



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월28일
(11) 등록번호 10-2722950
(24) 등록일자 2024년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 9/50 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01) C07K 14/78 (2024.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 9/5063 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7010214
(22) 출원일자(국제) 2018년09월21일
심사청구일자 2021년07월08일
(85) 번역문제출일자 2020년04월08일
(65) 공개번호 10-2020-0088799
(43) 공개일자 2020년07월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/052213
(87) 국제공개번호 WO 2019/060719
국제공개일자 2019년03월28일
(30) 우선권주장
15/712,294 2017년09월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2017526723 A
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 18 항

(73) 특허권자
더 유니버시티 오브 마이애미
미국, 플로리다 33136, 마이애미, 스위트 1214,
1400 엔더블류 10 애비뉴
(72) 발명자
바디아바스 에반젤로스 브이.
미국, 플로리다 33136, 코랄 케이블스, 4405 톨레
도 스트리트
(74) 대리인
특허법인한얼

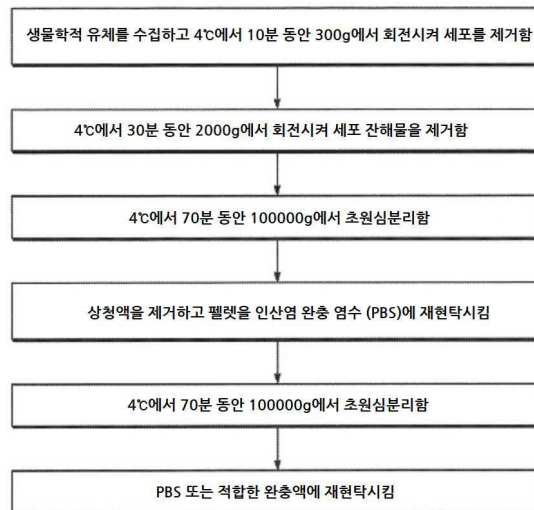
심사관 : 윤미란

(54) 발명의 명칭 **수포성 표피박리증의 치료를 위한 방법 및 조성물**

(57) 요약

본 발명은 수포성 표피박리증을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 17/02 (2018.01)

C07K 14/78 (2024.01)

(56) 선행기술조사문헌

JP2016518109 A

US20170258845 A1

US20160184363 A1

WO2017122095 A1

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 생물활성제(bioactive agent)를 포함하는 단리된 미세소포(microvesicles)의 분비체(secretome)를 포함하는, 수포성 표피박리증(epidermolysis bullosa)의 치료를 필요로 하는 대상체에서 수포성 표피박리증을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 분비체가 2 nm 내지 1000 nm의 크기를 갖는 미세소포의 이종 집단(heterogeneous population)을 포함하고,

상기 미세소포는 하기 단계:

(i) 골수 유래 중간엽 줄기 세포로부터 수득된 세포 배양 배지를 정화하여 세포 잔해물(cell debris)을 제거하는 단계,

(ii) 미세소포의 이종 집단을 침전시키기에 충분한 시간 동안 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 정화된 배양 배지를 접촉시킴으로써 미세소포의 이종 집단을 침전시키는 단계,

(iii) 침전된 미세소포의 이종 집단을 원심분리에 의해 수집하는 단계, 및

(iv) 미세소포의 이종 집단을 정제하는 단계

를 포함하는 방법에 의해, 대상체에게 투여하기 전에 단리된 것이고,

상기 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 평균 분자량은 200 내지 35,000 Da이고,

상기 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 농도는 5 내지 100% w/v이고,

상기 미세소포는 초원심분리 단리에 의해 수득된 미세소포와 비교하여 보다 매끄럽고 주름이 없는 경계를 가지고,

대상체에서 수포성 표피박리증의 하나 이상의 증상이 완화 또는 감소되는, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜의 평균 분자량은 6,000 Da, 8,000 Da, 10,000 Da 또는 20,000 Da인, 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 수포성 표피박리증의 하나 이상의 증상이 두꺼워진 굳은살(thickened calluses), 표피 물집(epidermal blistering), 구강 점막의 물집(blistering of oral mucosa), 두꺼워진 손톱 및/또는 발톱(thickened fingernails and/or toenails), 패혈증(sepsis), 영양실조(malnutrition), 탈수(dehydration), 전해질 불균형(electrolyte imbalance), 폐쇄성 기도 합병증(obstructive airway complications), 결함있는 콜라겐 VII 발현(defective collagen VII expression), 빈혈(anemia), 식도 협착(esophageal strictures), 성장 지연(growth retardation), 손가락 및/또는 발가락의 웨빙(webbing) 또는 융합, 치아 기형(malformation of teeth), 소구증(microstomia) 및 각막 찰과상(corneal abrasions)의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 표피 물집이 손, 발, 팔꿈치 및/또는 무릎의 표피 물집인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 치료가 대상체에서 콜라겐 VII 발현을 증가시키고/시키거나 상처 치유와 관련된 마커의 발현을 증가시키는 것을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 6

하나 이상의 생물활성제(bioactive agent)를 포함하는 단리된 미세소포(microvesicles)의 분비체(secretome)를 포함하는, 이영양성 수포성 표피박리증 (dystrophic epidermolysis bullosa; DEB)의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이영양성 수포성 표피박리증을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 분비체가 2 nm 내지 1000 nm의 크기를 갖는 미세소포의 이종 집단(heterogeneous population)을 포함하고,

상기 미세소포는 하기 단계:

(i) 골수 유래 중간엽 줄기 세포로부터 수득된 세포 배양 배지를 정화하여 세포 잔해물(cell debris)을 제거하는 단계,

(ii) 미세소포의 이종 집단을 침전시키기에 충분한 시간 동안 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 정화된 배양 배지를 접촉시킴으로써 미세소포의 이종 집단을 침전시키는 단계,

(iii) 침전된 미세소포의 이종 집단을 원심분리에 의해 수집하는 단계, 및

(iv) 미세소포의 이종 집단을 정제하는 단계

를 포함하는 방법에 의해, 대상체에게 투여하기 전에 단리되고,

상기 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 평균 분자량은 200 내지 35,000 Da이고,

상기 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 농도는 5 내지 100% w/v이고,

상기 미세소포는 초원심분리 단리에 의해 수득된 미세소포와 비교하여 보다 매끄럽고 주름이 없는 경계를 가지고,

대상체에서 DEB의 하나 이상의 증상이 감소 또는 제거되는, 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 이영양성 수포성 표피박리증(DEB)은 상염색체 우성(DDEB) 또는 상염색체 열성(RDEB)인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 폴리에틸렌 글리콜의 평균 분자량은 6,000 Da, 8,000 Da, 10,000 Da 또는 20,000 Da인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 수포성 표피박리증의 하나 이상의 증상이 두꺼워진 굳은살(thickened calluses), 표피 물집(epidermal blistering), 구강 점막의 물집(blistering of oral mucosa), 두꺼워진 손톱 및/또는 발톱(thickened fingernails and/or toenails), 패혈증(sepsis), 영양실조(malnutrition), 탈수(dehydration), 전해질 불균형(electrolyte imbalance), 폐쇄성 기도 합병증(obstructive airway complications), 결함있는 콜라겐 VII 발현(defective collagen VII expression), 빈혈(anemia), 식도 협착(esophageal strictures), 성장 지연(growth retardation), 손가락 및/또는 발가락의 웨빙(webbing) 또는 융합, 치아 기형(malformation of teeth), 소구증(microstomia) 및 각막 찰과상(corneal abrasions)의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 표피 물집이 손, 발, 팔꿈치 및/또는 무릎의 표피 물집인, 약제학적 조성물.

청구항 11

제6항에 있어서, 치료가 대상체에서 콜라겐 VII 발현을 증가시키고/시키거나 상처 치유와 관련된 마커의 발현을 증가시키는 것을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 12

단리된 미세소포(microvesicles)의 분비체(secretome)를 포함하는, 세포에서 콜라겐 VII 수준을 증가시키거나 세포에 하나 이상의 생물활성제를 전달하는 데 사용하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 분비체가 2 nm 내지 1000 nm의 크기를 갖는 미세소포의 이종 집단(heterogeneous population)을 포함하고,

상기 세포는 상기 단리된 미세소포와 접촉되고,

상기 세포는 수포성 포피박리증 유전자형을 발현하고,

상기 단리된 미세소포는 하기 단계:

(i) 골수 유래 중간엽 줄기 세포로부터 수득된 세포 배양 배지를 정화하여 세포 잔해물(cell debris)을 제거하는 단계,

(ii) 미세소포의 이종 집단을 침전시키기에 충분한 시간 동안 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 정화된 배양 배지를 접촉시킴으로써 미세소포의 이종 집단을 침전시키는 단계,

(iii) 침전된 미세소포의 이종 집단을 원심분리에 의해 수집하는 단계, 및

(iv) 미세소포의 이종 집단을 정제하는 단계

를 포함하는 방법에 의해, 대상체에게 투여하기 전에 정제되고,

상기 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 평균 분자량은 200 내지 35,000 Da이고,

상기 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 농도는 5 내지 100% w/v이고,

상기 미세소포는 초원심분리 단리에 의해 수득된 미세소포와 비교하여 보다 매끄럽고 주름이 없는 경계를 가지고,

대상체에서 콜라겐 VII 수준이 증가되는, 약제학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 세포가 *COL7A1* 유전자에서 돌연변이를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 단리된 세포의 소포가 콜라겐 VII 단백질 및/또는 *COL7A1* mRNA를 세포에 전달하는, 약제학적 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 하나 이상의 생물활성제가 콜라겐 VII 단백질, 콜라겐 VII mRNA, STAT3 신호전달 활성화제 및 정준 Wnt 활성화제(canonical Wnt activator)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, STAT3 신호전달 활성화제가 인터페론, 포피 성장 인자, 인터류킨-5, 인터류킨-6, MAP 키나제 및 c-src 비-수용체 티로신 키나제로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나, STAT3이 인산화되는, 약제학적 조성물.

청구항 17

제12항에 있어서, 하나 이상의 생물활성제가 하나 이상의 약제학적 화합물인, 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 또는 제6항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 대상체의 피부에 국소적으로 적용되는, 약제학적 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2017년 9월 22일에 출원된 USSN 제15/712,294호에 대한 우선권을 주장하며, 그 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 의학, 세포 생물학, 분자 생물학 및 유전학 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 수포성 표피박리증을 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 수포성 표피박리증 (epidermolysis bullosa; EB)은 피부와 점막에 물집을 일으키는 유전피부병의 한 그룹이며, 미국에서 신생아 백만 명 당 20명의 발병률을 갖는다. 이것은 피부 연약을 야기하는 표피와 진피 사이의 고정

결합의 결과이다. 이의 중증도는 경증 내지 치사에 이른다.

[0006] 이영양성 수포성 표피박리증 (dystrophic epidermolysis bullosa; DEB)은 피부 및 기타 기관에 영향을 미치는 유전 변이이다. 이 질환을 갖고 태어난 아이는 피부가 나비의 날개처럼 섬세하고 연약한 것으로 묘사되기 때문에 "나비 아이"라고 한다. DEB 환자의 피부는 심한 물집이 형성되기 매우 쉽다. 피부의 열린 상처가 서서히 치유되거나 전혀 치유되지 않으며, 종종 광범위하게 흉터가 생기고, 특히 감염되기 쉽다. 많은 개인들이 이러한 감염을 퇴치하기 위해 표백제와 물 혼합물로 목욕을 한다. 만성 염증은 영향을 받는 피부 세포의 DNA에 오류를 유발하여 결국 편평 세포 암종 (SCC)을 유발한다. DEB 환자의 대다수는 30세 이전에 SCC 또는 DEB와 관련된 합병증으로 사망한다.

[0007] DEB는 단백질 VII형 콜라겐 (콜라겐 VII)을 암호화하는 인간 COL7A1 유전자 내의 돌연변이에 의해 야기된다. DEB-유발 돌연변이는 상염색체 우성 (DDEB) 또는 상염색체 열성 (RDEB)일 수 있다. COL7A1은 3p21.31로 표시된 염색체 영역에서 인간 염색체 3의 짧은 팔에 위치한다. 유전자는 대략 31,000개 염기 쌍의 크기이며, 118개 엑손으로의 이들의 암호화 서열의 극심한 단편화에 주목할 만하다. COL7A1은 9,287개 염기 쌍의 mRNA로 전사된다. 피부에서, VII형 콜라겐 단백질은 각질세포 및 진피 섬유아세포에 의해 합성된다.

[0008] 콜라겐 VII는 이량체화되어 반원형 루핑 구조: 고정 원섬유를 형성하는 300 kDa 단백질이다. 고정 원섬유가 표피 기저막과 상부 진피의 원섬유성 콜라겐 사이에 구조적 연결을 형성하는 것으로 생각된다. 콜라겐 VII는 또한 식도 내강의 상피와 관련이 있으며, DEB 환자는 만성 흉터, 웨빙(webbing) 및 식도 폐쇄를 앓을 수 있다. 영향을 받은 개인들은 종종 구강 및 식도 점막의 외상으로 인해 영양실조가 심하며 영양을 위해 공급 튜브를 필요로 한다. 이들은 또한 불확실한 기원의 철분-결핍 빈혈을 앓으며, 이것이 만성 피로를 유발한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] EB를 치료하기 위한 방법 및 조성물을 제공할 필요성이 남아 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 미세소포(microvesicle)의 구조적 및/또는 기능적 완전성을 손상시키지 않으면서 생물학적 유체로부터 미세소포 (MV), 예를 들어 세포의 소포 (MV)를 분리하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 구조적 및/또는 기능적 완전성을 손상시키지 않으면서 생물학적 유체로부터 엑토솜, 미세입자, 미세소포, 나노소포, shedding 소포 (shedding vesicle), 세포자멸체 또는 막 입자를 분리하는 방법을 제공한다. 본 발명은 추가로 MV (예를 들어, EV), 및 EB (예를 들어, RDEB 및/또는 DDEB)의 치료를 위해 MV (예를 들어, EV)를 사용하는 방법을 제공한다.

[0011] 하나의 측면에서, 생물학적 유체로부터 침전에 의해 정제된 분리된 미세소포를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계, 및 대상체에서 수포성 표피박리증의 하나 이상의 증상을 완화 또는 감소시키는 단계를 포함하여, 이를 필요로 하는 대상체에서 수포성 표피박리증을 치료하는 방법이 제공된다.

[0012] 특정 예시적인 실시양태에서, 수포성 표피박리증은 이영양성 수포성 표피박리증, 예를 들어, 열성 이영양성 수포성 표피박리증이다.

[0013] 특정 예시적인 실시양태에서, 분리된 미세소포는 칼슘 이온, 마그네슘 이온, 나트륨 이온, 암모늄 이온, 철 이온, 황산암모늄, 알기네이트 및 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된 침전제를 사용하여 생물학적 유체로부터 임의로 침전되는 세포의 소포이다.

[0014] 특정 예시적인 실시양태에서, 생물학적 유체는 말초 혈액, 혈청, 혈장, 복수, 뇨, 뇌척수액 (CSF), 가래, 타액, 골수, 활액, 수양액(aqueous humor), 양수, 귀지, 모유, 기관지 폐포 세척액, 정액, 전립선액, 쿠퍼액(Cowper's fluid), 여성 사정액, 땀, 대변, 털, 눈물, 낭액, 흉막 및 복막 액, 심장막액, 림프액, 유미즙(chyme), 유미(chyle), 담즙, 간질액, 월경, 고름, 피지, 구토, 질 분비물, 점막 분비물, 대변 물, 췌액(pancreatic juice), 세척액, 세포 유래 유체, 조직 샘플 유래 유체, 및 세포 배양액으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 예시적인 실시양태에서, 생물학적 유체는 포유동물 (예를 들어, 사람) 세포에서 유래된다. 특정 예시적인 실시양태에서, 포유동물 세포는 중간엽 세포이다.

[0015] 특정 예시적인 실시양태에서, 침전제는 임의로 약 6,000 Da, 약 8,000 Da, 약 10,000 Da 또는 약 20,000 Da의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이다.

- [0016] 특정 예시적인 실시양태에서, 수포성 표피박리증의 하나 이상의 증상은 두꺼워진 굳은살(thickened calluses), (예를 들어, 손, 발, 팔꿈치 및/또는 무릎의) 표피 물집(epidermal blistering), 구강 점막의 물집(blistering of oral mucosa), 두꺼워진 손톱 및/또는 발톱(thickened fingernails and/or toenails), 패혈증(sepsis), 영양실조(malnutrition), 탈수(dehydration), 전해질 불균형(electrolyte imbalance), 폐쇄성 기도 합병증(obstructive airway complications), 결함있는 콜라겐 VII 발현(defective collagen VII expression), 빈혈(anemia), 식도 협착(esophageal strictures), 성장 지연(growth retardation), 손가락 및/또는 발가락의 웨빙(webbing) 또는 융합, 치아 기형(malformation of teeth), 소구증(microstomia) 및 각막 찰과상(corneal abrasions)의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0017] 특정 예시적인 실시양태에서, 치료는 대상체에서 콜라겐 VII 발현을 증가시킴을 포함한다.
- [0018] 또 다른 측면에서, 단리된 세포의 소포를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 및 대상체에서 수포성 표피박리증의 하나 이상의 증상을 완화 또는 감소시키는 단계를 포함하여 이를 필요로 하는 대상체에서 수포성 표피박리증을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0019] 특정 예시적인 실시양태에서, 수포성 표피박리증은 이영양성 수포성 표피박리증, 예를 들어, 열성 이영양성 수포성 표피박리증이다.
- [0020] 특정 예시적인 실시양태에서, 단리된 미세소포는 칼슘 이온, 마그네슘 이온, 나트륨 이온, 암모늄 이온, 철 이온, 황산암모늄, 알기네이트, 및 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된 침전제를 사용하여 생물학적 유체로부터 임의로 침전되는 세포의 소포이다.
- [0021] 특정 예시적인 실시양태에서, 생물학적 유체는 말초 혈액, 혈청, 혈장, 복수, 뇨, 뇌척수액 (CSF), 가래, 타액, 골수, 활액, 수양액, 양수, 귀지, 모유, 기관지 폐포 세척액, 정액, 전립선액, 쿠퍼액, 여성 사정액, 땀, 대변, 털, 눈물, 낭액, 흉막 및 복막 액, 심장막액, 림프액, 유미즙, 유미, 담즙, 간질액, 월경, 고름, 피지, 구토, 질 분비물, 점막 분비물, 대변 물, 체액, 세척액, 세포 유래 유체, 조직 샘플 유래 유체, 및 세포 배양액으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 예시적인 실시양태에서, 생물학적 유체는 포유동물 (예를 들어, 사람) 세포에서 유래된다. 특정 예시적인 실시양태에서, 포유동물 세포는 중간엽 세포이다.
- [0022] 특정 예시적인 실시양태에서, 침전제는 임의로 약 6,000 Da, 약 8,000 Da, 약 10,000 Da 또는 약 20,000 Da의 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이다.
- [0023] 특정 예시적인 실시양태에서, 수포성 표피박리증의 하나 이상의 증상은 두꺼워진 굳은살(thickened calluses), (예를 들어, 손, 발, 팔꿈치 및/또는 무릎의) 표피 물집(epidermal blistering), 구강 점막의 물집(blistering of oral mucosa), 두꺼워진 손톱 및/또는 발톱(thickened fingernails and/or toenails), 패혈증(sepsis), 영양실조(malnutrition), 탈수(dehydration), 전해질 불균형(electrolyte imbalance), 폐쇄성 기도 합병증(obstructive airway complications), 결함있는 콜라겐 VII 발현(defective collagen VII expression), 빈혈(anemia), 식도 협착(esophageal strictures), 성장 지연(growth retardation), 손가락 및/또는 발가락의 웨빙(webbing) 또는 융합, 치아 기형(malformation of teeth), 소구증(microstomia) 및 각막 찰과상(corneal abrasions)의 임의의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0024] 특정 예시적인 실시양태에서, 치료는 대상체에서 콜라겐 VII 발현을 증가시킴을 포함한다.
- [0025] 또 다른 측면에서, 세포를 포유동물 유체로부터의 단리된 세포의 소포와 접촉시킴(여기서, 세포는 수포성 표피 박리증 유전자형을 발현한다)을 포함하여, 세포에서 콜라겐 VII 수준을 증가시키는 방법이 제공된다.
- [0026] 특정 예시적인 실시양태에서, 포유동물 유체는 말초 혈액, 혈청, 혈장, 복수, 뇨, CSF, 가래, 타액, 골수, 활액, 수양액, 양수, 귀지, 모유, 기관지 폐포 세척액, 정액, 전립선액, 쿠퍼액, 여성 사정액, 땀, 대변, 털, 눈물, 낭액, 흉막 및 복막 액, 심장막액, 림프액, 유미즙, 유미, 담즙, 간질액, 월경, 고름, 피지, 구토, 질 분비물, 점막 분비물, 대변 물, 체액, 세척액, 세포 유래 유체, 조직 샘플 유래 유체, 및 세포 배양액으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 예시적인 실시양태에서, 포유동물 유체는 컨디셔닝된 배지(conditioned medium)이다. 특정 예시적인 실시양태에서, 컨디셔닝된 배지는 중간엽 줄기 세포로부터 유래된다.
- [0027] 특정 예시적인 실시양태에서, 세포는 COL7A1 유전자에서 돌연변이를 포함한다.
- [0028] 특정 예시적인 실시양태에서, 수포성 표피박리증 유전자형은 열성 이영양성 수포성 표피박리증이다.
- [0029] 특정 예시적인 실시양태에서, 세포의 증식 중 하나 또는 둘 다가 자극되고, 트립신 소화에 대한 세포의 내성이

향상된다.

