、UBM（ACell Corporation; Jessup, Md.）が挙げられる。

30

【0083】

MBVは、以下に開示されている方法を使用して細胞外マトリックスから引き出す（それから放出させる）ことができる。一部の実施形態では、ECMを、ペプシン、コラゲナーゼ、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、またはプロテイナーゼKなどの酵素を用いて消化し、MBVを単離する。他の実施形態では、グリシンHCL、クエン酸、水酸化アンモニウムなどの溶液を用いてpHを変化させることによって、これだけに限定されないが、EDTA、EGTAなどのキレート剤の使用、これだけに限定されないが、塩化カリウム（KCl）、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、ヨウ化ナトリウム、チオシアン酸ナトリウムなどの塩を使用したイオン強度および/もしくはカオトロピック効果によって、またはECMをグアニジンHCLもしくは尿素のような変性条件に曝露させることによって、MBVをECMから放出させ、分離する。

40

【0084】

50

特定の例では、MBVを、ECMをペプシン、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、プロテイナーゼK、塩類溶液、またはコラゲナーゼなどの酵素で消化した後に調製する。ECMを凍結融解させるまたは機械的な分解に供することができる。

【0085】

開示されるMBVはIL-33を含有する。一部の実施形態では、MBVにおいてCD63および/またはCD81の発現を検出することはできない。したがって、MBVは、CD63および/またはCD81を発現しない。特定の例では、ナノ小胞においてCD63およびCD81のどちらも検出することができない。他の実施形態では、MBVは、例えばウエスタンブロットによって検出可能なものなど、わずかに検出可能なレベルのCD63およびCD81を有する。これらのMBVは、CD63^{1°}CD81^{1°}である。当業者は、例えば、CD63およびCD81に特異的に結合する抗体を使用して、CD63^{1°}CD81^{1°}であるMBVを容易に同定することができる。これらのマーカーの低レベルを蛍光活性化細胞選別(FACS)などの手順および蛍光標識された抗体を使用して確立して、CD63およびCD81の少量および多量についての閾値を決定することができる。開示されるMBVは、生体液中に存在しているので、ECMの表面に一過性に付着し得るエキソソームなどのナノ小胞とは異なる。

【0086】

MBVは、リシルオキシダーゼ(Lox)を含む。一般に、ECMに由来するナノ小胞のLox含有量はエキソソームよりも多い。Loxは、MBVの表面に発現される。ナノLCMS/MSプロテオミクス解析を使用して、Loxタンパク質を検出することができる。Loxの定量は、以前に記載されている通り実施することができる(Hill R C, et al., Mol Cell Proteomics, 2015; 14(4): 961-73)。

【0087】

ある特定の実施形態では、MBVは、1つまたは複数のmiRNAを含む。特定の非限定的な例では、MBVは、miR-143、miR-145およびmiR-181のうちの1つ、2つ、または3つ全てを含む。MiR-143、miR-145およびmiR-181は、当技術分野で公知である。

【0088】

miR-145核酸配列は、参照により本明細書に組み込まれるMiRbase受託番号MI0000461で提供される。miR-145核酸配列は、CACCUUGUCCUCACGGUCCAGUUUCCAGGAUCCCUUAGAUGCUAAGAUGGGGAUUCCUGGAAAUACUGUUCUUGAGGUCAUGGUU(配列番号1)である。miR-181核酸配列は、参照により本明細書に組み込まれるmiRbase受託番号MI0000269で提供される。miR-181核酸配列は、AGAAAGGCUAUCAGGCCAGCCUUCAGAGGACUCCAAGGAACA UUCAACGCUGUCGGUGAGUUUGGGAUUUGAAAAACCAUGACCGUUGACUGUACCUUGGGGUCCUUA(配列番号2)である。miR-143核酸配列は、参照により本明細書に組み込まれるNCBI受託番号NR_029684.1、2018年3月30日で提供される。miR-143核酸配列は、GCGCAGCGCC CUGUCUCCA GCCUGAGGUG CAGUGCUGCA UCUCUGGUCA GUUGGGAGUC UGAGAUGAAG CACUGUAG CU CAGGAAGAGA GAAGUUGUUC UGCAGC(配列番号3)である。

【0089】

一部の実施形態では、投与後、MBVは、対象におけるマクロファージにおいてCD68およびCD11bの発現を維持する。開示されている実験研究では、ナノ小胞で処理したマクロファージは、主に、M2表現型を示すF4/80+Fizz1+である。したがって、一部の実施形態では、マクロファージはM2表現型を維持する。

【0090】

本明細書に開示されるMBVは、薬学的送達のための組成物に製剤化し、生体足場およ

10

20

30

40

50

びデバイスに使用することができる。MBVは、参照により本明細書に組み込まれるPCT公開第WO2017/151862号に開示されている。

MBVのECMからの単離

【0091】

MBVを作製するために、ECMを任意の目的の細胞に産生させることもでき、商業的供給源から利用することもできる。上記を参照されたい。MBVは、処置される対象と同じ種から作製することもでき、異なる種から作製することもできる。一部の実施形態では、これらの方法は、ECMを酵素で消化して消化されたECMを作製するステップを含む。特定の実施形態では、ECMをペプシン、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、コラゲナーゼ、メタロプロテイナーゼ、および/またはプロテイナーゼKのうちの1つまたは複数で消化する。特定の非限定的な例では、ECMをエラスターゼおよび/またはメタロプロテイナーゼのみで消化する。別の非限定的な例では、ECMをコラゲナーゼおよび/またはトリプシンおよび/またはプロテイナーゼKでは消化しない。他の実施形態では、ECMを界面活性剤で処理する。さらなる実施形態では、方法は、酵素の使用を含まない。特定の非限定的な例では、方法は、MBVを単離するために、塩化カリウムなどの塩などのカオトロピック剤またはイオン強度を利用する。追加的な実施形態では、ECMを、MBVの単離前にMBV含有量が増加するように操作することができる。

10

【0092】

一部の実施形態では、ECMを酵素で消化する。ECMを酵素で約12~約48時間、例えば、約12~約36時間などにわたって消化することができる。ECMを酵素で約12、約24、約36または約48時間にわたって消化することができる。特定の非限定的な一例では、ECMを酵素を用いて室温で消化する。しかし、消化は、約4、または約4から25の間の任意の温度で行うことができる。一般に、ECMを、酵素を用い、コラーゲン原線維を除去するのに十分な任意の時間の長さにとわたって、任意の温度で消化する。消化プロセスは、組織供給源に応じて変動し得る。必要に応じて、ECMを、酵素での消化前またはその後のいずれかに凍結および融解によって処理する。ECMをイオン性および/または非イオン性界面活性剤を含めた界面活性剤で処理することができる。

20

【0093】

次いで、消化されたECMを、例えば遠心分離によって処理して、原線維を含まない上清を単離する。一部の実施形態では、消化されたECMを、例えば、第1のステップとして約300~約1000gで遠心分離する。したがって、消化されたECMを、約400g~約750gで、例えば、約400g、約450g、約500gまたは約600gで遠心分離することができる。この遠心分離は、約10~約15分にとわたって、例えば、約10~約12分にとわたって、例えば、約10、約11、約12、約14、約14、または約15分にとわたって行うことができる。消化されたECMを含む上清を収集する。

30

【0094】

MBVはLoxを含む。一部の実施形態では、そのようなMBVを単離するための方法は、細胞外マトリックスをエラスターゼおよび/またはメタロプロテイナーゼで消化して消化された細胞外マトリックスを作製するステップと、消化された細胞外マトリックスを遠心分離してコラーゲン原線維レムナントを除去し、したがって原線維を含まない上清を作製するステップと、原線維を含まない上清を遠心分離して固形物を単離するステップと、固形物を担体中に懸濁させるステップとを含む。

40

【0095】

一部の実施形態では、消化されたECMを、第2のステップとして約2000g~約3000gで遠心分離することもできる。したがって、消化されたECMを、約2,500g~約3,000gで、例えば、約2,000g、2,500g、2,750gまたは3,000gで遠心分離することができる。この遠心分離は、約20~約30分にとわたって、例えば、約20~約25分にとわたって、例えば、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29または約30分にとわたって行うことができる。消化されたECMを含む上清を収集する。

50

【0096】

追加的な実施形態では、消化されたECMを、第3のステップとして約10,000～約15,000gで遠心分離することができる。したがって、消化されたECMを、約10,000g～約12,500gで、例えば、約10,000g、11,000gまたは12,000gで遠心分離することができる。この遠心分離は、約25～約40分にわたって、例えば、約25～約30分にわたって、例えば、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39または約40分にわたって行うことができる。消化されたECMを含む上清を収集する。

【0097】

これらの遠心分離ステップのうちの1つ、2つ、または3つ全てを独立に利用することができる。一部の実施形態では、3つ全ての遠心分離ステップを利用する。遠心分離ステップを例えば2回、3回、4回、または5回、繰り返すことができる。一実施形態では、3つ全ての遠心分離ステップを3回繰り返す。

【0098】

一部の実施形態では、消化されたECMを約500gで約10分にわたって遠心分離する、約2,500gで約20分にわたって遠心分離する、および/または約10,000gで約30分にわたって遠心分離する。これらのステップ(複数可)、例えば、3つ全てのステップを、2回、3回、4回、または5回、例えば3回、繰り返すことができる。したがって、非限定的な一例では、消化されたECMを約500gで約10分にわたって遠心分離し、約2,500gで約20分にわたって遠心分離し、約10,000gで約30分にわたって遠心分離する。これらの3つのステップを3回繰り返す。このようにして、原線維を含まない上清を作製する。

【0099】

次いで、原線維を含まない上清を遠心分離してMBVを単離する。一部の実施形態では、原線維を含まない上清を約100,000g～約150,000gで遠心分離する。したがって、原線維を含まない上清を約100,000g～約125,000gで、例えば、約100,000g、約105,000g、約110,000g、約115,000gまたは約120,000gで遠心分離する。この遠心分離は、約60～約90分にわたって、例えば、約70～約80分、例えば、約60、約65、約70、約75、約80、約85または約90分にわたって行うことができる。非限定的な一例では、線維を含まない上清を約100,000gで約70分にわたって遠心分離する。MBVである固形物を収集する。次いで、これらのMBVを、これだけに限定されないが、緩衝剤などの任意の目的の担体中に再懸濁させることができる。

【0100】

さらなる実施形態では、ECMを酵素で消化しない。これらの方法では、ECMをリン酸緩衝食塩水などの等張食塩溶液中に懸濁させる。次いで、塩を懸濁液に、塩の最終濃度が約0.1Mよりも高くなるように添加する。濃度は、例えば、最大約3M、例えば、約0.1Mの塩～約3M、または約0.1M～約2Mであり得る。塩は、例えば、約0.1M、0.15M、0.2M、0.3M、0.4M、0.7M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1.0M、1.1M、1.2M、1.3M、1.4M、1.5M、1.6M、1.7M、1.8M、1.9M、または2Mであり得る。一部の非限定的な例では、塩は、塩化カリウム、塩化ナトリウムまたは塩化マグネシウムである。他の実施形態では、塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、ヨウ化ナトリウム、チオシアン酸ナトリウム、ナトリウム塩、リチウム塩、セシウム塩またはカルシウム塩である。

【0101】

一部の実施形態では、ECMを塩類溶液中に約10分～約2時間、例えば、約15分～約1時間、約30分～約1時間、または約45分～約1時間にわたって懸濁させる。ECMを塩類溶液中に約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115または12

10

20

30

40

50

0分にわたって懸濁させることができる。ECMを塩類溶液中に4 から約50 まで、例えば、これだけに限定されないが、約4 ~約25 または約4 ~約37 の温度で懸濁させることができる。特定の非限定的な例では、ECMを塩類溶液中に約4 で懸濁させる。他の特定の非限定的な例では、ECMを塩類溶液中に約22 または約25 (室温)で懸濁させる。別の非限定的な例では、ECMを塩類溶液中に約37 で懸濁させる。

【0102】

一部の実施形態では、方法は、細胞外マトリックスを約0.4Mよりも高い塩濃度でインキュベートするステップと、消化された細胞外マトリックスを遠心分離してコラーゲン原線維レムナントを除去するステップと、上清を単離するステップと、上清を遠心分離して固形物を単離するステップと、固形物を担体中に懸濁させ、それにより、MBVを細胞外マトリックスから単離するステップとを含む。

10

【0103】

塩類溶液中でインキュベートした後、ECMを遠心分離してコラーゲン原線維を除去する。一部の実施形態では、消化されたECMを約2000g~約5000gで遠心分離することもできる。したがって、消化されたECMを約2,500g~約4,500gで、例えば、約2,500g、約3,000g、3,500、約4,000g、または約4,500gで遠心分離することができる。特定の非限定的な一例では、遠心分離を約3,500gで行う。この遠心分離は、約20~約40分にわたって、例えば、約25~約35分にわたって、例えば、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30分、約31、約32、約33、約34または約35分にわたって行うことができる。次いで、上清を収集する。

20

【0104】

追加的な実施形態では、次いで、上清を、第3のステップとして、約100,000~約150,000gで遠心分離することができる。したがって、消化されたECMを、約100,000g~約125,000gで、例えば、約100,000g、110,000gまたは120,000gで遠心分離することができる。この遠心分離は、約30分~約2.5時間にわたって、例えば、約1時間~約3時間にわたって、例えば、約30分、約45分、約60分、約90分、または約120分(2時間)にわたって行うことができる。固形物を収集し、緩衝生理食塩水などの溶液中に懸濁させ、それにより、MBVを単離する。

30

【0105】

さらに他の実施形態では、ECMを、これだけに限定されないが、リン酸緩衝食塩水などの等張緩衝塩類溶液中に懸濁させる。遠心分離または他の方法を使用して大きな粒子を除去することができる(以下を参照されたい)。次いで、限外濾過を利用して、MBVをECMから単離し、粒子は、約10nmから約10,000nmの間、例えば、約10から約1,000nmの間、例えば、約10nmから約300nmの間である。

【0106】

特定の非限定的な例では、等張緩衝食塩溶液は約0.164mMの総塩濃度および約7.2~約7.4のpHを有する。一部の実施形態では、等張緩衝食塩溶液は、0.002MのKCl~約0.164MのKCl、例えば、約0.0027MのKClを含む(リン酸緩衝食塩水中のKClの濃度)。次いで、この懸濁液を超遠心分離によって処理する。

40

【0107】

等張緩衝塩類溶液中でインキュベートした後、ECMを遠心分離してコラーゲン原線維を除去する。一部の実施形態では、消化されたECMを約2000g~約5000gで遠心分離することもできる。したがって、消化されたECMを約2,500g~約4,500gで、例えば、約2,500g、約3,000g、3,500、約4,000g、または約4,500gで遠心分離することができる。特定の非限定的な一例では、遠心分離を約3,500gで行う。この遠心分離は、約20~約40分にわたって、例えば、約25~約35分にわたって、例えば、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約

50

26、約27、約28、約29、約30分、約31、約32、約33、約34または約35分にわたって行うことができる。

【0108】

高分子量材料を懸濁液から除去するために精密濾過と遠心分離とを使用し、組み合わせることができる。一実施形態では、精密濾過を使用して200nmを超えるものなどのサイズが大きな分子材料を除去する。別の実施形態では、遠心分離を使用することによってサイズが大きな材料を除去する。第3の実施形態では、精密濾過および超遠心分離の両方を使用して、高分子量材料を除去する。約10,000nmよりも大きい、約1,000nmよりも大きい、約500nmよりも大きい、または約300nmよりも大きい材料などの高分子量材料を懸濁ECMから除去する。

10

【0109】

次いで、精密濾過の流出液、または上清を限外濾過に供する。したがって、約10,000nm未満、約1,000nm未満、約500nm未満、または約300nm未満の粒子を含む流出液を収集し、利用する。次いで、この流出液を、分画分子量(MWCO)が3,000~100,000である膜を用いた限外濾過に供する。実施例では100,000MWCOを使用した。

対象を処置するための方法

【0110】

本開示の方法は、対象にIL-33を含有するMBVの治療有効量を投与し、それにより、対象を処置し、対象における疾患または障害を阻害するステップを含む。一部の実施形態では、方法により、疾患または障害を防止する。

20

【0111】

非限定的な一実施形態では、疾患または障害は、臓器または組織の線維症である。例えば、線維症は、肝硬変、肺線維症、心臓線維症、縦隔線維症、関節線維症、骨髄線維症、腎性全身性線維症、ケロイド線維症、強皮症線維症(scleroderma fibrosis)、腎線維症、リンパ組織線維症、動脈線維症、毛細血管線維症、血管線維症、または睥線維症である。一実施形態では、線維症は肺線維症である。線維症は、特発性肺線維症、疾患もしくは環境毒素への曝露に起因する肺線維症、または放射線により誘発される肺線維症を含み得る。さらに別の実施形態では、線維症は、心臓線維症である。心臓線維症は、反応性間質性線維症、置換性線維症、浸潤性線維症、または心内膜心筋線維症を含み得る。一実施形態では、線維症は、急性または慢性臓器拒絶に関連する。例えば、一実施形態では、線維症は、移植された心臓の急性または慢性拒絶に関連する心臓線維症である。

30

【0112】

別の非限定的な実施形態では、疾患または障害は、心疾患または障害である。一実施形態では、疾患または障害は、心筋梗塞ではない心疾患または障害である。別の実施形態では、心疾患または障害は、心筋虚血ではない心疾患または障害である。さらに別の実施形態では、心疾患または障害は、心筋梗塞でも心筋虚血でもない心疾患または障害である。一実施形態では、疾患または障害は、心筋梗塞または心筋虚血である。一実施形態では、心疾患または障害は、心筋梗塞、心筋虚血、急性冠状動脈症候群、慢性安定狭心症、不安定狭心症、血管形成術、一過性脳虚血発作、虚血性再灌流傷害、跛行、血管閉塞、動脈硬化症、心不全、慢性心不全、急性非代償性心不全、心肥大、大動脈弁疾患、大動脈弁または僧帽弁狭窄症、心筋症、心房細動、心不整脈、および心膜疾患から選択される。一実施形態では、心疾患または障害は、急性冠状動脈症候群、慢性安定狭心症、不安定狭心症、血管形成術、一過性脳虚血発作、虚血性再灌流傷害、跛行、血管閉塞、動脈硬化症、心不全、慢性心不全、急性非代償性心不全、心肥大、大動脈弁疾患、大動脈弁または僧帽弁狭窄症、心筋症、心房細動、心不整脈、および心膜疾患から選択される。さらに別の実施形態では、疾患は、急性冠状動脈症候群、慢性安定狭心症、不安定狭心症、血管形成術、一過性脳虚血発作、跛行、血管閉塞、動脈硬化症、心不全、心肥大、および心筋症である。さらに別の実施形態では、疾患は、心筋梗塞、心筋虚血、急性冠状動脈症候群、慢性安定

40

50

狭心症、不安定狭心症、血管形成術、一過性脳虚血発作、跛行、血管閉塞、動脈硬化症、心不全、心肥大、および心筋症である。

【0113】

さらに別の非限定的な実施形態では、疾患または障害は、実質臓器移植片拒絶である。一実施形態では、移植された実質臓器は、肝臓、腎臓、心臓、皮膚、肺、膵臓、または腸である。一実施形態では、移植された実質臓器は肺である。別の実施形態では、移植された実質臓器は心臓である。一実施形態では、移植片拒絶は慢性臓器移植片拒絶である。別の実施形態では、移植片拒絶は急性臓器移植片拒絶である。

【0114】

さらに別の非限定的な実施形態では、疾患または障害は、移植された組織、例えば、心臓弁、血管、骨、角膜、または顔、手、もしくは指を含めた複合組織の同種異系移植片の拒絶である。

10

【0115】

心疾患もしくは障害、実質臓器移植片拒絶、または臓器もしくは組織の線維症などの疾患または障害を有するまたはそれが発生するリスクがある対象を、膜に結合したST2を通じたIL-33シグナル伝達を増大させることによって処置することができる。参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0003199A1号を参照されたい。MBVはIL-33を含み、したがって、これらの対象に対して使用することができる。膜封入型IL-33を含有するMBVの使用により、IL-33のST2受容体への結合が妨げられ、炎症促進性キナーゼカスケードの誘導が軽減される。一部の非限定的な例では、ナノ小胞は、対象におけるマクロファージにおいてCD68およびCD11bの発現を維持する。

20

【0116】

IL-33は、MBVの内腔中に安定に存在する。MBV内に封入されたIL-33は、MBVの細胞内取り込み後に古典的なST2受容体シグナル伝達経路をバイパスして、免疫細胞分化および/または機能を方向付ける。

【0117】

一部の実施形態では、対象を、開示される方法を使用して処置することができ、この場合、対象は、心疾患または障害を有することがすでに診断されている（本明細書に提示される方法および/または当技術分野で公知の方法を用いて）対象、ならびに今後のある時点で心疾患または障害に罹患するリスクがあるとみなされる対象を含め、心疾患または障害を有するまたはそれが発生するリスクがある。この後者の対象の群は、心血管イベントに罹患するリスクがある対象を含む。さらなる実施形態では、心疾患は心筋梗塞でも心筋虚血でもない。他の実施形態では、障害は、心臓線維症および/または心不全である。一実施形態では、障害は、心不全である。

30

【0118】

方法および組成物は、任意の心疾患または障害の急性、慢性、および予防的処置において有用である。本明細書で使用される場合、急性処置は、虚血性イベントなどの特定の疾患または障害を現在有する対象の処置を指す。予防的処置は、疾患または障害を有するリスクがあるが、現在は疾患または障害を有さないまたはその症状を経験していない対象の処置を指す。処置を必要とする対象が特定の心疾患または障害を有する場合、心疾患または障害を処置することとは、疾患もしくは障害またはその疾患もしくは障害から生じる1つもしくは複数の症状を好転させる、低減するまたは排除することを指す。処置を必要とする対象が、心疾患または障害が発生するリスクがある対象である場合、対象を処置することとは、疾患または障害が発生する対象のリスクを低減することを指す。

40

【0119】

移植片対宿主病（GVHD）を防止または処置するための方法が本明細書に開示される。したがって、GVHDまたはGVHDのリスクを有する対象を処置のために選択することができる。GVHDは急性であっても慢性であってもよい。

【0120】

50

一部の実施形態では、実質臓器移植などの移植された臓器のレシピエントである対象を処置する。移植された臓器の例としては、腎臓、皮膚、肝臓、複合組織の同種異系移植片（CTA；顔、手、肢、陰茎などのものを含む）または心臓を含めた実質臓器移植片が挙げられる。腎移植は実質臓器移植のおよそ60%を占め、その次に、肝臓移植が21%、心臓が8%、肺が4%であり、残りの7%は膵臓および腸などの他の臓器移植が占める。（OPTN/SRTR Annual Report 2004）。臓器の型は特に限定されず、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、肺、および小腸などの実質性臓器を含む。しかし、開示される方法は、心臓弁、血管、皮膚、骨、および角膜の移植にも適用可能である。したがって、任意の型の臓器移植を受けた対象を処置のために選択することができる。移植は実質臓器移植であり得る。実質臓器は心臓であり得る。MBVは、移植時に、または移植手順後、例えば、移植の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10日後に投与することができる。一部の非限定的な例では、MBVを移植片に直接投与することができる。

【0121】

実質臓器移植の急性または慢性拒絶などの拒絶を抑制するための方法が開示される。本発明の抑制剤によって抑制される拒絶の型は特に限定されないが、実際の移植医療が問題になる急性拒絶であってよい。これらの拒絶は、同種異系移植片が、組織適合性を決定する主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）の違いに起因して外来抗原と認識され、したがって、レシピエントの細胞傷害性T細胞およびヘルパーT細胞の活性化を通じて攻撃される病理学的状態である。急性拒絶は、一般に移植の3カ月以内に発生する。しかし、拒絶は、移植の3カ月後またはそれよりも後の同種異系移植片組織への細胞浸潤と認識することもできる。開示される方法は、移植の3カ月以内または移植の3カ月後を含めた移植後の任意の時点で有用である。一部の実施形態では、方法により、損傷が抑制されることにより、移植された臓器の生存能力が改善される。

【0122】

さらに別の実施形態では、対象は、線維症関連疾患を有するまたは有するリスクがある。MBVの治療有効量を使用して線維症を低減するための方法も提供される。そのような方法は、*in vitro*で行うこともでき、*in vivo*で行うこともできる。本明細書で使用される場合、「接触させること」は、MBVなどの作用物質を、1つもしくは複数の細胞と直接相互作用するように、または間接的に、1つもしくは複数の細胞が結果として何らかの方法で影響を受けるように置くことを指す。方法を*in vivo*で行う場合、対象にMBVを線維症の低減に有効な量で投与する。さらなる実施形態では、開示される方法により、線維症が生じている組織または臓器に対してネイティブな解剖学的に適当な細胞が増加する。

【0123】

心臓線維症の場合では、対象にMBVを線維症の低減および/または心筋細胞（cardiac muscle cell）の増加に有効な量で投与する。ネイティブな細胞の成長または線維症の低減を評価するための方法は、当業者には容易に明らかである。したがって、線維症関連疾患を有するまたはそれが発生するリスクがある対象もMBVを投与することによって処置することができる。特定の非限定的な実施形態では、線維症を処置するための方法が提供される。それらとしては、これだけに限定されないが、肝硬変、肺線維症、心臓線維症、縦隔線維症、関節線維症、骨髄線維症、腎性全身性線維症、ケロイド線維症、強皮症線維症、腎線維症、リンパ組織線維症、動脈線維症、毛細血管線維症、血管線維症、または膵線維症が挙げられる。特定の非限定的な例では、障害は、間質性肺線維症または職業性曝露によって誘発される線維症などの肺の線維症である。

【0124】

一部の実施形態では、肺の処置のために、MBVを含む組成物を吸入用調製物を使用して投与することができる。これらの吸入用調製物は、エアロゾル、粒子などを含み得る。一般に、吸入用の粒子サイズの目標は、当該医薬が吸収のために肺の肺胞領域に到達するように、約1 μ mまたはそれ未満である。しかし、肺内の沈着領域を調整するために粒子サイズを改変することができる。したがって、呼吸細気管支および気腔内への沈着を実現

10

20

30

40

50

するために、より大きな粒子を利用することができる（例えば、直径約 1 ~ 約 5 μm など）。

【0125】

吸入による投与のために、組成物を、適切な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切な気体を使用し、加圧されたパックまたはネブライザーからのエアロゾル噴霧提示の形態で都合よく送達することができる。加圧されたエアロゾルの場合は、計量量（metered amount）を送達するための弁を提供することによって投薬単位を決定することができる。化合物および適切な粉末基剤（ラクトースおよびデンプンなど）の粉末ミックスを含有する、吸入器または吹き入れ器に使用するためのカプセルおよびカートリッジを製剤化することができる。

10

【0126】

別の実施形態では、MBVと併せて、抗炎症剤、気管支拡張薬、酵素、去痰薬、ロイコトリエンアンタゴニスト、ロイコトリエン形成阻害剤、または肥満細胞安定剤などの追加的な薬剤の治療有効量を投与する。これらは、例えば単一の製剤として同時に投与することもでき、逐次的に投与することもできる。

【0127】

処置の効果は、当業者に公知の方法によって肺機能をモニタリングすることにより測定することができる。例えば、肺機能に関する種々の測定可能なパラメータを、処置前、処置中、または処置後に試験することができる。肺機能は、これだけに限定されないが、吸気流速、呼気流速、および肺容量を含めた、いくつかの物理的に測定可能な肺の働きのいずれかを試験することによってモニタリングすることができる。数式および統計学的方法によって決定される、これらのパラメータの1つまたは複数の統計的に有意な増加により、処置の有効性が示される。

20

【0128】

診療で最も一般的に使用される肺機能の測定方法は、特定のパラメータを測定するための吸気および呼気に関する動作の時限測定を伴う。例えば、FVCにより、患者が最初に深く吸い込んだところから力強く吐き出したリットル単位の総体積を測定する。このパラメータをFEV1と併せて評価することにより、気管支収縮を定量的に評価することが可能になる。当業者に周知の数式によって決定されるFVCまたはFEV1の統計的に有意な増加は気管支収縮の減少を反映し、それにより、治療が有効であることが示される。

30

【0129】

努力肺活量の決定に伴う問題は、努力肺活量に関する動作（すなわち、最大吸気から最大呼気までの努力呼出）が大きく技法依存性であることである。言い換えれば、所与の対象により、一連の連続したFVC動作の間に異なるFVC値が生じ得る。努力呼出動作の midpoint にわたって決定されるFEF₂₅₋₇₅または努力呼気流量は、FVCよりも技法依存性が低い傾向がある。同様に、FEV1はFVCよりも技法依存性が低い傾向がある。したがって、当業者に周知の数式によって決定されるFEF₂₅₋₇₅またはFEV1の統計的に有意な増加は気管支収縮の減少を反映し、それにより、治療が有効であることが示される。

40

【0130】

吐き出された空気の体積を肺機能の指標として測定することに加えて、呼気性周期の種々の部分にわたって測定される1分当たりのリットル単位の流量が、患者の肺機能の状態を決定することにおいて有用であり得る。具体的には、努力最大呼出中の最も高い1分当たりのリットル単位の空気流速として取得されるピーク呼気流量が喘息および他の呼吸器疾患を有する患者の全体的な肺機能とよく相関する。したがって、投与後の、当業者に周知の数式によって決定されるピーク呼気流量の統計的に有意な増加により、治療が有効であることが示される。

【0131】

一部の実施形態では、心疾患もしくは障害または線維症関連疾患、または移植片拒絶の

50

診断をすでに受けており、それを処置するための別の治療剤を用いた処置の過程にある対象を、処置のために選択する。治療剤は、化学的薬剤であっても生物学的薬剤であってもよく、また、食事および/または運動などの薬物によらない処置であってもよい。一部の実施形態では、治療剤（心疾患または障害に対するもの）は、C反応性タンパク質（CRP）のレベルを低下させる治療剤の使用を含む。他の実施形態では、治療剤（心疾患または障害に対するもの）は、スタチンの使用を含む。さらなる実施形態では、CRPレベルが1mg/Lを超える対象を、処置のために選択する。治療剤は、例えば、移植片拒絶を処置する場合には免疫抑制剤（immunosuppressive agent）であり得る。例えば、線維症関連疾患に対する治療は、抗炎症剤または免疫抑制剤の使用であり得る。

10

【0132】

一部の実施形態では、例えば心筋梗塞などの一次（第1の）心血管イベントを有するまたは血管形成術を受けた対象を、開示される方法を用いた処置のために選択する。一次心血管イベントを有したことがある対象は、二次（第2の）心血管イベントのリスクが上昇している。一部の実施形態では、対象は、一次心血管イベントを有したことがないが、対象が1つまたは複数の危険因子を有することが原因で心血管イベントを有するリスクが上昇している。一次心血管イベントの危険因子の例としては、高脂血症、肥満症、糖尿病、高血圧症、高血圧前症、全身性炎症のマーカーのレベル（複数可）の上昇、年齢、心血管イベントの家族歴および喫煙が挙げられる。心血管イベントのリスクの度合いは、対象が有する危険因子の数の多さおよび重症度または大きさに依存する。対象における心血管イベントのリスクを危険因子の存在および重症度に基づいて評価するためにリスクチャートおよび予測アルゴリズムが利用可能である。1つのそのような例は、Framingham Heart Studyリスク予測スコアである。対象の10年算出Framingham Heart Studyリスクスコアが5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%を超えるまたはそれよりも大きい場合、対象は心血管イベントを有するリスクが上昇している。対象における心血管イベントのリスクを評価するための別の方法は、CRPなどの全身性炎症のマーカーのレベルの測定値をFramingham Heart Studyリスク予測スコアに組み入れる、全般リスクスコアである。対象における心血管イベントのリスクを評価する他の方法としては、冠動脈カルシウムスキニング、心臓磁気共鳴画像法および/または磁気共鳴血管造影が挙げられる。一部の実施形態では、開示される方法を用いた処置のために選択される対象は、一次心血管イベントを有し、1つまたは複数の他の危険因子を有する。別の実施形態では、対象は、脂質レベルを低下させるためにスタチンによる治療中である。別の実施形態では、対象は、健康な脂質レベルを有する（すなわち、対象は高脂血症ではない）。したがって、一実施形態では、患者に心疾患または障害が発生することを防止するまたは発生するリスクを低減するために、患者にMBVを本発明の方法に従って投与する。言い換えれば、MBVを患者に、心疾患または障害に対する予防法として投与する。そのような例では、患者は、心疾患または障害の1つまたは複数の危険因子を示していることが原因で予防法を必要としているが、患者は、まだ心疾患もしくは障害と診断されていない、または心疾患もしくは障害の診断に必要な全ての症状を示していない。一部の実施形態では、脳卒中を有しているまたは有していた対象を、処置のために選択する。脳卒中（本明細書では虚血性脳卒中および/または脳血管虚血とも称される）は、World Health Organizationにより、限局性または全般的な大脳機能障害の臨床徴候が急速に発生しており、症状が少なくとも24時間続くことと定義される。脳卒中は、血管に起因する影響以外の明らかな原因がない場合には死亡にも関係付けられる。脳卒中は、一般には、脳への血管または脳内の血管の遮断または閉塞によって引き起こされる。完全に閉塞すると、数秒以内に大脳循環の停止によりニューロン電氣的活動の休止が引き起こされる。エネルギー状態およびイオン恒常性が悪化して数分以内に、高エネルギーリン酸塩の枯渇、膜イオンポンプ機能停止、細胞内カリウムの流出、塩化ナトリウムおよび水の流入、ならびに膜脱分極が起こる。閉塞が5~10分

20

30

40

50

よりも長く持続すると、不可逆的な損傷がもたらされる。しかし、不完全な虚血では、転帰を評価することは難しく、転帰は残留している灌流および酸素の利用可能性に大きく依存する。大脳血管の血栓性閉塞後に虚血が完全になることはめったにない。側副血行および局所的灌流圧に応じて、いくらかの残留する灌流が通常は虚血領域において持続する。開示される方法は、脳卒中の処置に有用である。

【0133】

虚血性イベントは血管系のどこでも起こり得るが、頸動脈分岐部および内頸動脈の起点が、脳虚血をもたらす大脳血管の血栓性閉塞の発生頻度が最も高い部位である。狭窄症または血栓症に起因する血流の減少の症状は、中大脳動脈疾患によって引き起こされる症状と同様である。眼動脈を通る血流は一過性黒内障または一過性単眼盲が生じるのに十分に影響を受けることが多い。重症両側性内頸動脈狭窄症の結果、大脳半球の低灌流が生じ得る。これは、急性に虚血した半球と同側の急性頭痛と共に顕在化する。血流の閉塞または減少の結果として前交通動脈より遠位の1つの前大脳動脈の虚血が伴い、それにより、反対側の脚、および、頻度は低い近位の腕に運動感覚および皮質感覚の症状が生じる。前大脳動脈の閉塞または不十分な灌流の他の顕在化は、歩行失調および時には傍矢状前頭葉の損傷に起因した尿失禁を含む。自発語の減少として顕在化する言語障害が全身性の精神運動活動の低下に関連し得る。

【0134】

脳卒中を有する対象は、経験する症状によって、および/またはCTおよびMRIイメージングなどの介入的および非介入的診断ツールを含めた身体検査によって脳卒中と診断される。脳卒中を有する対象は、以下の症状の1つまたは複数を示し得る：麻痺、衰弱、感覚および/または視覚の低下、しびれ、刺痛、失語症（例えば、話すことができないことまたは不明瞭発語、読み書きの困難）、失認（すなわち、知覚刺激を認識または識別することができないこと）、記憶喪失、協調困難、嗜眠、眠気または意識消失、排尿調節または排便調節の欠如、および認知機能低下（例えば、認知症、注意持続時間の限定、集中できないこと）。医用画像技法を使用すると、脳卒中を有する対象を、梗塞を有する対象または脳内出血を有する対象として同定することが可能であり得る。

【0135】

提供される組成物および方法は、脳卒中を経験した患者に使用することもでき、脳卒中を防止するための予防的処置とすることもできる。塞栓の放出、血圧の低下または脳への血流の減少のリスクがある外科的または診断的手順を有する対象に対して、手順の結果として生じる任意の虚血性イベントに起因する傷害を低減するために、短期予防的処置が指示される。脳への血流の減少が導かれる恐れがある心臓の状態、または脳脈管構造に直接影響を及ぼす状態を有する対象に対しては長期または慢性予防的処置が指示される。予防的なものである場合、上記の通り、処置は、虚血性脳卒中のリスクがある対象に対するものである。対象が脳卒中を経験している場合、処置は、急性処置を含み得る。脳卒中の対象に対する急性処置とは、状態の症状の発症時もしくは発症の48時間以内、好ましくは状態の症状の発症の24時間以内、より好ましくは12時間以内、より好ましくは6時間以内、なおより好ましくは1、2もしくは3時間以内、または診断時すぐに、または医療関係者により脳卒中が生じたことが疑われた時に本発明の組成物を投与することを意味する。

【0136】

さらに他の実施形態では、対象は、心筋梗塞を有するまたは心筋梗塞を有するリスクがある対象であり得る。「心筋梗塞を有する」とは、対象が心筋梗塞を現在有しているまたは罹患したことがあることを意味する。一部の実施形態では、投与は、心血管イベント、または心疾患もしくは障害の診断もしくは疑いの前（やがて疑われるもしくは診断される場合）、または48時間以内に行われるが、心血管イベント、または心疾患もしくは障害の診断もしくは疑いの後、例えば、その後14日以内の投与が対象に有益な場合もある。即時投与は、心血管イベントまたは心疾患もしくは障害の診断または疑いから15、20、30、40もしくは50分以内、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、

10

20

30

40

50

15、18、20もしくは22時間以内または1もしくは2日以内の投与も含み得る。さらに別の実施形態では、IL-33を含有するMBVを、心血管イベントまたは心疾患もしくは障害の診断または疑い時またはその直後に開始して、数日間、1週間または数週間（例えば、1、2、3または4週間）にわたって投与することができる。

【0137】

心筋梗塞を診断するためのいくつかの臨床検査が当技術分野で周知である。一般に、検査は、4つの主要なカテゴリーに分けることができる：（1）組織壊死および炎症の非特異的指標、（2）心電図、（3）血清中酵素の変化（例えば、クレアチンホスホキナーゼレベル）および（4）心臓イメージング。当業者は、対象が心筋梗塞のリスクを有するか、それに罹患しているか、またはそれに罹患したことがあるかを決定するために前述の検査のいずれかを容易に適用することができる。

10

【0138】

対象は、心不全を有し得る。心不全は、心臓のポンプ機能障害という共通因子によって結び付けられた多様な病因の臨床的症候群であり、心臓が、代謝を行う組織の要求と釣り合うように血液を送り出すことができないまたは充満圧の上昇によってしか血液を送り出すことができないことを特徴とする。

【0139】

さらに他の実施形態では、対象は、心肥大を有する。この状態は、一般には、明白な先立つ原因を伴わない、通常は非拡張房室（nondilated chamber）の左室肥大を特徴とする。現行の診断方法は心電図および心エコー図を含む。しかし、多くの患者は無症候であり、疾患が分かっている患者の親類であり得る。残念ながら、この疾患の最初の顕在化は突然死であり得、これは小児および若年成人において、多くの場合、労作中または労作後に頻繁に起こる。

20

【0140】

別の実施形態では、対象は、心疾患もしくは障害またはそれらのリスクのマーカーのレベルが上昇している。マーカーは、例えば、コレステロール、低密度リポタンパク質コレステロール（LDLC）または全身性炎症のマーカーであり得る。マーカーのレベル（複数可）の上昇は、レベルが健康な対象集団（例えば、心疾患または障害の徴候および症状を有さないヒト対象）の平均を超えているレベルである。マーカーがCRPである場合、CRPレベル>1がレベルの上昇とみなされる。

30

【0141】

線維症を有する対象を選択することができる。一部の実施形態では、対象は、肝硬変、肺線維症、心臓線維症、縦隔線維症、関節線維症、骨髄線維症、腎性全身性線維症、ケロイド線維症、強皮症線維症、腎線維症、リンパ組織線維症、動脈線維症、毛細血管線維症、血管線維症、または脾線維症と診断されている。これだけに限定されないが、シリカ、アスベスト、ベリリウム、炭塵、またはポーキサイトを含めた無機粒子に曝露している、または曝露するリスクがある対象を処置のために選択することができる。間質性肺線維症を有する対象を処置のために選択することができる。心臓線維症を有する対象を処置のために選択することができる。開示される方法を使用して、対象における線維症を処置または阻害することができる。

40

【0142】

医薬組成物は、MBV、および必要に応じて1つまたは複数の追加的な作用物質を含み得る。これらの組成物は、対象に投与するため、または疾患過程を遅延させる、防止する、発生リスクを低減する、もしくは処置する、もしくは低減するために、様々なやり方で製剤化することができる。本明細書に記載の組成物は、組成物により最初の病変の転移が防止されるような適用のために製剤化することもできる。一部の実施形態では、組成物を心臓内投与などの局所投与のために製剤化する。局所投与は、移植片に対し、対象への移植前および/または移植後になされるものであり得る。MBVは、非経口投与、例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、腹腔内、胸骨内、もしくは関節内注射もしくは注入、または舌下、経口、局部、鼻腔内、もしくは経粘膜投与によるもの、または肺への吸入によ

50

るものを含めた任意の経路によって投与することができる。適当な投与経路は医師が選択することができる。MBVを含む医薬組成物は、局所使用および全身使用のどちらのためにも製剤化することができ、ヒト医学または獣医学において使用するために製剤化することができる。一部の実施形態では、組成物を注射またはカテーテルによって投与することができる。投与は静脈内または筋肉内であり得る。

【0143】

開示された組成物を1回または繰り返し投与することができる。開示された組成物を局所的にまたは全身的に投与することができる。開示された組成物を点滴注入などの静脈内注射、皮下注射、局所投与または任意の他の経路により、月に1回から数回、例えば、週に2回、週に1回、2週間毎に1回、または4週間毎に1回、投与することができる。毎日、週2回、毎週、月2回または毎月などの定義された時間間隔にわたってなど、複数の処置が構想される。投与スケジュールは、例えば、週に2回または週に1回の投与間隔を2週間毎に1回、3週間毎に1回、または4週間毎に1回に延ばすことによって調整することができる。一部の実施形態では、方法は、移植後の臓器機能および/または血液検査値の変化をモニタリングするステップを含む。組成物を対象に臓器移植前、臓器移植時、または臓器移植後に投与することができる。投与は、疾患の抑制または防止が望まれる任意のときに、例えば、対象のある特定の年齢で、または実質臓器移植を受けた後に開始することができる。

10

【0144】

本開示の方法および組成物は一般にはヒト対象を処置するために使用されるが、他の霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシなどの他の脊椎動物における同様または同一の疾患を処置するためにも使用することができる。適切な投与フォーマットは、医療実践者により、各対象に対して個別に最良に決定され得る。種々の薬学的に許容される担体およびそれらの製剤は、標準の製剤専門書、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martinに記載されている。Wang, Y. J. and Hanson, M. A., Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report No. 10, Supp. 42: 2S, 1988も参照されたい。医薬組成物の剤形は、選択される投与形式によって決定される。一部の実施形態では、対象はヒトであり、MBVはヒト組織由来である。

20

【0145】

一部の実施形態では、開示された組成物を心臓移植片などの目的の患部領域または組織における細胞に局所投与した場合、開示された組成物により、筋肉細胞増殖が増加し、および/または炎症が低減する。

【0146】

MBV (ECM由来ナノ小胞) を例えば注射または注入用の非経口用組成物として提供する場合、一般に、水性担体、例えば、pH約3.0~約8.0、好ましくはpH約3.5~約7.4、例えば、約7.2~約7.4の等張性緩衝液に懸濁させる。有用な緩衝液としては、クエン酸ナトリウム-クエン酸およびリン酸ナトリウム-リン酸、および酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液が挙げられる。

40

【0147】

調製物の治療有効量が注射または送達後長時間または数日にわたって血流中に送達されるように持続性または「デポ」緩徐放出調製物の形態を使用することができる。持続放出組成物の適切な例としては、適切なポリマー材料(例えば、成形品、例えば、フィルムもしくはマイクロカプセルの形態の半透性ポリマートリックスなど)、適切な疎水性材料(例えば、許容される油中エマルジョンなど)またはイオン交換樹脂、およびやや難溶性の誘導体(例えば、やや難溶性の塩など)が挙げられる。持続放出製剤は経口的に、直腸に、非経口的に、大槽内に(intracistemally)、腔内に、腹腔内に、局部的に(散剤、軟膏剤、ゲル剤、滴剤または経皮吸収パッチとして)、頬側に、または経口もしくは鼻スプレーとして投与することができる。医薬組成物は、生分解性ポリマーな