- [0030] 특정 예시적인 실시양태에서, 단리된 세포의 소포는 콜라겐 VII 단백질 및/또는 *COL7A1* mRNA를 세포에 전달한다.
- [0031] 또 다른 측면에서, 세포를 포유동물 유체로부터의 단리된 세포의 소포와 접촉시킴을 포함하여, 하나 이상의 생물활성제(bioactive agent)를 세포에 전달하는 방법이 제공된다.
- [0032] 특정 예시적인 실시양태에서, 포유동물 유체는 말초 혈액, 혈청, 혈장, 복수, 뇨, CSF, 가래, 타액, 골수, 활액, 수양액, 양수, 귀지, 모유, 기관지 폐포 세척액, 정액, 전립선액, 쿠퍼액, 여성 사정액, 땀, 대변, 털, 눈물, 낭액, 흉막 및 복막 액, 심장막액, 림프액, 유미즙, 유미, 담즙, 간질액, 월경, 고름, 피지, 구토, 질 분비물, 점막 분비물, 대변 물, 침액, 세척액, 세포 유래 유체, 조직 샘플 유래 유체, 및 세포 배양액으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 예시적인 실시양태에서, 포유동물 유체는 컨디셔닝된 배지이다. 특정 예시적인 실시양태에서, 컨디셔닝된 배지는 중간엽 줄기 세포로부터 유래된다.
- [0033] 특정 예시적인 실시양태에서, 세포는 *COL7A1* 유전자에서 돌연변이를 포함한다.
- [0034] 특정 예시적인 실시양태에서, 하나 이상의 생물활성제는 콜라겐 VII 단백질, 콜라겐 VII mRNA, STAT3 신호전달 활성화제 (예를 들어, 인터페론, 표피 성장 인자, 인터류킨-5, 인터류킨-6, MAP 키나제 및/또는 c-src 비-수용체 티로신 키나제), 및 정준(canonical) Wnt 활성화제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0035] 특정 예시적인 실시양태에서, STAT3은 인산화된다.
- [0036] 특정 예시적인 실시양태에서, 하나 이상의 생물활성제는 하나 이상의 약제학적 화합물이다.
- [0037] 특정 예시적인 실시양태에서, 세포는 열성 이영양성 수포성 표피박리증 유전자형을 갖는다.
- [0038] 특정 예시적인 실시양태에서, 세포의 증식 중 하나 또는 둘 다가 자극되고, 트립신 소화에 대한 세포의 내성이 향상된다.
- [0039] 또 다른 측면에서, 용매화 물을 대체함으로써 세포 배양 상청액 또는 생물학적 유체로부터 미세소포를 침전시키는 침전제를 이용하여 세포 배양 상청액 또는 생물학적 유체로부터 미세소포를 단리 및/또는 정제하는 방법이 제공된다.
- [0040] 또 다른 측면에서, 미세소포의 단리된 제제가 제공된다. 하나의 실시양태에서, 미세소포의 단리된 제제는 후속적으로 정제된다. 하나의 실시양태에서, 미세소포의 단리된 제제는 후속적으로 정제되어 엑토솜의 제제를 생성한다. 하나의 실시양태에서, 미세소포의 단리된 제제는 후속적으로 정제되어 미세입자의 제제를 생성한다. 하나의 실시양태에서, 미세소포의 단리된 제제는 후속적으로 정제되어 나노소포의 제제를 생성한다. 하나의 실시양태에서, 미세소포의 단리된 제제는 후속적으로 정제되어 세딩 소포의 제제를 생성한다. 하나의 실시양태에서, 미세소포의 단리된 제제는 후속적으로 정제되어 막 입자의 제제를 생성한다. 하나의 실시양태에서, 미세소포의 단리된 제제는 후속적으로 정제되어 세포자멸체의 제제를 생성한다.
- [0041] 또 다른 측면에서, 혈관형성을 촉진 또는 향상시키는 미세소포의 단리된 제제가 제공된다. 하나의 실시양태에서, 미세소포의 단리된 제제는 환자에서 혈관형성을 촉진 또는 향상시킨다.
- [0042] 또 다른 측면에서, 뉴런 재생을 촉진 또는 향상시키는 미세소포의 단리된 제제가 제공된다. 하나의 실시양태에서, 미세소포의 단리된 제제는 환자에서 뉴런 재생을 촉진 또는 향상시킨다.
- [0043] 또 다른 측면에서, 세포 증식을 촉진 또는 향상시키는 미세소포의 단리된 제제가 제공된다. 하나의 실시양태에서, 미세소포의 단리된 제제는 환자에서 세포 증식을 촉진 또는 향상시킨다.
- [0044] 또 다른 측면에서, 세포 이동을 촉진 또는 향상시키는 미세소포의 단리된 제제가 제공된다. 하나의 실시양태에서, 미세소포의 단리된 제제는 환자에서 세포 이동을 촉진 또는 향상시킨다. 하나의 실시양태에서, 본 발명은 상처 치유를 촉진 또는 향상시키는 미세소포의 단리된 제제를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 상처는 전층 화상(full-thickness burn)이다. 하나의 실시양태에서, 상처는 2도 화상이다.
- [0045] 또 다른 측면에서, 환자에서 흉터 형성을 감소시키는 미세소포의 단리된 제제가 제공된다.
- [0046] 또 다른 측면에서, 환자의 피부에서 주름 형성을 감소시키는 미세소포의 단리된 제제가 제공된다.
- [0047] 또 다른 측면에서, 환자에서 질환의 존재 및/또는 진행을 진단하는데 사용되는 미세소포의 단리된 제제가 제공

된다. 하나의 실시양태에서, 질환은 전이성 흑색종(metastatic melanoma)이다. 대안적인 실시양태에서 질환은 염증성/자가면역 장애, 예를 들어 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)이다. 하나의 실시양태에서, 질환은 이식편 대 숙주 질환(graft versus host disease)이다.

[0048] 또 다른 측면에서, 복잡한 조직 구조의 기능적 재생 및 조직화를 촉진할 수 있는 미세세포의 단리된 제제가 제공된다. 하나의 실시양태에서, 재생 불량성 빈혈(aplastic anemia)을 가진 환자에서 조혈 조직을 재생시킬 수 있는 미세세포의 단리된 제제가 제공된다. 하나의 실시양태에서, 질환이 있거나, 손상되거나 없어진 피부를 갖는 환자에서 상피 조직, 간질 조직, 신경 조직, 혈관 조직 및 부속 구조로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 조직을 재생시킬 수 있는 미세세포의 단리된 제제가 제공된다. 하나의 실시양태에서, 본 발명은 모든 세 개의 배엽으로부터 조직 및/또는 세포를 재생시킬 수 있는 미세세포의 단리된 제제를 제공한다.

[0049] 또 다른 측면에서, 환자의 면역계를 조절하는데 사용되는 미세세포의 단리된 제제가 제공된다.

[0050] 또 다른 측면에서, 환자에게 이식된 조직 또는 세포의 생존을 향상시키는 미세세포의 단리된 제제가 제공된다. 하나의 실시양태에서, 환자는 이식된 조직 또는 세포를 제공받기 전에 미세세포의 단리된 제제로 치료된다. 대안적인 실시양태에서, 환자는 이식된 조직 또는 세포를 제공받은 후 미세세포의 단리된 제제로 치료된다. 대안적인 실시양태에서, 조직 또는 세포는 미세세포의 단리된 제제로 처리된다. 하나의 실시양태에서, 조직 또는 세포는 이식 전에 미세세포의 단리된 제제로 처리된다.

[0051] 또 다른 측면에서, 숙주 세포로부터의 RNA, DNA 및 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자를 함유하는 미세세포의 단리된 제제가 제공된다. 하나의 실시양태에서, 숙주 세포는 RNA, DNA 및 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자를 발현하도록 조작된다. 하나의 실시양태에서, 숙주 세포로부터의 RNA, DNA 및 단백질로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자를 함유하는 미세세포의 단리된 제제가 치료제로서 사용된다.

도면의 간단한 설명

[0052] 본원에 포함되고 본 명세서의 일부를 형성하는 첨부된 도면은 본 발명의 다양한 실시양태를 예시하고, 추가로, 상세한 설명과 함께 본 발명의 원리를 설명하고 당업계의 통상의 숙련가가 본 발명을 만들고 사용할 수 있게 하는 역할을 한다. 도면에서, 동일한 참조 번호는 동일하거나 기능적으로 유사한 요소를 나타낸다. 첨부된 도면과 관련하여 고려될 때 다음의 상세한 설명을 참조하여 더 잘 이해되기 때문에 본 발명의 보다 완전한 이해 및 이의 수반되는 많은 이점들이 쉽게 얻어질 것이며, 여기서:

도 1은 초원심분리에 의해 미세세포를 단리하는데 사용된 프로토콜의 개략적인 개요를 보여준다.

도 2는 본 발명의 미세세포 단리 방법의 하나의 실시양태를 보여준다.

도 3은 본 발명의 미세세포 단리 방법의 대안적인 실시양태를 보여준다.

도 4는 여과에 의한 생물학적 유체의 정화 및 침전된 미세세포의 수집을 용이하게 하는 본 발명의 장치의 하나의 실시양태를 보여준다.

도 5a - 도 5d는 패널에 표시된 배율로 실시예 1에 기술된 초원심분리 방법에 의해 단리된 (도 5a & 도 5b) 및 본 발명의 방법에 따라 단리된 (도 5c & 도 5d) 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 유래된 미세세포의 전자 현미경 사진을 보여준다.

도 6a - 도 6d는 패널에 표시된 배율로 실시예 1에 기술된 초원심분리 방법에 의해 단리된 (도 6a & 도 6b) 및 본 발명의 방법에 따라 단리된 (도 6c & 도 6d) 돼지 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 유래된 미세세포의 전자 현미경 사진을 보여준다.

도 7a - 도 7d는 패널에 표시된 배율로 실시예 1에 기술된 초원심분리 방법에 의해 단리된 (도 7a & 도 7b) 및 본 발명의 방법에 따라 단리된 (도 7c & 도 7d) 무린 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 유래된 미세세포의 전자 현미경 사진을 보여준다.

도 8a - 도 8c는 본 발명의 방법에 따라 인간 혈장으로부터 단리된 미세세포의 전자 현미경 사진을 보여준다. 도 8a 내지 도 8c는 패널에 기준자로 나타낸 바와 같이 증가하는 배율하에서 미세세포를 보여준다.

도 9a - 도 9c는 본 발명의 방법에 따라 돼지 혈장으로부터 단리된 미세세포의 전자 현미경 사진을 보여준다. 도 9a 내지 도 9c는 패널에 기준자로 나타낸 바와 같이 증가하는 배율하에서 미세세포를 보여준다.

도 10a - 도 10c는 본 발명의 방법에 따라 인간 뇨로부터 단리된 미세세포의 전자 현미경 사진을 보여준다. 도 10a 내지 도 10c는 패널에 기준자로 나타낸 바와 같이 증가하는 배율하에서 미세세포를 보여준다.

도 11은 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포의 용해물, 초원심분리(hMSC MV Ultracentrifuge), 또는 실시예 3에 기술된 바와 같은 본 발명의 방법 (hMSC PEG 침전)에 의해 제조된, 인간 골수 유래 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 미세세포에서의 HSP70, CD63, STAT 3 및 인산화 STAT3의 발현을 보고하는 웨스턴 블롯을 보여준다. 실시예 3에 기술된 바와 같이 본 발명의 방법에 의해 제조된 인간 혈장 및 인간 뇨로부터 유래된 미세세포를 또한 분석하였다. 각각 (인간 혈장 PEG 침전) 및 (인간 뇨 PEG 침전).

도 12a - 도 12c는 정상 인간 진피 섬유아세포 (도 12a), 당뇨병성 족부 궤양으로부터 수득된 진피 섬유아세포 (도 12b) 및 압박성 족부 궤양으로부터 수득된 진피 섬유아세포 (도 12c)의 증식에 대한 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 미세세포의 효과를 보여준다. 초원심분리에 의해 단리된 미세세포(MV U/C) 및 본 발명의 방법에 의해 단리된 미세세포(MV PEG)의 효과를 비교하였다. PBS 또는 미세세포 고갈된 배양 배지로 처리된 섬유아세포를 대조군으로 포함시켰다. 증식은 MTT 분석을 사용하여 결정하였다.

도 13a - 도 13g는 섬유아세포가 굽힌 부위로 이동하는 능력에 의해 결정된 바와 같이, 인간 진피 섬유아세포의 이동에 대한 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 미세세포의 효과를 보여준다. "처리전"으로 표시된 패널은 시험 처리의 첨가 전, 세포가 제거된 세포 배양 플레이트의 대표적인 영역을 보여준다. 섬유아세포 이동의 효과는 나타낸 농도에서 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포 (PEG 침전) 및 초원심분리에 의해 단리된 미세세포 (초원심분리)를 사용하여 시험하였다. PBS 또는 미세세포 고갈된 배양 배지로 처리된 섬유아세포를 대조군으로 포함시켰다.

도 14a - 도 14g는 섬유아세포가 굽힌 부위로 이동하는 능력에 의해 결정된 바와 같이, 당뇨병성 족부 궤양으로부터 수득된 인간 진피 섬유아세포의 이동에 대한 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 미세세포의 효과를 보여준다. "처리전"으로 표시된 패널은 시험 처리의 첨가 전, 세포가 제거된 세포 배양 플레이트의 대표적인 영역을 보여준다. 섬유아세포 이동의 효과는 나타낸 농도에서 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포 (PEG 침전) 및 초원심분리에 의해 단리된 미세세포 (초원심분리)를 사용하여 시험하였다. PBS 또는 미세세포 고갈된 배양 배지로 처리된 섬유아세포를 대조군으로 포함시켰다.

도 15a - 도 15d는 인간 진피 섬유아세포로의 본 발명의 미세세포의 흡수를 보여준다. Hoechst 33342 염료를 사용하여 분해된 세포 핵은 "Hoechst33342"로 표시된 패널에 도시된다. vybrant 염료를 사용하여 분해된 세포는 "Vybrant-Dio"로 표시된 패널에 도시된다. PKH 염료를 사용하여 분해된 미세세포는 "PKH 표지된 MV"로 표시된 패널에 도시된다. 모든 세 가지 염료로부터 수득된 이미지가 겹쳐있는 패널은 "복합"으로 표시된 패널에 도시된다.

도 16a - 도 16d는 인간 진피 섬유아세포로의 본 발명의 미세세포의 흡수를 보여준다. Hoechst 33342 염료를 사용하여 분해된 세포 핵은 "Hoechst33342"로 표시된 패널에 도시된다. vybrant 염료를 사용하여 분해된 세포는 "Vybrant-Dio"로 표시된 패널에 도시된다. PKH 염료를 사용하여 분해된 미세세포는 "PKH 표지된 MV"로 표시된 패널에 도시된다. 모든 세 가지 염료로부터 수득된 이미지가 겹쳐있는 패널은 "복합"으로 표시된 패널에 도시된다.

도 17은 류마티스 관절염을 앓고 있는 환자로부터 수득된 혈장으로부터 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포 (인간 혈장 MV PEG 침전); 골수 유래 중간엽 줄기 세포로 컨디셔닝된 배지로부터 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포 (인산 hMSC MV PEG 침전); 골수 유래 중간엽 줄기 세포로 컨디셔닝된 배지로부터 초원심분리를 통해 단리된 미세세포 (인산 hMSC MV 초원심분리); PBS 대조군; 및 고갈된 배지 대조군 (MV가 고갈된 hMSC 컨디셔닝된 배지)로 처리된 인간 진피 섬유아세포의 용해물의 웨스턴 블롯을 보여준다.

도 18은 프라이머 1을 사용하여 증폭된 RNA로부터의 SK-MEL28 세포 (레인 3); 프라이머 2를 사용하여 증폭된 RNA로부터의 SK-MEL28 세포 (레인 4); 프라이머 1을 사용하여 증폭된 RNA로부터의 SK-MEL28 세포로 컨디셔닝된 배지로부터 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포 (레인 5); 프라이머 2를 사용하여 증폭된 RNA로부터의 SK-MEL28 세포로 컨디셔닝된 배지로부터 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포 (레인 6); 프라이머 1을 사용하여 증폭된 DNA로부터의 SK-MEL28 세포 (레인 7); 프라이머 2를 사용하여 증폭된 DNA로부터의 SK-MEL28 세포 (레인 8); 프라이머 1을 사용하여 증폭된 DNA로부터의 SK-MEL28 세포로 컨디셔닝된 배지로부터 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포 (레인 9); 및 프라이머 2를 사용하여 증폭된 DNA로부터의 SK-MEL28 세포로 컨디셔닝된 배지로부터 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포 (레인 10)에서 T1799A 돌연변이를 함유하는 BRAF의 엑손 15를 함

유하는 영역의 존재를 보여준다.

도 19는 SK-MEL28 세포의 용해물 및 SK-MEL28 세포로 컨디셔닝된 배지로부터 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포의 용해물에서 V600E BRAF의 존재를 보여준다.

도 20a - 도 20d는 인간 진피 섬유아세포로의 녹색 형광 단백질 (GFP) 발현 마우스로부터 획득된 골수 유래 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배양 배지로부터 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포의 흡수를 보여준다. Hoechst 33342 염료를 사용하여 분해된 세포 핵은 "Hoechst33342"로 표시된 패널에 도시된다. vybrant 염료를 사용하여 분해된 세포는 "Vybrant-Dio"로 표시된 패널에 도시된다. GFP-표지된 미세세포는 "GFP"로 표시된 패널에 도시된다. 모든 세 가지 염료로부터 획득된 이미지가 겹쳐있는 패널은 "복합"으로 표시된 패널에 도시된다.

도 21a - 도 21d는 인간 진피 섬유아세포로의 GFP 발현 마우스로부터 획득된 골수 유래 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배양 배지로부터 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포의 흡수를 보여준다. Hoechst 33342 염료를 사용하여 분해된 세포 핵은 "Hoechst33342"로 표시된 패널에 도시된다. vybrant 염료를 사용하여 분해된 세포는 "Vybrant-Dio"로 표시된 패널에 도시된다. GFP-표지된 미세세포는 "GFP"로 표시된 패널에 도시된다. 모든 세 가지 염료로부터 획득된 이미지가 겹쳐있는 패널은 "복합"으로 표시된 패널에 도시된다.

도 22a - 도 22d는 상처가 생긴지 5일 후, 도 22a - 처리되지 않은 동물; 도 22b - 본 발명의 방법에 따라 자가 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 미세세포; 도 22c - 염수; 및 도 22d - 초원심분리에 의해 자가 골수 유래 중간엽 줄기 세포로부터 단리된 미세세포로부터의 전층 상처(full-thickness wound)의 조직학적 부분을 보여준다.

도 23a- 도 23d는 상처가 생긴지 7일 후 도 23a - 초원심분리에 의해 자가 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 미세세포로 처리된 동물; 도 23b - 본 발명의 방법에 따라 자가 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 미세세포로 처리된 동물; 및 도 23c - 처리되지 않은 동물에 대한 2도 화상의 사진을 보여준다. 도 23d는 상처가 생긴지 7일 후 초원심분리에 의해 자가 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 미세세포로 처리된 동물에서의 전층 상처를 보여준다. 화살표는 7일차에 초원심분리에 의해 단리된 미세세포로 처리된 전층 상처에서 농양 형성을 나타낸다 (40X). 이것은 본 발명의 방법에 따라 제조된 미세세포로 처리된 전층 상처에서는 관찰되지 않았다.

도 24는 본 발명의 방법에 따라 자가 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 미세세포로 처리된 동물로부터의, 상처가 생긴지 28일 후의 2도 상처의 조직학적 슬라이드를 보여준다.

도 25는 염수로 처리된 동물로부터의, 상처가 생긴지 28일 후의 2차 상처의 조직학적 슬라이드를 보여준다.

도 26은 본 발명의 방법에 따라 자가 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 미세세포로 처리된 동물로부터의, 상처가 생긴지 28일 후의 전층 상처의 조직학적 슬라이드를 보여준다.

도 27a - 도 27c은 본 발명의 방법에 따라 자가 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 미세세포로 처리된 동물로부터의, 상처가 생긴지 28일 후의 전층 상처의 조직학적 슬라이드를 보여준다. 도 27a는 새로운 신경 성장 (화살표) 및 혈관형성 (원)을 나타낸다. 도 27b는 새로운 신경 성장 (화살표)을 나타낸다. 도 27c는 새로운 혈관 성장 (화살표)을 나타낸다.

도 28은 자가 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 유래된 미세세포로 처리된 동물에서 상처가 생긴지 7일 후의 전층 상처의 조직학적 슬라이드를 보여준다.

도 29a - 도 29b는 GFP-표지된 골수의 투여 후 조사된 동물에서 키메라 현상(chimerism)의 존재 또는 부재를 보여준다.

도 30a - 도 30c는 감마선 조사 후 털 성장에 대한 MSC 처리의 효과 (도 30a 및 도 30b) 및 GFP-표지된 골수의 투여 후 조사된 동물에서 키메라 현상의 부재 (도 30c)를 보여준다.

도 31a - 도 31f는 혈관형성의 시험관내 분석을 사용하여, 혈관 형성에 대한 본 발명의 방법을 사용하여 획득된 골수 유래 미세세포의 효과를 보여준다. 상부 3개 패널은 본 발명의 방법을 사용하여 획득된 골수 유래 미세세포로 처리된 HUVEC 세포의 배양물의 에피플루오레센트 현미경(epifluorescent microscope)을 사용하여 촬영된 대표적인 이미지이다 ("골수 흡입물 MV"). 하부 3개 패널은 비히클 대조군으로 처리된 HUVEC 세포의 배양물의 에피플루오레센트 현미경을 사용하여 촬영된 대표적인 이미지이다 ("비히클 대조군").

도 32a - 도 32c는 세포 성장의 시험관내 분석을 사용하여, 세포 성장 또는 증식에 대한 본 발명의 방법을 사용하여 수득된 골수 유래 미세세포의 효과를 보여준다. 도 32a는 처리한지 3일 후 본 발명의 방법을 사용하여 수득된 골수 유래 미세세포 ("골수 MV") 또는 PBS ("PBS")로 처리된 정상 성인 섬유아세포의 배양물의 에피플루오레센트 현미경을 사용하여 촬영된 대표적인 이미지를 보여준다. 도 32b는 처리한지 3일 후 본 발명의 방법을 사용하여 수득된 골수 유래 미세세포 ("골수 MV") 또는 PBS ("PBS")로 처리된 정상 성인 섬유아세포의 배양물에서의 평균 세포 수를 보여준다. 도 32c는 세포 수를 그래프로 도시한다.

도 33a - 도 33b는 골수 줄기 세포 (BM-MSC 포함)로의 만성 상처 치료의 결과를 보여준다. 도 33a - 치료 전 및 상처 변연절제술(debridement) 전. 피사 아킬레스 건이 보인다. 도 33b - 골수 세포의 투여 (즉, 국소 투여) 후 치유됨.

도 34a - 도 34c는 골수 줄기 세포로 치료된 상처에서의 피부 재건을 보여준다. (A) 도 34a - 섬유증 반환 상처의 치료전 생검. 수많은 레티쿨린 섬유 (도 34b) 및 탄성 섬유 (도 34c)가 생성된 치료후 생검이 도시되어 있다.