50

らびに／または多糖ゼリー化および／もしくは生体接着性ポリマー、両親媒性ポリマー、粒子の界面特性を改変する作用物質、ならびに薬理活性のある物質を含む粒子の形態であってよい。これらの組成物は、活性物質の制御放出を可能にするある特定の生体適合性特色を示す。米国特許第5,700,486号を参照されたい。

【0148】

開示される方法において有用な薬学的に許容される担体および賦形剤は、従来のものである。例えば、非経口製剤は、通常、例えば水、生理的食塩水、他の平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどの、薬学的および生理的に許容される流体ビヒクルである注射液を含む。含めることができる賦形剤は、例えば、ヒト血清アルブミンまたは血漿調製物などのタンパク質である。所望であれば、投与される医薬組成物は、微量の無毒性補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルピタンモノラウレートも含有し得る。そのような剤形の実際の調製方法は公知である、または当業者には明らかになる。

10

【0149】

投与されるMBVの量は、処置される対象、病気の重症度、および投与様式に依存し、処方する臨床医の判断に委ねることが最良である。これらの縛りの中で、投与される製剤は、ある量のMBVを処置される対象において所望の効果を實現するために有効な量で含有する。

【0150】

正確な用量は、当業者により、特定の画分の効力、対象の年齢、体重、性別および生理的状态に基づいて容易に決定される。適切な濃度としては、これだけに限定されないが、約1ng/ml~100gr/mlが挙げられる。

20

【0151】

処置することを必要とする対象を処置するための本明細書に提示される方法は、追加的な治療剤の使用を含み得る。MBVを含む組成物は、追加的な治療剤も含み得る。そのような追加的な治療剤としては、抗脂血症薬、抗炎症剤、抗血栓剤、線維素溶解剤、抗血小板剤、直接トロンピン阻害剤、糖タンパク質IIb/IIIa受容体阻害剤、細胞接着分子に結合し、白血球(white blood cell)のそのような分子に付着する能力を阻害する薬剤(例えば、抗細胞接着分子抗体)、アルファ-アドレナリン作動性遮断薬、ベータ-アドレナリン作動性遮断薬、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤、アンジオテンシン系阻害剤、抗不整脈薬、カルシウムチャンネル遮断薬、利尿薬、強心薬、血管拡張薬、昇圧剤、チアゾリジンジオン、カンナビノイド-1受容体遮断薬、免疫抑制剤およびこれらの任意の組合せが挙げられる。

30

【0152】

抗脂血症薬は、総コレステロールを減少させる、LDLCを減少させる、トリグリセリドを減少させる、および／またはHDLCを増加させる薬剤である。抗脂血症薬としては、スタチン、非スタチン抗脂血症薬およびこれらの組合せが挙げられる。スタチンは、ヒト総コレステロール、LDLCおよびトリグリセリドレベルの低下に有効であることが示された医薬のクラスである。スタチンは、コレステロール合成のステップで作用する。スタチンは、細胞により合成されるコレステロールの量を減少させることにより、HMG-CoA還元酵素遺伝子の阻害を通じて、肝細胞によるLDLCの取り込みの増加を完結させるイベントのサイクルを開始させる。LDLCの取り込みが増加すると、血液中の総コレステロールおよびLDLCレベルが低下する。両方の因子の血中レベルが低いことは、アテローム性動脈硬化症および心臓病のリスクが低いことに関連付けられ、スタチンはアテローム硬化症の罹患率および死亡率を低下させるために広く使用されている。

40

【0153】

スタチンとの例としては、これだけに限定されないが、シンバスタチン(ZOCOR(登録商標))、ロバスタチン(MEVACOR(登録商標))、プラバスタチン(PRAVACHOL(登録商標))、フルバスタチン(LESCOL(登録商標))、アトルバスタチン(LIPIITOR(登録商標))、セリバスタチン(BAYCOL(登録商標))

50

)、ロスバスタチン(CRESTOR(登録商標))、ピタバスタチン(pitavastatin)ならびに米国特許第4,444,784号;米国特許第4,231,938号;米国特許第4,346,227号;米国特許第4,739,073号;米国特許第5,273,995号;米国特許第5,622,985号;米国特許第5,135,935号;米国特許第5,356,896号;米国特許第4,920,109号;米国特許第5,286,895号;米国特許第5,262,435号;米国特許第5,260,332号;米国特許第5,317,031号;米国特許第5,283,256号;米国特許第5,256,689号;米国特許第5,182,298号;米国特許第5,369,125号;米国特許第5,302,604号;米国特許第5,166,171号;米国特許第5,202,327号;米国特許第5,276,021号;米国特許第5,196,440号;米国特許第5,091,386号;米国特許第5,091,378号;米国特許第4,904,646号;米国特許第5,385,932号;米国特許第5,250,435号;米国特許第5,132,312号;米国特許第5,130,306号;米国特許第5,116,870号;米国特許第5,112,857号;米国特許第5,102,911号;米国特許第5,098,931号;米国特許第5,081,136号;米国特許第5,025,000号;米国特許第5,021,453号;米国特許第5,017,716号;米国特許第5,001,144号;米国特許第5,001,128号;米国特許第4,997,837号;米国特許第4,996,234号;米国特許第4,994,494号;米国特許第4,992,429号;米国特許第4,970,231号;米国特許第4,968,693号;米国特許第4,963,538号;米国特許第4,957,940号;米国特許第4,950,675号;米国特許第4,946,864号;米国特許第4,946,860号;米国特許第4,940,800号;米国特許第4,940,727号;米国特許第4,939,143号;米国特許第4,929,620号;米国特許第4,923,861号;米国特許第4,906,657号;米国特許第4,906,624号;および米国特許第4,897,402号に記載されている多数の他のものが挙げられる。

10

20

【0154】

ヒトへの使用に関してすでに承認されているスタチンの例としては、アトルバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチンおよびロスバスタチンが挙げられる。以下の参考文献により、HMG-CoA還元酵素阻害剤に関するさらなる情報が提供される: 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、および Current Opinion in Lipidology, (1997), 8, 362-368。注目すべき別のスタチン薬は、Watanabe (1997) Bioorganic and Medicinal Chemistry 5: 437-444の化合物3a(S-4522)である。

30

40

【0155】

非スタチン抗高脂血症剤としては、これだけに限定されないが、フィブリン酸誘導体(フィブラート系薬剤)、胆汁酸捕捉剤または樹脂、ニコチン酸剤、コレステロール吸収阻害剤、アシル-補酵素A:コレステロールアシルトランスフェラーゼ(ACAT)阻害剤、コレステリルエステル転移タンパク質(CETP)阻害剤、LDL受容体アンタゴニスト、ファルネソイドX受容体(FXR)アンタゴニスト、ステロール調節性結合性タンパク質切断活性化タンパク質(SCAP)活性化剤、ミクロソームトリグリセリド転移タンパク質(MTP)阻害剤、スクアレンシンターゼ阻害剤およびペルオキシソーム増殖活性化受容体(PPAR)アゴニストが挙げられる。フィブリン酸誘導体の例としては、これだけに限定されないが、ゲムフィプロジル(LOPID(登録商標))、フェノフィブラ

50

ート(TRICOR(登録商標))、クロフィブラート(ATROMID(登録商標))およびベザフィブラートが挙げられる。胆汁酸捕捉剤または樹脂の例としては、これだけに限定されないが、コレセバラム(WELCHOL(登録商標))、コレスチラミン(QUESTRAN(登録商標))またはPREVALITE(登録商標))およびコレステロール(COLESTID(登録商標))、DMD-504、GT-102279、HBS-107およびS-8921が挙げられる。ニコチン酸剤の例としては、これだけに限定されないが、ナイアシンおよびプロブコールが挙げられる。コレステロール吸収阻害剤の例としては、これだけに限定されないが、エゼチミブ(ZETIA(登録商標))が挙げられる。ACAT阻害剤の例としては、これだけに限定されないが、アバシミブ、CI-976(Parke Davis)、CP-113818(Pfizer)、PD-138142-15(Parke Davis)、FF1394、ならびに米国特許第6,204,278号;米国特許第6,165,984号;米国特許第6,127,403号;米国特許第6,063,806号;米国特許第6,040,339号;米国特許第5,880,147号;米国特許第5,621,010号;米国特許第5,597,835号;米国特許第5,576,335号;米国特許第5,321,031号;米国特許第5,238,935号;米国特許第5,180,717号;米国特許第5,149,709号、および米国特許第5,124,337号に記載されている多数の他のものが挙げられる。CETP阻害剤の例としては、これだけに限定されないが、トルセトラピブ、CP-529414、CETi-1、JTT-705、ならびに米国特許第6,727,277号;米国特許第6,723,753号;米国特許第6,723,752号;米国特許第6,710,089号;米国特許第6,699,898号;米国特許第6,696,472号;米国特許第6,696,435号;米国特許第6,683,099号;米国特許第6,677,382号;米国特許第6,677,380号;米国特許第6,677,379号;米国特許第6,677,375号;米国特許第6,677,353号;米国特許第6,677,341号;米国特許第6,605,624号;米国特許第6,586,448号;米国特許第6,521,607号;米国特許第6,482,862号;米国特許第6,479,552号;米国特許第6,476,075号;米国特許第6,476,057号;米国特許第6,462,092号;米国特許第6,458,852号;米国特許第6,458,851号;米国特許第6,458,850号;米国特許第6,458,849号;米国特許第6,458,803号;米国特許第6,455,519号;米国特許第6,451,830号;米国特許第6,451,823号;米国特許第6,448,295号;米国特許第5,512,548号に記載されている多数の他のものが挙げられる。FXRアンタゴニストの1つの例は、ググルステロンである。SCAP活性化剤の1つの例は、GW532(GlaxoSmithKline)である。MTP阻害剤の例としては、これだけに限定されないが、インプリタピドおよびR-103757が挙げられる。スクアレンシンターゼ阻害剤の例としては、これだけに限定されないが、ザラゴジン酸が挙げられる。PPARアゴニストの例としては、これだけに限定されないが、GW-409544、GW-501516、およびLY-510929が挙げられる。

【0156】

抗炎症剤としては、これだけに限定されないが、アルクロフェナク、アルクロメタゾンプロピオン酸エステル、アルゲストンアセトニド、アルファアミラーゼ、アムシナファル、アムシナフィド、アンフェナクナトリウム、塩酸アミプリロース、アナキンラ、アニロラク、アニトラザフェン、アバゾン、バルサラジドニナトリウム、ペンダザック、ペノキサプロフェン、塩酸ベンジダミン、プロメライン、プロペラモール、ブデソニド、カルプロフェン、シクロプロフェン、シントゾン、クリプロフェン、クロベタゾールプロピオン酸エステル、クロベタゾン酪酸エステル、クロピラク、プロピオン酸クロチカゾン、コルメタゾンアセタート、コルトドキソン、デフラザコート、デソニド、デスオキシメタゾン、デキサメタゾンプロピオン酸エステル、ジクロフェナクカリウム、ジクロフェナクナトリウム、ジフロラゾン酢酸エステル、ジフルミドンナトリウム、ジフルニサル、ジフルブレドナート、ジフタロン、ジメチルスルホキシド、ドロシノニド、エンドリソン、エンリ

10

20

30

40

50

モマブ、エノリカムナトリウム、エピリゾール、エトドラク、エトフェナメート、フェルピナク、フェナモール、フェンブフェン、フェンクロフェナック、フェンクロラク、フェンドサール、フェンピパロン、フェンチアザク、フラザロン、フルアザコルト、フルフェナム酸、フルミゾール、酢酸フルニソリド、フルニキシム、フルニキシムメグルミン、フルオコルチンブチル、酢酸フルオロメトロン、フルクァゾン (Fluquazone)、フルルピプロフェン、フルレトフェン、フルチカゾンプロピオン酸エステル、フラプロフェン、フロブフェン、ハルシノニド、ハロベタソールプロピオン酸塩、ハロプレドン酢酸エステル、イブフェナック、イブプロフェン、イブプロフェンアルミニウム、イブプロフェンピコノール、イロニダブ、インドメタシン、インドメタシンナトリウム、インドプロフェン、インドキソール、イントラゾール、イソフルプレドンアセタート、イソキセバク、イソキシカム、ケトプロフェン、ロフェミゾール塩酸塩、ロモキシカム、エタボン酸ロテプレドノール、メクロフェナム酸ナトリウム、メクロフェナム酸、メクロリソンジブチレート、メフェナム酸、メサラミン、メセクラゾン、スレプタン酸メチルプレドニゾン、モルニフルメート、ナブメトン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、ナプロキソール、ニマゾン、オルサラジンナトリウム、オルゴテイン、オルパノキシム、オキサプロジン、オキシフェンブタゾン、塩酸パラニリン、ペントサンポリ硫酸ナトリウム、フェンブタゾンナトリウムグリセレート、ピルフェニドン、ピロキシカム、桂皮酸ピロキシカム、ピロキシカムオラミン、ピルプロフェン、プレドナザート、プリフェロン、プロドール酸、プロカゾン、プロキサゾール、クエン酸プロキサゾール、リメキソロン、ロマザリット、サルコレクス、サルナセジン、サルサレート、サリチレート (Salicylate)、塩化サンガイナリウム (Sanguinarium Chloride)、セクラゾン、セルメタシン、スドキシカム、スリンダク、スプロフェン、タルメタシン、タルニフルメート、タロサラート、テブフェロン、テニダップ、テニダップナトリウム、テノキシカム、テシカム、テシミド、テトリダミン、チオピナク、チキソコルトールピバレート、トルメチン、トルメチンナトリウム、トリクロニド、トリフルミダート、ジドメタシン、グルココルチコイドおよびゾメピラクナトリウムが挙げられる。

【0157】

抗血栓剤および/または線維素溶解剤としては、これだけに限定されないが、組織プラスミノゲンアクチベーター (例えば、ACTIVASE (登録商標)、ALTEPLASE (登録商標)) (不活性プラスミノゲンのプラスミンへの変換を触媒する)。これは、プレカリクレイン、キニノーゲン、第XII因子、第XIIa因子、プラスミノゲンプロアクチベーター、および組織プラスミノゲンアクチベーターTPAの相互作用によって起こり得る)、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、アニソイレート化プラスミノゲン-ストレプトキナーゼ活性化因子複合体、プロ-ウロキナーゼ、(プロ-UK)、rTPA (ACTIVASE (登録商標)、ALTEPLASE (登録商標)); rは組換え型であることを示す)、rプロ-UK、アボキナーゼ、エミナーゼ、スレプターゼ、アナグレリド塩酸塩、ピバリルジン、ダルテパリンナトリウム、ダナパロイドナトリウム、ダゾキシベン塩酸塩、硫酸エフェガトラン、エノキサパリンナトリウム、イフェトロバン、イフェトロバンナトリウム、チンザパリンナトリウム、レタブラーゼ、トリフェナグレール、ワルファリン、デキストラン、アミノカプロン酸 (AMICAR (登録商標)) およびトラネキサム酸 (AMSTAT (登録商標)) が挙げられる。

【0158】

抗血小板剤としては、これだけに限定されないが、クロピドグレール (Clopidogrel)、スルフィンピラゾン、アスピリン、ジピリダモール、クロフィブラート、ピリジノールカルバメート、PGE、グルカゴン、抗セロトニン薬、カフェイン、テオフィリンペントキシフィリン、チクロピジンおよびアナグレリドが挙げられる。直接トロンビン阻害剤としては、これだけに限定されないが、ヒルジン、ヒルゲン、ヒルログ、アルガトロバン (agatroban)、PPACKおよびトロンピンアプタマーが挙げられる。糖タンパク質IIb/IIIa受容体阻害剤には抗体および非抗体の両方があり、それらとして、これだけに限定されないが、REOPRO (登録商標) (アブシキマブ (ab

10

20

30

40

50

cixamab))、ラミフィバンおよびチロフィバンが挙げられる。細胞接着分子に結合し、白血球 (white blood cell) のそのような分子に付着する能力を阻害する薬剤としては、ポリペプチド剤が挙げられる。そのようなポリペプチドとしては、従来の方法体系に従って調製されたポリクローナルおよびモノクローナル抗体が挙げられる。そのような抗体はすでに当技術分野で公知であり、それらとして、抗 ICAM 1 抗体および他のそのような抗体が挙げられる。

【0159】

アルファ - アドレナリン作動性遮断薬の例としては、これだけに限定されないが、ドキサゾシン (doxazocin)、プラゾシン (prazosin)、タムスロシン、およびテラゾシン (tarazosin) が挙げられる。ベータ - アドレナリン作動性受容体遮断剤は、狭心症、高血圧症および心不整脈 (cardiac arrhythmia) においてカテコールアミンの心血管に対する影響をアンタゴニズする薬物のクラスである。ベータ - アドレナリン作動性受容体遮断薬としては、これだけに限定されないが、アテノロール、アセプトロール、アルプレノロール、ベフノロール、ベタキソロール、ブニトロロール、カルテオロール、セリプロロール、ヒドロキサロール、インデノロール、ラベタロール、レボプロロール、メピンドロール、メチプラノール、メチンドール、メトプロロール、メトリゾラノール、オクスプレノロール、ピンドロール、プロプラノロール、プラクトロール、プラクトロール、ソタロールナドロール、チプレノロール、トマロロール、チモロール、ププラノロール、ペンプトロール、トリメプラノール、2 - (3 - (1, 1 - ジメチルエチル) - アミノ - 2 - ヒドロキシプロポキシ) - 3 - ピリデネカルボニトリル HCl、1 - ブチルアミノ - 3 - (2, 5 - ジクロロフェノキシ) - 2 - プロパノール、1 - イソプロピルアミノ - 3 - (4 - (2 - シクロプロピルメトキシエチル) フェノキシ) - 2 - プロパノール、3 - イソプロピルアミノ - 1 - (7 - メチルインダン - 4 - イルオキシ) - 2 - プタノール、2 - (3 - t - ブチルアミノ - 2 - ヒドロキシ - プロピルチオ) - 4 - (5 - カルバモイル - 2 - チエニル) チアゾール、7 - (2 - ヒドロキシ - 3 - t - ブチルアミノプロポキシ) フタリドが挙げられる。上で識別された化合物は、異性体混合物として使用することもでき、それらのそれぞれの左旋型または右旋型で使用することもできる。

【0160】

選択的 COX - 2 阻害剤が当技術分野で公知であり、利用することができる。それらとして、これだけに限定されないが、米国特許第 5, 521, 213 号；米国特許第 5, 536, 752 号；米国特許第 5, 550, 142 号；米国特許第 5, 552, 422 号；米国特許第 5, 604, 253 号；米国特許第 5, 604, 260 号；米国特許第 5, 639, 780 号；米国特許第 5, 677, 318 号；米国特許第 5, 691, 374 号；米国特許第 5, 698, 584 号；米国特許第 5, 710, 140 号 米国特許第 5, 733, 909 号；米国特許第 5, 789, 413 号；米国特許第 5, 817, 700 号；米国特許第 5, 849, 943 号；米国特許第 5, 861, 419 号；米国特許第 5, 922, 742 号；米国特許第 5, 925, 631 号；および米国特許第 5, 643, 933 号に記載されている F COX - 2 阻害剤が挙げられる。いくつかの上で識別された COX - 2 阻害剤が選択的 COX - 2 阻害剤のプロドラッグであり、それらの作用は、in vivo で活性かつ選択的 COX - 2 阻害剤に変換されることによって発揮される。上で識別された COX - 2 阻害剤プロドラッグから形成される活性かつ選択的 COX - 2 阻害剤は、PCT 公開第 WO 95 / 00501 号、PCT 公開第 WO 95 / 18799 号、および米国特許第 5, 474, 995 号に記載されている。

【0161】

アンジオテンシン系阻害剤は、アンジオテンシン II の機能、合成または異化を妨げる薬剤である。これらの薬剤としては、これだけに限定されないが、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤、アンジオテンシン II アンタゴニスト、アンジオテンシン II 受容体アンタゴニスト、アンジオテンシン II の異化を活性化する薬剤、および最終的にアンジオテンシン II が生じるアンジオテンシン I の合成を妨げる薬剤が挙げられる。その

ような化合物のクラスの例としては、抗体（例えば、レニンに対するもの）、アミノ酸およびその類似体（より大きな分子とコンジュゲートしたものを含む）、ペプチド（アンジオテンシンおよびアンジオテンシン I のペプチド類似体を含む）、プロ-レニン関連類似体などが挙げられる。最も強力で有用なレニン-アンジオテンシン系阻害剤にはレニン阻害剤、ACE 阻害剤、およびアンジオテンシン II アンタゴニストがある。

【0162】

アンジオテンシン II アンタゴニストは、アンジオテンシン II 受容体に結合し、その活性に干渉することによってアンジオテンシン II の活性に干渉する化合物である。アンジオテンシン II アンタゴニストは周知であり、ペプチド化合物および非ペプチド化合物を含む。大多数のアンジオテンシン II アンタゴニストは、8位のフェニルアラニンを、ある他のアミノ酸で置き換えることによってアゴニスト活性を減弱させたわずかに改変された同類物である。in vivoにおける変性を遅くする他の置換えによって安定性を増強することができる。アンジオテンシン II 受容体アンタゴニストの例としては、これだけに限定されないが、カンデサルタン (Alacand)、IRBESARTAN (登録商標) (Avapro)、ロサルタン (COZAARS (登録商標))、テルミサルタン (MICARDIS (登録商標))、およびバルサルタン (DIOVAN (登録商標)) が挙げられる。アンジオテンシン II アンタゴニストの他の例としては、ペプチド性化合物（例えば、サララシン、[(Sar¹)(Val⁵)(Ala⁸)]アンジオテンシン-(1-8)オクタペプチドおよび関連する類似体)；N置換イミダゾール-2-オン (米国特許第5,087,634号)；2-n-ブチル-4-クロロ-1-(2-クロロベンジル)イミダゾール-5-酢酸を含めたイミダゾール酢酸誘導体 (Long et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 247 (1), 1-7 (1988) を参照されたい)；4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-6-カルボン酸および類似体誘導体 (米国特許第4,816,463号)；N2-テトラゾールベータ-グルクロニド類似体 (米国特許第5,085,992号)；置換型ピロール、ピラゾール、およびトリアゾール (米国特許第5,081,127号)；フェノールおよび複素環式誘導体、例えば、1,3-イミダゾールなど (米国特許第5,073,566号)；イミダゾ縮合7員環複素環 (米国特許第5,064,825号)；ペプチド (例えば、米国特許第4,772,684号)；アンジオテンシン II に対する抗体 (例えば、米国特許第4,302,386号)；およびビフェニル-メチル置換イミダゾールなどのアラルキルイミダゾール化合物 (例えば、EP第253,310号、1988年1月20日)；ES8891 (N-モルホリノアセチル-(1-ナフチル)-L-アラニル-(4,チアゾリル)-L-アラニル(35,45)-4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-シクロ-ヘキサペンタノイル-N-ヘキシルアミド、Sankyo Company, Ltd., Tokyo, Japan)；SKF108566 (E-アルファ-2-[2-ブチル-1-(カルボキシフェニル)メチル]1H-イミダゾール-5-イル[メチラン]-2-チオフェンプロパン酸、Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, PA)；LOSARTAN (登録商標) (DUP 753/MK954, DuPont Merck Pharmaceutical Company)；レミキリン (RO42-5892, F. Hoffman La Roche AG)；A₂アゴニスト (Marion Merrill Dow) ならびにある特定の非ペプチド複素環 (G.D. Searle and Company) が挙げられる。

【0163】

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) は、アンジオテンシン I のアンジオテンシン II への変換を触媒する酵素である。ACE 阻害剤としては、アミノ酸およびその誘導体、ジペプチドおよびトリペプチドを含めたペプチド、ならびに、ACE の活性を阻害し、それにより、昇圧物質であるアンジオテンシン II の形成を減少させるまたは排除することによってレニン-アンジオテンシン系に介入する ACE に対する抗体が挙げられる。ACE 阻害剤は、高血圧症、鬱血性心不全、心筋梗塞および腎疾患を処置するために医学的に使用されている。ACE 阻害薬として有用であることが公知の化合物のクラスとしては、カ

10

20

30

40

50

プトプリル（米国特許第4,105,776号）およびゾフェノプリル（米国特許第4,316,906号）などのアシルメルカプトおよびメルカプトアルカノイルプロリン、エナプリル（米国特許第4,374,829号）、リシノプリル（米国特許第4,374,829号）、キナプリル（米国特許第4,344,949号）、ラミプリル（米国特許第4,587,258号）、およびペリンドプリル（米国特許第4,508,729号）などのカルボキシアシルキルジペプチド、シラザプリル（米国特許第4,512,924号）およびベナゼプリル（benazapril）（米国特許第4,410,520号）などのカルボキシアシルキルジペプチド模倣体、ホシノプリル（米国特許第4,337,201号）およびトランドラプリル（trandolopril）などのホスフィニルアルカノイルプロリンが挙げられる。

10

【0164】

レニン阻害剤は、レニンの活性に干渉する化合物である。レニン阻害剤としては、アミノ酸およびその誘導体、ペプチドおよびその誘導体、ならびにレニンに対する抗体が挙げられる。米国特許の対象であるレニン阻害剤の例は、以下の通りである：ペプチドの尿素誘導体（米国特許第5,116,835号）；非ペプチド結合が連結したアミノ酸（米国特許第5,114,937号）；ジペプチド誘導体およびトリペプチド誘導体（米国特許第5,106,835号）；アミノ酸およびその誘導体（米国特許第5,104,869号および第5,095,119号）；ジオールスルホンアミドおよびスルフィニル（米国特許第5,098,924号）；修飾ペプチド（米国特許第5,095,006号）；ペプチジルベータ-アミノアシルアミノジオールカルバメート（米国特許第5,089,471号）；ピロールイミダゾロン（米国特許第5,075,451号）；フッ素および塩素スタチンまたはスタチン含有ペプチド（米国特許第5,066,643号）；ペプチジルアミノジオール（米国特許第5,063,208号および第4,845,079号）；N-モルホリノ誘導体（米国特許第5,055,466号）；ペプスタチン誘導体（米国特許第4,980,283号）；N-複素環式アルコール（米国特許第4,885,292号）レニンに対するモノクローナル抗体（米国特許第4,780,401号）；ならびに種々の他のペプチドおよびその類似体（米国特許第5,071,837号；米国特許第5,064,965号；米国特許第5,063,207号；米国特許第5,036,054号；米国特許第5,036,053号、米国特許第5,034,512号、および第4,894,437号）。

20

30

【0165】

カルシウムチャネル遮断薬は、高血圧症、狭心症、および心不整脈（などのいくつかの心血管障害を含めた種々の疾患の制御において重要な治療的価値を有する化学的に多様なクラスの化合物である（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)）。カルシウムチャネル遮断薬は、細胞カルシウムチャネルを調節することによってカルシウムの細胞への進入を妨げるまたは遅くする薬物の不均一な群である。（Remington, *The Science and Practice of Pharmacology*, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company, Eaton, Pa., p. 963 (1995)）。現在利用可能であり、本発明に従って有用なカルシウムチャネル遮断薬の大部分は、3つの主要な薬物の化学群のうちの1つに属する。ジヒドロピリジン、例えば、ニフェジピン、フェニルアルキルアミン、例えば、ベラパミル、およびベンゾチアゼピン、例えば、ジルチアゼム。本発明に従って有用な他のカルシウムチャネル遮断薬としては、これだけに限定されないが、アミノン、アムロジピン、ベンシクラン、フェロジピン、フェンジリン、フルナリジン、イスラジピン、ニカルジピン、ニモジピン、ペルヘキシレン、ガロパミル、チアパミルおよびチアパミル類似体（例えば、1993RO-11-2933など）、フェニロイン

40

50

、バルビツール酸、およびペプチドダイノルフィン、オメガ - コノトキシン、およびオメガ - アガトキシンなど、ならびに / または薬学的に許容されるその塩が挙げられる。

【 0 1 6 6 】

利尿薬としては、これだけに限定されないが、炭酸脱水素酵素阻害剤、ループ利尿薬、カリウム保持性利尿薬、チアジドおよび関連する利尿薬が挙げられる。血管拡張薬としては、これだけに限定されないが、冠状動脈血管拡張薬および末梢血管拡張薬が挙げられる。昇圧剤は、血管収縮を生じさせ、および / または血圧を上昇させる薬剤である。昇圧剤としては、これだけに限定されないが、ドーパミン、エフェドリン、エピネフリン、メトキシサミン H C l (V A S O X Y L (登録商標))、フェニレフリン、フェニレフリン H C l (N E O - S Y N E P H R I N E (登録商標))、およびメタラミノールが挙げられる。チアゾリジンジオンとしては、これだけに限定されないが、ロシグリタゾン (r o s i g l e t a z o n e) (A V A N D I A (登録商標))、ピオグリタゾン (A C T O S (登録商標))、トログリタゾン (R e z u l i n) が挙げられる。これらのいずれも開示されている方法および組成物に使用することができる。

10

【 0 1 6 7 】

免疫抑制剤としては、これだけに限定されないが、ステロイド、カルシニューリン阻害剤、抗増殖剤 (a n t i - p r o l i f e r a t i v e a g e n t)、生物学的製剤、およびモノクローナルまたはポリクローナル抗体が挙げられる。生物学的製剤としては、これだけに限定されないが、組換えまたは合成ペプチドおよびタンパク質、ならびに合成形態の核酸が挙げられる。ステロイドは、コルチコステロイドであり得る。コルチコステロイドの例としては、これだけに限定されないが、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、およびメチルプレドニゾンが挙げられる。カルシニューリン阻害剤の例としては、これだけに限定されないが、タクロリムス、F K 5 0 6、A D V A G R A F T (登録商標)、P R O G R A F (登録商標)、E N V A R S U S X R (登録商標)、H E C O R I A (登録商標)、A S T A G R A F X L (登録商標)、およびシクロスポリン (C E Q U A S (登録商標)、N E O R A L (登録商標)、R E S T A S I S (登録商標))、N E O R A L (登録商標)、P I M E C R O L I M U S (登録商標)、S A N D I M M U N E (登録商標)、P R O T O P I C (登録商標)、G E N G R A F T (登録商標)、および E L I D E L (登録商標) が挙げられる。モノクローナル抗体の例としては、これだけに限定されないが、抗 C D 3 抗体 (ムロモナブ - C D 3、O R T H O C L O N E (登録商標) O K T 3)、ピシリズマブ (N U V I O N (登録商標))、抗 C D 5 2 (アレムツズマブ (A l t e m t u z u m a b) (C A M P A T H (登録商標) - 1 H))、抗 C D 2 5 (バシリキシマブ (S I M U L E C T (登録商標)))、抗 C D 2 0 (リツキシマブ (R I T U X A N (登録商標)))、オビヌツズマブ (G A Z Y V A (登録商標))、オクレリズマブ (O C R E V U S (登録商標)))、抗補体タンパク質 (エクリズマブ (S O L I R I S (登録商標)))、抗共刺激分子 (プレセルマブ、L U L I Z U M A B (登録商標))、および抗サイトカインまたはサイトカイン受容体 (トシリズマブ (A C T E M R A (登録商標))、ウステキヌマブ (S T E L A R A (登録商標))、カナキヌマブ (I L A R I S (登録商標))、セクキヌマブ (C O S E N T Y X (登録商標))、シルツキシマブ (S Y L V A N T (登録商標))、プロダルマブ (S I L I Q (登録商標))、イクセキズマブ (T A L T Z (登録商標))、サリルマブ (K E V A Z R A (登録商標))、グセルクマブ (T R E M F Y A (登録商標))、およびチルドラキズマブ (I L U M Y A (登録商標))) が挙げられる。ポリクローナル抗体の例としては、これだけに限定されないが、抗胸腺細胞グロブリン - ウマ科の動物 (A T G A M (登録商標)) および抗胸腺細胞グロブリン - ウサギ (R A T G サイモグロブリン)、ポリクローナルヒト I g G 免疫グロブリン (I V I G、B I V I G A M (登録商標)、C A R I M U N E (登録商標)、C U T A Q U I G (登録商標)) が挙げられる。生物学的タンパク質の例としては、これだけに限定されないが、可溶性 C T L A - 4 - I g (A B A T A C E P T (登録商標))、C 1 - エステラーゼ阻害剤 (C 1 - I N H、C I N R Y Z E (登録商標)、H A E G A R D A (登録商標))、I L - 1 または I L - 1 R アンタゴニスト (アナキンラ (K I N E R E

20

30

40

50

T (登録商標))、リロナセプト (ARCALYST (登録商標))、および *Streptococcus pyogenes* の IgG 分解酵素 (IdeS) が挙げられる。抗増殖剤または代謝拮抗剤としては、これだけに限定されないが、ミコフェノール酸モフェチル、ミコフェノール酸ナトリウム、アザチオプリン、シクロホスファミド、ラパマイシン、シロリムス (RAPAMUNE (登録商標))、エベロリムス (AFINITOR (登録商標)) が挙げられる。他の免疫抑制剤 (immunosuppressant) としては、これだけに限定されないが、スルファサラジン、アザルフィジン、メトキサレン、およびサリドマイドが挙げられる。これらのいずれも開示された組成物および方法に使用することができる。一部の実施形態では、免疫抑制剤は、カルシニューリン阻害剤、抗増殖剤 (antiproliferative agent)、mTOR 阻害剤、および / またはステロイドである。特定の非限定的な例では、カルシニューリン阻害剤は、タクロリムスまたはシクロスポリンであり、抗増殖剤は、ミコフェノール酸であり、mTOR 阻害剤は、シロリムスであり、および / またはステロイドは、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはコルチゾンである。

10

【0168】

提示される方法は、食事および / または運動などの他の治療の使用も含み得る。一部の実施形態では、これらの治療を、MBV を用いた治療的処置に加える。「共投与すること」とは、本明細書で使用される場合、2 つまたはそれよりも多くの治療剤 (例えば、MBV および第 2 の治療剤) を単一の組成物中の混和物として同時に、または逐次的に、および一部の実施形態では、化合物が相加効果またはさらには相乗効果を発揮することができるように十分に近い時間内に投与することを指す。他の実施形態では、治療剤を併用して投与する。さらに他の実施形態では、1 つの治療剤を別の治療剤の前またはその後に投与する。

20

【0169】

投与される MBV の用量は治療的に有効なものであり、投与経路を含めたいくつかの因子に依存し、熟練臨床医が決定することができる。一部の実施形態では、MBV の濃度は、1 ml 当たり約 1×10^5 ~ 約 1×10^{12} 個、例えば、1 ml 当たり 1×10^6 ~ 約 1×10^{11} 個、1 ml 当たり約 1×10^7 ~ 約 1×10^{11} 個、または 1 ml 当たり約 1×10^8 ~ 約 1×10^{10} 個である。一部の非限定的な例では、局所的に投与する場合、1 ml 当たり約 1×10^8 ~ 約 1×10^{10} 個の用量、例えば、1 ml 当たり約 1×10^8 個、1 ml 当たり約 5×10^8 個、1 ml 当たり約 1×10^9 個、1 ml 当たり約 5×10^9 個、または 1 ml 当たり約 1×10^{10} 個が提供される。局所的に投与する場合、体積は部位に適したものである。例示的な非限定的な体積は、硝子体内には 0.1 ml であり、移植領域の表面上に拡散させる場合には 1.0 ml であり、3 cm の長さの皮膚切開部の縁に注射する場合には 1.5 ml であり、腔全体がおよそ 1.40 mm^3 である脳卒中腔に注射する場合には 0.15 ml である。当業者は、場所に適した体積を容易に特定することができる。一般に、体積は、処置に有効であり、目的の部位における損傷を誘発しない。

30

【0170】

一般に、活性化化合物または薬剤の用量は、1 日当たり約 0.01 mg/kg から 1 日当たり 1000 mg/kg までであり得る。1 日当たり 1 回または数回の投与で経口投与するためには $1 \sim 5 \text{ mg/kg}$ 、 $5 \sim 50 \text{ mg/kg}$ または $50 \sim 100 \text{ mg/kg}$ にわたる用量が適し得ることが予想される。静脈内投与などの他の投与の形態では低い用量がもたらされる。適用された初回用量でヒト対象における応答が不十分である場合には、より高い用量 (または異なる、より局在化される送達経路による有効により高い用量) を患者の耐容性が許す範囲内で使用することができる。化合物の適当な全身性レベルを実現するために 1 日当たり複数回投与が意図されている。

40

【0171】

投与される場合、医薬調製物は、薬学的に許容される量で、薬学的に許容される組成物として適用される。そのような調製物は、常套的に、塩、緩衝剤、保存剤、適合性の担体、および必要に応じて他の治療剤を含有する。薬に使用される場合、塩は、薬学的に許容

50

されるものであるべきであるが、薬学的に許容される塩ではない塩も、その薬学的に許容される塩を調製するために都合よく使用することができ、本発明の範囲から除外されない。そのような薬理学的および薬学的に許容される塩としては、これだけに限定されないが、以下の酸から調製される塩が挙げられる：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸など。また、薬学的に許容される塩は、ナトリウム塩、カリウム塩またはカルシウム塩など、アルカリ性金属またはアルカリ土類塩として調製することができる。参照により本明細書に組み込まれる米国公開出願第2008/0003199号、IL-33 in the treatment and diagnosis of diseases and disordersを参照されたい。

10

筋芽細胞分化を増大させるための方法

【0172】

筋芽細胞分化を増大させるための方法も開示される。これらの方法は、筋芽細胞に細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の有効量を接触させるステップであって、ナノ小胞が、インターロイキン(IL)-33を含有し、リシルオキシダーゼを含み、ナノ小胞が、a) CD63もCD81も発現しないか、またはb) CD63^{1°}CD81^{1°}である、ステップを含む。筋芽細胞は、in vivoのものであってもin vitroのものであってもよい。

【0173】

筋肉細胞の決定、分化、および多核合胞体への融合のプロセスである筋形成は、傷害後の正常な筋肉発達および組織再生に必須である。

20

【0174】

一部の実施形態では、梗塞後心機能不全の結果を限定することを目的とする処置は、損傷を受けた左心室に細胞(筋細胞または幹細胞)を移植することを含む。移植された細胞は、心臓の収縮に関与することによって心室駆出率を上昇させる。心筋内移植のためには多数の潜在的に収縮性の細胞が必要である。したがって、開示される方法は、心臓または骨格筋移植片として使用するために適した細胞集団を拡大増殖させることができる。

例示的な実施形態

【0175】

条項1. 障害を有するまたは有するリスクがある対象における障害を処置または阻害するための方法であって、障害を有するまたは有するリスクがある対象を選択するステップと、対象に、細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の治療有効量を投与するステップであって、ナノ小胞がインターロイキン(IL)-33を含有し、リシルオキシダーゼを含み、ナノ小胞が、a) CD63もCD81も発現しないか、またはb) CD63^{1°}CD81^{1°}である、ステップとを含み、それにより、対象における障害が処置または阻害され、障害が、a) 臓器もしくは組織の線維症；b) 実質臓器移植片拒絶；またはc) 心筋梗塞でも心筋虚血でもない心疾患である、方法。

30

【0176】

条項2. 細胞外マトリックスが、哺乳動物細胞外マトリックスである、条項1に記載の方法。

40

【0177】

条項3. 哺乳動物細胞外マトリックスが、ヒト細胞外マトリックスである、条項2に記載の方法。

【0178】

条項4. 細胞外マトリックスが、食道組織、膀胱、小腸粘膜下組織、真皮、臍帯、心膜、心臓組織、または骨格筋に由来する、条項1から3までのいずれか一項に記載の方法。

【0179】

条項5. ナノ小胞が、miR-145および/またはmiR-181を含む、条項1から4までのいずれか一項に記載の方法。

【0180】

50

条項 6 . 障害が、実質臓器移植片拒絶であり、対象が、移植された実質臓器のレシピエントである、条項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 8 1 】

条項 7 . ナノ小胞が、移植された実質臓器に投与される、条項 6 に記載の方法。

【 0 1 8 2 】

条項 8 . 移植された実質臓器が、心臓である、条項 7 に記載の方法。

【 0 1 8 3 】

条項 9 . 障害が、心疾患である、条項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 8 4 】

条項 1 0 . 心疾患が、心不全または心虚血である、条項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。 10

【 0 1 8 5 】

条項 1 1 . 心疾患が、急性冠状動脈症候群、慢性安定狭心症、不安定狭心症、血管形成術、一過性脳虚血発作、虚血性再灌流傷害、跛行、血管閉塞、動脈硬化症、心不全、慢性心不全、急性非代償性心不全、心肥大、心臓線維症、大動脈弁疾患、大動脈弁または僧帽弁狭窄症、心筋症、心房細動、心不整脈、および心膜疾患を含む、条項 1 から 5 までのいずれかに記載の方法。

【 0 1 8 6 】

条項 1 2 . ナノ小胞が、静脈内に投与される、条項 1 から 1 1 までのいずれか一項に記載の方法。 20

【 0 1 8 7 】

条項 1 3 . 障害が、臓器または組織の線維症である、条項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 8 8 】

条項 1 4 . 線維症が、肝硬変、肺線維症、心臓線維症、縦隔線維症、関節線維症、骨髄線維症、腎性全身性線維症、ケロイド線維症、強皮症線維症、腎線維症、リンパ組織線維症、動脈線維症、毛細血管線維症、血管線維症、または腭線維症である、条項 1 3 に記載の方法。

【 0 1 8 9 】

条項 1 5 . 線維症が、肺線維症である、条項 1 4 に記載の方法。 30

【 0 1 9 0 】

条項 1 6 . 線維症が、心臓線維症である、条項 1 4 に記載の方法。

【 0 1 9 1 】

条項 1 7 . 心臓線維症が、

a) 肥大型心筋症、サルコイドーシス、慢性腎不全、中毒性心筋症、虚血再灌流傷害、急性臓器拒絶、慢性臓器拒絶、老化、慢性高血圧症、非虚血性拡張型心筋症 (non - i s c h e m i c d e l a t e d c a r d i o m y o p a t h y) 、不整脈、アテローム性動脈硬化症、H I V 関連慢性血管疾患、および肺高血圧症 ; または

b) 心筋梗塞もしくは心筋虚血

によって引き起こされる、条項 1 6 に記載の方法。 40

【 0 1 9 2 】

条項 1 8 . ナノ小胞が、患者に吸入によって投与される、条項 1 5 に記載の方法。

【 0 1 9 3 】

条項 1 9 . ナノ小胞が、対象に毎週、月 2 回、または毎月投与される、条項 1 から 1 6 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 9 4 】

条項 2 0 . 対象に追加的な治療剤の治療有効量を投与するステップをさらに含む、条項 1 から 1 9 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 1 9 5 】

条項 2 1 . 追加的な治療剤が、免疫抑制剤である、条項 2 0 に記載の方法。 50

【 0 1 9 6 】

条項 2 2 . 免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、抗増殖剤、m T O R 阻害剤、および/またはステロイドである、条項 2 1 に記載の方法。

【 0 1 9 7 】

条項 2 3 . カルシニューリン阻害剤が、タクロリムスまたはシクロスポリンであり、抗増殖剤が、ミコフェノール酸であり、m T O R 阻害剤が、シロリムスであり、および/またはステロイドが、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはコルチゾンである、条項 2 2 に記載の方法。

【 0 1 9 8 】

条項 2 4 . 対象がヒトである、条項 1 から 2 3 までのいずれか一項に記載の方法。

10

【 0 1 9 9 】

条項 2 5 . 障害を有するまたは有するリスクがある対象における障害を処置または阻害するための方法であって、障害を有するまたは有するリスクがある対象を選択するステップと、対象に、細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の治療有効量を投与するステップであって、ナノ小胞がインターロイキン (I L) - 3 3 を含有し、リシルオキシダーゼを含み、ナノ小胞が、 a) C D 6 3 も C D 8 1 も発現しないか、または b) C D 6 3 ¹ o C D 8 1 ¹ o である、ステップとを含み、それにより、対象における障害が処置または阻害され、障害が、臓器または組織の線維症である、方法。

【 0 2 0 0 】

条項 2 6 . 細胞外マトリックスが、哺乳動物細胞外マトリックスである、条項 2 5 に記載の方法。

20

【 0 2 0 1 】

条項 2 7 . 哺乳動物細胞外マトリックスが、ヒト細胞外マトリックスである、条項 2 6 に記載の方法。

【 0 2 0 2 】

条項 2 8 . 細胞外マトリックスが、食道組織、膀胱、小腸粘膜下組織、真皮、臍帯、心臓組織、または骨格筋に由来する、条項 2 5 から 2 7 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 0 3 】

条項 2 9 . ナノ小胞が、m i R - 1 4 5 および/またはm i R - 1 8 1 を含む、条項 2 5 から 2 8 までのいずれか一項に記載の方法。

30

【 0 2 0 4 】

条項 3 0 . 線維症が、肝硬変、肺線維症、心臓線維症、縦隔線維症、関節線維症、骨髄線維症、腎性全身性線維症、ケロイド線維症、強皮症線維症、腎線維症、リンパ組織線維症、動脈線維症、毛細血管線維症、血管線維症、または腓線維症である、条項 2 5 から 2 9 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 0 5 】