도 35a - 도 35c는 심한 2도 화상을 보여준다. 환자에게 11일 간격으로 BM-MSC를 2회 투여하였다. 도 35a - 심한 2도 화상 0일째 (치료 전). 원형 영역은 화상이 가장 심한 부분을 나타낸다. 도 35b - BM-MSC의 1차 투여 (즉, 국소 투여) 11일 후 모낭 향진. 향진된 모낭은 A의 원형 영역에서 주지된다. 도 35c - BM-MSC의 2차 투여 34일 후, 도 35a의 원형 영역에서의 털 성장.

도 36a - 도 36c는 10일 간격으로 제공된 MSC의 2회 국소 투여로 치료된 화상 환자의 치유를 보여준다. 도 36a - 치료 전. 도 36b - 제1 용량의 MSC로 치료한지 10일 후 (즉, 국소 투여). 도 36c - 제2 용량의 BM-MSC로 치료한지 7일 후 (즉 도 36a 이후 17일).

도 37a - 도 37b는 BM-MSC로 치료한지 1년 후 평가된 화상 환자에서 흉터의 흔적이 없음을 보여준다. 상단 패널: 좌측 복부 팔뚝 (하단 패널은 노란색 윤곽선이 표시된 영역을 보여준다). 환자의 피부는 원래의 화상 부위에 흉터의 증거없이 정상적인 탄력의 증거를 보여주었다.

도 38a - 도 38b는 요크셔 돼지에서 생성된 전층 상처 (5일)를 보여준다. 도 38a - 처리되지 않은 대조군. 도 38b - 본 발명의 특정 실시양태에 따라 BM-MSC EV로 치료된 상처. BM-MSC EV로 치료한 후 상처가 상당히 크게 봉합되었다. 화살표는 본 발명의 특정 실시양태에 따라 증가된 진피 재건의 영역을 나타낸다.

도 39a - 도 39c는 특정 예시적인 실시양태에 따라 BM-MSC EV로 치료된 요크셔 돼지에서 생성된 전층 상처 (28일)를 보여준다. 도 39a - 화살표는 신경 성장을 강조하고 별은 혈관 성장을 나타낸다. 도 39b - 혈관 성장을 보여주는 고배율 (화살표). 도 39c - 신경 성장을 보여주는 고배율 (화살표).

도 40a - 도 40b는 특정 예시적인 실시양태에 따른 돼지 BM-MSC EV의 병변내 주사로 치료한지 5일 후 돼지에서의 2도 화상 상처를 보여준다. 좌측: 당업계에 공지된 초원심분리 방법에 의해 제조된 EV를 화상 상처를 치료하는데 사용하였다. 상처가 생기고 무균 농포 형성(감염이 아닌 유도된 염증 반응을 나타냄) 및 치유 감소로 심한 염증을 일으켰다. 우측: 본원에 기술된 예시적인 방법을 사용하여 제조된 EV를 화상 상처를 치료하는데 사용하였다. 상처는 초원심분리에 의해 제조된 종래의 EV에 비해 감소된 염증으로 치유가 가속화되었다.

도 41a - 도 41b는 BM-MSC EV (각 패널의 중간 막대)에서의 COL7A1 mRNA의 풍부를 그래프로 도시한다. EV 처리는 RDEB 섬유아세포에서 COL7A1 발현을 증가시켰다. 좌측 패널은 프라이머 쌍 1로 검출된 COL7A1 발현을 보여주고; 우측 패널은 프라이머 쌍 2로 검출된 COL7A1 발현을 보여준다. 유전자 발현은 공통 EV 하우스키핑 유전자인 베타-액틴 발현에 의해 표준화되었다.

도 42는 BM-MSC EV (10 µg/mL) 및 새로 합성된 단백질에 포함된 L-메티오닌 유사체 L-호모프로파르길글리신 (HPG) (변형된 아미노산)으로 공동처리한 후 RDEB 섬유아세포로부터의 새로운 콜라겐 VII의 생성을 나타내는 ("click iT" 반응 화학을 사용한) 화학선택적 결합 분석을 그래프로 도시한다.

도 43a - 도 43b는 BM-MSC EV가 RDEB 증식 (도 43a) 및 트립신 소화에 대한 내성 (도 43b)(둘 다 RDEB 진피 섬유아세포의 사전-상처 치유 잠재력을 지지하는 기능 획득(gain-of-function)을 평가하기 위한 표준 시험관내 분석) 둘 다를 유의하게 촉진시킨다는 것을 그래프로 도시한다.

도 44a - 도 44c는 RDEB (Hallopeau-Siemens 타입)를 갖는 것으로 진단된 유아로부터 유래된 시험관내 세포주의 검증을 보여준다. RDEB 섬유아세포는 영향을 받지 않은 대상체 (NHF)로부터 유래된 섬유아세포에 비해 COL7A1이 유의적으로 덜 발현되었다. 도 44a - mRNA의 5' 말단에 상응하는 cDNA의 3'말단 근처에 설계된 프라이머 쌍

1 및 2. 도 44b - 정상 인간 섬유아세포 (NHf) 및 RDEB 섬유아세포에서의 COL7A1 유전자 발현. 도 44c - RDEB 세포는 정상 (대조군) 인간 섬유아세포에 비해 낮은 수준의 콜라겐 VII 단백질을 분비하였다.

도 45a - 도 45b는 BM-MSc와 RDEB 섬유아세포 사이의 소포 교환을 보여준다. RDEBF (지질 염료 DiI (적색)로 염색됨) 및 BM-MSc (지질 염료 DiO (녹색)로 염색됨)를 공동-배양하였으며, 하루 안에, 세포의 소포 (황색)를 흡수하기 시작하였다. 기준자, 10 μm.

도 46a - 도 46d는 콜라겐 VII 단백질이 BM-MSc 세포의 소포 (EV)와 공동-단리되었음을 보여준다. 도 46a - BM-MSc 무-혈청 컨디셔닝된 배지 (CM)로부터 단리된 세포의 소포의 투과 전자현미경 사진. 도 46b - 1:500으로 희석된 BM-MSc EV의 NanoSight 이미지. 도 46c - 크기 대 농도의 히스토그램 (1:500 희석됨). 삽도는 EV가 CD63 엑소솜 마커를 함유함을 보여준다. 도 46d - BM-MSc CM 중의 및 정제된 BM-MSc EV와 관련된 콜라겐 VII 단백질.

도 47a - 도 47b는 BM-MSc EV (각 패널의 중간 막대)에서의 COL7A1 mRNA의 풍부를 보여준다. EV 처리는 RDEB 섬유아세포에서 COL7A1 발현을 증가시켰다. 좌측 패널은 프라이머 쌍 1로 검출된 COL7A1 발현을 보여주고; 우측 패널은 프라이머 쌍 2로 검출된 COL7A1 발현을 보여준다. 유전자 발현은 공동 EV 하우스키퍼 유전자인 베타-액틴 발현에 의해 표준화되었다.

도 48a - 도 48c는 BM-MSc EV로 처리된 RDEB 섬유아세포는 세척한지 3일 후 배지에 더 많은 콜라겐 VII 단백질을 함유하였음을 보여준다. 도 48a - 치료 개략도. 도 48b - RDEB 배지에서의 콜라겐 VII의 웨스턴 블롯. 도 48c - 도 48b의 밀도측정 정량 (콜라겐 VII 검출 기준선 이상).

도 49a - 도 49c는 BM-MSc EV (10 μg/mL) 및 새로 합성된 단백질에 포함된 L-메티오닌 유사체 L-호모프로파르길글리신 (HPG) (변형된 아미노산)으로 공동-처리한 후 RDEB 섬유아세포로부터의 새로운 콜라겐 VII의 생성을 나타내는 ("click iT" 반응 화학을 사용한) (도 49a 및 도 49b) 화학선택적 결합 분석을 도시한다 (도 49c).

도 50a - 도 50b는 BM-MSc EV가 RDEB 섬유아세포의 상처 치유 (증식 및 트립신-내성)와 관련된 시험관내 대리 분석(surrogate assay)을 증가시켰음을 보여준다. 도 50a - 증식 (MTT) 분석. 도 50b - 트립신 내성 분석.

도 51a - 도 51e는 임상 시험에서 화상 환자에게 염수로 전달된 BM-MSc를 보여준다. BM-MSc는 수 시간 (4시간 도시됨) 내에 염수로 많은 수의 EV (CD63 양성)를 분비하였다. 좌측 상단 패널, 염수 완충액 배경의 NanoSight; 우측 상단 패널, 염수 중의 EV (1:500 희석) NanoSight; 하단 패널: 화상 임상 시험에서 전달된 염수의 1:500 희석의 히스토그램, 막대 그래프 정량. 웨스턴 블롯 삽도는 4시간 내에 BM-MSc에 의해 분비된 CD63 (엑소솜 마커)을 보여준다.

도 52는 BM-MSc의 분비체가 콜라겐 VII 단백질, 콜라겐 VII mRNA, STAT3 신호전달 활성화제 및 정준 Wnt 활성화제를 포함한, RDEB 섬유아세포에 다수의 사전-상처 치유 기능을 전달하는 EV-관련 및 비-EV-관련 단백질을 함유하는 본 발명의 특정 예시적인 실시양태에 따르는 모델을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 제한을 위한 것이 아니라 본 개시내용을 명확하게 하기 위해, 본 발명의 상세한 설명은 본 발명의 특정 특징, 실시양태 또는 응용을 기술하거나 예시하는 다음의 세부항목으로 나뉜다.

[0054] 본 발명의 미세소포를 단리하는 방법

[0055] 본원에서 사용되는 용어 "미세소포"는 세포의 원형질 막으로부터 형성되고 크기가 약 2 nm 내지 약 5000 nm 범위로 불균일한 지질 이중층을 포함하는 소포를 지칭한다. 미세소포가 형성되는 세포를 본원에서 "숙주 세포"라고 한다. 미세소포는 소포의 이중 집단이며, 세포의 소포 (EV), 엑토솜, 미세입자, 미세소포, 나노소포, 세딩 소포, 막 입자 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 미세소포는 이들의 막 표면 상에 이들의 숙주 세포로부터의 막 단백질을 나타내고, 또한 숙주 세포로부터의 미세소포 내에, 예를 들면 mRNA, miRNA, tRNA, RNA, DNA, 지질, 단백질 또는 전염성 입자와 같은 분자를 함유할 수 있다. 이들 분자는 숙주 세포에 도입된 재조합 분자로부터 유래되거나 재조합 분자일 수 있다. 미세소포는 세포간 연락에서 결정적인 역할을 하며, 체내에서 국소적으로 및 원위로 작용하여, 표적 세포와 융합함으로써 세포의 변화를 유도하고, 미세소포 상에 및/또는 미세소포 내에 수송된 분자를 표적 세포에 도입할 수 있다. 예를 들면, 미세소포는 항-종양 역전, 암, 종양 면역 억제, 전이, 종양-간질 상호작용, 혈관형성 및 조직 재생에 연관되어 있다. 미세소포는 또한 예를 들면 심장 질환, HIV 및 백혈병을 포함한 여러 질환의 바이오-마커를

보유하는 것으로 밝혀졌기 때문에 질환을 진단하는데 사용될 수 있다.

- [0057] 하나의 실시양태에서, 미세소포는 다음의 단계를 포함하는 방법에서 미세소포를 함유하는 생물학적 유체로부터 단리된다:
- [0058] a) 미세소포를 함유하는 생물학적 유체를 수득하는 단계,
- [0059] b) 세포 잔해물을 제거하기 위해 생물학적 유체를 정화하는 단계,
- [0060] c) 정화된 생물학적 유체에 침전제를 첨가하여 미세소포를 침전시키는 단계,
- [0061] d) 침전된 미세소포를 수집하고 물질을 세척하여 침전제를 제거하는 단계; 및
- [0062] e) 저장 또는 후속 사용을 위해 세척된 미세소포를 용액에 현탁시키는 단계.
- [0063] 하나의 실시양태에서, 생물학적 유체는 원심분리에 의해 정화된다. 대안적인 실시양태에서, 생물학적 유체는 여과에 의해 정화된다.
- [0064] 하나의 실시양태에서, 침전된 미세소포는 원심분리에 의해 수집된다. 대안적인 실시양태에서, 침전된 미세소포는 여과에 의해 수집된다.
- [0065] 하나의 실시양태에서, 미세소포는 다음의 단계를 포함하는 방법에서 미세소포를 함유하는 생물학적 유체로부터 단리된다:
- [0066] a) 미세소포를 함유하는 생물학적 유체를 수득하는 단계,
- [0067] b) 세포 잔해물을 제거하기 위해 생물학적 유체를 정화하는 단계,
- [0068] c) 정화된 생물학적 유체에 침전제를 첨가하여 미세소포를 침전시키는 단계,
- [0069] d) 침전된 미세소포를 수집하고 물질을 세척하여 침전제를 제거하는 단계;
- [0070] e) 세척된 미세소포를 용액에 현탁시키는 단계, 및
- [0071] f) 미세소포를 가공하여 핵산, 탄수화물, 지질, 소분자 및/또는 단백질 함량을 분석하는 단계.
- [0072] 하나의 실시양태에서, 생물학적 유체는 원심분리에 의해 정화된다. 대안적인 실시양태에서, 생물학적 유체는 여과에 의해 정화된다.
- [0073] 하나의 실시양태에서, 침전된 미세소포는 원심분리에 의해 수집된다. 대안적인 실시양태에서, 침전된 미세소포는 여과에 의해 수집된다.
- [0074] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 생물학적 유체로부터 미세소포를 단리하기 위한 시약 및 키트를 제공한다.
- [0075] 생물학적 유체는 말초 혈액, 혈청, 혈장, 복수, 뇨, 뇌척수액 (CSF), 가래, 타액, 골수, 활액, 수양액, 양수, 귀지, 모유, 기관지 폐포 세척액, (전립선액을 포함한) 정액, 쿠피액 또는 사정전 유체(pre-ejaculatory fluid), 여성 사정액, 땀, 대변, 털, 눈물, 낭액, 흉막 및 복막 액, 심장막액, 림프액, 유미즙, 유미, 담즙, 간질액, 월경, 고름, 피지, 구토, 질 분비물, 점막 분비물, 대변 물, 땀, 부비강으로부터의 세척액, 기관지폐 흡입물 또는 기타 세척액일 수 있다.
- [0076] 생물학적 유체는 또한 태아 또는 모계 기원일 수 있는 배반포낭(blastocyl cavity), 제대혈(umbilical cord blood) 또는 모체 순환(maternal circulation)으로부터 유래될 수 있다. 생물학적 유체는 또한 조직 샘플 또는 생검으로부터 유래될 수 있다.
- [0077] 생물학적 유체는 식물 세포 또는 식물 세포의 배양물로부터 유래될 수 있다. 생물학적 유체는 효모 세포 또는 효모 세포의 배양물로부터 유래될 수 있다.
- [0078] 하나의 실시양태에서, 생물학적 유체는 세포 배양 배지이다. 하나의 실시양태에서, 세포 배양 배지는 본 발명의 방법에 따라 미세소포의 단리 전에 조직 및/또는 세포를 사용하여 컨디셔닝된다.
- [0079] 용어 "컨디셔닝된" 또는 "컨디셔닝된 배지"는 세포 또는 조직의 집단, 또는 이들의 조합이 성장하는 배지를 가리키며, 세포 또는 조직의 집단, 또는 이들의 조합이 배지에 인자를 기여한다. 하나의 이러한 용도에서, 세포 또는 조직의 집단, 또는 이들의 조합은 배지로부터 제거되는 반면, 세포가 생성하는 인자는 남아있다. 하나의

실시양태에서, 생성되는 인자는 미세세포이다. 배지는 당업계의 통상의 숙련가에 의해 선택된 임의의 적합한 방법을 통해 컨디셔닝될 수 있다. 예를 들면, 배지는 제EP1780267A2호에 기술된 방법에 따라 배양할 수 있다.

[0080] 하나의 실시양태에서, 미세세포는 미세세포의 단리 전에 전처리된 세포 또는 조직으로부터 단리된다. 전처리는, 예를 들면, 특정 배지, 적어도 하나의 첨가제, 성장 인자, 혈청이 없는 배지, 또는 이들의 조합을 함유하는 배지에서의 배양을 포함할 수 있다. 대안적으로, 전처리는 세포 또는 조직을 첨가제 (예를 들어, 인터류킨, VEGF, 전사 인자의 유도제, 전사 인자, 호르몬, 신경전달물질, 약제학적 화합물, 마이크로RNA), 형질전환제 (예를 들어, 리포솜, 바이러스, 형질감염된 제제 등)와 접촉시킴을 포함할 수 있다. 대안적으로, 전처리는 세포 또는 조직을 변경된 신체적 조건 (예를 들어, 저산소증, 저온 충격, 열 충격 등)에 노출시킴을 포함할 수 있다.

[0081] 하나의 실시양태에서, 미세세포는 미세세포의 단리 전에 전처리된 세포 또는 조직을 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리된다. 전처리는, 예를 들면, 특정 배지, 적어도 하나의 첨가제, 성장 인자, 혈청이 없는 배지, 또는 이들의 조합을 함유하는 배지에서의 배양을 포함할 수 있다. 대안적으로, 전처리는 세포 또는 조직을 첨가제 (예를 들어, 인터류킨, VEGF, 전사 인자의 유도제, 전사 인자, 호르몬, 신경전달물질, 약제학적 화합물, 마이크로RNA), 형질전환제 (예를 들어, 리포솜, 바이러스, 형질감염된 제제 등)와 접촉시킴을 포함할 수 있다. 대안적으로, 전처리는 세포 또는 조직을 변경된 신체적 조건 (예를 들어, 저산소증, 저온 충격, 열 충격 등)에 노출시킴을 포함할 수 있다.

[0082] 하나의 실시양태에서, 생물학적 유체는 식물로부터의 추출물이다. 대안적인 실시양태에서, 생물학적 유체는 식물 세포의 배양물로부터의 세포 배양 배지이다. 대안적인 실시양태에서, 생물학적 유체는 효모 추출물이다. 대안적인 실시양태에서, 생물학적 유체는 효모 세포의 배양물로부터의 세포 배양 배지이다.

[0083] 본 발명의 방법은 임의의 온도에서 수행될 수 있지만, 당업계의 통상의 숙련가는 특정 생물학적 유체가 분해될 수 있으며, 샘플이 생물학적 유체가 분해되는 온도 이하의 온도에서 유지된다면 이러한 분해가 감소된다는 것을 쉽게 인지할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 4°C에서 수행된다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 방법의 적어도 하나는 단계는 4°C에서 수행된다. 특정 실시양태에서, 생물학적 유체는 본 발명의 방법에 적용되기 전에 희석될 수 있다. 샘플의 점도가 너무 커서 허용 가능한 수율의 미세세포를 수득할 수 없는 경우, 샘플의 점도를 감소시키기 위해 점성 생물학적 유체에 대해 희석이 필요할 수 있다. 희석은 1:2 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:3 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:4 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:5 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:6 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:7 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:8 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:9 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:10 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:20 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:30 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:40 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:50 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:60 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:70 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:80 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:90 희석일 수 있다. 대안적으로, 희석은 1:100 희석일 수 있다.

[0084] 희석제가 미세세포의 기능적 및/또는 구조적 완전성에 영향을 미치지 않는 한, 생물학적 유체는 임의의 희석제로 희석될 수 있다. 당업계의 통상의 숙련가는 적합한 희석제를 쉽게 선택할 수 있다. 희석제는, 예를 들면, 인산염 완충 염수, 세포 배양 배지 등일 수 있다.

[0085] 하나의 실시양태에서, 세포 잔해물을 제거하기 위해 원심력을 적용함으로써 생물학적 유체가 정화된다. 생물학적 유체에 적용된 원심력은 생물학적 유체로부터 임의의 세포, 용해된 세포, 조직 잔해물을 제거하기에 충분하지만, 적용된 원심력은 미세세포를 제거하기에는 크기, 지속시간 또는 둘 다가 불충분하다. 생물학적 유체는 정화를 촉진하기 위해 희석을 필요로 할 수 있다.

[0086] 생물학적 유체를 정화하는데 사용되는 원심력의 지속시간 및 크기는, 예를 들면, 생물학적 유체, 생물학적 유체의 pH, 단리된 미세세포의 원하는 순도, 단리된 미세세포의 원하는 크기, 미세세포의 원하는 분자량 등을 포함하는, 당업계의 통상의 숙련가에 의해 쉽게 인지되는 다수의 인자에 따라 달라질 수 있다. 하나의 실시양태에서, 2000 x g의 원심력이 30분 동안 생물학적 유체에 적용된다.

[0087] 정화된 생물학적 유체는 침전제와 접촉하여 미세세포를 침전시킨다. 하나의 실시양태에서, 침전제는 미세세포를 둘러싸고 용매화 물을 대체하는 임의의 제제일 수 있다. 이러한 침전제는 폴리에틸렌 글리콜, 텍스트란 및 다당류로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0088] 대안적인 실시양태에서, 침전제는 미세세포의 응집을 야기할 수 있다.