条項 3 1 . 線維症が、肺線維症である、条項 3 0 に記載の方法。

【 0 2 0 6 】

条項 3 2 . 線維症が、心臓線維症である、条項 3 0 に記載の方法。

40

【 0 2 0 7 】

条項 3 3 . 心臓線維症が、

a) 肥大型心筋症、サルコイドーシス、慢性腎不全、中毒性心筋症、虚血再灌流傷害、急性臓器拒絶、慢性臓器拒絶、老化、慢性高血圧症、非虚血性拡張型心筋症、不整脈、アテローム性動脈硬化症、H I V 関連慢性血管疾患、および肺高血圧症；または

b) 心筋梗塞もしくは心筋虚血

によって引き起こされる、条項 3 2 に記載の方法。

【 0 2 0 8 】

条項 3 3 . 1 . 心臓線維症が、急性臓器拒絶によって引き起こされる、条項 3 3 に記載の方法。

50

【 0 2 0 9 】

条項 3 3 . 2 . 心臓線維症が、慢性臓器拒絶によって引き起こされる、条項 3 3 に記載の方法。

【 0 2 1 0 】

条項 3 4 . ナノ小胞を患者に吸入によってまたは静脈内に投与する、条項 2 5 から 3 3 . 2 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 1 1 】

条項 3 5 . ナノ小胞が、対象に毎週、月 2 回、または毎月投与される、条項 2 5 から 3 3 . 2 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 1 2 】

条項 3 6 . 対象に追加的な治療剤の治療有効量を投与するステップをさらに含む、条項 2 5 から 3 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 1 3 】

条項 3 7 . 追加的な治療剤が、免疫抑制剤である、条項 3 6 に記載の方法。

【 0 2 1 4 】

条項 3 8 . 免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、抗増殖剤、m T O R 阻害剤、および/またはステロイドである、条項 3 7 に記載の方法。

【 0 2 1 5 】

条項 3 9 . カルシニューリン阻害剤が、タクロリムスまたはシクロスポリンであり、抗増殖剤が、ミコフェノール酸であり、m T O R 阻害剤が、シロリムスであり、および/またはステロイドが、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはコルチゾンである、条項 3 8 に記載の方法。

【 0 2 1 6 】

条項 4 0 . 対象がヒトである、条項 2 5 から 3 9 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 1 7 】

条項 4 1 . 障害を有するまたは有するリスクがある対象における障害を処置または阻害するための方法であって、障害を有するまたは有するリスクがある対象を選択するステップと、対象に、細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の治療有効量を投与するステップであって、ナノ小胞がインターロイキン (I L) - 3 3 を含有し、リシルオキシダーゼを含み、ナノ小胞が、a) C D 6 3 も C D 8 1 も発現しないか、または b) C D 6 3 ^{1 0} C D 8 1 ^{1 0} である、ステップとを含み、それにより、対象における障害が処置または阻害され、障害が、実質臓器移植片拒絶である、方法。

【 0 2 1 8 】

条項 4 2 . 細胞外マトリックスが、哺乳動物細胞外マトリックスである、条項 4 1 に記載の方法。

【 0 2 1 9 】

条項 4 3 . 哺乳動物細胞外マトリックスが、ヒト細胞外マトリックスである、条項 4 2 に記載の方法。

【 0 2 2 0 】

条項 4 4 . 細胞外マトリックスが、食道組織、膀胱、小腸粘膜下組織、真皮、臍帯、心臓組織、または骨格筋に由来する、条項 4 1 から 4 3 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 2 1 】

条項 4 5 . ナノ小胞が、m i R - 1 4 5 および/またはm i R - 1 8 1 を含む、条項 4 1 から 4 3 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 2 2 】

条項 4 6 . ナノ小胞が、移植された実質臓器に投与される、条項 4 1 から 4 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 2 3 】

条項 4 7 . 移植された実質臓器が、心臓である、条項 4 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 2 2 4 】

条項 4 7 . 1 . 移植された実質臓器が、肺、腎臓または肝臓である、条項 4 6 に記載の方法。

【 0 2 2 5 】

条項 4 8 . ナノ小胞が、静脈内に投与される、条項 4 1 から 4 7 . 1 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 2 6 】

条項 4 9 : ナノ小胞が、吸入によって投与される、条項 4 1 から 4 6 までおよび 4 7 . 1 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 2 7 】

条項 5 0 . ナノ小胞が、対象に毎週、月 2 回、または毎月投与される、条項 4 1 から 4 9 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 2 8 】

条項 5 1 . 対象に追加的な治療剤の治療有効量を投与するステップをさらに含む、条項 4 1 から 5 0 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 2 9 】

条項 5 2 . 追加的な治療剤が、免疫抑制剤である、条項 5 1 に記載の方法。

【 0 2 3 0 】

条項 5 3 . 免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、抗増殖剤、m T O R 阻害剤、および/またはステロイドである、条項 5 2 に記載の方法。

【 0 2 3 1 】

条項 5 4 . カルシニューリン阻害剤が、タクロリムスまたはシクロスポリンであり、抗増殖剤が、ミコフェノール酸であり、m T O R 阻害剤が、シロリムスであり、および/またはステロイドが、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはコルチゾンである、条項 5 3 に記載の方法。

【 0 2 3 2 】

条項 5 5 . 対象がヒトである、条項 4 1 から 5 4 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 3 3 】

条項 5 5 . 1 . 実質臓器移植片拒絶が急性拒絶である、条項 4 1 から 5 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 3 4 】

条項 5 5 . 2 . 実質臓器移植片拒絶が慢性拒絶である、条項 4 1 から 5 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 3 5 】

条項 5 6 . 障害を有するまたは有するリスクがある対象における障害を処置または阻害するための方法であって、障害を有するまたは有するリスクがある対象を選択するステップと、対象に、細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の治療有効量を投与するステップであって、ナノ小胞がインターロイキン (I L) - 3 3 を含有し、リシルオキシダーゼを含み、ナノ小胞が、 a) C D 6 3 も C D 8 1 も発現しないか、または b) C D 6 3 ^{1 0} C D 8 1 ^{1 0} である、ステップとを含み、それにより、対象における障害が処置または阻害され、障害が、心筋梗塞でも心筋虚血でもない心疾患である、方法。

【 0 2 3 6 】

条項 5 7 . 細胞外マトリックスが、哺乳動物細胞外マトリックスである、条項 5 6 に記載の方法。

【 0 2 3 7 】

条項 5 8 . 哺乳動物細胞外マトリックスが、ヒト細胞外マトリックスである、条項 5 7 に記載の方法。

【 0 2 3 8 】

条項 5 9 . 細胞外マトリックスが、食道組織、膀胱、小腸粘膜下組織、真皮、臍帯、心膜、心臓組織、または骨格筋に由来する、条項 5 6 から 5 8 までのいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

方法。

【 0 2 3 9 】

条項 6 0 . ナノ小胞が、mi R - 1 4 5 および / または mi R - 1 8 1 を含む、条項 5 5 から 5 8 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 4 0 】

条項 6 1 . 心疾患が、心不全または心虚血である、条項 5 6 から 6 0 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 4 1 】

条項 6 2 . 心疾患が、急性冠状動脈症候群、慢性安定狭心症、不安定狭心症、血管形成術、一過性脳虚血発作、虚血性再灌流傷害、跛行、血管閉塞、動脈硬化症、心不全、慢性心不全、急性非代償性心不全、心肥大、心臓線維症、大動脈弁疾患、大動脈弁または僧帽弁狭窄症、心筋症、心房細動、心不整脈、および心膜疾患を含む、条項 5 6 から 6 0 までのいずれかに記載の方法。

10

【 0 2 4 2 】

条項 6 3 . ナノ小胞が、静脈内に投与される、条項 5 5 から 6 2 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 4 3 】

条項 6 4 . ナノ小胞が、対象に毎週、月 2 回、または毎月投与される、条項 5 5 から 6 2 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 4 4 】

条項 6 5 . 対象に追加的な治療剤の治療有効量を投与するステップをさらに含む、条項 5 5 から 6 4 までのいずれか一項に記載の方法。

20

【 0 2 4 5 】

条項 6 6 . 対象がヒトである、条項 5 5 から 6 5 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 4 6 】

条項 6 6 . 1 . 心障害が心不全である、条項 5 5 から 6 6 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 4 7 】

条項 6 6 . 2 . 心障害が心筋症である、条項 5 5 から 6 6 までのいずれか一項に記載の方法。

30

【 0 2 4 8 】

条項 6 6 . 3 . 心障害が虚血性再灌流傷害である、条項 5 5 から 6 6 までのいずれか一項に記載の方法。

【 0 2 4 9 】

条項 6 7 . 対象における障害の処置または阻害に使用するための組成物であって、細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の治療有効量を含み、ナノ小胞が、インターロイキン (I L) - 3 3 を含有し、リシルオキシダーゼを含み、ナノ小胞が、 a) C D 6 3 も C D 8 1 も発現しないか、または b) C D 6 3 ^{1 0} C D 8 1 ^{1 0} であり、障害が、 a) 臓器もしくは組織の線維症 ; b) 実質臓器移植片拒絶 ; または c) 心筋梗塞ではない心疾患である、組成物。

40

【 0 2 5 0 】

条項 6 8 . 細胞外マトリックスが、哺乳動物細胞外マトリックスである、条項 6 7 に記載の組成物。

【 0 2 5 1 】

条項 6 9 . 哺乳動物細胞外マトリックスが、ヒト細胞外マトリックスである、条項 6 7 に記載の組成物。

【 0 2 5 2 】

条項 7 0 . 細胞外マトリックスが、食道組織、膀胱、小腸粘膜下組織、真皮、臍帯、心膜、心臓組織、または骨格筋に由来する、条項 6 7 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【 0 2 5 3 】

50

条項 7 1 . ナノ小胞が、mi R - 1 4 5 および / または mi R - 1 8 1 を含む、条項 6 7 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【 0 2 5 4 】

条項 7 2 . 障害が、実質臓器移植片拒絶であり、対象が、移植された実質臓器のレシピエントである、条項 6 7 ~ 7 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【 0 2 5 5 】

条項 7 3 . ナノ小胞が、移植された実質臓器への投与のために製剤化される、条項 7 0 に記載の組成物。

【 0 2 5 6 】

条項 7 4 . 移植された実質臓器が、心臓である、条項 7 3 に記載の組成物。

10

【 0 2 5 7 】

条項 7 5 . 障害が、心疾患である、条項 6 5 ~ 7 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【 0 2 5 8 】

条項 7 6 . 心疾患が、心不全または心虚血である、条項 7 5 に記載の組成物。

【 0 2 5 9 】

条項 7 7 . 心疾患が、急性冠状動脈症候群、慢性安定狭心症、不安定狭心症、血管形成術、一過性脳虚血発作、虚血性再灌流傷害、跛行、血管閉塞、動脈硬化症、心不全、慢性心不全、急性非代償性心不全、心肥大、心臓線維症、大動脈弁疾患、大動脈弁または僧帽弁狭窄症、心筋症、心房細動、心不整脈、および心膜疾患を含む、条項 7 5 に記載の組成物。

20

【 0 2 6 0 】

条項 7 8 . ナノ小胞が、静脈内投与用に製剤化される、条項 6 7 ~ 7 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【 0 2 6 1 】

条項 7 9 . 障害が、臓器または組織の線維症である、条項 6 7 ~ 7 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【 0 2 6 2 】

条項 8 0 . 線維症が、肝硬変、肺線維症、心臓線維症、縦隔線維症、関節線維症、骨髄線維症、腎性全身性線維症、ケロイド線維症、強皮症線維症、腎線維症、リンパ組織線維症、動脈線維症、毛細血管線維症、血管線維症、または腭線維症である、条項 7 9 に記載の組成物。

30

【 0 2 6 3 】

条項 8 1 . 線維症が、肺線維症である、条項 8 0 に記載の組成物。

【 0 2 6 4 】

条項 8 2 . 線維症が、心臓線維症である、条項 8 0 に記載の組成物。

【 0 2 6 5 】

条項 8 3 . 心臓線維症が、

a) 肥大型心筋症、サルコイドーシス、慢性腎不全、中毒性心筋症、虚血再灌流傷害、急性臓器拒絶、慢性臓器拒絶、老化、慢性高血圧症、非虚血性拡張型心筋症、不整脈、アテローム性動脈硬化症、H I V 関連慢性血管疾患、および肺高血圧症；または

40

b) 心筋梗塞もしくは心筋虚血

によって引き起こされる、条項 8 2 に記載の組成物。

【 0 2 6 6 】

条項 8 3 . ナノ小胞が、患者に吸入によって投与される、条項 6 7 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【 0 2 6 7 】

条項 8 4 . ナノ小胞が、対象に毎週、月 2 回、または毎月投与される、条項 6 7 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【 0 2 6 8 】

条項 8 5 . 追加的な治療剤の治療有効量をさらに含む、条項 6 7 ~ 8 4 のいずれか一項

50

に記載の組成物。

【0269】

条項86．追加的な治療剤が、免疫抑制剤である、条項85に記載の組成物。

【0270】

条項87．免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、抗増殖剤、mTOR阻害剤、および/またはステロイドである、条項86に記載の組成物。

【0271】

条項88．カルシニューリン阻害剤が、タクロリムスまたはシクロスポリンであり、抗増殖剤が、ミコフェノール酸であり、mTOR阻害剤が、シロリムスであり、および/またはステロイドが、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはコルチゾンである、条項87に記載の組成物。

10

【0272】

条項89．対象がヒトである、条項67～88のいずれか一項に記載の組成物。

【0273】

条項90．筋芽細胞分化を増大させるための方法であって、

筋芽細胞に細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の有効量を接触させるステップであって、ナノ小胞が、インターロイキン(IL)-33を含有し、リシルオキシダーゼを含み、ナノ小胞が、a)CD63もCD81も発現しないか、またはb)CD63¹⁰CD81¹⁰である、ステップを含み、

それにより、筋芽細胞分化を増大させる方法。

20

【0274】

条項91．筋芽細胞が、in vitroにある、条項90に記載の方法。

【0275】

条項92．細胞外マトリックスが、哺乳動物細胞外マトリックスである、条項90または条項91に記載の方法。

【0276】

条項93．哺乳動物細胞外マトリックスが、ヒト細胞外マトリックスである、条項92に記載の方法。

【0277】

条項94．細胞外マトリックスが、食道組織、膀胱、小腸粘膜下組織、真皮、臍帯、心臓組織、または骨格筋に由来する、条項90から93までのいずれか一項に記載の方法。

30

【0278】

条項95．ナノ小胞が、miR-145および/またはmiR-181を含む、条項90から94までのいずれか一項に記載の方法。

【0279】

条項96．筋芽細胞が、哺乳動物対象内にある、条項90から95までのいずれか一項に記載の方法。

【0280】

条項97．哺乳動物対象がヒトである、条項96に記載の方法。

40

【0281】

条項98．障害を有するまたは有するリスクがある対象における障害を処置または阻害するための方法であって、障害を有するまたは有するリスクがある対象を選択するステップと、対象に、細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の治療有効量を投与するステップであって、ナノ小胞がインターロイキン(IL)-33を含有し、リシルオキシダーゼを含み、ナノ小胞が、a)CD63もCD81も発現しないか、またはb)CD63¹⁰CD81¹⁰である、ステップとを含み、それにより、対象における障害が処置または阻害され、障害が、心筋梗塞または心筋虚血である、方法。

【0282】

条項99．細胞外マトリックスが、哺乳動物細胞外マトリックスである、条項98に記

50

載の方法。

【0283】

条項100．哺乳動物細胞外マトリックスが、ヒト細胞外マトリックスである、条項99に記載の方法。

【0284】

条項101．細胞外マトリックスが、食道組織、膀胱、小腸粘膜下組織、真皮、臍帯、心膜、心臓組織、または骨格筋に由来する、条項98から100までのいずれか一項に記載の方法。

【0285】

条項102．ナノ小胞が、miR-145および/またはmiR-181を含む、条項98から101までのいずれか一項に記載の方法。

10

【0286】

条項103．障害が、心筋虚血である、条項98から102までのいずれか一項に記載の方法。

【0287】

条項104．障害が、心筋梗塞である、条項98から102までのいずれかに記載の方法。

【0288】

条項105．ナノ小胞が、静脈内に投与される、条項98から104までのいずれか一項に記載の方法。

20

【0289】

条項106．ナノ小胞が、対象に毎週、月2回、または毎月投与される、条項98から105までのいずれか一項に記載の方法。

【0290】

条項107．対象に追加的な治療剤の治療有効量を投与するステップをさらに含む、条項98から106までのいずれか一項に記載の方法。

【0291】

条項108．対象がヒトである、条項98から107までのいずれか一項に記載の方法。

【0292】

本開示を以下の非限定的な実施例によって例示する。

30

【実施例】

【0293】

心筋虚血は、損傷を受けた心筋細胞 (cardiac myocyte) が線維芽細胞および付随する過剰な細胞外マトリックス (ECM) により置き換えられた後に線維症を引き起こし、これにより、心筋硬直および心不全の増大をもたらされる。線維症はまた、移植 (Tx) 後11年以内に移植片の > 50% の喪失を引き起こす慢性心臓同種異系移植片拒絶にも寄与する。心臓傷害後の線維症を防止するまたは逆転させるために利用可能な治療モダリティは存在しない。

【0294】

免疫抑制剤は、同種異系移植片線維症をもたらす病原性リモデリングプロセスに対しては効果がない。IL-33は、一般には間質細胞の核に見いだされ、一般に、組織損傷後に放出されてIL-33受容体、ST2を介して免疫細胞を活性化するアラミン、または自己由来分子とみなされる、IL-1ファミリーメンバーである。新たなエビデンスにより、IL33がST2+調節性T細胞 (Treg) を刺激することによって心血管および骨格筋修復を促進することが示されている。しかし、以前に記載された、IL-33を使用して組織修復を促進する方法は、可溶性IL-33サイトカインの使用だけに依拠するものであり、ST2を発現する細胞が多数あることを考慮すると、オフターゲット効果を有する可能性がある。IL-33を送達するための新しい方法、および、これだけに限定されないが心疾患などの、IL-33が役割を果たす種々の状態の新しい処置方法が依然として必要とされる。

40

50

【 0 2 9 5 】

ECM足場は、心臓の修復を含めた多数の臨床的適用に関してFDAに承認されている。心筋梗塞後のECMハイドロゲルの心臓内注射の使用に関して調査する第I相試験が現在進行中であるが、ECMにより心臓組織リモデリングが方向付けられる機構は部分的にしか分かっていない。ECM足場に包埋されたマトリックス結合型ナノ小胞(MBV)が核外インターロイキン-33(IL-33)の豊富な供給源であることが本明細書に開示される。bIL-33は、一般には間質細胞の核に見いだされ、一般に、免疫系に細胞傷害を警告し、その結果、IL-33受容体であるST2を伴う炎症促進性メディエーターの産生をもたらすアラミンとみなされる。エビデンスから、IL-33が、特に心臓ストレス後のIL-33の誘導が転帰の改善と関連している心血管疾患のモデルにおいて、組織修復のプロモーターとして機能し得ることが示唆される。IL-33がECM内に安定に貯蔵され、MBVに組み入れられることによる不活化から保護されることが決定された。結果から、IL33^{+/+}マウス組織由来のMBVでは修復性リモデリング促進性M2表現型へのST2^{-/-}マクロファージ分化が方向付けられるが、IL33^{-/-}マウス組織由来のMBVではそれが方向付けられないことが示され、さらに、MBVに関連するIL-33によりマクロファージの活性化が非標準ST2非依存性経路によってモジュレートされることが示唆される。IL-33がECM-MBVの不可欠な構成要素であることの発見により、免疫により駆動される病理学的線維症の調節に関する機構的洞察がもたらされる。ECM足場を心臓の修復のために使用することができる。

10

(実施例1)

20

ECM生体足場から単離されたマトリックス結合型ナノ小胞は全長IL-33を含有する

【 0 2 9 6 】

MBVのECM生体足場からの単離およびmiRNAカーゴの特徴付けは以前に記載されている(Huleihel et al., Sci Adv 2, e1600502 (2016); Huleihel et al., Tissue Eng part A 23, 1283-1294 (2017))。MBVに関連するタンパク質シグナル伝達分子を同定するために、予備的なサイトカイン、ケモカイン、および成長因子スクリーニングを、脱細胞化野生型(wt)マウス小腸または脱細胞化il33^{-/-}マウス小腸から単離されたMBVを用い、R&D systemのMouse XL Cytokine Array Kitを使用して実施した(図1A)。MBVの発現レベルが最も高いタンパク質の定量から、IL-33が、wtマウスから単離されたMBV(IL33⁺MBV)においてil33^{-/-}マウスから単離されたMBV(IL33⁻MBV)と比較して高度に発現され、単離されたMBV中に存在する他のタンパク質の発現の差は最小であったことが示された(図1B)。さらに、脱細胞化WTマウス腸から単離されたMBVの透過型電子顕微鏡検査イメージングから、これらの小胞が直径およそ100nmであることが示された(図1C)。サイトカインスクリーニングからの結果を免疫プロット分析によってさらに検証し、それにより、MBVに関連するIL-33がタンパク質の全長(32kDa)形態であり(図1D)、より小さな記載された切断産物ではないことが示された(Lefrancais et al., Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 1673-1678 (2012); Cayrol et al., Nature immunology 19, 375 (2018))。その後、MBVにおける全長IL-33発現の存在を、臨床的適用に一般に使用されるECM外科用メッシュで観察し、これには、実験室で作製したものと並び市販の等価物、膀胱マトリックス(UBM)およびACELL(登録商標)MATRISTEM(商標);小腸粘膜下組織(SIS)およびCook Biotech(登録商標)BIODESIGN(商標);真皮およびBD(登録商標)XENMATRIX(商標);ならびに心臓ECMを含めた(図1E)。結果から、実験室で作製した足場におけるIL-33発現レベルがそれらのそれぞれの市販の対応物と同様であることが示され、これにより、これらの結果が実験室での製造プロトコールのアーチファクトではないことが示される。

30

40

50

(実施例2)