- [0089] 대안적인 실시양태에서, 침전제는 칼슘 이온, 마그네슘 이온, 나트륨 이온, 암모늄 이온, 철 이온, 황산암모늄과 같은 유기 용매, 및 알기네이트와 같은 응집제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0090] 정화된 생물학적 유체는 미세소포를 침전시키기에 충분한 시간 동안 침전제와 접촉된다. 미세소포를 침전시키기에 충분한 시간은, 예를 들면, 생물학적 유체, 생물학적 유체의 pH, 단리된 미세소포의 원하는 순도, 단리된 미세소포의 원하는 크기, 미세소포의 원하는 분자량 등을 포함한, 당업계의 통상의 숙련가에 의해 쉽게 인지되는 다수의 인자에 따라 달라질 수 있다. 하나의 실시양태에서, 미세소포를 침전시키기에 충분한 시간은 6시간이다.
- [0091] 하나의 실시양태에서, 정화된 생물학적 유체는 4°C에서 미세소포를 침전시키기에 충분한 시간 동안 침전제와 접촉된다.
- [0092] 생물학적 유체로부터 미세소포를 침전시키기 위해 사용되는 침전제의 농도는, 예를 들면, 생물학적 유체, 생물학적 유체의 pH, 단리된 미세소포의 원하는 순도, 단리된 미세소포의 원하는 크기, 미세소포의 원하는 분자량 등을 포함한, 당업계의 통상의 숙련가에 의해 쉽게 인지되는 다수의 인자에 따라 달라질 수 있다.
- [0093] 하나의 실시양태에서, 침전제는 폴리에틸렌 글리콜이다. 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은 약 200 Da 내지 약 10,000 Da일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은 10,000 Da를 초과할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은 10,000 Da 또는 20,000 Da이다. 분자량의 선택은, 예를 들면, 생물학적 유체의 점도, 미세소포의 원하는 순도, 미세소포의 원하는 크기, 사용된 생물학적 유체 등을 포함하는 다양한 인자에 영향을 받을 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은 약 200 Da 내지 약 8,000 Da일 수 있거나, 대략 200 Da, 300 Da, 400 Da, 600 Da, 1000 Da, 1450 Da, 1500 Da, 2000 Da, 3000 Da, 3350 Da, 4000 Da, 6000 Da, 8000 Da, 10000 Da, 20000 Da 또는 35000 Da 중의 어느 것 또는 그 사이의 임의의 범위 또는 분자량이다.
- [0094] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은 약 6000 Da이다.
- [0095] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 평균 분자량은 약 8000 Da이다.
- [0096] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 평균 분자량은 약 10000 Da이다.
- [0097] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 평균 분자량은 약 20000 Da이다.
- [0098] 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 농도는 약 0.5% w/v 내지 약 100% w/v일 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 농도는, 예를 들면, 생물학적 유체의 점도, 미세소포의 원하는 순도, 미세소포의 원하는 크기, 사용된 생물학적 유체 등을 포함하는 다양한 인자에 의해 영향을 받을 수 있다.
- [0099] 특정 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 약 5% 내지 25% w/v 농도의 본 발명의 농도로 사용된다. 특정 실시양태에서, 농도는 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 또는 15%, 또는 이러한 값들 중 어느 두 개 사이의 범위이다.
- [0100] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 농도는 약 8.5% w/v이다.
- [0101] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 농도는 약 6% w/v이다.
- [0102] 하나의 실시양태에서, 6000 Da의 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이 8.5% w/v의 농도로 사용된다. 하나의 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 0.4M 염화나트륨에 희석된다.
- [0103] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 폴리에틸렌 글리콜의 농도는 폴리에틸렌 글리콜의 평균 분자량에 반비례한다. 예를 들면, 하나의 실시양태에서, 4000 Da의 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜은 20% w/v의 농도로 사용된다. 대안적인 실시양태에서, 8000 Da의 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜은 10% w/v의 농도로 사용된다. 대안적인 실시양태에서, 20000 Da의 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜은 4% w/v의 농도로 사용된다.
- [0104] 하나의 실시양태에서, 침전된 미세소포는 원심력의 적용에 의해 수집된다. 원심력은 미세소포가 펠렛을 형성하기에 충분하고 미세소포가 펠렛을 형성하기에 충분하지만 미세소포를 손상시키기에는 불충분한 지속시간 동안 적용된다.
- [0105] 생물학적 유체로부터 미세소포를 침전시키기 위해 사용되는 원심력의 지속시간 및 크기는, 예를 들면, 생물학적

유체, 생물학적 유체의 pH, 단리된 미세세포의 원하는 순도, 단리된 미세세포의 원하는 크기, 미세세포의 원하는 분자량 등을 포함한, 당업계의 통상의 숙련가에 의해 쉽게 인지되는 다수의 인자에 따라 달라질 수 있다. 하나의 실시양태에서, 침전된 미세세포는 60분 동안 10000 x g의 원심력을 적용함으로써 수집된다.

- [0106] 액체가 미세세포의 기능적 및/또는 구조적 완전성에 영향을 미치지 않는 한, 침전된 미세세포는 임의의 액체로 세척될 수 있다. 당업계의 통상의 숙련가는 적합한 액체를 쉽게 선택할 수 있다. 액체는, 예를 들면, 인산염 완충 염수, 세포 배양 배지 등일 수 있다.
- [0107] 하나의 실시양태에서, 세척 단계는 침전제를 제거한다. 하나의 실시양태에서, 미세세포는 100 kDa 분자량 컷오프를 갖는 여과 장치를 사용하여 원심분리 여과를 통해 세척된다.
- [0108] 액체가 미세세포의 기능적 및/또는 구조적 완전성에 영향을 미치지 않는 한, 단리된 미세세포는 임의의 액체로 현탁될 수 있다. 당업계의 통상의 숙련가는 적합한 액체를 쉽게 선택할 수 있다. 액체는, 예를 들면, 인산염 완충 염수, 세포 배양 배지 등일 수 있다.
- [0109] 하나의 실시양태에서, 단리된 미세세포는 추가로 가공될 수 있다. 추가 가공은 특정 크기의 미세세포의 단리일 수 있다. 대안적으로, 추가 가공은 특정 크기 범위의 미세세포의 단리일 수 있다. 대안적으로, 추가 가공은 특정 분자량의 미세세포의 단리일 수 있다. 대안적으로, 추가 가공은 특정 분자량 범위의 미세세포의 단리일 수 있다. 대안적으로, 추가 가공은 특정 분자를 나타내거나 함유하는 미세세포의 단리일 수 있다.
- [0110] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세세포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 1000 nm의 크기를 갖는 미세세포의 제제를 단리하기 위해 추가로 가공된다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세세포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 500 nm의 크기를 갖는 미세세포의 제제를 단리하기 위해 추가로 가공된다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세세포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 400 nm의 크기를 갖는 미세세포의 제제를 단리하기 위해 추가로 가공된다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세세포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 300 nm의 크기를 갖는 미세세포의 제제를 단리하기 위해 추가로 가공된다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세세포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 200 nm의 크기를 갖는 미세세포의 제제를 단리하기 위해 추가로 가공된다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세세포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 100 nm의 크기를 갖는 미세세포의 제제를 단리하기 위해 추가로 가공된다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세세포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 50 nm의 크기를 갖는 미세세포의 제제를 단리하기 위해 추가로 가공된다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세세포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 20 nm의 크기를 갖는 미세세포의 제제를 단리하기 위해 추가로 가공된다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세세포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 10 nm의 크기를 갖는 미세세포의 제제를 단리하기 위해 추가로 가공된다.
- [0111] 하나의 실시양태에서, 후속 정제는 면역친화도, HPLC, 접선 유동 여과, 상 분리/분할 및 미세유체공학으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법을 사용하여 수행된다.
- [0112] 하나의 실시양태에서, 단리된 미세세포를 추가로 가공하여 미세세포 상에 나타나거나 미세세포 내에 함유된 분자를 분석한다. 분석된 분자는 핵산, 탄수화물, 지질, 소분자, 이온, 대사산물, 단백질 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0113] 배양된 세포를 사용하여 컨디셔닝된 세포 배양 배지를 포함하는 생물학적 유체: 하나의 실시양태에서, 미세세포는 배양된 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 취득된다. 임의의 배양된 세포, 또는 세포 집단이 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 세포는 줄기 세포, 일차 세포, 세포주, 조직 또는 기관 외식편, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 세포는 동종, 자가 또는 이종 기원일 수 있다.
- [0114] 하나의 실시양태에서, 세포는 골수 흡입물로부터 유래된 세포이다. 하나의 실시양태에서, 골수 흡입물로부터 유래된 세포는 골수 유래 중간엽 줄기 세포이다. 하나의 실시양태에서, 골수 흡입물로부터 유래된 세포는 단핵 세포이다. 하나의 실시양태에서, 골수 흡입물로부터 유래된 세포는 단핵 세포와 골수 유래 중간엽 줄기 세포의 혼합물이다.
- [0115] 하나의 실시양태에서, 골수 유래 중간엽 줄기 세포는 골수 흡입물을 플라스틱 조직 배양 플라스크에서 최대 약 4일 동안 배양한 다음 비-부착성 세포를 제거하기 위해 세척함으로써 골수 흡입물로부터 단리된다.
- [0116] 하나의 실시양태에서, 단핵 세포는 피콜 구배(ficoll gradient)를 사용하여 저밀도 원심분리한 다음 계면에서

단핵 세포를 수집함으로써 골수 흡입물로부터 단리된다.

- [0117] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따른 미세세포의 단리 전에, 세포는 세포 배양기에서 적절한 온도 및 기체 혼합물 (전형적으로 포유동물 세포의 경우 37°C, 5% CO₂)에서 배양, 성장 또는 유지된다. 배양 조건은 각 세포 유형에 따라 광범위하게 달라지며, 당업계의 통상의 숙련가에 의해 쉽게 결정된다.
- [0118] 하나의 실시양태에서, 하나 또는 하나 이상의 배양 조건이 달라진다. 하나의 실시양태에서, 이러한 변화가 상이한 표현형을 초래한다.
- [0119] 하나의 실시양태에서, 세포가 미세세포 단리 절차를 시작하기 위해 이들의 배양 배지에 혈청을 필요로 하는 경우, 세포 배양 배지에 미세세포가 없는 혈청을 보충한 다음 컨디셔닝하고자 하는 세포에 첨가한다. 미세세포를 컨디셔닝된 세포 배양 배지로부터 수집한다. 혈청은, 예를 들면, 초원심분리, 여과, 침전 등과 같은 임의의 적합한 방법에 의해 고갈될 수 있다. 배지, 혈청 농도 및 배양 조건의 선택은, 예를 들면, 배양될 세포 유형, 미세세포의 원하는 속도, 배양된 세포의 원하는 표현형 등을 포함한, 당업계의 통상의 숙련가에 의해 쉽게 인지되는 다양한 인자에 의해 영향을 받는다. 하나의 실시양태에서, 미세세포 단리 절차를 위해 컨디셔닝된 세포 배양 배지는 미세세포 단리 절차 전에 세포가 성장하는 배지와 동일한 유형의 세포 배양 배지이다.
- [0120] 하나의 실시양태에서, 미세세포 단리 절차를 시작하기 위해, 세포 배양 배지를 제거하고, 무-혈청 배지를 컨디셔닝시키고자 하는 세포에 첨가한다. 그 후, 미세세포를 컨디셔닝된 무-혈청 배지로부터 수집한다. 배지 및 배양 조건의 선택은, 예를 들면, 배양될 세포 유형, 미세세포의 원하는 속도, 배양된 세포의 원하는 표현형 등을 포함한, 당업계의 통상의 숙련가에 의해 쉽게 인지되는 다양한 인자에 의해 영향을 받는다. 하나의 실시양태에서, 무-혈청 배지는 무-혈청 배지에서 세포의 생존을 촉진시키거나 향상시키는 적어도 하나의 추가 인자로 보충된다. 이러한 인자는, 예를 들면, 세포에 영양 지원(trophic support)을 제공하거나, 세포의 아포토시스를 억제 또는 방지할 수 있다.
- [0121] 세포는 세포가 미세세포를 배양 배지로 분비하도록 하기에 충분한 시간 동안 배양 배지에서 배양된다. 세포가 미세세포를 배양 배지로 분비하도록 하기에 충분한 시간은, 예를 들면, 배양될 세포 유형, 미세세포의 원하는 속도, 배양된 세포의 원하는 표현형, 미세세포의 원하는 수율 등을 포함한, 당업계의 통상의 숙련가에 의해 쉽게 인지되는 다양한 인자에 의해 영향을 받는다.
- [0122] 그 후 미세세포는 본 발명의 방법에 의해 배양 배지로부터 제거된다.
- [0123] 하나의 실시양태에서, 미세세포 단리 절차 전에, 세포는 소염성 화합물, 항-아포토시스 화합물, 섬유증의 억제제, 혈관형성을 향상시킬 수 있는 화합물, 면역억제 화합물, 세포의 생존을 촉진하는 화합물, 화학요법제, 세포 이동을 향상시킬 수 있는 화합물, 신경성 화합물 및 성장 인자로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 제제로 처리된다. 하나의 실시양태에서, 세포가 미세세포가 수집되는 배지에서 배양되는 동안, 세포는 소염성 화합물, 항-아포토시스 화합물, 섬유증의 억제제, 혈관형성을 향상시킬 수 있는 화합물, 면역억제 화합물, 세포의 생존을 촉진하는 화합물, 및 성장 인자로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 제제로 처리된다.
- [0124] 하나의 실시양태에서, 소염성 화합물은 미국 특허 제6,509,369호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0125] 하나의 실시양태에서, 항-아포토시스 화합물은 미국 특허 제6,793,945호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0126] 하나의 실시양태에서, 섬유증의 억제제는 미국 특허 제6,331,298호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0127] 하나의 실시양태에서, 혈관형성을 향상시킬 수 있는 화합물은 미국 특허 출원 제2004/0220393호 또는 미국 특허 출원 제2004/0209901호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0128] 하나의 실시양태에서, 면역억제 화합물은 미국 특허 출원 제2004/0171623호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0129] 하나의 실시양태에서, 세포의 생존을 촉진하는 화합물은 미국 특허 출원 제2010/0104542호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0130] 하나의 실시양태에서, 성장 인자는 그중에서도 TGF-β 1, 2, 및 3을 포함한 TGF-β 패밀리의 구성원, 골 형태형성 단백질 (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, 및 -13), 섬유아세포 성장 인자-1 및 -2, 혈소판-유래 성장 인자-AA, -AB 및 -BB, 혈소판 풍부 혈장, 인슐린 성장 인자 (IGF-I, II) 성장 분화 인자 (GDF-5, -6, -8, -10, -15), 혈관 내피 세포-유래 성장 인자 (VEGF), 플레이오토프린(pleiotrophin), 엔도텔린으로 이루어진 그룹으로

부터 선택된 적어도 하나의 분자일 수 있다. 다른 약제학적 화합물은, 예를 들면, 니코틴아미드, 산소결핍 유도성 인자 1-알파, 글루카곤 유사 펩티드-1 (GLP-1), GLP-1 및 GLP-2 모방체 및 II, 엑센딘-4, 노달, 노긴, NGF, 레티노산, 부갑상선 호르몬, 테나신-C, 트로포엘라스틴, 트롬빈-유래 펩티드, 카텔리시딘, 데펜신, 라미닌, 피브로넥틴 및 비트로넥틴과 같은 접착성 세포의 매트릭스 단백질의 세포- 및 헤파린-결합 도메인을 함유하는 생물학적 펩티드, 및 예를 들면, 미국 특허 출원 제2004/0209901호 및 미국 특허 출원 제2004/0132729호에 개시된 화합물과 같은 MAPK 억제제를 포함할 수 있다.

- [0131] 하나의 실시양태에서, 미세세포는 다음의 단계를 포함하여 골수 유래 중간엽 줄기 세포의 배양물을 사용하여 컨디셔닝된 세포 배양 배지를 포함하는 생물학적 유체로부터 단리된다:
- [0132] a) 골수 유래 중간엽 줄기 세포의 집단을 수득하고 세포의 1:4 희석으로 플라스크에 시딩하는 단계,
- [0133] b) 세포가 80 내지 90% 합류될 때까지 배지에서 세포를 배양하는 단계,
- [0134] c) 세포 잔해물을 제거하기 위해 배지를 제거하고 정화하는 단계,
- [0135] d) 정화된 배양 배지에 침전제를 첨가하여 미세세포를 침전시키는 단계,
- [0136] e) 침전된 미세세포를 수집하고 물질을 세척하여 침전제를 제거하는 단계; 및
- [0137] f) 저장 또는 후속 사용을 위해 세척된 미세세포를 용액에 현탁시키는 단계.
- [0138] 하나의 실시양태에서, 미세세포는 다음의 단계를 포함하여 골수 유래 단핵 세포의 배양물을 사용하여 컨디셔닝된 세포 배양 배지를 포함하는 생물학적 유체로부터 단리된다:
- [0139] a) 골수 유래 단핵 세포의 집단을 수득하고 세포의 1:4 희석으로 플라스크에 시딩하는 단계,
- [0140] b) 세포가 80 내지 90% 합류될 때까지 배지에서 세포를 배양하는 단계,
- [0141] c) 세포 잔해물을 제거하기 위해 배지를 제거하고 정화하는 단계,
- [0142] d) 정화된 배양 배지에 침전제를 첨가하여 미세세포를 침전시키는 단계,
- [0143] e) 침전된 미세세포를 수집하고 물질을 세척하여 침전제를 제거하는 단계; 및
- [0144] f) 저장 또는 후속 사용을 위해 세척된 미세세포를 용액에 현탁시키는 단계.
- [0145] 하나의 실시양태에서, 골수 유래 중간엽 줄기 세포는 37°C에서 95% 가습 공기 및 5% CO₂에서 20% 태아 소 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/글루타민이 보충된 α-MEM을 포함하는 배지에서 배양된다.
- [0146] 하나의 실시양태에서, 골수 유래 단핵 세포는 37°C에서 95% 가습 공기 및 5% CO₂에서 20% 태아 소 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/글루타민이 보충된 α-MEM을 포함하는 배지에서 배양된다.
- [0147] 하나의 실시양태에서, 배지는 원심분리에 의해 정화된다.
- [0148] 하나의 실시양태에서, 침전제는 평균 분자량이 6000인 폴리에틸렌 글리콜이다. 하나의 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 약 8.5 w/v %의 농도로 사용된다. 하나의 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 0.4 M의 최종 농도를 갖는 염화나트륨 용액에 희석된다.
- [0149] 하나의 실시양태에서, 침전된 미세세포는 원심분리에 의해 수집된다.
- [0150] 하나의 실시양태에서, 단리된 미세세포는 인산염 완충 염수를 사용하여 100 kDa 분자량 컷오프를 갖는 막을 사용한 원심분리 여과를 통해 세척된다.
- [0151] 혈장을 포함하는 생물학적 유체: 하나의 실시양태에서, 미세세포는 혈장으로부터 수득된다. 혈장은 건강한 개인으로부터, 또는 대안적으로, 특정 질환 표현형을 갖는 개인으로부터 수득될 수 있다.
- [0152] 하나의 실시양태에서, 미세세포는 다음의 단계를 포함하여 혈장을 포함하는 생물학적 유체로부터 단리된다:
- [0153] a) 혈장을 수득하고 혈장을 세포 배양 배지로 희석시키는 단계,
- [0154] b) 희석된 혈장에 침전제를 첨가하여 미세세포를 침전시키는 단계; 및
- [0155] c) 침전된 미세세포를 수집하고 물질을 세척하여 침전제를 제거하는 단계, 및

- [0156] d) 저장 또는 후속 사용을 위해 세척된 미세소포를 용액에 현탁시키는 단계.
- [0157] 하나의 실시양태에서, 혈장은 배양 배지로 1:10 희석된다. 하나의 실시양태에서, 배양 배지는 α -MEM이다.
- [0158] 하나의 실시양태에서, 침전제는 평균 분자량이 6000인 폴리에틸렌 글리콜이다. 하나의 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 약 8.5 w/v %의 농도로 사용된다. 하나의 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 0.4 M의 최종 농도를 갖는 염화나트륨 용액에 희석된다.
- [0159] 하나의 실시양태에서, 침전된 미세소포는 원심분리에 의해 수집된다.
- [0160] 하나의 실시양태에서, 단리된 미세소포는 인산염 완충 염수를 사용하여 100 kDa 분자량 컷오프를 갖는 막을 사용한 원심분리 여과를 통해 세척된다.
- [0161] 골수 흡입물을 포함하는 생물학적 유체: 하나의 실시양태에서, 미세소포는 골수 흡입물로부터 수득된다. 하나의 실시양태에서, 미세소포는 골수 흡입물의 세포 분획으로부터 수득된다. 하나의 실시양태에서, 미세소포는 골수 흡입물의 무세포 분획(acellular fraction)으로부터 수득된다.
- [0162] 하나의 실시양태에서, 미세소포는 골수 흡입물로부터 배양된 세포로부터 수득된다. 하나의 실시양태에서, 골수 흡입물로부터 배양된 세포는 미세소포가 단리되는 세포 배양 배지를 컨디셔닝하는데 사용된다.
- [0163] 하나의 실시양태에서, 미세소포는 다음의 단계를 포함하여 골수 흡입물을 포함하는 생물학적 유체로부터 단리된다:
 - [0164] a) 골수 흡입물을 수득하고 골수 흡입물을 무세포 부분과 세포 부분으로 분리하는 단계,
 - [0165] b) 무세포 부분을 희석하는 단계,
 - [0166] c) 세포 잔해물을 제거하기 위해 희석된 무세포 부분을 정화하는 단계,
 - [0167] d) 희석된 무세포 부분에 침전제를 첨가하여 무세포 부분에서 미세소포를 침전시키는 단계;
 - [0168] e) 침전된 미세소포를 수집하고 물질을 세척하여 침전제를 제거하는 단계, 및
 - [0169] f) 저장 또는 후속 사용을 위해 세척된 미세소포를 용액에 현탁시키는 단계.
- [0170] 하나의 실시양태에서, 무세포 부분은 배양 배지로 1:10 희석된다.
- [0171] 하나의 실시양태에서, 배양 배지는 α -MEM이다.
- [0172] 하나의 실시양태에서, 희석된 무세포 부분은 원심분리에 의해 정화된다.
- [0173] 하나의 실시양태에서, 침전제는 평균 분자량이 6000인 폴리에틸렌 글리콜이다. 하나의 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 약 8.5 w/v %의 농도로 사용된다. 하나의 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 0.4 M의 최종 농도를 갖는 염화나트륨 용액에 희석된다.
- [0174] 하나의 실시양태에서, 침전된 미세소포는 원심분리에 의해 수집된다.
- [0175] 하나의 실시양태에서, 단리된 미세소포는 인산염 완충 염수를 사용하여 100 kDa 분자량 컷오프를 갖는 막을 사용한 원심분리 여과를 통해 세척된다.
- [0176] 하나의 실시양태에서 세포 부분은 세포를 단리하고 수집하기 위해 추가로 가공된다. 하나의 실시양태에서, 세포 부분은 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 단리하고 수집하기 위해 추가로 가공된다. 하나의 실시양태에서, 세포 부분은 골수 유래 단핵 세포를 단리하고 수집하기 위해 추가로 가공된다. 하나의 실시양태에서, 세포 부분은 미세소포가 나중에 유래될 수 있는 배지를 컨디셔닝하는데 사용된다.
- [0177] 하나의 실시양태에서, 미세소포는 세포 부분으로부터 단리된다. 세포 부분은 미세소포의 단리 전에 일정 기간 동안 배양될 수 있다. 대안적으로, 미세소포는 세포 부분이 수집된 직후 세포 부분으로부터 단리될 수 있다.
- [0178] 하나의 실시양태에서, 세포 부분은 또한 소염성 화합물, 항-아포토시스 화합물, 섬유증의 억제제, 혈관형성을 향상시킬 수 있는 화합물, 면역억제 화합물, 세포의 생존을 촉진하는 화합물, 화학요법제, 세포 이동을 향상시킬 수 있는 화합물, 신경성 화합물 및 성장 인자로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 제제로 처리된다.
- [0179] 하나의 실시양태에서, 소염성 화합물은 미국 특허 제6,509,369호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.

- [0180] 하나의 실시양태에서, 항-아포토시스 화합물은 미국 특허 제6,793,945호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0181] 하나의 실시양태에서, 섬유증의 억제제는 미국 특허 제6,331,298호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0182] 하나의 실시양태에서, 혈관형성을 향상시킬 수 있는 화합물은 미국 특허 출원 제2004/0220393호 또는 미국 특허 출원 제 2004/0209901호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0183] 하나의 실시양태에서, 면역억제 화합물은 미국 특허 출원 제2004/0171623호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0184] 하나의 실시양태에서, 세포의 생존을 촉진하는 화합물은 미국 특허 출원 제2010/0104542호에 개시된 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0185] 하나의 실시양태에서, 성장 인자는 그중에서도 TGF- β 1, 2, 및 3을 포함한 TGF- β 패밀리의 구성원, 골 형태형성 단백질 (BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, 및 -13), 섬유아세포 성장 인자-1 및 -2, 혈소판-유래 성장 인자-AA, -AB 및 -BB, 혈소판 풍부 혈장, 인슐린 성장 인자 (IGF-I, II) 성장 분화 인자 (GDF-5, -6, -8, -10, -15), 혈관 내피 세포-유래 성장 인자 (VEGF), 플레이오토로핀, 엔도텔린으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자일 수 있다. 다른 약제학적 화합물은, 예를 들면, 니코틴아미드, 산소결핍 유도성 인자 1-알파, 글루카곤 유사 펩티드-1 (GLP-1), GLP-1 및 GLP-2 모방체, 및 II, 엑센딘-4, 노달, 노긴, NGF, 레티노산, 부갑상선 호르몬, 테라신-C, 트로포엘라스틴, 트롬빈-유래 펩티드, 카텔리시딘, 데켄신, 라미닌, 피브로넥틴 및 비트로넥틴과 같은 접착성 세포의 매트릭스 단백질의 세포- 및 헤파린-결합 도메인을 함유하는 생물학적 펩티드, 및 예를 들면, 미국 특허 출원 제2004/0209901호 및 미국 특허 출원 제2004/0132729호에 개시된 화합물과 같은 MAPK 억제제를 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 세포 부분은 저산소 조건하에서 배양된다. 하나의 실시양태에서, 세포 부분은 열-충격된다.
- [0186] 노를 포함하는 생물학적 유체: 하나의 실시양태에서, 미세세포는 노로부터 획득된다. 노는 건강한 개인으로부터, 또는 대안적으로, 특정 질환 표현형을 갖는 개인으로부터 획득될 수 있다.
- [0187] 하나의 실시양태에서, 미세세포는 다음의 단계를 포함하여 노를 포함하는 생물학적 유체로부터 분리된다:
- [0188] a) 노 샘플을 획득하는 단계,
- [0189] b) 세포 잔해물을 제거하기 위해 노를 정화하는 단계,
- [0190] c) 정화된 노에 침전제를 첨가하여 미세세포를 침전시키는 단계;
- [0191] d) 침전된 미세세포를 수집하고 물질을 세척하여 침전제를 제거하는 단계, 및
- [0192] e) 저장 또는 후속 사용을 위해 세척된 미세세포를 용액에 현탁시키는 단계.
- [0193] 하나의 실시양태에서, 노는 원심분리에 의해 정화된다.
- [0194] 하나의 실시양태에서, 침전제는 평균 분자량이 6000인 폴리에틸렌 글리콜이다. 하나의 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 약 8.5 w/v %의 농도로 사용된다. 하나의 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 0.4 M의 최종 농도를 갖는 염화나트륨 용액에 희석된다.
- [0195] 하나의 실시양태에서, 침전된 미세세포는 원심분리에 의해 수집된다.
- [0196] 하나의 실시양태에서, 분리된 미세세포는 인산염 완충 염수를 사용하여 100 kDa 분자량 컷오프를 갖는 막을 사용한 원심분리 여과를 통해 세척된다.
- [0197] 본 발명의 대안적인 실시양태에서, 생물학적 유체는 여과에 의해 정화된다. 대안적인 실시양태에서, 침전된 미세세포는 여과에 의해 수집된다. 대안적인 실시양태에서, 여과에 의해 생물학적 유체는 정화되고 침전된 미세세포는 수집된다. 특정 실시양태에서, 생물학적 유체 및/또는 침전된 미세세포의 여과는 외부 힘의 적용을 필요로 하였다. 외부 힘은 중력, 표준 중력 또는 원심력일 수 있다. 대안적으로, 외부 힘은 흡입일 수 있다.
- [0198] 하나의 실시양태에서, 본 실시양태는 여과에 의한 생물학적 유체의 정화를 용이하게 하는 장치를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명은 여과에 의한 침전된 미세세포의 수집을 용이하게 하는 장치를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명은 여과에 의한 생물학적 유체의 정화 및 침전된 미세세포의 수집을 용이하게 하는 장치를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 장치는 또한 미세세포를 세척한다.

- [0199] 하나의 실시양태에서, 장치는 도 4에 도시된 장치이다. 이러한 실시양태에서, 생물학적 유체가 내부 챔버에 첨가된다. 내부 챔버는 미세소포보다 큰 크기를 갖는 입자는 내부 챔버에 보유하면서 미세소포는 통과할 수 있는 공극 크기를 갖는 제1 필터를 갖는다. 하나의 실시양태에서, 내부 챔버의 필터의 공극 크기는 1 μm 이다. 이러한 실시양태에서, 생물학적 유체가 내부 챔버로부터 필터를 통해 통과할 때, 1 μm 보다 큰 입자는 내부 챔버에 보유되고, 모든 다른 입자는 내부 챔버의 바닥과 제2 필터 사이의 영역에 수집된다.
- [0200] 제2 필터는 미세소포가 통과할 수 없는 공극 크기를 갖는다. 하나의 실시양태에서, 내부 챔버의 제2 필터의 공극 크기는 0.01 μm 이다. 이러한 실시양태에서, 생물학적 유체가 제2 필터를 통과할 때, 미세소포는 내부 챔버의 바닥과 제2 필터 사이의 영역에 보유되고, 나머지 모든 입자 및 유체는 장치의 바닥에 수집된다.
- [0201] 당업계의 통상의 숙련가는 장치가, 예를 들면, 원하는 크기의 미세소포를 선택하기 위해 다양한 공극 크기의 둘 이상의 필터를 가질 수 있음을 쉽게 인지할 수 있다.
- [0202] 하나의 실시양태에서, 침전제는 내부 챔버에서 생물학적 유체에 첨가된다. 하나의 실시양태에서, 침전제는 제1 필터를 통과한 후에 여액에 첨가된다. 본 발명의 장치에 의해 이용되는 필터 막은, 필터 막이 생물학적 유체와 반응하지 않거나 생물학적 유체 내의 성분과 결합하지 않는 한, 임의의 적합한 물질로부터 제조될 수 있다. 예를 들면, 필터 막은, 예를 들면, 폴리에테르설폰, 나일론6, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리프로필렌, 제타 변성 유리 마이크로섬유, 셀룰로스 니트레이트, 셀룰로스 아세테이트, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 재생 셀룰로스 와 같은 저 결합 물질로부터 제조될 수 있다.
- [0203] **본 발명의 미세소포**
- [0204] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 5000 nm의 크기를 갖는다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 1000 nm의 크기를 갖는다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 500 nm의 크기를 갖는다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 400 nm의 크기를 갖는다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 300 nm의 크기를 갖는다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 200 nm의 크기를 갖는다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 100 nm의 크기를 갖는다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 50 nm의 크기를 갖는다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 20 nm의 크기를 갖는다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 전자 현미경에 의해 결정되는 바와 같이 약 2 nm 내지 약 10 nm의 크기를 갖는다.
- [0205] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 적어도 100 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0206] 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세소포는 치료법에 사용될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세소포는 진단 검사에 사용될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 미세소포는 세포 또는 조직을 변경하거나 조작하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 미세소포가 세포 또는 조직을 변경 또는 조작하는데 사용되는 경우, 미세소포는 세포 또는 조직을 변경하거나 조작하는 RNA, DNA, 지질, 탄수화물, 단백질, 약물, 소분자, 대사산물, 또는 이들의 조합으로 부하되고, 표지될 수 있다. 대안적으로, 미세소포는 RNA, DNA, 지질, 탄수화물, 단백질, 약물, 소분자, 대사산물, 또는 이들의 조합을 발현 및/또는 함유하는 세포 또는 조직으로부터 단리될 수 있다.
- [0207] **진단 검사에서의 본 발명의 미세소포의 용도**
- [0208] 본 발명의 미세소포는, 예를 들면, 병태 또는 질환, 또는 질환의 단계 또는 진행과 같은 특정 표현형을 식별하는 바이오마커를 검출하는 진단 검사에 사용될 수 있다. 기원 세포(cell-of-origin) 특이 미세소포로부터의 바이오마커 또는 마커는 질환, 병태, 질환 단계 및 병태의 단계에 대한 치료 섭생을 결정하는데 사용될 수 있고, 또한 치료 효능을 결정하는 데에도 사용될 수 있다. 기원 세포 특이 미세소포로부터의 마커는 또한 알려지지 않은 기원의 질환의 병태를 식별하는데 사용될 수 있다.
- [0209] 본원에서 사용되는 용어 "바이오마커"는 생물학적 상태의 지표를 가리킨다. 이것은 정상적인 생물학적 과정, 병원성 과정 또는 치료적 개입에 대한 약리학적 반응의 지표로서 객관적으로 측정되고 평가되는 특성이다. 미세소포의 하나 이상의 바이오마커가 표현형을 특성화하기 위해 평가될 수 있다. 바이오마커는 대사산물, 핵산, 펩티드, 단백질, 지질, 항원, 탄수화물 또는 프로테오글리칸, 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있다. RNA는 mRNA,

miRNA, snoRNA, snRNA, rRNA, tRNA, siRNA, hnRNA 또는 shRNA일 수 있다.

- [0210] 대상체의 표현형은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하고 샘플로부터 하나 이상의 미세소포를 분석함으로써 특성화될 수 있다. 예를 들면, 대상체 또는 개체에 대한 표현형을 특성화하는 것은 질환 또는 병태를 검출함(증상발생전 초기 단계 검출을 포함함), 질환 또는 병태의 예후, 진단 또는 치료를 결정함, 또는 질환 또는 병태의 단계 또는 진행을 결정함을 포함할 수 있다. 표현형을 특성화하는 것은 또한 특정 질환, 병태, 질환 단계 및 병태 단계에 대한 적절한 치료 또는 치료 효능 확인, 질환 진행, 특히 질환 재발, 전이성 확산 또는 질환 재발의 예측 및 가능성 분석을 포함할 수 있다. 표현형은 또한 암 또는 종양과 같은 병태 또는 질환의 임상적으로 구별되는 유형 또는 아형일 수 있다. 표현형 결정은 또한 생리학적 병태의 결정, 또는 이식후(post-transplantation)와 같은 장기 고통 또는 장기 거부의 평가일 수 있다. 본원에 기술된 생성물 및 공정은 대상체를 개인적으로 평가할 수 있게 하며, 이것은 치료에 있어 보다 효율적이고 경제적인 결정의 이점을 제공할 수 있다.
- [0211] 표현형은 미국 특허 제7,897,356호에 열거된 임의의 표현형일 수 있다. 표현형은 종양, 신생물 또는 암일 수 있다. 본원에 기술된 생성물 또는 공정에 의해 검출되거나 평가되는 암은 유방암(breast cancer), 난소암(ovarian cancer), 폐암(lung cancer), 결장암(colon cancer), 과형성 폴립(hyperplastic polyp), 선종(adenoma), 결장직장암(colorectal cancer), 고도 이형성증(high grade dysplasia), 저도 이형성증(low grade dysplasia), 전립선 비대증(prostatic hyperplasia), 전립선암(prostate cancer), 흑색종(melanoma), 췌장암(pancreatic cancer), 뇌암(예를 들어, 교모세포종(glioblastoma)), 혈액학적 악성 종양(hematological malignancy), 간세포 암종(hepatocellular carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 두경부암(head and neck cancer), 식도암(esophageal cancer), 위장관 간질성 종양(gastrointestinal stromal tumor) (GIST), 신장 세포 암종(renal cell carcinoma) (RCC) 또는 위암(gastric cancer)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 결장직장암은 CRC 두크스(Dukes) B 또는 두크스 C-D일 수 있다. 혈액학적 악성 종양은 B-세포 만성 림프구성 백혈병(Chronic Lymphocytic Leukemia), B-세포 림프종-DLBCL, B-세포 림프종-DLBCL-배중심형(germinal center-like), B-세포 림프종-DLBCL-활성화된 B-세포형, 및 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma)일 수 있다. 표현형은 또한 바렛 식도(Barrett's Esophagus)와 같은 전암성 질환일 수 있다.
- [0212] 표현형은 또한 염증성 질환, 면역 질환 또는 자가면역 질환일 수 있다. 예를 들면, 질환은 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease) (IBD), 크론병(Crohn's disease) (CD), 궤양성 대장염(ulcerative colitis) (UC), 골반 염증(pelvic inflammation), 혈관염(vasculitis), 건선(psoriasis), 당뇨병(diabetes), 자가면역성 간염(autoimmune hepatitis), 다발성 경화증(Multiple Sclerosis), 중증 근무력증(Myasthenia Gravis), I형 당뇨병(Type I diabetes), 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 건선, 전신 홍반성 루푸스(Systemic Lupus Erythematosus) (SLE), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's Thyroiditis), 그레이브스병(Grave's disease), 강직성 척추염(Ankylosing Spondylitis) 쇼그렌병(Sjorgen's Disease), CREST 증후군, 경피증(Scleroderma), 류마티스 질환(Rheumatic Disease), 장기 거부(organ rejection), 이식편 대 숙주 질환(graft versus host disease), 원발성 경화성 담관염(Primary Sclerosing Cholangitis) 또는 패혈증(sepsis)일 수 있다. 특정 예시적인 실시양태에서, 질환은 EB, 예를 들어, RDEB 및/또는 DDEB, 집합 EB, 단순 EB 및/또는 후천적 형태의 EB이다.
- [0213] 표현형은 또한 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 울혈성 심부전(congestive heart failure), 불안정형 플라크(vulnerable plaque), 뇌졸중(stroke) 또는 허혈(ischemia)과 같은 심혈관 질환일 수 있다. 심혈관 질환 또는 병태는 고혈압(high blood pressure), 협착증(stenosis), 혈관 폐색(vessel occlusion) 또는 혈전증(thrombotic event)일 수 있다.
- [0214] 표현형은 또한 다발성 경화증(Multiple Sclerosis) (MS), 파킨슨병(Parkinson's Disease) (PD), 알츠하이머병(Alzheimer's Disease) (AD), 조현병(schizophrenia), 양극성 장애(bipolar disorder), 우울증(depression), 자폐증(autism), 프리온병(Prion Disease), 픽병(Pick's disease), 치매(dementia), 헌팅턴병(Huntington disease) (HD), 다운 증후군(Down's syndrome), 뇌혈관 질환(cerebrovascular disease), 라스무센 뇌염(Rasmussen's encephalitis), 바이러스성 수막염(viral meningitis), 신경정신성 전신 홍 반성 루푸스(neuropsychiatric systemic lupus erythematosus) (NPSLE), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob disease), 게르스트만-슈투로이슬러-샤잉커 병(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease), 전염성 해면상 뇌증(transmissible spongiform encephalopathy), 허혈성 재관류 손상(ischemic reperfusion damage) (예를 들어, 뇌졸중), 뇌 외상(brain trauma), 미생물 감염(microbial infection) 또는 만성 피로 증후군(chronic fatigue syndrome)과 같은 신경학적 질환일 수 있다. 표현형은 또한 섬유근육통(fibromyalgia), 만성 신경병성 통증(chronic neuropathic pain) 또는 말초 신경병성

통증(peripheral neuropathic pain)과 같은 병태일 수 있다.

- [0215] 표현형은 또한 세균, 바이러스 또는 효모 감염과 같은 감염성 질환일 수 있다. 예를 들면, 질환 또는 병태는 휘플 병(Whipple's Disease), 프리온 병(Prion Disease), 간경변(cirrhosis), 메티실린-내성 황색 포도상 구균(methicillin-resistant staphylococcus aureus), HIV, 간염(hepatitis), 매독(syphilis), 수막염(meningitis), 말라리아(malaria), 결핵(tuberculosis) 또는 인플루엔자(influenza)일 수 있다. HIV 또는 HCV-유사 입자와 같은 바이러스 단백질이 바이러스 병태를 특성화하기 위해 엑소솜에서 평가될 수 있다.
- [0216] 표현형은 또한 주산기 또는 임신 관련 병태 (예를 들어, 자간전증(preeclampsia) 또는 조산(preterm birth)), 대사 질환 또는 병태, 예를 들어 철 대사와 관련된 대사 질환 또는 병태일 수 있다. 대사 질환 또는 병태는 또한 당뇨병, 염증 또는 주산기 병태(perinatal condition)일 수 있다.
- [0217] 표현형은, 예를 들면, 웨스턴 블롯, ELISA, PCR 등과 같은 임의의 적합한 분석 방법을 통해 검출될 수 있다. 하나 이상의 표현형의 다중 분석을 수행하기 위해 검정 방법을 조합할 수 있다. 본 발명의 미세소포에 적용될 수 있는 분석 방법의 예는 PCT 출원 제W02009092386A3호 및 제W02012108842A1호에 개시되어 있다.
- [0218] 바이오마커가 RNA인 경우, RNA는 미국 특허 제8,021,847호에 개시된 방법에 의해 본 발명의 미세소포로부터 분리될 수 있다.
- [0219] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 제7,897,356호에 개시된 질환에 대한 진단 검사에 사용된다.
- [0220] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 제8,211,653호에 개시된 방법에 따라 암에 대한 진단 검사에 사용된다.
- [0221] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 제8,216,784호에 개시된 방법에 따라 암에 대한 진단 검사에 사용된다.
- [0222] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 제8,278,059호에 개시된 방법에 따라 전립선암에 대한 진단 검사에 사용된다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 제8,343,725호에 개시된 방법에 따라 암 생존에 대한 예후의 진단 검사에 사용된다.
- [0223] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 제8,349,568호에 개시된 방법에 따라 암 생존에 대한 예후의 진단 검사에 사용된다.
- [0224] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 제8,349,560호에 개시된 방법에 따라 급성 림프종 백혈병(acute lymphomic leukemia)에 대한 진단 검사에 사용된다.
- [0225] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 제8,349,561호에 개시된 방법에 따라 급성 림프종 백혈병에 대한 진단 검사에 사용된다.
- [0226] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 C형 간염 바이러스에 대한 진단 검사에 사용된다. 하나의 실시양태에서, C형 간염 바이러스 RNA는 환자에서 C형 간염 바이러스의 존재에 대해 시험하기 위해 미국 특허 제 7,807,438호에 기술된 방법에 따라 본 발명의 미세소포로부터 추출된다.
- [0227] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 제8,349,574호에 개시된 방법에 따라 암 요법에 대한 환자의 반응을 결정하기 위한 진단 검사에 사용된다.
- [0228] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 출원 제US20120058492A1호에 개시된 방법에 따라 악성 종양을 진단하기 위한 진단 검사에 사용된다.
- [0229] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 출원 제US20120238467A1호에 개시된 방법에 따라 암 또는 유해 임신 결과(adverse pregnancy outcome)를 진단하기 위한 진단 검사에 사용된다.
- [0230] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 출원 제US20120214151A1호에 개시된 방법에 따라 노 중의 HIV에 대한 진단 검사에 사용된다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 출원 제 US20120309041A1호에 개시된 방법에 따라 심혈관 사례에 대한 진단 검사에 사용된다.
- [0231] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 PCT 출원 제W02012110099A1호에 개시된 방법에 따라 심혈관 사례에 대한 진단 검사에 사용된다.

- [0232] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 PCT 출원 제W02012126531A1호에 개시된 방법에 따라 심혈관 사례에 대한 진단 검사에 사용된다.
- [0233] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 PCT 출원 제W02013110253A3호에 개시된 방법에 따라 심혈관 사례에 대한 진단 검사에 사용된다.
- [0234] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 PCT 출원 제W02012135844A2호에 개시된 방법에 따라 흑색종에 대한 진단 검사에 사용된다.
- [0235] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세소포를 바이오마커 BRAF의 존재에 대해 시험함으로써 전이성 흑색종에 대한 진단 검사에 사용된다. BRAF의 존재는 웨스턴 블롯을 통해, 또는 대안적으로 PCR에 의해 결정될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 전이성 흑색종 검사는 야생형 및 악성 BRAF를 검출할 수 있다. 전이성 흑색종 검사는 악성 BRAF의 스플라이스 변이체를 검출할 수 있다.
- [0236] 하나의 실시양태에서, 전이성 흑색종에 대한 진단 검사에 사용되는 미세소포는 도 3에 요약된 단계를 포함하는 방법을 사용하여 단리된다.
- [0237] 하나의 실시양태에서, 미세소포는 전이성 흑색종의 존재에 대해 진단받고자 하는 환자로부터 수득된다. 하나의 실시양태에서, 미세소포는 환자의 혈장으로부터 수득된다.
- [0238] 하나의 실시양태에서, 전이성 흑색종의 존재는 하기 2개의 프라이머 세트 중 하나를 사용하여 PCR을 통해 결정된다:
- [0239] 서열 1:
- [0240] 정방향: AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA (서열 번호 1)
- [0241] 역방향: CTGATGGGACCCACTCCATC (서열 번호 2)
- [0242] 앰플리콘 길이: 70
- [0243] 서열 2:
- [0244] 정방향: GAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG (서열 번호 3)
- [0245] 역방향: CTGATGGGACCCACTCCATC (서열 번호 4)
- [0246] 앰플리콘 길이: 82
- [0247] 또 다른 실시양태에서, 전이성 흑색종의 존재는 마우스 항-BRAF V600E 항체 (NewEast Biosciences, Malvern, PA)를 사용하여 웨스턴 블롯을 통해 결정된다.
- [0248] **치료법에서의 본 발명의 미세소포의 용도**
- [0249] 본 발명의 미세소포는 질환을 치료하는 치료법으로서 사용될 수 있다.
- [0250] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 출원 제US20030198642A1호에 기술된 방법에 따라 백신으로서 사용된다.
- [0251] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 출원 제US20060116321A1호에 기술된 방법에 따라 환자의 면역 반응을 조절하거나 억제하는데 사용된다.
- [0252] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 PCT 특허 출원 제W006007529A3호에 기술된 방법에 따라 환자의 면역 반응을 조절하거나 억제하는데 사용된다.
- [0253] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 PCT 특허 출원 제W02007103572A3호에 기술된 방법에 따라 환자의 면역 반응을 조절하거나 억제하는데 사용된다.
- [0254] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 제8,288,172호에 기술된 방법에 따라 환자의 면역 반응을 조절하거나 억제하는데 사용된다.
- [0255] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 PCT 특허 출원 제W02011000551A1호에 기술된 방법에 따라 암에 대한 치료법으로서 사용된다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 출원 제US20120315324A1호에 기술된 방법에 따라 암 또는 염증성 질환에 대한 치료법으로서 사용된다.