IL-33はMBVの内腔内に貯蔵され、タンパク質分解から保護される

【0297】

検出されたIL-33がMBV単離プロセスの夾雑物ではないことを検証するために、MBVを、SEPHAROSE(登録商標)CL-2B樹脂を使用し、分子ふるいクロマトグラフィー(SEC)により、溶出画分を280nmにおけるUV吸光度によって連続的にモニタリングしながらさらに精製した(図2A)。免疫プロット分析により、重MBV画分中にIL-33が存在することが確認された(図2B、上のパネル)。別の実験において、MBVをまず、1%TRITON(登録商標)X-100を用いて溶解させ、次いで、抽出物をSECによって分析した。UVクロマトグラムにおけるシフト(図2A)、および免疫プロット分析(図2B、下のパネル)によって決定された通り、結果から、溶解したMBV由来の分子成分がより軽い画分中に主に溶出したことが示される。さらに、プール画分6~8の透過型電子顕微鏡検査により、これらの画分中に小胞が存在することが示された(図2C)。これらの結果から、IL-33がMBVに付随しており、MBV単離物の可溶性夾雑物ではないことが確認された。次に、IL-33がMBVの表面膜上に存在するのか、それとも内腔内に貯蔵されているのかを決定した。画分6~8由来のプールされたMBVをNHS-LC-ビオチンでビオチン化した。スルホン酸基によりビオチンが脂質膜を透過することが妨げられ、それにより、外表面タンパク質のみが標識される(Diaz et al., Scientific reports 6, 37975 (2016))。ビオチン化後、MBVを溶解させ、ストレプトアビジンプルダウンアッセイに供して、表面タンパク質を結合していない内腔成分から分画した。免疫プロット分析から、IL-33が結合していない画分中のみ存在し、ストレプトアビジン(SA)ビーズによってプルダウンされなかったことが示された(図2D)。別の実験において、MBVをまず、1%TRITON(登録商標)X-100を用いて溶解させ、次いで、ビオチン化に供した。これにより、MBVの表面成分および内腔成分の両方をビオチン化することが可能になった。免疫プロット分析から、ストレプトアビジンプルダウン後、IL-33はSAビーズに結合していることが示された(図2D)。累積的に、これらのデータから、IL-33がMBVの内腔内に貯蔵されていることが示唆された。これらの結果を確認するために、プロテイナーゼK保護アッセイを実施した。プール画分6~8由来のMBVを、漸増濃度のプロテイナーゼKと一緒に、1%TRITON(登録商標)X-100の非存在または存在下、37°Cで30分間インキュベートした。免疫プロット分析によって示された通り(図2E)、TRITON(登録商標)X-100の非存在下では、IL-33はプロテイナーゼKによって分解されなかった。しかし、TRITON(登録商標)X-100によるMBV膜の透過処理により、IL-33がプロテイナーゼKに到達可能になり、IL-33がプロテイナーゼKの影響を受けやすくなり、その結果、IL-33の分解がもたらされる(図2E)。これらの結果から、MBVに関連するIL-33が小胞膜の内腔内に存在し、そこでタンパク質分解から保護されることが確認された。

(実施例3)

IL33⁺MBVはリモデリング促進性マクロファージ表現型を非標準ST2非依存性経路によって活性化する

【0298】

IL-33⁺またはIL-33⁻MBVの骨髄細胞に対する影響に関する広範囲にわたる機構的調査をin vitroで行った。MBVの内腔内のIL-33の位置を考慮すると、IL-33を封入することにより、その同類のST2受容体への結合が妨げられると仮定され、ST2非依存性形質導入機構の存在が示唆される。このシナリオを調査するために、B6 wtマウス(図3A)またはst2^{-/-}マウス(図3B)から単離された骨髄由来マクロファージ(BMDM)を、M1様マクロファージ表現型を誘導するためにインターフェロン-γ(IFN-γ)およびリポ多糖(LPS)を用いて刺激し、M2様表現型を誘導するためにインターロイキン-4(IL-4)を用いて刺激し、組換えIL-33、脱細胞化wtマウス腸から単離されたMBV(IL33⁺MBV)、またはiL

IL33^{-/-}マウス腸 (IL33⁻MBV)、またはブタ小腸粘膜下組織から単離されたMBV (SIS MBV)を用いて刺激した。結果から、マクロファージが、IL-4により刺激された(M2)細胞の発現パターンと同様に、SIS MBVおよびIL33⁺MBVに反応してアルギナーゼ1 (Arg-1)を発現したことが示された(図3A、3D)。対照的に、IL33⁻MBVではiNOSの発現が誘導されたが、Arg-1の発現は誘導されなかった(図3A、3C)。st2^{-/-}マウスから単離されたマクロファージを用いて同様の効果が観察された。具体的には、IL33⁺MBVではst2^{-/-}マクロファージの修復性のリモデリング促進性M2様表現型への活性化が方向付けられたが、IL33⁻MBVではそれが方向付けられなかった(図3B、3C、3D)。その後、免疫標識アッセイからの結果をウエスタンブロット分析によって確認し、それにより、マクロファージをIL33⁺MBVで刺激することによりArg-1発現の上方調節を誘導することができるが、IL33⁻MBVではそれができないことが示された(図4A)。さらに、IL33⁺MBVはM2マクロファージをSTAT6リン酸化非依存的に活性化するので、このIL33⁺MBVのArg-1発現を誘導する能力は、よく特徴付けられたIL-4/IL-13媒介性M2マクロファージ分化経路とは別個であることが示された(図4B)。これらのデータから、MBVに関連するIL-33が、特徴付けられていない非標準ST2非依存性経路を通じてマクロファージの活性化をモジュレートすることが実証される。

10

(実施例4)

マクロファージ分泌物への曝露後の骨格筋前駆細胞の筋形成の評価

20

【0299】

選択的に活性化されるM2マクロファージに関連するセクレトームは骨格筋芽細胞の筋原性であることが示されている^{41, 42}。以前に、本発明者らは、ECMで処理したマクロファージによって条件付けした培地によりC2C12筋芽細胞の筋管形成およびサルコメアミオシン発現が促進されることを示した⁴³。本試験は、IL33⁺MBVを用いて刺激したマクロファージによって条件付けした培地により、C2C12筋芽細胞の筋管形成がIL-4により誘導されたM2様マクロファージの生物学的活性と同様に促進されるが、IL33⁻MBVを用いて刺激したマクロファージによって条件付けした培地ではそれが促進されないという点で、同様の結果を示す

(図5A、B)。

30

(実施例5)

実施例1~4の材料および方法

【0300】

マウス腸の脱細胞化：新鮮な小腸を成体野生型(wt)B6マウスまたは成体IL-33^{-/-}B6マウスから得た。小腸をリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄して、腸の内容物全てを完全に除去し、即時脱細胞化のために各腸から1.5cmの長さの断片を得た。試料を以前に記載されている通り(Oliveira AC, et al. PLoS ONE. 2013; 8(6): e66538)脱細胞化した。簡単に述べると、試料をまず、5MのNaCl中に、連続した穏やかな攪拌の下で72時間にわたって浸漬した。脱細胞化溶液を24時間ごとに交換した。次いで、マウス腸ECMを凍結乾燥させ、Wiley Millを使用し、#40メッシュスクリーンを用いて破碎して微粒子にした。

40

【0301】

皮膚ECMの調製：皮膚ECMを以前に記載されている通り調製した(Reing JE, et al. Biomaterials. 2010; 31(33): 8626-33)。簡単に述べると、市場体重(約110kg)ブタ(Tissue Source Inc.)から全層皮膚を回収し、皮下脂肪および表皮を機械的層剥離によって除去した。次いで、この組織を0.25%トリプシン(Thermo Fisher Scientific)で6時間、70%エタノールで10時間、3%H₂O₂で15分間、0.26%EDTA/0.69%トリス中1%TRITON(登録商標)X-100(Sigma-Aldrich)で6時間、溶液を交換してさらに16時間、および0.1%過

50

酢酸 / 4 % エタノール (Rochester Midland) で 2 時間処理した。各化学物質の変更の間に水洗浄を実施し、最終ステップ後に水洗浄とリン酸緩衝食塩水 (PBS) 洗浄を交互に実施した。化学的曝露は全てオービタルシェーカーにおいて 300 rpm で攪拌しながら行った。次いで、皮膚 ECM を凍結乾燥させ、Wiley Mill を使用し、# 40 メッシュスクリーンを用いて破碎して微粒子にした。

【0302】

膀胱マトリックス (UBM) の調製：UBM を以前に記載されている通り調製した (Mase VJ, et al. Orthopedics. 2010; 33 (7): 511)。市場体重動物由来のブタ膀胱を Tissue Source, LLC から取得した。簡単に述べると、漿膜、外筋層、粘膜下層、および筋層粘膜を機械的に除去した。粘膜の管腔尿路上皮細胞を脱イオン水で洗浄することによって基底膜から解離させた。残りの組織は基底膜および下にある粘膜の固有層からなり、4 % エタノールを含む 0.1 % 過酢酸中、300 rpm で 2 時間にわたって攪拌することによって脱細胞化した。次いで、組織を PBS および滅菌水で広範囲にわたってすすいだ。次いで、UBM を凍結乾燥させ、Wiley Mill を使用し、# 60 メッシュスクリーンを用いて破碎して微粒子にした。

10

【0303】

小腸粘膜下組織 (SIS) の調製：SIS を以前に記載されている通り調製した (Badylak SF, et al. J Surg Res. 1989; 47 (1): 74 - 80)。簡単に述べると、6 カ月齢の市場体重 (約 110 ~ 約 120 kg) ブタから空腸を回収し、縦方向に開裂した。粘膜の表層を機械的に除去した。同様に、漿膜および外筋層を機械的に除去し、粘膜下層および粘膜の基底部分を残した。4 % エタノールを含む 0.1 % 過酢酸中、300 rpm で 2 時間にわたって攪拌することによって組織の脱細胞化および消毒を完了した。次いで、組織を PBS および滅菌水で広範囲にわたってすすいだ。次いで、SIS を凍結乾燥させ、Wiley Mill を使用し、# 60 メッシュスクリーンを用いて破碎して微粒子にした。

20

【0304】

心臓 ECM の調製：心臓 ECM を以前に記載されている通り調製した (Wainwright JM, et al. Tissue Eng Part C Methods. 2010; 16 (3): 525 - 32)。簡単に述べると、ブタ心臓を安楽死の直後に得、- 80 で少なくとも 16 時間にわたって凍結させ、解凍した。大動脈にカニューレを挿入し、1 型試薬グレード (1 型) 水および 2 x PBS を交互にそれぞれ毎分 1 リットルで 15 分間灌流させた。0.02 % トリプシン / 0.05 % EDTA / 0.05 % NaN₃ を 37 で、3 % TRITON (登録商標) X - 100 / 0.05 % EDTA / 0.05 % NaN₃、および 4 % デオキシコール酸の段階的な灌流を行った (それぞれ毎分およそ 1.2 リットルで 2 時間)。最後に、心臓に 0.1 % 過酢酸 / 4 % EtOH を毎分 1.7 リットルで 1 時間にわたって灌流させた。各化学溶液の後、1 型水および 2 x PBS を心臓に流して、細胞溶解ならびに細胞デブリおよび化学残留物の除去を補助した。次いで、心臓 ECM を凍結乾燥させ、Wiley Mill を使用し、# 60 メッシュスクリーンを用いて破碎して微粒子にした。

30

40

【0305】

マトリックス結合型ナノ小胞 (MBV) の単離：MBV を以前に記載されている通り単離した (Huleihel L, et al. Sci Adv. 2016; 2 (6): e1600502)。簡単に述べると、酵素により消化された ECM を 500 g (10 分間)、2500 g (20 分間)、および 10,000 g (30 分間) での連続的な遠心分離に供して、コラーゲン原線維レムナントを除去した。上記の遠心分離ステップをそれぞれ 3 回実施した。次いで、線維を含まない上清を 4、100,000 g で 70 分間にわたって遠心分離した (Beckman Coulter Optima L - 90K ultracentrifuge)。100,000 g のペレットを洗浄し、PBS 500 μl 中に懸濁させ、0.22 μm のフィルター (Millipore) を通過させた。

50

【0306】

サイトカイン抗体アレイ：MBV内に貯蔵されたサイトカインを、Mouse X L C y t o k i n e A r r a y K i t (R & D S y s t e m s ; M i n n e a p o l i s 、 M N 、 U S A) を使用し、製造者の指示に従って分析した。脱細胞化WTマウス腸 (n = 3) または脱細胞化 I L - 3 3 - / - マウス腸 (n = 3) から単離されたMBVから抽出物を調製した。抽出物を希釈し、アレイ膜と一緒に終夜インキュベートした。アレイをすすいで非結合タンパク質を除去し、抗体カクテルと一緒にインキュベートし、ストレプトアビジン - 西洋ワサビペルオキシダーゼおよび化学発光検出試薬を使用して展開した。 I m a g e J ソフトウェアを使用して平均スポット画素密度を定量した。

【0307】

透過型電子顕微鏡検査 (T E M) : 以前に記載されている通り炭素をコーティングしたグリッドにローディングし、4%パラホルムアルデヒド中に固定したMBVに対してTE M イメージングを行った (H u l e i h e l l , e t a l . S c i A d v . 2 0 1 6 ; 2 (6) : e 1 6 0 0 5 0 2) 。グリッドを80kVにおいて高解像度 A d v a n c e d M i c r o s c o p y T e c h n i q u e s デジタルカメラを備えた J E O L 1 2 1 0 T E M を用いてイメージングした。 J E O L T E M ソフトウェアを使用して代表的な画像からMBVのサイズを決定した。

【0308】

分子ふるいクロマトグラフィー (S E C) : S E C によるMBVの分画を以前に記載されている通り実施した (B o i n g , A N , e t a l . J E x t r a c e l l u l a r V e s i c l e s . 2 0 1 4 ; 3 (1)) 。簡単に述べると、S e p h a r o s e C L - 2 B 樹脂 (S i g m a A l d r i c h) 1 5 m l を 1 c m x 2 0 c m の ガラ スカラム中に積層し、PBSで洗浄し、平衡化した。MBV 1ml をカラムにローディングし、PBSを溶出緩衝液として使用して画分収集 (画分当たり0.3ml および合計30画分の収集) をすぐに開始した。溶出画分を、B i o l o g i c L P s y s t e m (B i o R a d) を使用してUV280nmによって連続的にモニタリングした。MBV を1% T R I T O N (登録商標) X - 1 0 0 中で30分間インキュベートすることによって溶解したMBVを調製し、次いで、上記の通りSECに供した。

【0309】

MBVタンパク質のビオチン化：MBVタンパク質のビオチン化を以前に記載されている通り、軽微な改変を伴って実施した (D i a z G , e t a l . S c i R e p . 2 0 1 6 ; 6 : 3 7 9 7 5) 。インタクトなMBV 100マイクログラムを、10mM のスルホ - N H S - ビオチンの非存在下または存在下、室温で30分間インキュベートした。スルホ - N H S - ビオチンにスルホン酸基が存在することにより、試薬がMBV膜を透過することが妨げられる。インキュベーション後、10kDaのMWCO濾過カラムを使用して過剰なスルホ - N H S - ビオチンを除去し、次いで、MBVを1% T R I T O N (登録商標) X - 1 0 0 を用いて溶解させた。別の実験において、MBV 100マイクログラムをまず、1% T R I T O N (登録商標) X - 1 0 0 中に溶解させた。溶解後、緩衝液交換を実施して、1% T R I T O N (登録商標) X - 1 0 0 溶液を1xPBSで置き換えた。次いで、MBV抽出物を10mMのスルホ - N H S - ビオチンの非存在下または存在下、室温で30分間インキュベートした。インキュベーション後、10kDaのMWCO濾過カラムを使用して過剰なスルホ - N H S - ビオチンを除去した。MBV ± ビオチンまたはMBV抽出物 ± ビオチンを1xPBS中500μlまで希釈し、予洗したストレプトアビジン - セファロース樹脂 (S i g m a A l d r i c h) 5 0 μ l と一緒にインキュベートした。オービタルロッカーにおいて室温で2時間インキュベートした後、10,000xgで5分間にわたって遠心分離することによってストレプトアビジン - セファロース樹脂をペレット化した。結合していない画分を表す上清を新しい管に移し、樹脂を300mMのNaClで5回洗浄した。溶出緩衝液 (2% SDS、6Mの尿素) と一緒に室温で15分間、次いで96 で15分間インキュベートすることにより、結合したタンパク質を樹脂から溶出させた。

10

20

30

40

50

【0310】

プロテイナーゼK保護アッセイ：プロテイナーゼK保護アッセイを以前に記載されている通り実施した (de Jong OG, et al. J Cell Mol Med. 2016; 20(2): 342-350)。簡単に述べると、MBVを、PBSまたはPBS中漸増濃度のプロテイナーゼK中、1%TRITON(登録商標)X-100の存在を伴ってまたは伴わずに、最終体積を試料当たり20 μ lとし、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。10mMのDTTを含む95 μ lの2xLaemmli Buffer 20 μ lを添加することによってアッセイを停止した。95 μ lで5分間インキュベートした後、試料を免疫プロット分析のために使用した。

【0311】

マクロファージの単離および活性化：マウス骨髄由来マクロファージ(BMDM)を以前に記載されている通り単離し、特徴付けた(Huleihel L, et al. Tissue Eng part A. 2017; 23(21-22): 1283-1294)。簡単に述べると、6~8週齢のC57bl/6マウスから骨髄を回収した。骨髄から回収した細胞を洗浄し、1mL当たり細胞 1×10^6 個でプレティングし、マクロファージコロニー刺激因子(MCSF)の存在下、48時間ごとに完全培地交換を行って7日間にわたってマクロファージに分化させた。次いで、マクロファージを以下のうちの1つを用いて24時間にわたって活性化させた：(1)MIFN+LPS表現型(M1様)を促進するために、20ng/mLのインターフェロン-(IFN)および100ng/mLのリポ多糖(LPS)(Affymetrix eBioscience、Santa Clara, CA; Sigma Aldrich)、(2)MIL-4表現型(M2様)を促進するために、20ng/mLのインターロイキン(IL)-4(Invitrogen)、(3)100ng/mLのIL-33(Peprotech)、または(4)25 μ g/mLのWTマウスMBV、IL-33 $^{-/-}$ MBV、もしくはSIS-MBV。37 $^{\circ}$ Cでのインキュベーション期間後、細胞を滅菌PBSで洗浄し、免疫標識のために2%パラホルムアルデヒド(PFA)を用いて固定した。

【0312】

マクロファージ免疫標識：非特異的結合を防止するために、細胞をPBS、0.1%TRITON(登録商標)-X、0.1%TWEEN(登録商標)-20、4%ヤギ血清、および2%ウシ血清アルブミンで構成されるブロッキング溶液中、室温で1時間インキュベートした。次いで、ブロッキング緩衝液を除去し、細胞を以下の一次抗体のうちの1つの溶液中でインキュベートした：(1)モノクローナル抗F4/80(Abcam、Cambridge, MA)、1:200希釈、汎マクロファージマーカーとして、(2、3)ポリクローナル抗誘導性一酸化窒素合成酵素(iNOS)(Abcam、Cambridge, MA)、1:100希釈、M1様マーカーとして、および抗アルギナーゼ1(Abcam、Cambridge, MA)、1:200希釈、M2様マーカーとして。細胞を4 $^{\circ}$ Cで16時間インキュベートし、一次抗体を除去し、細胞をPBSで洗浄した。フルオロフォアとコンジュゲートした二次抗体(Alexaロバ抗ウサギ488またはロバ抗ラット488; Invitrogen, Carlsbad, CA)溶液を適当なウェルに添加し、室温で1時間置いた。次いで、抗体を除去し、細胞をPBSで洗浄し、DAPIを使用して核を対比染色した。サイトカインにより活性化したマクロファージを使用して、標準曝露時間(陽性対照)を確立し、これをその後、群全体を通して一定に保持した。Cell Profiler(Broad Institute, Cambridge, MA)を使用して画像を定量した。データを、処理したマクロファージを適当なM0培地対照と比較した、対応のないスチューデントのt検定、または多重比較のためにTukeyのポストホック検定を用いた一元配置分散分析のいずれかを使用して統計的有意性に関して解析した。データを最低N=3の平均 \pm 標準偏差として報告した。p値<0.05を統計的に有意であるとみなした。

【0313】

C2C12筋形成アッセイ：高血清培地(20%ウシ胎仔血清)では、細胞増殖が細胞周

10

20

30

40

50

期内で維持され、分化が阻害される。逆に、低血清培地（1%ウシ胎仔血清、1%ウマ血清）では、細胞周期からの退出および筋管形成が誘導され、陽性対照がもたらされる。これらは、それぞれ増殖培地および分化培地と称される。筋分化潜在性を、骨格筋芽細胞の融合指数を調査することによって決定した。C₂C₁₂骨格筋芽細胞を増殖培地中、および80%集密に達するまで培養した。次いで、培地を、マクロファージ上清および増殖培地の50:50溶液からなる処置培地または増殖培地もしくは分化培地である対照に交換した。5~7日後、または分化培地対照に筋管形成が示されたときに、細胞を免疫標識のために2%パラホルムアルデヒドで固定した。固定された細胞を以前に記載されたプロトコールに従って室温で1時間ブロッキングし、抗サルコメアミオシン抗体中でインキュベートした。一次インキュベーション後、細胞をPBSで洗浄し、1:200の希釈度のAlexa Fluorロバ抗マウス488二次抗体中、室温で1時間インキュベートし、DAPIで対比染色した。各ウェルについて、Zeiss Axiovert顕微鏡を使用して5つの20倍視野の画像を取得した。

10

（実施例6）

移植片拒絶におけるIL-33およびMBV

【0314】

急性心臓移植（HTx）拒絶は、一般には、アロ抗原に対するレシピエントのCD4⁺およびCD8⁺T細胞応答を制御する免疫抑制剤治療によって防がれる。しかし、そのような免疫抑制治療は、慢性心臓移植拒絶（CR）に対しては効果がなく、結果生じる免疫媒介性線維症および血管リモデリングにより、移植後およそ11年以内に進行性心筋機能不全および大多数のHTxの喪失がもたらされる。最近の試験により、炎症性マクロファージ、単球、および単球由来樹状細胞（DC）などの自然免疫細胞が、移植プロセスに関連する虚血再灌流傷害（IRI）後に放出される損傷関連分子パターン（DAMP）に対するそれらの強力な炎症促進性応答に起因してCRにおいて重要な役割を果たすことが示されている。実質臓器にレシピエント単球およびレシピエント単球由来DCが急速に浸潤し、これらが、CRを開始し、持続させるアロ反応性T細胞に対する重要な局所的刺激として作用する。したがって、損傷関連分子パターンを含有する自己分子が組織傷害の間に放出され、浸潤性自然免疫細胞における炎症促進性応答を刺激することが明らかである。しかし、同じく免疫応答を制御するために傷害部位に存在する局所的な内在性の負の調節因子は十分に理解されていない。間質細胞の核内に隔離されているIL-1ファミリーメンバーであるIL-33は、そのような免疫調節特性を有し得る。組換えIL-33の送達により、調節性T細胞（Treg）が拡大増殖すること（expanding）によって心臓移植後の移植片生存が促進される。種々の臓器のECMから単離されたMBVがIL-33の豊富かつ安定な供給源であることが発見されたことが本明細書に開示される。IL-33は核タンパク質であることが理解されているが、IL-33を核内での隔離から解放し、IL-33の免疫細胞に対する媒介効果を可能にする機構は欠如している。本明細書で提示されているデータから、MBV内のIL-33が、in vitroおよびin vivoにおける自然免疫細胞分化を方向付けることができる隔離されていない免疫調節性IL-33の重要な供給源であることが確立される。