- [0256] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 미국 특허 제8,343,485호에 기술된 방법에 따라 혈관 손상에 대한 치료법으로서 사용된다.
- [0257] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 분자를 세포에 전달하는데 사용된다. 분자의 전달은 질환을 치료하거나 예방하는데 유용할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 전달은 PCT 출원 제W004014954A1호에 기술된 방법에 따라 이루어진다. 대안적인 실시양태에서, 전달은 PCT 출원 제W02007126386A1호에 기술된 방법에 따라 이루어진다. 대안적인 실시양태에서, 전달은 PCT 출원 제W02009115561A1호에 기술된 방법에 따라 이루어진다. 대안적인 실시양태에서, 전달은 PCT 출원 제W02010119256A1호에 기술된 방법에 따라 이루어진다.
- [0258] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 상처 치유를 촉진하거나 향상시키는데 사용된다. 하나의 실시양태에서, 상처는 전층 화상이다. 하나의 실시양태에서, 상처는 2도 화상이다.
- [0259] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 환자에서 혈관형성을 촉진하거나 향상시키는데 사용된다.
- [0260] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 환자에서 뉴런 재생을 촉진하거나 향상시키는데 사용된다.
- [0261] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 환자에서 흉터 형성을 감소시키는데 사용된다.
- [0262] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 환자의 피부에서 주름 형성을 감소시키는데 사용된다.
- [0263] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 미세소포는 환자에서 복잡한 조직 재생을 조정하는데 사용된다.
- [0264] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 복잡한 조직 구조의 기능적 재생 및 조직화를 촉진할 수 있는 미세소포의 단리된 제제를 제공한다. 하나의 실시양태에서 본 발명은 재생 불량성 빈혈을 가진 환자에서 조혈 조직을 재생시킬 수 있는 미세소포의 단리된 제제를 제공한다. 하나의 실시양태에서 본 발명은 질환이 있거나, 손상되거나 없어진 피부를 갖는 환자에서 상피 조직, 간질 조직, 신경 조직, 혈관 조직 및 부속 구조로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 조직을 재생시킬 수 있는 미세소포의 단리된 제제를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명은 모든 세 개의 배엽으로부터 조직 및/또는 세포를 재생시킬 수 있는 미세소포의 단리된 제제를 제공한다.
- [0265] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 환자의 면역계를 조절하는데 사용되는 미세소포의 단리된 제제를 제공한다.
- [0266] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 환자에서 EB(예를 들어, RDEB 및/또는 DDEB, 접합 EB, 단순 EB 및/또는 후천적 형태의 EB)의 하나 이상의 증상을 완화시키는데 사용되는 미세소포의 단리된 제제를 제공한다.
- [0267] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 EB(예를 들어, RDEB 및/또는 DDEB, 접합 EB, 단순 EB 및/또는 후천적 형태의 EB)를 갖는 환자에서 콜라겐 VII 발현을 증가시키는데 사용되는 미세소포의 단리된 제제를 제공한다.
- [0268] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 이식된 조직 또는 세포의 생존을 향상시키는 미세소포의 단리된 제제를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 환자는 이식된 조직 또는 세포를 제공받기 전에 미세소포의 단리된 제제로 치료된다. 대안적인 실시양태에서, 환자는 이식된 조직 또는 세포를 제공받은 후 미세소포의 단리된 제제로 치료된다. 대안적인 실시양태에서, 조직 또는 세포는 미세소포의 단리된 제제로 처리된다. 하나의 실시양태에서, 조직 또는 세포는 이식 전에 미세소포의 단리된 제제로 처리된다.
- [0269] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 숙주 세포로부터의 RNA, DNA, 지질, 탄수화물, 대사산물, 단백질 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자를 함유하는 미세소포의 단리된 제제를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 숙주 세포는 RNA, DNA, 지질, 탄수화물, 대사산물, 단백질 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자를 발현하도록 조작된다. 하나의 실시양태에서, 숙주 세포로부터의 RNA, DNA, 지질, 탄수화물, 대사산물, 단백질 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 분자를 함유하는 미세소포의 단리된 제제는 치료제로서 사용된다.
- [0270] **치료법에서의 본 발명의 미세소포의 용도**
- [0271] 치료적 사용을 위해, MV는 바람직하게는 약제학적으로 허용되는 담체와 조합된다. 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"는 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고 합리적인 이익/위험 비를 갖는 완충제, 담체 및 부형제를 의미한다. 담체(들)는 제형의 다른 성분들과 상용성이고 수용자에게 해롭지 않다는 의미에서 "허용 가능"해야 한다. 약제학적으로 허용되는 담체는 약제학적 투여와 상용성인 완충제, 용매, 분산 매질, 코팅, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당업계에 공지되어 있다.
- [0272] 따라서, 본 발명의 EV 조성물은 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친유성 용매, 보존제, 보조제 등과 같

지만 이에 제한되지 않는 임의의 적합한 부형제 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 부형제가 바람직하다. 문헌[Gennaro, Ed., Remington 's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990]에 기술된 것과 같지만 이에 제한되지 않는 이러한 멸균 용액의 비제한적인 예 및 제조방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 당업계에 널리 공지되어 있거나 본원에 기술된 바와 같이 EV 조성물의 투여 방식, 용해도 및/또는 안정성에 적합한 약제학적으로 허용되는 담체가 일상적으로 선택될 수 있다.

[0273] 본 발명의 조성물에 유용한 약제학적 부형제 및 첨가제는 단독으로 또는 1-99.99 중량 또는 용적 %로 조합함을 포함하여 단독으로 또는 조합하여 존재할 수 있는 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질 및 탄수화물 (예를 들어, 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 및 올리고당을 포함한 당; 알디톨, 알톤산, 에스테르화 당 등과 같은 유도체화된 당; 및 다당류 또는 당 중합체)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 단백질 부형제는 인간 혈청 알부민 (HSA), 재조합 인간 알부민 (rHA), 젤라틴, 카제인 등과 같은 혈청 알부민을 포함한다. 완충 능력에 있어서 또한 작용할 수 있는 대표적인 아미노산/항체 분자 성분은 알라닌, 글리신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 리신, 류신, 이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파르트산 등을 포함한다.

[0274] 본 발명에서 사용하기에 적합한 탄수화물 부형제는, 예를 들면, 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등과 같은 단당류; 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등과 같은 이당류; 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 텍스트린, 전분 등과 같은 다당류; 및 만니톨, 크실리톨, 말티톨, 락티톨, 크실리톨 소르비톨 (글루시톨), 미오이노시톨 등과 같은 알디톨을 포함한다. 본 발명에서 사용하기에 바람직한 탄수화물 부형제는 만니톨, 트레할로스 및 라피노스이다.

[0275] EV 조성물은 또한 완충제 또는 pH 조절제를 포함할 수 있고; 전형적으로, 완충제는 유기 산 또는 염기로부터 제조된 염이다. 대표적인 완충제는 유기산 염, 예를 들어 시트르산, 아세트산, 아스코르브산, 글루콘산, 탄산, 타르타르산, 석신산 또는 프탈산의 염; 트리소, 트로메타민 하이드로클로라이드, 또는 포스페이트 완충제를 포함한다.

[0276] 추가로, 본 발명의 EV 조성물은 중합체성 부형제/첨가제, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈, 피콜 (중합체성 당), 텍스트레이트 (예를 들어, 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린과 같은 사이클로덱스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 방향제, 향미생물제, 감미제, 산화방지제, 대전방지제, 계면활성제 (예를 들어, "TWEEN 20" 및 "TWEEN 80" 과 같은 폴리소르베이트), 지질 (예를 들어, 인지질, 지방산), 스테로이드 (예를 들어, 콜레스테롤), 및 킬레이트화제 (예를 들어, EDTA)를 포함할 수 있다.

[0277] 본 발명에 따르는 항체 분자 조성물에서 사용하기에 적합한 이러한 및 추가의 공지된 약제학적 부형제 및/또는 첨가제가, 예를 들어, 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy," 19th ed., Williams & Williams, (1995), and in the "Physician's Desk Reference," 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998)]에 열거된 바와 같이 당업계에 공지되어 있다. 바람직한 담체 또는 부형제 물질은 탄수화물 (예를 들어, 당류 및 알디톨) 및 완충제 (예를 들어, 시트레이트) 또는 중합체성 제제이다.

[0278] 본 발명은 약제학적으로 허용되는 제형으로 MV를 포함하는 안정한 조성물을 제공한다. 보존된 제형은 수성 희석제 중의 적어도 하나의 공지된 보존제를 함유하거나 적어도 하나의 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 아질산페닐수은, 페녹시에탄올, 포름알데히드, 클로로부탄올, 염화마그네슘 (예를 들어, 육수화물), 알킬과라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 나트륨 데하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 그룹으로부터 임의로 선택된다. 0.001, 0.003, 0.005, 0.009, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.3, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값과 같지만 이에 제한되지 않는 0.001-5% 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값의 임의의 적합한 농도 또는 혼합물이 당업계에 공지된 바와 같이 사용된다. 비제한적인 예는 무 보존제, 0.1-2% m-크레졸 (예를 들어, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9, 또는 1.0%), 0.1-3% 벤질 알콜 (예를 들어, 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 또는 2.5%), 0.001-0.5% 티메로살 (예를 들어, 0.005 또는 0.01%), 0.001-2.0% 페놀 (예를 들어, 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 또는 1.0%), 0.0005-1.0% 알킬과라벤(들) (예를 들어, 0.00075, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.005, 0.0075, 0.009, 0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 0.9, 또는 1.0%) 등을 포함한다.

[0279] 본원에 개시된 바와 같은 MV를 함유하는 약제학적 조성물은 투여 단위 형태로 제공될 수 있고 임의의 적합한 방

법에 의해 제조될 수 있다. 약제학적 조성물은 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화되어야 한다. 투여 경로의 예는 정맥내 (IV), 피내, 흡입, 경피, 국소, 경점막 및 직장 투여이다. MV를 위한 바람직한 투여 경로는 국소 투여이다. 유용한 제형은 약학 분야에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 상기 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (1990)]을 참조한다. 비경구 투여에 적합한 제형 성분은 주사용수, 염수 용액, 고점유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤과 같은 항균제; 아스코르브산 또는 중아황산나트륨과 같은 산화방지제; EDTA와 같은 킬레이트화제; 아세이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 완충제; 및 염화나트륨 또는 텍스트로스와 같은 장성 조절을 위한 제제를 포함한다.

[0280] 담체는 제조 및 저장 조건하에서 안정해야 하며 미생물로부터 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리에틸렌 (예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다.

[0281] 약제학적 제제는 바람직하게는 멸균성이다. 멸균은 임의의 적합한 방법, 예를 들어, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결건조되는 경우, 동결건조 및 재구성 전에 또는 후에 필터 멸균이 수행될 수 있다.

[0282] 본 발명의 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이들은, 예를 들면, 액체 용액 (예를 들어, 주사용 및 주입용 용액), 분산액 또는 현탁액, 및 리포솜과 같은 액체, 반고체 및 고체 투여 형태를 포함한다. 바람직한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료적 적용에 따라 좌우된다. 전형적인 바람직한 조성물은 주사용 또는 주입용 용액의 형태이다. 바람직한 투여 방식은 비경구 (예를 들어, 정맥내, 피하, 안내, 복강내, 근육내)이다. 바람직한 실시양태에서, 제제는 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 다른 바람직한 실시양태에서, 제제는 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여된다.

[0283] 본원에서 사용되는 어구 "비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여된"은 통상적으로 주사에 의한 경장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 정맥내, 근육내, 피하, 동맥내, 척수강내, 낭내, 안와내, 유리체내, 심장내, 피내, 복강내, 기관경유, 흡입, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 제한없이 포함한다.

[0284] 본 발명은 포장재, 및 임의로 수성 희석제 중에 처방된 완충제 및/또는 보존제를 갖는 MV의 용액을 포함하는 적어도 하나의 바이알을 포함하는 키트를 제공한다. 수성 희석제는 임의로 약제학적으로 허용되는 보존제를 추가로 포함한다. 보존제는 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 나트륨 데하이드로아세이트 및 티메로살, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것들을 포함한다. 제형에 사용된 보존제의 농도는 항미생물 효과를 산출하기에 충분한 농도이다. 이러한 농도는 선택된 보존제에 따라 좌우되며 당업계 숙련가에 의해 용이하게 결정된다.

[0285] 다른 부형제, 예를 들어, 등장화제, 완충제, 산화방지제, 보존제 증강제가 임의로 및 바람직하게는 희석제에 첨가될 수 있다. 글리세린과 같은 등장화제는 일반적으로 알려진 농도로 사용된다. 개선된 pH 제어를 제공하기 위해 생리학적으로 허용되는 완충제가 첨가될 수 있다. 제형은 약 pH 4.0 내지 약 pH 10.0, 약 pH 5.0 내지 약 pH 9.0, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 8.0과 같은 광범위한 pH를 커버할 수 있다.

[0286] 다른 첨가제, 예를 들어 TWEEN 20 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트), TWEEN 40 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노팔미테이트), TWEEN 80 (폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노올레에이트), Pluronic F68 (폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 블록 공중합체), 및 PEG (폴리에틸렌 글리콜)와 같은 약제학적으로 허용되는 가용화제 또는 폴리소르베이트 20 또는 80 또는 폴록사머 184 또는 188, 플루로닉 (Pluronic)® 폴리올, 다른 블록 공중합체와 같은 비이온성 계면활성제, 및 EDTA 및 EGTA와 같은 킬레이터가 응집을 감소시키기 위해 제형 또는 조성물에 임의로 첨가될 수 있다. 이들 첨가제는 펌프 또는 플라스틱 용기를 사용하여 제형을 투여하는 경우 특히 유용하다. 약제학적으로 허용되는 계면활성제의 존재는 단백질이 응집하는 경향을 완화시킨다.

[0287] 다양한 전달 시스템이 MV를 대상체에 투여하는데 사용될 수 있다. 특정 예시적인 실시양태에서, MV의 투여는 국소적이며, 임의로 드레싱, 붕대, 의료용 테이프, 패드, 거즈 등이 추가된다. 국소 전달을 돕는 적합한 드레싱은 당업계에 잘 알려져 있으며 상업적으로 이용 가능하다. 또 다른 실시양태에서, MV는 폐 전달, 예를 들어, 비강내 투여에 의해 또는 경구 흡입 투여에 의해 투여된다. 폐 전달은 주사기 또는 흡입기 장치 (예를 들어, 분무기, 가압 계량-용량 흡입기, 다중-용량 액체 흡입기, 열 기화 에어로졸 장치, 건조 분말 흡입기 등)를 통해

달성될 수 있다. 폐 전달을 위한 적합한 방법은 당업계에서 잘 공지되어 있으며 상업적으로 이용 가능하다.

[0288] 상기 기술된 임의의 제형은 액체 또는 동결된 형태로 저장될 수 있으며 임의로 보존 공정에 적용될 수 있다.

[0289] 본 발명의 특정 예시적인 실시양태에서, 본원에 기술된 EV는 하나 이상의 생물활성제를 표적 세포에 전달하는데 사용된다. 용어 "생물활성제(bioactive agent)"는 세포 및/또는 세포액에서 발견되고 본원에 기술된 EV의 정제 및/또는 제조 동안 첨가되는 단백질 (예를 들어, 비-막결합 단백질), 펩티드 (예를 들어, 비-막결합 펩티드), 전사 인자, 핵산 등 및/또는 본원에 기술된 EV가 본원에 기술된 하나 이상의 정제 및/또는 제조 단계 동안 노출되는 약제학적 화합물, 단백질 (예를 들어, 비-막결합 단백질), 펩티드 (예를 들어, 비-막결합 펩티드), 전사 인자, 핵산 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 것으로 의도된다. 특정 실시양태에서, 생물활성제는 콜라겐 VII 단백질, 콜라겐 VII mRNA, STAT3 신호전달 활성화제 (예를 들어, 인터페론, 표피 성장 인자, 인터류킨-5, 인터류킨-6, MAP 키나제, c-src 비-수용체 티로신) 키나제 또는 STAT3를 인산화 및/또는 달리 활성화시키는 다른 분자 및/또는 정준 Wnt 활성화제 (예를 들어, 문헌(McBride et al. (2017)) 참조)이다. 정준 Wnt 억제제인 칼리스타틴의 형질전환(Transgenic) 발현은 말초 혈액에서 순환 CD19+ B 림프구 감소와 관련이 있다. 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌을 참조한다 (International Journal of Hematology, 1-10. DOI: 10.1007/s12185-017-2205-5). 또 다른 실시양태에서, 생물활성제는 당업계에 공지된 하나 이상의 약제학적 화합물이다.

[0290] 본원에 기술된 방법의 다른 적합한 수정 및 개조는 본원에 개시된 실시양태의 범위를 벗어나지 않으면서 적합한 등가물을 사용하여 이루어질 수 있다는 것이 당업계의 숙련자들에게 용이하게 명백할 것이다. 이하에서 특정 실시양태들을 상세하게 설명하지만, 이는 단지 예시의 목적으로 포함되며 제한하려는 의도가 아닌 하기 실시예를 참조하여 보다 명확하게 이해될 것이다. 본원에 기술된 모든 특허, 특허 출원 및 참고 문헌은 모든 목적을 위해 전문이 참고로 포함된다.

[0291] **실시예**

[0292] **실시예 1: 초원심분리에 의한 세포 배양 배지로부터의 미세세포의 단리**

[0293] 당해 실시예는 미세세포가 세포 배양 배지 또는 임의의 생물학적 유체로부터 단리되는 전형적인 방법을 예시한다. 세포 배양 배지로부터 미세세포를 단리하는 방법의 개요가 도 1에 도시되어 있다. 요약하면, 세포를 미세세포가 없는 혈청이 보충된 배지에서 배양한다 (혈청은 초원심분리, 여과, 침전 등에 의해 미세세포가 고갈될 수 있다). 세포를 일정 시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 원추형 관으로 옮기고 4°C에서 10분 동안 400 x g에서 원심분리하여 세포를 펠렛화한다. 그 후, 상청액을 새로운 원추형 관으로 옮기고 4°C에서 30분 동안 2000 x g에서 원심분리하여 세포 및 세포 잔해물을 추가로 제거한다. 이어서 또 다른 원심분리 단계 (예를 들어, 세포 잔해물을 추가로 고갈시키고/시키거나 더 큰 미세세포를 제거하기 위해 10000 x g에서 30분 동안)가 뒤따를 수 있다. 생성된 상청액을 초원심분리 관으로 옮기고, 동일한 중량을 보장하도록 칭량하고 4°C에서 70분 동안 70000+ x g에서 초원심분리하여 미세세포를 펠렛화한다.

[0294] 이어서, 이 상청액을 버리고 펠렛을 빙냉 PBS에 재현탁시킨다. 용액을 4°C에서 70분 동안 70000+ x g에서 초원심분리하여 미세세포를 펠렛화한다. 미세세포 풍부화된 펠렛을 소량 (대략 50-100 μl)의 적절한 완충액 (예를 들어, PBS)에 재현탁시킨다.

[0295] **실시예 2: 본 발명의 방법에 의한 세포 배양 배지로부터의 미세세포의 단리**

[0296] 당해 실시예는 본 발명의 방법에 의해 미세세포가 세포 배양 배지로부터 어떻게 단리되는지를 예시한다. 배양된 세포를 갖는 배지로부터 미세세포를 단리하는 방법의 개요는 도 2 및 3에 도시되어 있다. 요약하면, 세포를 미세세포가 없는 혈청이 보충된 배지에서 배양한다 (혈청은 초원심분리, 여과, 침전 등에 의해 미세세포가 고갈될 수 있다). 세포를 일정 시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 원추형 관으로 옮기고 4°C에서 10분 동안 400 x g에서 원심분리하여 세포를 펠렛화한다. 그 후, 그 후, 상청액을 새로운 원추형 관으로 옮기고 4°C에서 30분 동안 2000 x g에서 원심분리하여 세포 및 세포 잔해물을 추가로 제거한다. 이어서 또 다른 원심분리 단계 (예를 들어, 세포 잔해물을 추가로 고갈시키고 더 큰 입자를 제거하기 위해 10000 x g에서 30분 동안)가 뒤따를 수 있다.

[0297] 이어서, 미세세포를 8.5% w/v PEG 6000 및 0.4 M NaCl을 사용하여 4°C에서 침전시킨다. 이 혼합물을 4°C에서 30분 동안 10000 x g에서 회전시킨다. 상청액을 제거하고 펠렛을 적절한 완충액 (예를 들어, PBS)에 재현탁시킨다. 이것은 즉각적인 다운스트림 반응에 사용하거나 추가로 정제될 수 있다. 추가 정제 절차는 원심분리 필터 (예를 들어, 100 kDa의 MWC), 면역친화도, HPLC, 접선 유동 여과, 상 분리/분할, 미세유체공학 등의 사용을

포함할 수 있다.

[0298] 실시예 3: 본 발명의 방법에 의한 골수 유래 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배양 배지로부터의 미세세포의 단리

[0299] 정상 기증자 인간 골수는 AllCells LLC (Emeryville, CA, <http://www.allcells.com>)로부터 입수하였다. MSC는 표준 플라스틱 접착 방법에 의해 단리되었다. 골수 단핵 세포는 제조사의 프로토콜 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)에 따라 Ficoll-Paque Premium (밀도: 1.077 g/ml)을 사용한 저밀도 원심분리에 의해 단리하였다. 단핵 세포를 계면에서 수집하고, 2% FBS (Atlanta Biologics, Atlanta, GA)가 보충된 인산염-완충 염수 (PBS)에서 3회 세척하고, 알파-최소 필수 배지 (a-MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA) 및 20% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Lonza, Allendale, NJ) 및 1% 글루타민 (Lonza)으로 구성된 MSC 배지에 재현탁시켰다.