20

30

（実施例7）

IL-33が存在しないと慢性拒絶が増加する

【0315】

in vitro試験により、マクロファージを免疫調節性かつ潜在的に修復性のM2サブセットにシフトさせる強力な能力が明らかになった（図3A~3C、図4A~4B）。MBV内に位置するものを含めたIL-33の心臓移植転帰に対する影響を試験するために、IL-33が欠損したまたはIL-33が十分であるBm12マウス由来の心臓を、野生型（WT）C57BL/6（B6）レシピエントマウスに移植した。これらのマウスは、核およびMBVのどちらにおいてもIL-33を欠く。Bm12マウスは、H2-A b1^bとは3ヌクレオチドが異なり、その結果、WT B6マウスの免疫系によって非自己であると認識される3つのアミノ酸置換が生じているH2-A b1^bm1²を発現する

40

50

。これらの試験では、IL-33が欠損した(KO)またはIL-33が十分であるBm12移植片(WT)を、B6レシピエントに移植し、慢性拒絶に関連する血管閉塞および線維症の発生を移植後90~100日目に評価した(図6A~6D)。ヘマトキシリン・エオシン(H+E; 図6A)およびトリクローム染色(図6B)およびコンピュータ支援画像解析により、IL-33を欠くHTxでは血管症(図6C)および筋線維喪失/線維性疾患(図6D)が有意に増加することが確認された。したがって、IL-33が全く存在しないと慢性拒絶の発生が明白に増加した。

(実施例8)

IL-33+MBVは移植後の炎症性骨髄細胞の生成を制御する

【0316】

機構的試験において、移植片IL-33およびIL-33+MBVの再建を完全に欠くことの影響、具体的には、このことが慢性拒絶を統合する局所的免疫細胞にどのように影響を及ぼすかを調査した。これらの試験では、白血球を単離し、術後3日目にフローサイトメトリー分析によって評価した。ナイーブBm12マウスの心臓(ナイーブ対照)から単離された白血球をベースライン対照として含めた(n=4)。フローサイトメトリー分析から代表的なドットプロット(図7A~7D)を生成し、その統計解析が示されている(P値は一元配置分散分析(ANOVA)によって生成した。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005、****P<0.001)。IL-33を欠く心臓移植により、Tx後初期に、単球由来樹状細胞(monodC)(図7A~7B:CD45+CD11b+CD11c+F4-80^{lo}MHCII^{hi})および炎症性マクロファージ(図7C~7D;CD45+CD11b+F4-80^{hi}Ly6c^{hi}MHCII^{hi})などの局所的な炎症性骨髄細胞の存在下で例示される初期の炎症反応が有意に増加した。この炎症性骨髄細胞の増加は、IL-33+MBVを使用した局所的IL-33の再建によって補正することができた(図8A~8D)。これは、心臓移植片におけるCD11b+CD11c^{hi}monodC(図8A、8C)およびCD11b+F4/80^{hi}Ly6c^{hi}炎症性マクロファージ(図8B、8D)の有意な減少によって実証される。総合して、これらのデータから、MBV内のIL-33が、移植後の移植片における炎症性骨髄細胞の生成を制御する重要な局所的因子として同定される。

【0317】

局所炎症の低減により、初期の拒絶およびその後の慢性拒絶の発生を制限することができる。全ての実質臓器(心臓、腎臓、肝臓、肺)が、線維性疾患および加速された血管病理を伴う一種の慢性拒絶を受ける。一般に利用される齧歯類固形移植モデルにおける所見に基づいて、他の実質臓器移植の直後の局所的IL-33+MBV送達は、局所的骨髄細胞の炎症能が制限され、移植転帰の改善が促進されるように作用する。虚血時間の延長および実質臓器移植後初期の組織損傷に起因する炎症は、移植転帰不良ならびに急性および慢性拒絶の増加に関連する。逆に、虚血時間が短いことにより浸潤性の自然骨髄性細胞によって媒介される炎症反応が低減/制限される場合には、生きているドナー移植後に最良の移植転帰が観察される。移植後に利用される現行の免疫抑制剤(immunosuppressant agent)は、主に適応免疫細胞(T細胞およびB細胞)を標的とする。これらは、ステロイドを除いて、自然免疫細胞に対しては効果がない。これらの薬物は、一般には、拒絶応答を開始する自然細胞(innate cell)に対しては強力な影響を及ぼさない。したがって、自然骨髄性細胞を標的とするためのMBVと適応免疫細胞を標的とする免疫抑制剤(immunosuppressant)との組合せが高度に有効な組合せである。

(実施例9)

実施例7~8の材料および方法

【0318】

動物: C57BL/6(B6)およびBm12マウスはJackson Laboratoriesから購入した。il33^{-/-}マウスは、S.Nakae(University of Tokyo, Tokyo, Japan)⁸⁴からの寄贈品であった。Bm12

10

20

30

40

50

マウスを $i l 3 3^{-/-}$ バックグラウンドに対して6回戻し交配することにより $B m 1 2 \times i l 3 3^{-/-}$ マウスを生成した。 $S t 2^{-/-}$ マウスは、元々は記載の通り⁸⁵ $B A L B / c$ バックグラウンドに対して生成されたものであり、 *Dr. Anne Sperling* (*University of Chicago*) から、 $C 5 7 B L / 6$ バックグラウンドに対して7回戻し交配した後のものを得た。次いで、これらのマウスを $C 5 7 B L / 6$ バックグラウンドに対してさらに3回戻し交配した。動物を、病原体を含まない特定の設備内に収容した。

【0319】

血管化心臓移植：慢性拒絶のマウスモデルにおける心臓移植ドナーとして $H 2 - A b 1^b$ に野生型 (*WT*) $B 6$ マウスと比較して3つのアミノ酸置換を有する $B 6 B m 1 2$ が一般に使用される。 $B m 1 2$ マウスと $I L - 3 3$ 欠損 $B 6$ マウスを交配させることにより、慢性拒絶における $I L - 3 3$ の役割を定義することができた。 $B m 1 2$ または $B m 1 2 \times i l 3 3^{-/-}$ 心臓を $C 5 7 B L / 6$ または $C 5 7 B L / 6 i l 3 3^{-/-}$ レシピエントの腹部に異所性に移植した。簡単に述べると、ドナー心臓をレシピエントに、ドナー上行大動脈および肺動脈のそれぞれレシピエント腹大動脈および下大静脈への端側吻合によって移植した。移植片機能を毎日、心臓収縮の腹部触診によって評価した。いくつかの実験では、 $I L - 3 3^+$ $M B V$ をブタ由来 $U B M$ ハイドロゲル中に $1 m g / m l$ の $M B V$ の最終濃度まで希釈した。移植片の再灌流後に、移植片に希釈した $M B V 4 0 \mu g$ を含有するハイドロゲルで覆った。消化管を置き換え、移植された心臓の周囲のその正常な位置を再び占めるようにすると同時に、ハイドロゲル中の $M B V$ を心臓表面に安定に接着させた。移植片機能を、示されている回収日まで毎日、心臓収縮の腹部触診によって検証した。

【0320】

脾臓および移植片浸潤性白血球の単離：マウスを麻酔し、 $P B S + 0 . 5 \%$ ヘパリンを、左心室を介し、右心室を出た流体が目に見える血液を全く含有しなくなるまで灌流させた。脾臓を単離し、機械的解離および $R B X$ 溶解後に単一細胞浮遊液を生成した。次いで、心臓を取り出し、断片に切り、 *gentleMACS dissociator* (*Miltenyi Biotec*) においてプログラムEを使用し、 *GentleMACS* C管中の、 $3 5 0 \mu / m l$ の $I V$ 型コラゲナーゼおよび $1 \mu l / m l$ の $D N A s e I$ を含有する培地中でホモジナイズした。次いで、 $4 0 \mu m$ の細胞濾過器を使用した濾過および $1 5 0 0 g$ での *Lympholyte - M* (*Cedarlane*) 密度勾配で20分間の遠心分離によって単一細胞浮遊液を得た。細胞を間期に *Pasteur* ピペットを使用して取り出し、洗浄、細胞計数、および分析のために新しい管に移した。

【0321】

フローサイトメトリー：単離された脾細胞および移植片浸潤性白血球を、熱失活させたヤギ血清 (5%) と一緒にインキュベートして $F c R$ をブロックし、生/死識別染色で処理し、次いで、蛍光色素とコンジュゲートした $A b$ の種々の組合せ (*BD Bioscience*、 *Biolegend*、 *eBioscience* または *MD Biosciences*) で標識して骨髓性細胞集団を評価した。 *LSRFortessa* フローサイトメーター (*BD*、 *Biosciences*) でデータを取得し、 *FlowJo*、 *Version 10.1* (*TreeStar*) を使用して解析した。

【0322】

組織学および免疫組織化学染色：ナイーブマウスの心臓および心臓移植片をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、 $4 \mu m$ に切片作製した後、 $H + E$ またはマッソントリクロームを用いて標準のプロトコールに従って染色した。 *NearCTE* ソフトウェア (*nearctye.org* を通じてインターネットで入手可能) を使用して、青色の線維症 + 領域 ($m m^2$) を全組織領域 ($m m^2$) で割ったものを算出し、それに $1 0 0$ を掛けて % 線維化領域測定値をもたらした。動脈閉塞のパーセンテージを、閉塞した動脈を各心臓試料中の動脈の総数と比べて手動で比較することによって算出した。

(実施例 1 0)

線維症の処置

【 0 3 2 3 】

間質性肺線維症（I P F）患者および年齢を釣り合わせた正常（対照）患者の外植された肺からヒト肺線維芽細胞を単離した。線維症のマーカーであるC o l 1、C o l 3、フィブロネクチン、およびA C T A 2の発現レベルを、M B Vを用いた処置の前後に決定した。M B Vを3つの異なる供給源組織：ブタ脱細胞化膀胱マトリックス（U B M）、ブタ脱細胞化肺（p L u n g）、およびヒト肺組織（h L u n g）から単離した。M B Vを培養培地に2つの異なる濃度（1 m l 当たり粒子 1×10^9 個および 3×10^9 個）で添加した。結果から、全ての処置でこれらの線維症のマーカーの発現レベルの顕著な低下が示された。脱細胞化肺から単離されたM B Vではより顕著な低下がもたらされた。図 9 A、9 Bを参照されたい。したがって、M B Vの投与を、肺および他の組織における線維症を低減するための治療として使用することができる。

10

【 0 3 2 4 】

記載されている方法または組成物の正確な詳細は、記載の発明の主旨から逸脱することなく変形させるまたは改変することができることが明らかである。本発明者らは、以下の特許請求の範囲の範囲および主旨の中に入る全てのそのような改変および変形を特許請求する。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目 1)

障害を有するまたは有するリスクがある対象における前記障害を処置または阻害するための方法であって、

20

前記障害を有するまたは有するリスクがある対象を選択するステップと、

前記対象に、細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の治療有効量を投与するステップであって、前記ナノ小胞がインターロイキン（I L）- 3 3を含有し、リシルオキシダーゼを含み、前記ナノ小胞が、a）C D 6 3もC D 8 1も発現しないか、またはb）C D 6 3^{1 0}C D 8 1^{1 0}である、ステップと

を含み、

それにより、前記対象における前記障害が処置または阻害され、前記障害が、a）臓器もしくは組織の線維症；b）実質臓器移植片拒絶；またはc）心筋梗塞でも心筋虚血でもない心疾患である、方法。

(項目 2)

30

前記細胞外マトリックスが、哺乳動物細胞外マトリックスである、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記哺乳動物細胞外マトリックスが、ヒト細胞外マトリックスである、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記細胞外マトリックスが、食道組織、膀胱、小腸粘膜下組織、真皮、臍帯、心膜、心臓組織、または骨格筋に由来する、項目 1 から 3 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 5)

前記ナノ小胞が、m i R - 1 4 5 および / または m i R - 1 8 1 を含む、項目 1 から 4 までのいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 6)

前記障害が、前記実質臓器移植片拒絶であり、前記対象が、移植された実質臓器のレシピエントである、項目 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 7)

前記ナノ小胞が、前記移植された実質臓器に投与される、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

前記移植された実質臓器が心臓である、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

前記障害が心疾患である、項目 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0)

50

前記心疾患が、心不全または心虚血である、項目 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1)

前記心疾患が、急性冠状動脈症候群、慢性安定狭心症、不安定狭心症、血管形成術、一過性脳虚血発作、虚血性再灌流傷害、跛行、血管閉塞、動脈硬化症、心不全、慢性心不全、急性非代償性心不全、心肥大、心臓線維症、大動脈弁疾患、大動脈弁または僧帽弁狭窄症、心筋症、心房細動、心不整脈、および心膜疾患を含む、項目 1 から 5 までのいずれかに記載の方法。

(項目 1 2)

前記ナノ小胞が、静脈内に投与される、項目 1 から 1 1 までのいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 1 3)

前記障害が、臓器または組織の線維症である、項目 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 4)

前記線維症が、肝硬変、肺線維症、心臓線維症、縦隔線維症、関節線維症、骨髄線維症、腎性全身性線維症、ケロイド線維症、強皮症線維症、腎線維症、リンパ組織線維症、動脈線維症、毛細血管線維症、血管線維症、または腭線維症である、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 5)

前記線維症が、肺線維症である、項目 1 4 に記載の方法。

20

(項目 1 6)

前記線維症が、心臓線維症である、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記心臓線維症が、

a) 肥大型心筋症、サルコイドーシス、慢性腎不全、中毒性心筋症、虚血再灌流傷害、急性臓器拒絶、慢性臓器拒絶、老化、慢性高血圧症、非虚血性拡張型心筋症、不整脈、アテローム性動脈硬化症、H I V 関連慢性血管疾患、および肺高血圧症；または

b) 心筋梗塞もしくは心筋虚血

によって引き起こされる、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記ナノ小胞が、前記患者に吸入によって投与される、項目 1 5 に記載の方法。

30

(項目 1 9)

前記ナノ小胞が、前記対象に毎週、月 2 回、または毎月投与される、項目 1 から 1 6 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 0)

前記対象に追加的な治療剤の治療有効量を投与するステップをさらに含む、項目 1 から 1 9 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 1)

前記追加的な治療剤が、免疫抑制剤である、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、抗増殖剤、m T O R 阻害剤、および/またはステロイドである、項目 2 1 に記載の方法。

40

(項目 2 3)

前記カルシニューリン阻害剤が、タクロリムスまたはシクロスポリンであり、前記抗増殖剤が、ミコフェノール酸であり、前記 m T O R 阻害剤が、シロリムスであり、および/または前記ステロイドが、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはコルチゾンである、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記対象がヒトである、項目 1 から 2 3 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 5)

50

対象における障害の処置または阻害に使用するための組成物であって、細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の治療有効量を含み、前記ナノ小胞が、インターロイキン（IL）- 33を含有し、リシルオキシダーゼを含み、前記ナノ小胞が、a）CD 63もCD 81も発現しないか、またはb）CD 63¹⁰CD 81¹⁰であり、前記障害が、a）臓器もしくは組織の線維症；b）実質臓器移植片拒絶；またはc）心筋梗塞ではない心疾患である、組成物。

(項目 2 6)

追加的な治療剤をさらに含む、項目 2 5 に記載の組成物。

(項目 2 7)

前記追加的な治療剤が、免疫抑制剤である、項目 2 6 に記載の組成物。

10

(項目 2 8)

前記免疫抑制剤が、カルシニューリン阻害剤、抗増殖剤、mTOR阻害剤、および/またはステロイドである、項目 2 7 に記載の組成物。

(項目 2 9)

前記カルシニューリン阻害剤が、タクロリムスまたはシクロスポリンであり、前記抗増殖剤が、ミコフェノール酸であり、前記mTOR阻害剤が、シロリムスであり、および/または前記ステロイドが、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはコルチゾンである、項目 2 2 に記載の組成物。

(項目 3 0)

筋芽細胞分化を増大させるための方法であって、

20

筋芽細胞に細胞外マトリックス由来の単離されたナノ小胞の有効量を接触させるステップであって、前記ナノ小胞が、インターロイキン（IL）- 33を含有し、リシルオキシダーゼを含み、前記ナノ小胞が、a）CD 63もCD 81も発現しないか、またはb）CD 63¹⁰CD 81¹⁰である、ステップを含み、

それにより、筋芽細胞分化を増大させる、方法。

(項目 3 1)

前記筋芽細胞が、in vitroにある、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記細胞外マトリックスが、哺乳動物細胞外マトリックスである、項目 3 0 または項目 3 1 に記載の方法。

30

(項目 3 3)

前記哺乳動物細胞外マトリックスが、ヒト細胞外マトリックスである、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記細胞外マトリックスが、食道組織、膀胱、小腸粘膜下組織、真皮、臍帯、心膜、心臓組織、または骨格筋に由来する、項目 3 0 から 3 3 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 5)

前記ナノ小胞が、miR - 145 および/またはmiR - 181を含む、項目 3 0 から 3 4 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 6)

40

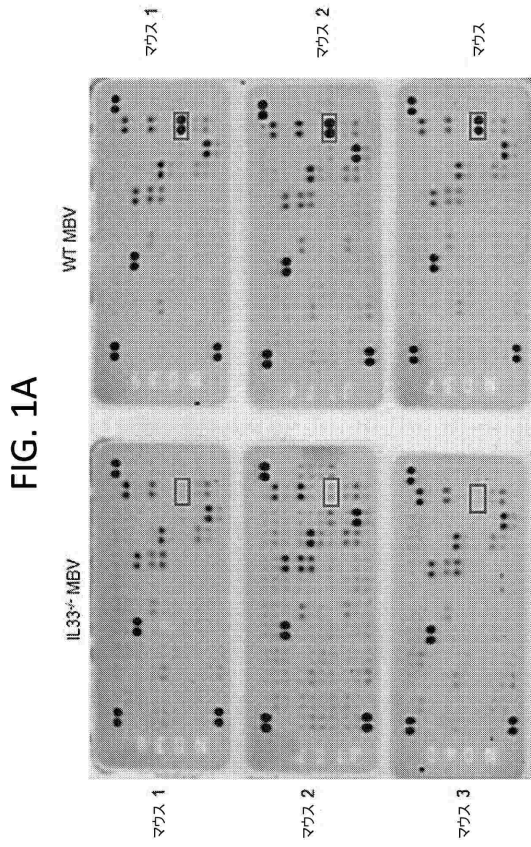
前記筋芽細胞が、哺乳動物対象内にある、項目 3 0 から 3 5 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 7)

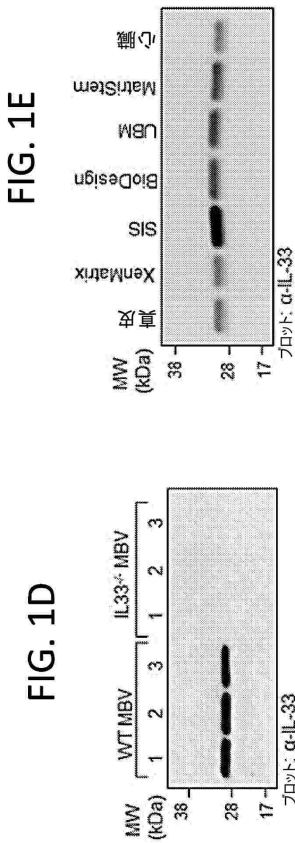
前記哺乳動物対象がヒトである、項目 3 6 に記載の方法。

【図面】

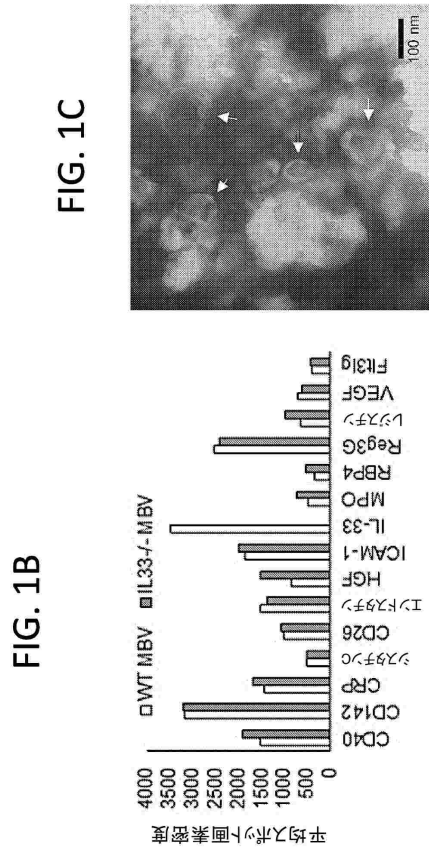
【図 1 - 1】



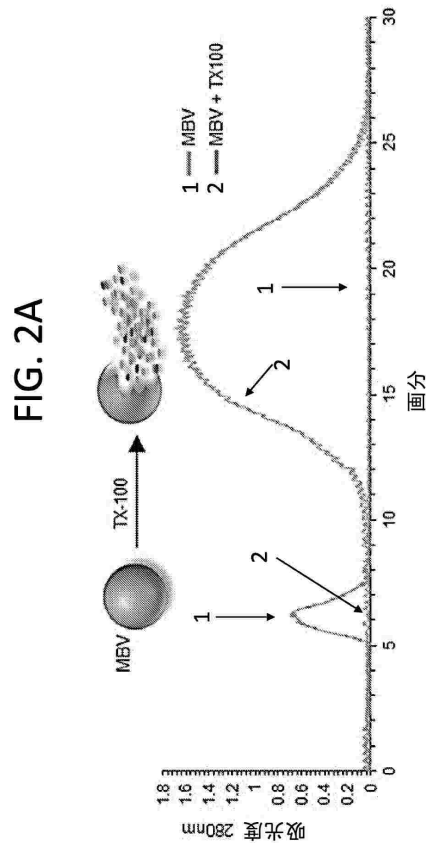
【図 1 - 3】



【図 1 - 2】



【図 2 - 1】



10

20

30

40

50

【 図 2 - 2 】

FIG. 2C

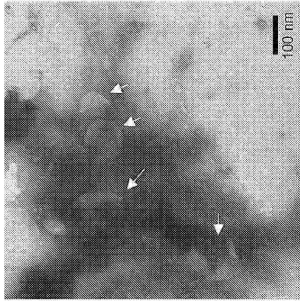
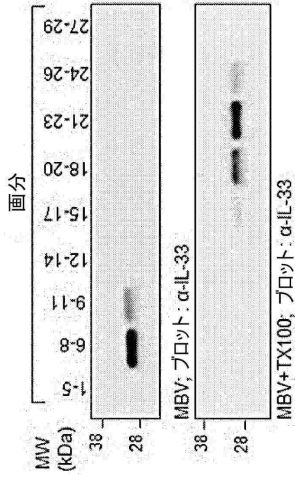
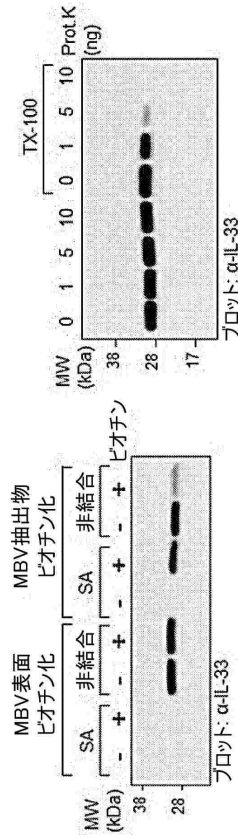