[0300] MSC 또는 단핵 세포의 초기 배양물을 조직 배양물-처리된 접시 (BD Biosciences, San Jose, CA)에 $2-3 \times 10^5$ 개 세포/cm²로 시딩하고, 95% 가습 공기 및 5% CO₂에서 37°C의 세포 배양기에 두었다. 48 내지 72시간 후, 비-접착성 세포를 제거하고, 배양 플라스크를 PBS로 1회 세정하고, 신선한 배지를 플라스크에 첨가하였다. 세포를 80% 함유에 도달할 때까지 성장시킨 다음 트립신-EDTA (Life Technologies, Carlsbad, CA)에 의해 계대배양하였다. 세포를 1:4 비로 5층 멀티-플라스크 (BD Biosciences)로 나누었다. 대안적으로, 동결보존된 MSC를 37°C에서 해동하고 95% 가습 공기 및 5% CO₂에서 20% 미세세포-비함유 태아 소 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/글루타민이 보충된 a-MEM에서 즉시 배양하였다. 이들을 상기와 유사하게 확장시켰다.

[0301] 세포를 80-90% 함유에 도달할 때까지 다중-플라스크에서 성장시켰다. 플라스크를 PBS로 2회 세정하고 1% 페니실린/스트렙토마이신/글루타민이 보충된 a-MEM을 첨가하였다. 24시간 후, 컨디셔닝된 배지를 50mL 원추형 원심분리관 (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL)으로 옮기고 즉시 4°C에서 10분 동안 400 x g에서 원심분리하여 임의의 비-부착성 세포를 펠렛화하였다. 상청액을 새로운 50mL 원추형 원심분리관으로 옮기고 4°C에서 30분 동안 2000 x g에서 원심분리하여 세포 및 세포 잔해물을 추가로 제거하였다. 상청액을 수집하여 250ml 멸균 폴리프로필렌 일회용 용기 (Corning, Corning, NY)에 넣었다. 상청액에, RNase 및 프로테아제 비함유 폴리에틸렌 글리콜 평균 분자량 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 8.5 w/v % 및 염화나트륨 (최종 농도 0.4 M)을 첨가하였다. 용액을 밤새 흔들면서 4°C의 냉방에 두었다. 용액을 50 mL 원추형 원심분리관으로 옮기고 4°C에서 30분 동안 10000 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 경사여과하고 미세세포 풍부화된 펠렛을 인산염 완충 염수 (PBS)에 재현탁시켰다. 미세세포 풍부화된 용액을 Amicon ultra-15 원심분리 필터 유닛 (공칭 분자량 한계 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA)으로 옮기고 5000 x g에서 30분 동안 원심분리하였다. 필터 유닛을 인산염 완충 염수로 세척하고 5000 x g에서 30분 동안 다시 원심분리하였다. 농축된 샘플을 필터 장치의 바닥으로부터 회수하였다 (대략 200 μ l). 단백질 농도는 마이크로 BSA 단백질 분석 키트 (Pierce, Rockford, IL)에 의해 결정하였고 풍부화된 미세세포 용액은 -70도에서 저장하거나 다운스트림 사용을 위해 가공하였다 (예를 들어, 단백질, RNA 및 DNA 추출).

[0302] 실시예 4: 본 발명의 방법에 의한 혈장으로부터의 미세세포의 단리

[0303] 대략 6-8 ml의 혈액 (인간 및 돼지)을 정맥천자를 통해 수집하고 BD Vacutainer 플라스틱 EDTA 라벤더 튜브 (BD Biosciences, San Jose, CA)에 넣었다. 정맥천자 튜브를 실온에서 30분 동안 400 x g에서 원심분리하였다. 혈장을 제거하고 (약 3-4 ml) 새로운 50 ml 원추형 원심분리관 (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL)에 넣었다. 멸균 알파-최소 필수 배지 (Mediatech Inc., Manassas, VA)를 1:10 (혈장 대 배지) 비로 첨가하였다.

[0304] 상기 용액에 RNase 및 프로테아제 비함유 폴리에틸렌 글리콜 평균 분자량 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 8.5 w/v % 및 염화나트륨 (최종 농도 0.4 M)을 첨가하였다. 용액을 밤새 흔들면서 4°C의 냉방에 두었다. 용액을 4°C에서 30분 동안 10000 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 경사여과하고 미세세포 풍부화된 펠렛을 인산염 완충 염수 (PBS)에 재현탁시켰다. 미세세포 풍부화된 용액을 Amicon ultra-15 원심분리 필터 유닛 (공칭 분자량 한계 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA)으로 옮기고 5000 x g에서 30분 동안 원심분리하였다. 필터 유닛을 인산염 완충 염수로 세척하고 5000 x g에서 30분 동안 다시 원심분리하였다. 농축된 샘플을 필터 장치의 바닥으로부터 회수하였다 (대략 200-400 μ l). 단백질 농도는 마이크로 BSA 단백질 분석 키트 (Pierce, Rockford, IL)에 의해 결정하였고 풍부화된 미세세포 용액은 -70도에서 저장하거나 다운스트림 사용을 위해 가

공하였다 (예를 들어, 단백질, RNA 및 DNA 추출).

[0305] 실시예 5: 본 발명의 방법에 의한 골수 흡입물로부터의 미세세포의 단리

[0306] 돼지 골수를 장골 능선으로부터 단리하였다. 피부 부위를 포비딘 요오드 7.5% 및 이소프로판올 70%로 조심스럽게 세척하였다. 11-게이지 3mm 투관침 (Ranafac, MA, Avon, MA)을 장골 능선에 삽입하였다. 골수 샘플의 응고를 방지하기 위해 흡인 주사기에 5000-1000 단위의 헤파린을 부하하였다. 대략 20-25 ml의 골수가 흡입되었으며 용액을 50 ml 원추형 원심분리관으로 옮겼다. 대안적으로, 정상 기증자 인간 골수 (대략 50ml)는 AllCells LLC (Emeryville, CA, URL: allcells.com)로부터 입수하였다.

[0307] 50 ml 원추형 관을 실온에서 30분 동안 400 x g에서 원심분리하였다. 상청액 (무세포 부분)을 수집하고 (50 ml 당 대략 10-12 ml) 새로운 50 ml 원추형 원심분리관 (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL)에 넣었다. 멸균 알파-최소 필수 배지 (α-MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA)를 1:10 (골수 상청액 대 배지) 비로 첨가하였다. 용액을 새로운 50 ml 원추형 관으로 옮기고 4°C에서 30분 동안 2000 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 새로운 50 ml 원추형 관으로 옮기고, 이 용액에 RNase 및 프로테아제 비함유 폴리에틸렌 글리콜 평균 분자량 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 8.5 w/v % 및 염화나트륨 (최종 농도 0.4 M)을 첨가하였다.

[0308] 용액을 밤새 흔들면서 4°C의 냉방에 두었다. 용액을 4°C에서 30분 동안 10000 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 경사여과하고 미세세포 풍부화된 펠렛을 인산염 완충 염수 (PBS)에 재현탁시켰다. 미세세포 풍부화된 용액을 Amicon ultra-15 원심분리 필터 유닛 (공칭 분자량 한계 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA)으로 옮기고 5000 x g에서 30분 동안 원심분리하였다. 필터 유닛을 인산염 완충 염수로 세척하고 5000 x g에서 30분 동안 다시 원심분리하였다. 농축된 샘플을 필터 장치의 바닥으로부터 회수하였다 (대략 200-400 μl). 단백질 농도는 마이크로 BSA 단백질 분석 키트 (Pierce, Rockford, IL)에 의해 결정하였고 풍부화된 미세세포 용액은 -70도에서 저장하거나 다운스트림 사용을 위해 가공하였다 (예를 들어, 단백질, RNA 및 DNA 추출).

[0309] 세포 부분을 수집하고 중간엽 줄기 단리 또는 골수 완전 단리를 위해 가공하였다.

[0310] 실시예 6: 본 발명의 방법에 의한 뇨로부터의 미세세포의 단리

[0311] 대략 500 ml의 깨끗하게 채취한 인간 뇨를 단리하고 50 ml 원추형 관 (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL)에 넣었다.

[0312] 50 ml 원추형 관을 4°C에서 30분 동안 400 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 제거하고 새로운 50ml 원추형 원심분리 관 (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL)에 넣었다. 용액을 새로운 50 ml 원추형 관으로 4°C에서 30분 동안 2000 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 새로운 50 ml 원추형 관으로 옮기고, 이 용액에 RNase 및 프로테아제 비함유 폴리에틸렌 글리콜 평균 분자량 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 8.5 w/v % 및 염화나트륨 (최종 농도 0.4 M)을 첨가하였다.

[0313] 용액을 밤새 흔들면서 4°C의 냉방에 두었다. 용액을 4°C에서 30분 동안 10000 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 경사여과하고 미세세포 풍부화된 펠렛을 인산염 완충 염수 (PBS)에 재현탁시켰다. 미세세포 풍부화된 용액을 Amicon ultra-15 원심분리 필터 유닛 (공칭 분자량 한계 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA)으로 옮기고 5000 x g에서 30분 동안 원심분리하였다. 필터 유닛을 인산염 완충 염수로 세척하고 5000 x g에서 30분 동안 다시 원심분리하였다. 농축된 샘플을 필터 장치의 바닥으로부터 회수하였다 (대략 200-400 μl). 단백질 농도는 마이크로 BSA 단백질 분석 키트 (Pierce, Rockford, IL)에 의해 결정하였고 풍부화된 미세세포 용액은 -70도에서 저장하거나 다운스트림 사용을 위해 가공하였다 (예를 들어, 단백질, RNA 및 DNA 추출).

[0314] 실시예 7: 본 발명의 방법에 의한 골수 세포의 장기 배양으로부터의 배지로부터의 미세세포의 단리

[0315] 골수를 흡입물로부터 수득하고 (실시예 1 참조) 0.1 mM EDTA (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC)를 함유하는 0.8% 염화암모늄 용액을 사용하여 적혈구를 용해시켰다. 핵형성된 세포를 태아 소 혈청 (Atlanta Biologics, Atlanta, GA) 쿠션하에 400 X g에서 5분 동안 펠렛화하였다. 핵형성된 세포를 400 x g에서 5분 동안 펠렛화함으로써 맥코이 5a 배지 (Mediatech Inc., Manassas, VA)에서 세척하였다. 세포를 1 x 10⁶ 개 세포/ml의 밀도로 배양 배지에 재현탁시키고 25, 75 또는 225 cm² 플라스크 (Corning, Corning, NY)에 플레이팅하였다.

[0316] 배양 배지는 McCoy 5a 배지, 1% 중탄산나트륨 (Life technologies, Carlsbad, CA), 0-4% MEM 비필수 아미노산 (Life technologies), 0-8% MEM 필수 아미노산 (Life technologies), 1% L-글루타민 (Lonza, Allendale, NJ),

0.1 μ M 하이드로코르티손 (Life technologies), 1% 페니실린/스트렙토 마이신 (Lonza), 12-5% 태아 송아지 혈청 (Atlanta Biologics) 및 12-5% 말 혈청 (Stem Cell Technology)으로 구성되었다. 배양물을 33°C 및 5% CO₂ 에서 배양하였다. 첫 9주간의 배양 동안 배지를 제거하지 않고서 원래 용적의 절반의 배지를 첨가하여 매주 급식을 수행하였다. 배양물이 9주를 초과하여 성장한 경우, 배양 배지의 용적을 원래 용적으로 감소시키고, 원래 용적의 절반의 신선한 배지를 매주 첨가하였다.

[0317] 대략 9주간의 배양 후, 원래 배지를 제거하고 저장하였다. 세포를 인산염 완충 염수 (PBS)로 2회 세척하고 McCoy 5a 배지, 1% 중탄산나트륨, 0-4% MEM 비필수 아미노산, 0-8% MEM 필수 아미노산 (Life technologies), 1% L-글루타민 (Lonza, Allendale, NJ), 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Lonza)으로 구성된 배지에서 24시간 동안 배양하였다.

[0318] 24시간 후, 상청액을 50mL 원추형 원심분리관 (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL)으로 옮기고 즉시 4°C에서 10분 동안 400 x g에서 원심분리하여 임의의 비-부착성 세포를 펠렛화하였다. 저장된 원래 배지를 다시 세포에 추가하였다. 상청액을 새로운 50 mL 원추형 원심분리관으로 옮기고 4°C에서 30분 동안 2000 x g에서 원심분리하여 세포 및 세포 잔해물을 추가로 제거하였다.

[0319] 상청액을 수집하여 250ml 멸균 폴리프로필렌 일회용 용기 (Corning, Corning, NY)에 넣었다. 상등액에, RNase 및 프로테아제 비함유 폴리에틸렌 글리콜 평균 분자량 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 8.5 w/v % 및 염화나트륨 (최종 농도 0.4 M)을 첨가하였다. 용액을 밤새 흔들면서 4°C의 냉방에 두었다. 용액을 50 mL 원추형 원심분리관으로 옮기고 4°C에서 30분 동안 10000 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 경사여과하고 미세세포 풍부화된 펠렛을 인산염 완충 염수 (PBS)에 재현탁시켰다. 미세세포 풍부화된 용액을 Amicon ultra-15 원심분리 필터 유닛 (공칭 분자량 한계 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA)으로 옮기고 5000 x g에서 30분 동안 원심분리하였다. 필터 유닛을 인산염 완충 염수로 세척하고 5000 x g에서 30분 동안 다시 원심분리하였다. 농축된 샘플을 필터 장치의 바닥으로부터 회수하였다 (대략 200 μ l). 단백질 농도는 마이크로 BSA 단백질 분석 키트 (Pierce, Rockford, IL)에 의해 결정하였고 풍부화된 미세세포 용액은 -70도에서 저장하거나 다운스트림 사용을 위해 가공하였다 (예를 들어, 단백질, RNA 및 DNA 추출).

[0320] **실시예 8: 본 발명의 미세세포의 분석**

[0321] 미세세포의 샘플을 전자 현미경으로 분석하였다. 투과 전자 현미경 (TEM)의 경우, 각 미세세포 표본을 20분 동안 포름바르-코팅된 150 메쉬 구리 그리드 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) 상에 부하하였다. 그리드를 배수하고 2% 글루타르알데히드의 점적 상에 5분간 부유시킨 다음 이중 증류수 (DDOH)에서 세척하고, 이어서 4% 수성 우라닐 아세테이트 점적에 염색하고 DDOH에서 다수회 세척하였다. 그리드를 필립스 CM10 전자 현미경으로 80kV에서 검사하였다.

[0322] 도 5는 실시예 1에 기술된 초원심분리 방법 (패널 A&B)에 의해 그리고 실시예 3에 기술된 바와 같은 본 발명의 방법 (패널 C&D)에 따라 단리된 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포로부터 유래된 미세세포의 전자 현미경 사진을 보여준다. 도 6은 실시예 1에 기술된 초원심분리 방법 (패널 A&B)에 의해 그리고 실시예 3에 기술된 바와 같은 본 발명의 방법 (패널 C&D)에 따라 단리된 돼지 골수 유래 중간엽 줄기 세포로부터 유래된 미세세포의 전자 현미경 사진을 보여준다. 도 7은 실시예 1에 기술된 초원심분리 방법 (패널 A&B)에 의해 그리고 실시예 3에 기술된 바와 같은 본 발명의 방법 (패널 C&D)에 따라 단리된 무린 골수 유래 중간엽 줄기 세포로부터 유래된 미세세포의 전자 현미경 사진을 보여준다.

[0323] 도 5 내지 7은 초원심분리 단리와 비교하여 본 발명의 방법에 의해 단리된 미세세포 간의 차이를 예시한다. 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포는 보다 매끄럽고 주름이 없으며 보다 "온전한(intact)" 것으로 보이는 경계를 갖는다.

[0324] 도 8은 본 발명의 방법에 따라 인간 혈장으로부터 단리된 미세세포의 전자 현미경 사진을 보여준다. PEG 단리로 달성된 형태 및 크기의 불균일성은 모든 유형의 미세세포가 단리되었음을 시사한다. 본 발명의 방법에 따라 단리된 돼지 혈장 (도 9) 및 인간 뇨 (도 10)로부터의 미세세포에서 유사한 불균일성이 관찰되었다.

[0325] 미세세포의 샘플에서 단백질 발현을 분석하기 위해, 세포 및 미세세포를 RIPA 완충액 (Cell signaling technology, Danvers, MA)에 용해시키고 단백질을 마이크로BSA 분석 키트 (Pierce, Rockford, IL)에 의해 추정하였다. 대략 20 마이크로그램의 용해물을 각각의 레인에 부하하고 막을 토끼 항-63 항체 (SBI Biosciences, Mountain View, CA), 토끼 항-hsp70 (SBI Biosciences), 토끼 STAT3 (Cell signaling

technology), 및/또는 토끼 포스포-STAT3 (Cell signaling technology)에 의해 밤새 프로브하였다 (1:1000).

[0326] 엑소솜 마커 (HSP 70 및 CD63)의 존재는 본 발명의 방법이 엑소솜을 단리할 수 있음을 확인시켜 주었다. 추가로, 엑소솜은 또한 전사 인자 STAT3 및 활성화된 인산화 형태 포스포-STAT3을 함유하였다. 도 11을 참조한다.

[0327] **실시예 9: 섬유아세포 증식 및 이동에 대한 본 발명의 미세소포의 효과**

[0328] 본 발명의 미세소포가 상처 치유를 촉진 또는 향상시키는 능력을 연구하기 위해, 미세소포가 진피 섬유아세포의 증식을 자극하는 능력을 시험하였다. 정상 인간 성인 진피 섬유아세포는 Life Technology (Carlsbad, CA)로부터 입수하였다. 만성 상처 환자 섬유아세포 (압박성 족부 궤양 및 당뇨병성 족부 궤양)는 표준 치료 및 고급 상처 관리 치료에도 불구하고 치유의 증거 없이 2년간 지속된 상처로부터 IRB 승인 프로토콜 (IND# BB IND 13201) 하에서 수집하였다. 정상 및 만성 상처 섬유아세포를 24 웰 조직 배양 플레이트 (BD Biosciences, San Jose, CA) 상에 웰당 5×10^3 개 세포로 플레이팅하였다. 0일째 및 3일째에 MTT 세포 증식 분석을 수행하였다. 0일째에 미세소포를 첨가하였다. PEG 분리된 미세소포 및 초원심분리 단리된 미세소포 둘 다는 3일 후 정상 및 만성 상처 섬유아세포 둘 다의 성장을 증가시키는데 대략 동등하였다. 미세소포가 고갈된 인산염 완충 염수 (PBS) 및 컨디셔닝된 MSC 배지는 거의 성장하지 않았다. 도 12를 참조한다.

[0329] 공동-배양 실험에서, 정상 성인 섬유아세포 및 당뇨병성 족부 궤양으로부터의 섬유아세포를 24개의 웰 플레이트에 시딩하였다. 각 웰을 100% 함유를 달성하도록 시딩하였다 (웰당 대략 1×10^5 개 세포). 세포 증식의 영향을 방지하기 위해, 스크래치 2시간 전에, 배지를 미토마이신을 $10 \mu\text{g/ml}$ 로 함유하는 신선한 무혈청 배양 배지로 대체하였다. 그 후, 함유된 단층을 1 ml 멸균 피펫 팁으로 스코어링하여 0.4-0.5 mm 폭의 스크래치를 남겼다. 그 후, 배양 배지를 (임의의 탈락된 세포와 함께) 즉시 제거하였다. 제거된 배지를 미세소포 (PEG 또는 초원심분리 유래)를 함유하는 신선한 배양 배지 (10% FBS), PBS, 또는 미세소포가 고갈된 MSC 컨디셔닝된 배지로 교체하였다. 스크래치 직후 및 처리한지 3일 후에 디지털화된 이미지를 수집함으로써 스크래치된 영역을 모니터링하였다. 디지털화된 이미지는 도립 IX81 Olympus 현미경 (Olympus America, Center Valley, PA, URL: olympusamerica.com) 및 ORCA-AG Hamamatsu 디지털 카메라 (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Shizuoka Pref., Japan, URL: hamamatsu.com)로 캡처하였다. 처리한지 3일 후, 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세소포가 가장 큰 이동 (본질적으로 상처가 봉합됨)을 보이고, 초원심분리기로부터 유래된 미세소포가 그 뒤를 이었다. 대조군 (PBS) 및 미세소포가 고갈된 MSC 컨디셔닝된 배지 (Depleted)는 거의 이동을 보이지 않았다. 도 13을 참조한다.

[0330] 도 14는 당뇨병성 족부 궤양으로부터 유래된 세포 이동 섬유아세포에 대한 미세소포의 효과를 보여준다. 도 13의 결과와 유사하게, 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세소포가 가장 큰 이동을 일으키고, 실시예 1에 기술된 초원심분리 방법을 사용하여 단리된 미세소포가 그 뒤를 이었다. 대조군 (PBS) 및 미세소포가 고갈된 MSC 컨디셔닝된 배지 (Depleted)는 거의 이동을 보이지 않았다.

[0331] **실시예 10: 세포 내로의 본 발명의 미세소포의 흡수**

[0332] 본 발명의 방법에 따라 컨디셔닝된 배지로부터 단리된 인간 MSC 미세소포를 제조사(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)의 지침에 따라 인지질 세포 링커 염료 PKH-26 (적색)으로 표지하였다. 정상 진피 섬유아세포를 제조사의 지침에 따라 Vybrant-Dio (Life technology)로 표지하였다. 정상 진피 섬유아세포를 퍼브로벡틴 (Sigma-Aldrich) 코팅된 4-웰 Nunc* Lab-Tek* II 챔버 슬라이드 (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL) (웰당 5×10^6 개 세포) 상에 플레이팅하였다. 세포를 제조사의 지침에 따라 핵 염료 Hoechst 33342 (Life technology)로 염색하였다. Dio 표지된 섬유아세포를 24시간 동안 PKH-26 표지된 미세소포로 처리하였다. 이미지를 도립 IX81 Olympus 현미경 및 ORCA-AG Hamamatsu 디지털 카메라로 캡처하였다. 정상 진피 섬유아세포 (녹색 지질 막 염료 Dio로 염색됨)는 핵 주위 위치에서 PEG 침전에 의해 단리된 PKH-26 표지된 인간 MSC MV의 흡수를 입증하였다. 도 15 및 16을 참조한다. 도 16에서, 핵 주위 위치에 미세소포가 보인다.