FIG. 2B



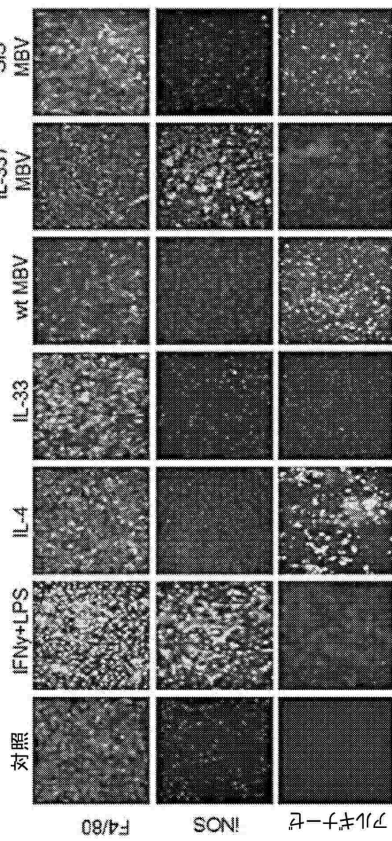
【 図 2 - 3 】

FIG. 2E



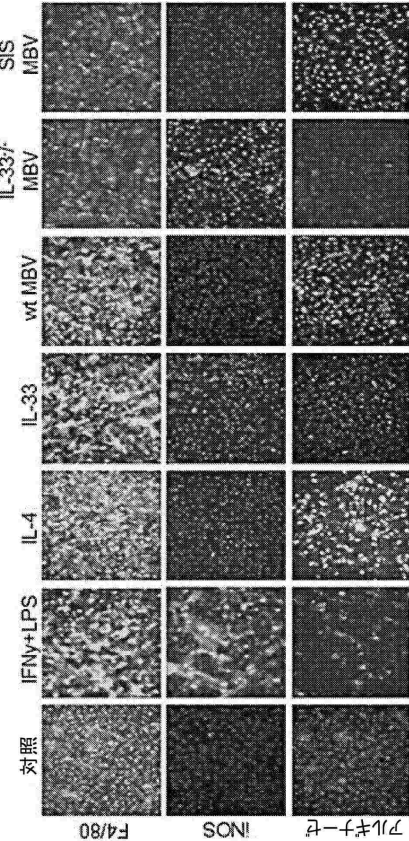
【 図 3 - 1 】

FIG. 3A



【 図 3 - 2 】

FIG. 3B



10

20

30

40

50

【 図 3 - 3 】

FIG. 3D

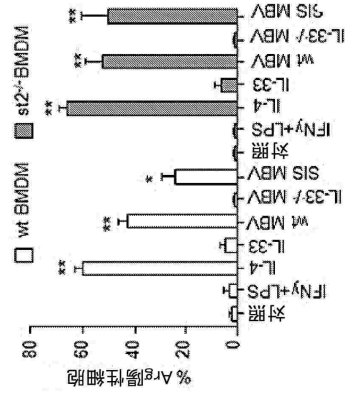
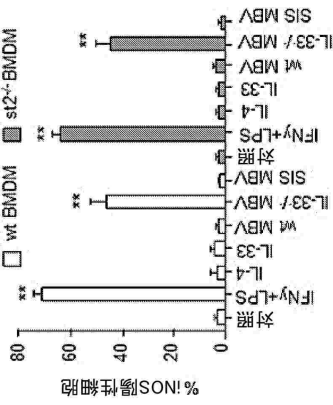


FIG. 3C



【 図 5 - 1 】

FIG. 5A



【 図 4 】

FIG. 4A

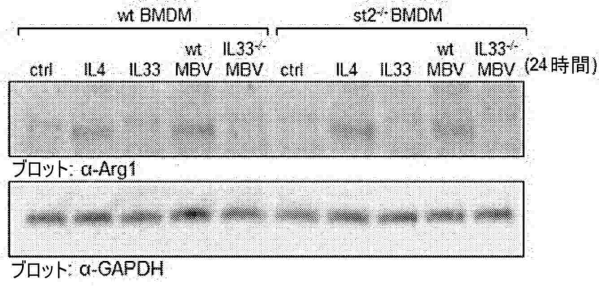
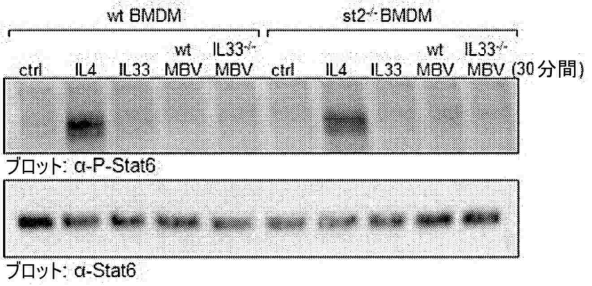
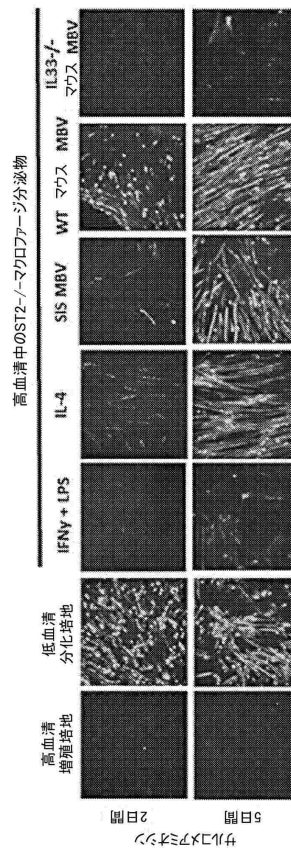


FIG. 4B



【 図 5 - 2 】

FIG. 5B



10

20

30

40

50

【図 6 - 1】

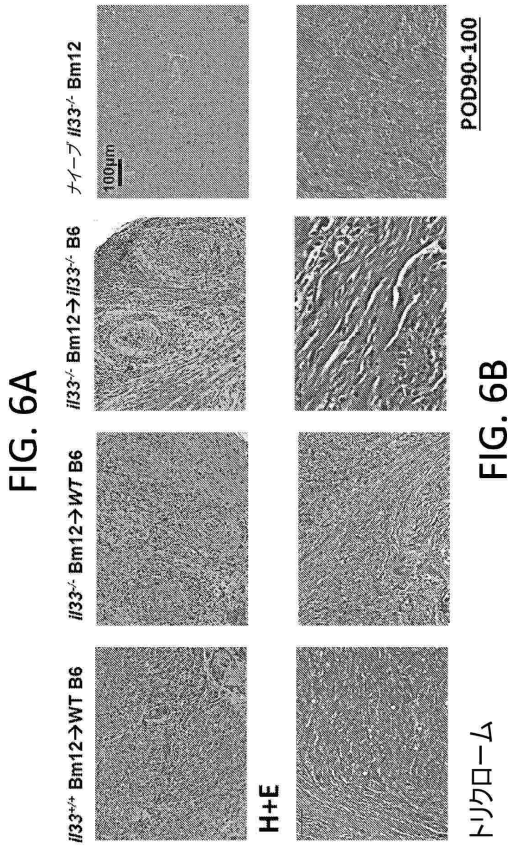
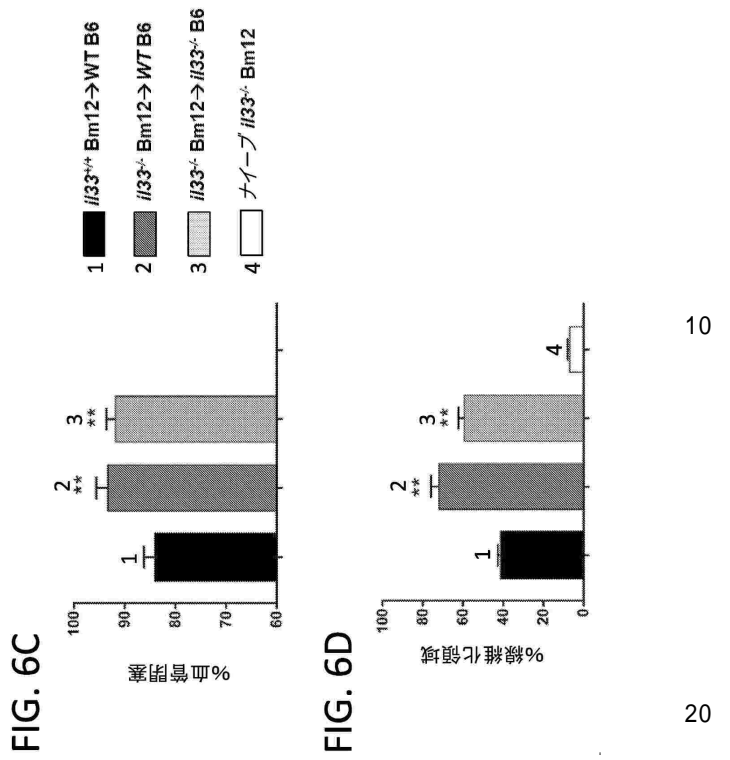


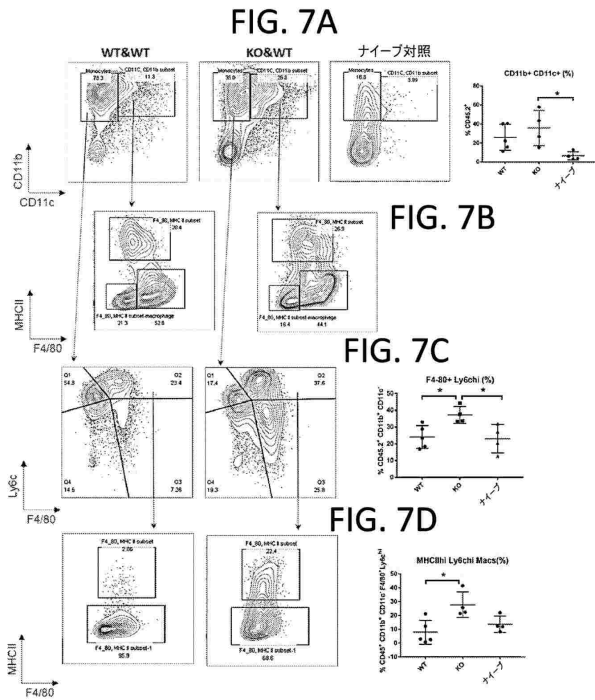
FIG. 6B

トリクローム

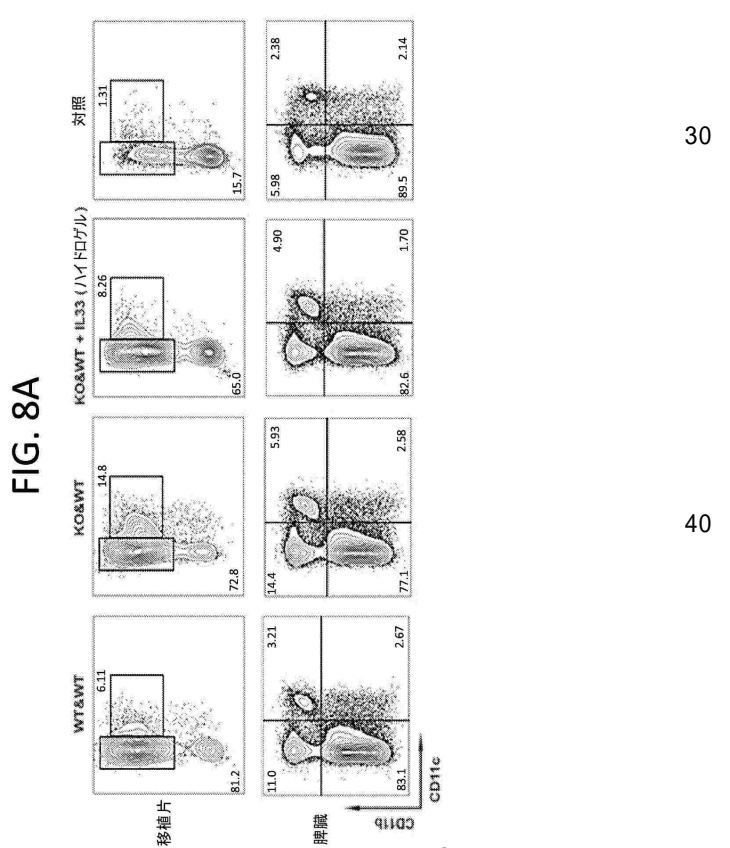
【図 6 - 2】



【図 7】



【図 8 - 1】



10

20

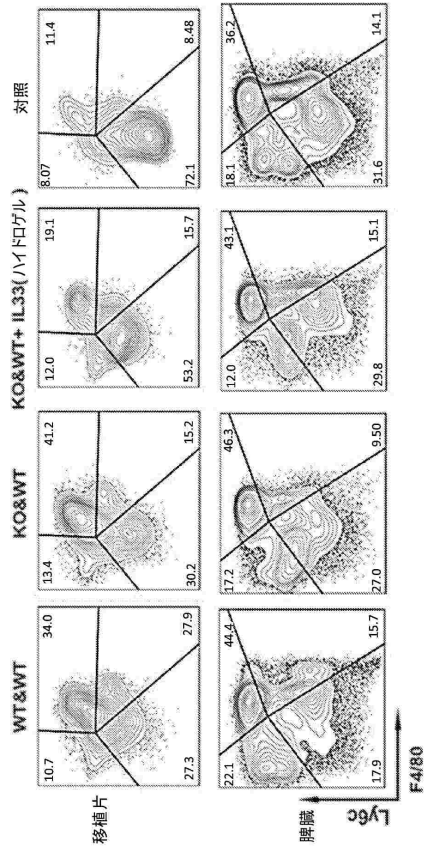
30

40

50

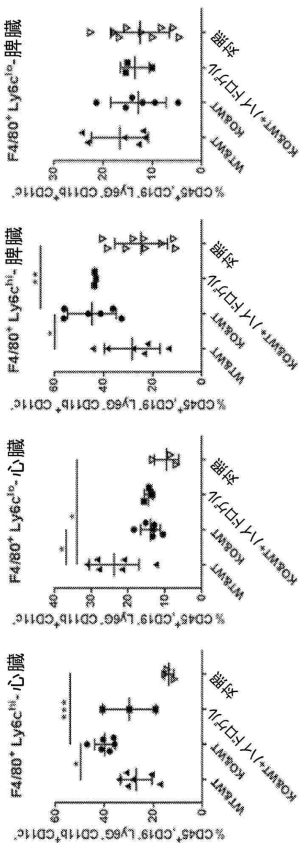
【 図 8 - 2 】

FIG. 8B



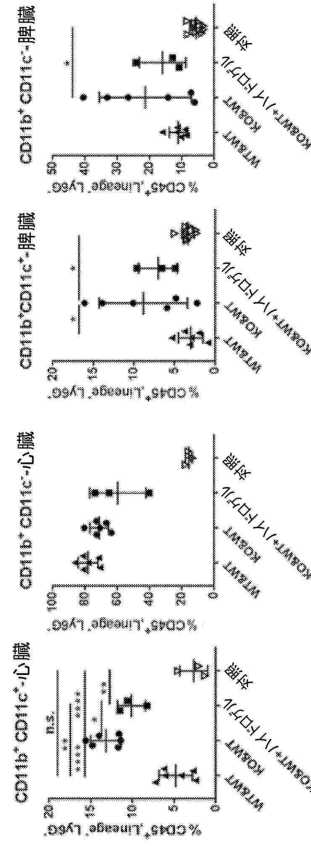
【 図 8 - 4 】

FIG. 8D



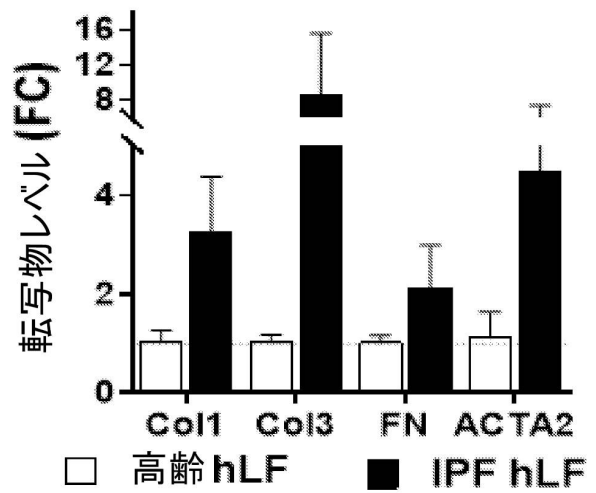
【 図 8 - 3 】

FIG. 8C



【 図 9 - 1 】

FIG. 9A



10

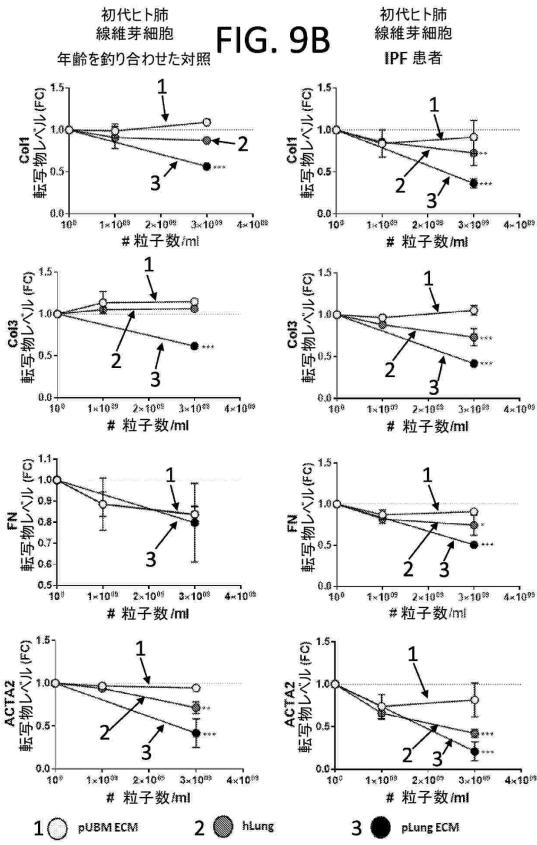
20

30

40

50

【図 9 - 2】



10

20

【配列表】

0007548567000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I		
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	9/72 (2006.01)	A 6 1 K	9/72	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/706(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	31/365(2006.01)	A 6 1 K	31/706	
A 6 1 K	31/436(2006.01)	A 6 1 K	31/365	
A 6 1 K	31/573(2006.01)	A 6 1 K	31/436	
C 1 2 N	5/077(2010.01)	A 6 1 K	31/573	
C 0 7 H	15/04 (2006.01)	C 1 2 N	5/077	
C 0 7 D	307/88 (2006.01)	C 0 7 H	15/04	B
C 0 7 D	498/18 (2006.01)	C 0 7 D	307/88	
C 0 7 J	5/00 (2006.01)	C 0 7 D	498/18	
C 0 7 K	14/54 (2006.01)	C 0 7 J	5/00	
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 0 7 K	14/54	
C 1 2 N	9/02 (2006.01)	C 1 2 N	15/113	Z
		C 1 2 N	9/02	

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 バディラク, スティーブン フランシス

アメリカ合衆国 インディアナ 4 7 9 0 6, ウエスト ラファイエット, キングスウッド ロード
サウス 1 1 5 0

(72)発明者 ハッシー, ジョージ エス.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 6 0 6 6, クランベリー タウンシップ, マクドナルド ド
ライブ 1 0 5

(72)発明者 ターンクイスト, ヘス

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 5 2 1 5, ピッツバーグ, イースタン アベニュー 9 8

(72)発明者 ジキ, ジェンナ リン

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 5 2 0 3, ピッツバーグ, シドニー ストリート 2 9 1 5,
アパートメント 4 1 0

(72)発明者 リウ, チュアン

中華人民共和国 5 1 8 0 5 5 グアンドン, シェンジェン, ナンシャン ディストリクト, フ
ァフィコンメン コンプレックス, ビルディング 3, ルーム 3 3 ディー

(72)発明者 ジャン, ジョンチャン

中華人民共和国 4 1 0 0 1 1 チャンシャ, シャオシャン ロード ナンバー 2 9 8, ビルディ
ング ナンバー 7, ルーム 1 3 1 1

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 5 1 8 6 2 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 9 7 0 3 8 (W O , A 1)

特表 2 0 1 3 - 5 3 6 2 4 6 (J P , A)

特表 2 0 1 2 - 5 1 8 0 4 1 (J P , A)

Tissue Gngineering PartA, 2017, Vol.23 No.19, p.1152-1159

Tissue Gngineering PartA, 2017, Vol.23 Suppl.1, p.S-29(107)

Cytokine, 2012, Vol.58, p.368-379

Nat Med., 2012, Vol.18 No.7, p.1028-1040

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0

A 6 1 P

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)