[0333] **실시예 11: 류마티스 관절염을 위한 진단제로서의 본 발명의 미세소포의 용도**

[0334] 정상 진피 섬유아세포를 6-웰 조직 배양 플레이트 (BD Biosciences)에 1×10^5 개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 섬유아세포를 밤새 혈청 결핍 (serum starved)시키고, PBS (대조군), 류마티스 관절염을 앓고 있는 환자로부터 수득된 혈장으로부터 본 발명의 방법에 따라 단리된 10 마이크로그램의 미세소포 (인간 혈장 MV PEG 침전); 골수 유래 중간엽 줄기 세포로 컨디셔닝된 배지로부터 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세소포 (인간 hMSC MV PEG 침전); 골수 유래 중간엽 줄기 세포로 컨디셔닝된 배지로부터 초원심분리에 따라 단리된 미세소포 (인간

hMSC MV 초원심분리); PBS 대조군; 및 고갈된 배지 대조군 (MV가 고갈된 hMSC 컨디셔닝된 배지)로 처리하였다. 섬유아세포에서 관찰된 STAT3 인산화의 양은 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포에서 더 많았다. 도 17을 참고한다.

[0335] 실시예 12: 전이성 흑색종을 위한 진단제로서의 본 발명의 미세세포의 용도

[0336] BRAF는 B-Raf로 불리는 단백질을 만드는 인간 유전자이다. 인간 암과 관련된 BRAF 유전자의 30개 이상의 돌연변이가 확인되었다. 본 발명자들은 전이성 흑색종과 연관된 BRAF의 돌연변이된 형태를 증폭시키도록 프라이머에 따라 설계하였다. 돌연변이는 BRAF에서 엑손 15의 T1799A 돌연변이이다. 이로 인해 코돈 600 (현재 V600E로 지칭됨)에서 발린 (V)이 글루타메이트 (E)로 대체된다. 이러한 돌연변이의 존재는 BRAF 억제제 베무라페닙 (Vemurafenib)에 의한 치료에 필요하다. ATCC (Washington DC, Maryland)로부터 입수된 SK-Mel28 세포주가 BRAF에서 엑손 15에 T1799A 돌연변이를 갖는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세세포는 EMEM (ATCC) + 10% 혈청 (Atlanta Biologics, Georgia, Atlanta)에서 3일간 배양함으로써 컨디셔닝된 배지로부터 획득되었다.

[0337] 단리된 미세세포를 Qiagen (Hilden, Germany) AUPrep DNA/RNA 키트를 사용하여 DNA 및 RNA 단리를 위해 가공하였다. SK-MEL28 세포 및 미세세포로부터의 대략 50 ng의 RNA를 iScript™ 역전사 SuperMix (BioRad, Hercules, CA)를 사용하여 역전사시켰다. 2 ml 분취량을 제조사의 지침에 따라 Platinum® PCR SuperMix (Life technology)를 이용하는 PCR에 사용하였다. 또한, SK-MEL28 세포 및 미세세포로부터의 80 ng의 DNA를 제조사의 지침에 따라 Platinum® PCR SuperMix를 이용하는 PCR에 사용하였다. PCR 산물을 3% 아가로스 겔에서 작동시키고 Bio-Rad의 gel-doc 시스템에 의해 시각화하였다. 결과는 도 18에 나타내어진다.

[0338] 사용된 프라이머는 다음과 같았다:

[0339] 서열 1:

[0340] 정방향: AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGA (서열 번호 1)

[0341] 역방향: CTGATGGGACCCACTCCATC (서열 번호 2)

[0342] 앰플리콘 길이: 70

[0343] 서열 2:

[0344] 정방향: GAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTG (서열 번호 3)

[0345] 역방향: CTGATGGGACCCACTCCATC (서열 번호 4)

[0346] 앰플리콘 길이: 82

[0347] 또한, 미세세포의 샘플을 RIPA 완충액에 용해시키고, 단백질 농도를 microBSA 분석 키트에 의해 추정하였다. 각각의 레인에 대략 50 마이크로그램을 부하하고 막을 마우스 항-BRAF V600E 항체 (NewEast Biosciences, PA, Malvern, PA)에 의해 밤새 (1:1000) 프로브하였다. 이차 항체, 염소 항-마우스 (Pierce)를 1시간 동안 1:10000 희석으로 적용하였다. 웨스턴 블롯은 SKMEL28 세포 및 MV 용해물에서 BRAF V600E 검출을 보여준다.

[0348] 실시예 13: 본 발명의 방법에 의한 GFP-표지된 골수 유래 중간엽 줄기 세포의 배양물을 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터의 미세세포의 단리

[0349] 인간 유비퀴틴 C 프로모터 (C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J)의 지시하에 강화된 녹색 형광 단백질 (GFP)을 발현하는 동종접합 형질전환 마우스를 Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine)로부터 입수하였다. 이 마우스는 모든 조직에서 GFP를 발현하는 것으로 알려져 있다.

[0350] GFP-마우스 (대략 3-4주령)를 CO₂ 질식에 의해 안락사시켰다. 다리를 엉덩이 위와 발목 관절 아래로 절단한다. 뒷다리를 수확하고 피부, 근육 및 모든 결합 조직을 제거하였다. 그 후, 뼈를 빙냉 멸균 IX PBS의 접시에 넣고 PBS에서 수 회 세척하였다. 각 뼈의 말단을 가위로 깎둑 잘라냈다. 가운데 배지 (20% 태아 소 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/글루타민이 보충된 α-MEM)를 갖는 10 cc 주사기를 골간(bone shaft)을 통해 밀어넣어 모든 골수를 150 mm 플레이트로 추출하였다. 모든 골수가 제거되도록 이를 수회 반복하였다. 세포 혼합물을 수회 피펫팅하여 세포를 분리하고 세포 현탁액을 세포 스트레이너 (70 μm 크기) (BD Biosciences, San Jose, CA)를 통해 통과시켜 큰 세포 덩어리 또는 뼈 입자를 제거하였다.

- [0351] 초기 배양물을 조직 배양물-처리된 접시 (BD Biosciences, San Jose, CA)에 $2-3 \times 10^5$ 개 세포/cm²로 시딩하고 95% 가습 공기 및 5% CO₂에서 37°C에서 세포 배양기에 두었다. 72-96시간 후, 비-접착성 세포를 제거하고, 배양 플라스크를 PBS로 1회 세정하고, 신선한 배지를 플라스크에 첨가하였다. 80% 함유에 도달할 때까지 세포를 성장시킨 다음 트립신-EDTA (Life Technologies, Carlsbad, CA)에 의해 계대배양하였다. 세포를 1:4 비로 나누었다.
- [0352] 대안적으로, 동결보존된 GFP 마우스-MSC를 37°C에서 해동하고 95% 가습 공기 및 5% CO₂에서 20% 태아 소 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/글루타민이 보충된 α -MEM에서 즉시 배양하였다. 이들을 상기와 유사하게 확장시켰다.
- [0353] 세포를 100% 함유에 도달할 때까지 (대략 1주) 플라스크에서 성장시켰다. 상청액을 50mL 원추형 원심분리관 (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL)으로 옮기고 즉시 4°C에서 10분 동안 400 x g에서 원심분리하여 임의의 비-부착성 세포를 펠렛화하였다. 상청액을 새로운 50 mL 원뿔형 원심분리관으로 옮기고 4°C에서 30분 동안 2000 x g에서 원심분리하여 세포 및 세포 잔해물을 추가로 제거하였다. 상청액을 수집하고 250 ml 멸균 폴리프로필렌 일회용 용기 (Corning, Corning, NY)에 넣었다. 상청액에, RNase 및 프로테아제 비함유 폴리에틸렌 글리콜 평균 분자량 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 8.5 w/v % 및 염화나트륨 (최종 농도 0.4 M)을 첨가하였다. 용액을 밤새 흔들면서 4°C의 냉방에 두었다. 용액을 50 mL 원추형 원심분리관으로 옮기고 4°C에서 30분 동안 10000 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 경사여과하고 미세세포 풍부화된 펠렛을 인산염 완충 염수 (PBS)에 재현탁시켰다. 미세세포 풍부화된 용액을 Amicon ultra-15 원심분리 필터 유닛 (공칭 분자량 한계 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA)으로 옮기고 5000 x g에서 30분 동안 원심분리하였다. 필터 유닛을 인산염 완충 염수로 세척하고 5000 x g에서 30분 동안 다시 원심분리하였다. 농축된 샘플을 필터 장치의 바닥으로부터 회수하였다 (대략 200-400 μ l). 단백질 농도는 마이크로 BSA 단백질 분석 키트 (Pierce, Rockford, IL)에 의해 결정하였고 풍부화된 미세세포 용액은 -70도에서 저장하거나 다운스트림 사용을 위해 가공하였다 (예를 들어, 단백질, RNA 및 DNA 추출).
- [0354] 미세세포의 세포 흡수를 결정하기 위해, 정상 인간 진피 섬유아세포를 제조사의 지침에 따라 Vybrant-Dio (Life technology)로 표지하였다. 정상 진피 섬유아세포를 피브로넥틴 (Sigma-Aldrich) 코팅된 4-웰 Nunc* Lab-Tek* II 챔버 슬라이드 (Thermo Fisher Scientific Inc., Weston, FL) (웰당 5 x 10개 세포) 상에 플레이팅하였다. 세포를 제조사의 지침에 따라 핵 염료 Hoechst 33342 (Life technology)로 염색하였다. Dil 표지된 섬유아세포를 24시간 동안 GFP 발현 마우스 MSC로부터 단리된 미세세포로 처리하였다. 이미지를 도립 IX81 Olympus 현미경 및 ORCA-AG Hamamatsu 디지털 카메라로 캡처하였다. 도 20 및 21을 참조한다. 중요하게, 이러한 이미지는 GFP를 함유하는 미세세포가 세포에 의해 흡수되었음을 보여준다.
- [0355] **실시예 14: 상처 치유를 촉진 또는 향상시키기 위한 치료법으로서의 본 발명의 미세세포의 용도**
- [0356] 10 mm 펀치 생검 기기를 사용하여 돼지의 등에 전층 상처를 생성하였다. 미세세포를 실시예 1에 기술된 방법 ("종래의 초원심분리 방법")에 따라 또는 실시예 3에 기술된 방법에 의해 자가 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배양 배지로부터 단리하였다. 30 마이크로그램의 미세세포를 상처가 생겼을 때 및 1일째와 2일째에 국소 주사로 상처에 투여하였다. 대조군은 염수로 처리하거나 공기 노출로 치유되게 하였다. 5일 후, 동물을 안락사시키고 상처를 검사하였다.
- [0357] 도 22는 상처가 생긴지 5일 후 상처의 조직학을 보여준다. 5일째에, 본 발명의 방법에 따라 (즉, 실시예 3에 기술된 방법에 따라) 단리된 미세세포로 처리된 상처는 염수 대조군, 공기 노출된 대조군 및 초원심분리에 의해 제조된 미세세포로 처리된 상처보다 작아 보였다. 초원심분리에 의해 제조된 미세세포로 처리된 상처는 본 발명의 방법에 따라 제조된 미세세포로 처리된 상처 및 두 대조군 모두에 비해 강화된 염증 반응을 나타냈다.
- [0358] 다른 연구에서, 100°C로 가열된 황동 막대를 사용하여 돼지의 등에 2도 화상 상처를 생성하였다. 미세세포를 실시예 1에 기술된 방법 ("종래의 초원심분리 방법")에 따라 또는 실시예 3에 기술된 방법에 의해 자가 골수 유래 중간엽 줄기 세포를 사용하여 컨디셔닝된 배지로부터 단리하였다. 30 마이크로그램의 미세세포를 상처가 생겼을 때 및 1일째와 2일째에 국소 주사로 상처에 투여하였다. 대조군은 염수로 처리하거나 공기 노출로 치유되게 하였다.
- [0359] 실험 과정 (화상 손상 후 28일까지)에 걸쳐, 초원심분리에 의해 제조된 미세세포로 처리된 상처는 본 발명의 방법에 따라 (즉, 실시예 3에 기술된 방법에 따라) 제조된 미세세포로 처리된 상처보다 훨씬 더 염증이 있었다.

도 23을 참조한다. 유사하게, 초원심분리에 의해 제조된 미세소포로 처리된 상처는 염수 대조군 및 공기 노출된 대조군보다 훨씬 더 염증이 있었다. 본 발명의 방법에 따라 제조된 미세소포로 처리된 화상 상처는 대조군보다 훨씬 더 염증이 있는 것으로 보이지 않았다.

[0360] 도 23은 초원심분리에 의해 제조된 미세소포로 처리된 상처, 본 발명의 방법에 따라 제조된 미세소포 및 공기 노출된 대조군 사이의 상처 후 7일째 염증의 차이를 예시한다. 현미경으로, 농양 형성은 초원심분리에 의해 제조된 미세소포로 처리된 화상 상처 및 전층 화상 상처 둘 다에서 보였다. 과학적 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 초원심분리에 의해 제조된 미세소포로 주지된 염증은 손상된 미세소포로 인한 것으로 생각되었으며, 이것은 염증 캐스케이드를 쉽게 자극할 수 있다. 본 발명의 미세소포는 또한 추가 입자를 포함함으로써 추가 혜택을 제공할 수 있다.

[0361] 도 24는 화상 손상 28일 후 본 발명의 방법에 의해 단리된 미세소포로 처리된 2도 돼지 화상 상처를 보여준다. 기질(ground substance)의 출현과 함께, 콜라겐이 상당히 재형성된다. 이러한 결과는 콜라겐 타입 III 형성에 의한 피부 재형성을 나타낸다. 또한 진피 표피 유도가 일어나 진피에 잘 고정된 것으로 보이는 비후화된 표피를 초래한다. 이러한 결과는 흉터 형성에서는 관찰되지 않으며 진피 재생과 더욱 일치한다. 흉터 위에 형성된 표피는 흉터가 있는 진피에 잘 고정될 수 없는 능력 때문에 재손상되기 쉽다.

[0362] 도 25는 화상 손상 28일 후 염수로 처리된 2도 돼지 화상 상처를 보여준다. 최소 피부 재생과 평평한 표피가 있다. 상당한 망상조직 융기부(retic ridge) 형성의 결여는 부적절하게 고정된 표피를 암시한다. 이러한 결과는 지속적인 손상의 위험이 있는 흉터 형성을 훨씬 더 잘 나타낸다.

[0363] 도 26은 손상 28일 후 본 발명의 방법에 따라 단리된 미세소포로 처리된 전층 돼지 상처를 보여준다. 재형성된 진피 안으로 신경(화살표로 표시됨)이 성장하며, 미세소포의 적용에 의해 자극된 것 같다. 성장한 신경은 혈관형성 반응을 동반한다(원형 영역). 신경은 발달된 구조로 보이며 단순한 축색 돌기 발아(axon sprouting)로 인한 것은 아니다. 이것은 유일무이한 발견이며 보고된 바 없으며, 대조군 상처 또는 초원심분리에 의해 제조된 미세소포로 처리된 상처에서도 관찰되지 않았다. 이러한 관찰은 표피, 기질, 혈관계 및 신경 조직을 포함한 모든 배엽으로부터 성숙한 요소를 생성할 수 있는 능력을 가진 복합 조직 재생을 잘 나타낸다. 이러한 방법은 외배엽, 내배엽 및 중배엽 유래 조직의 외상성, 염증성, 신생물성 및 퇴행성 장애를 포함하는 수많은 병태의 치료에 널리 적용 가능한 것으로 보인다.

[0364] 도 27은 손상 28일 후 본 발명의 방법에 의해 단리된 미세소포로 처리된 전층 돼지 상처를 보여준다. 당해 도면은 도 26에 묘사된 관찰을 더 큰 배율로 보여준다. A)에서 신경 성장은 혈관형성 반응과 관련된 경로를 뒤따르는 것으로 보인다. 이러한 결과는 신경 성장이 배아 발달에서 혈관형성에 뒤따르는 것으로 잘 알려져 있기 때문에 흥미롭다. 다시, 이러한 결과는 조직 재생을 나타낸다. B)는 보다 높은 배율에서 신경을 보여준다. C)는 신경 성장에 인접한 혈관형성을 보다 잘 예시한다.

[0365] 돼지 전층 상처 모델의 모든 처리 그룹(대조군 및 미세소포 처리군)에서 뼈 형성이 보였다. 도 28을 참조한다. 동물은 총 1.44 mg의 미세소포(반은 본 발명의 방법에 따라 제조되고 반은 초원심 분리에 의해 제조됨)를 제공받았다. 모든 상처에서 뼈의 형성을 자극하는 전신 효과가 있는 것으로 보였다. 뼈 형성은 더 많은 염증성 상처에서 더 많이 발생하는 경향이 있었으며 이것은 국소 염증 매개체의 상승 효과 및 미세소포의 전신 효과를 시사한다.

[0366] **실시예 15: 골수를 다시 채우고 복합 구조를 재생하기 위한 치료법으로서의 본 발명의 미세소포의 용도**

[0367] C57/CJ6 (GFP) 마우스에게 2회 사이클의 400 cGy 감마선 조사를 치명적으로 조사하여 숙주 골수 선구물질을 제거하였다. 조사 후, 마우스를 약 2cm 영역에 박피성 프락서널 에르븀: YAG 레이저로 처리하였다. 레이저 처리 후, 플라스틱 챔버를 피부에 부착시키고, 공통유전자 GFP⁺ 형질전환 마우스로부터 수득된 골수 유래 세포를 챔버에 첨가하였다. GFP⁺ 골수 세포는 갓 수확된 총 골수 세포, 계통 음성 선택된 골수 세포, 중간엽 줄기 세포 및 골수 완전 배양 세포(본 출원에 기술된 바와 같음)를 포함하였다. 몇 마리의 동물에서만 키메라 현상을 달성할 수 있었다: 세포 투여 4-6주 후에 순환 GFP⁺ 세포에 의해 검출됨. (도 29 참조.) 놀랍게도, 기증자 골수 생착(engraftment)의 증거 없이 많은 동물이 생존하였다. 세포를 제공받은 동물의 전체(주어진 세포의 모든 그룹에서) 30%가 생존하였다. 다른 그룹들 중에서, 계통 음성 선택된 세포(45%) 및 신선한 골수 세포(30%)를 제공받은 동물의 경우 생존율이 가장 높았다. 세포를 제공받지 않은 대조군 조사 동물은 100% 사망률을 나타냈다. 사이토카인은 유사하게 치명적으로 조사된 동물을 유사하게 구제하지 못했으며, 어떠한 기능적 기증자 골

수 생착도 이러한 생존한 동물에서 입증될 수 없었다. 전달된 세포에 의해 분비된 미세세포가 이러한 동물의 생존을 초래하는 숙주 골수의 회복을 담당할 가능성이 있다. 본 발명자들은 신선한 골수 (계통 음성 세포를 포함함)와 중간엽 줄기 세포가 이러한 효과를 달성할 수 있는 충분한 양의 미세세포를 생산한다는 것을 입증하였다. 또 다른 연구에서, C57/CJ6 (GFP⁻) 마우스에게 2회 사이클의 400 cGy 감마선 조사를 치명적으로 조사하여 이들의 털 성장을 억제하고 골수를 부분적으로 제거하였다. 조사 후, 마우스의 등을 면도한 다음 마우스를 대략 2cm 영역에 박피성 프락서닐 에르븀: YAG 레이저로 처리하였다. 레이저 처리 후, 플라스틱 챔버를 피부에 부착시키고, 공동유전자 GFP⁺ 형질전환 마우스로부터 수득된 골수 유래 세포를 챔버에 첨가하였다. GFP⁺ 골수 세포는 갓 수확된 골수 세포, 계통 음성 선택된 골수 세포, 중간엽 줄기 세포 및 골수 완전 배양 세포 (본 출원에 기술된 바와 같음)를 포함하였다. 어떤 동물에서도 키메라 현상을 달성할 수 없었다; 세포 투여 4-6주 후에 순환 GFP⁺ 세포에 의해 검출됨. 레이저 처리만을 제공받은 동물은 무성장 내지 매우 최소한의 짧고 뭉뚱한 털 성장을 나타냈다. 도 30 (a). 골수 세포를 제공받은 동물에서는 오래 지속되는 상당한 털 성장이 있었다. 도 30 (a & b). 이러한 결과는 GFP⁺ 계통 음성 선택된 세포 및 총 신선한 GFP⁺ 골수 세포로 처리된 마우스에서 가장 극적이었다. 털 성장은 2주 안에 검출될 수 있었고 몇 달 동안 계속 자랐다. 새로운 털 성장 영역에서 피부 생검을 수행하였으나 GFP⁺ 세포는 검출되지 않았다. 골수 세포의 기능적 생착 또한 FACS 분석에 의해 어떤 동물에서도 검출할 수 없었다. 도 30 (c). 도 29의 예에서와 같이, 사이토카인은 털 성장을 회복시키는데 이러한 효과를 갖는 것으로 입증되지 않았다. 전달된 세포에 의해 분비된 미세세포가 털 성장의 자극을 담당할 가능성이 있다.

[0368] **실시예 16: 혈관형성을 촉진 또는 자극하고 섬유아세포 증식을 촉진 또는 자극하기 위한 본 발명의 미세세포의 용도**

[0369] 골수 흡입물 미세세포의 단리: 대략 25 ml의 신선한 전체 골수를 AllCells, Inc. (Alameda, CA)로부터 입수하였다. 골수를 새로운 50 ml 원추형 원심분리관에 조심스럽게 넣고 실온에서 30분 동안 400 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 조심스럽게 제거하고 (대략 15ml) 새로운 50ml 원추형 원심분리관 (Thermo Fisher Scientific Inc., FL, Weston)에 넣고 4°C에서 30분 동안 2000 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 다시 조심스럽게 제거하고 멸균 알파-최소 필수 배지 (α-MEM) (Mediatech Inc., Manassas, VA)가 1:10 (골수 상청액 대 배지) 비로 첨가된 새로운 50ml 원추형 원심분리관에 넣었다. 용액에, RNase 및 프로테아제 비함유 폴리에틸렌 글리콜 평균 분자량 6000 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) 8.5 w/v % 및 염화나트륨 (최종 농도 0.4 M)을 첨가하였다. 용액을 밤새 흔들면서 4°C의 냉방에 두었다. 용액을 4°C에서 30분 동안 10000 x g에서 원심분리하였다. 상청액을 경사여과하고 미세세포 풍부화된 펠렛을 인산염 완충 염수 (PBS)에 재현탁시켰다. 미세세포 풍부화된 용액을 Amicon ultra-15 원심분리 필터 유닛 (공칭 분자량 한계 100 kDa) (Millipore, Billerica, MA)으로 옮기고 5000 x g에서 30분 동안 원심분리하였다. 필터 유닛을 인산염 완충 염수로 세척하고 5000 x g에서 30분 동안 다시 원심분리하였다. 농축된 샘플을 필터 장치의 바닥으로부터 회수하였다 (대략 200-400 μl).

[0370] 혈관형성 분석: 혈관형성은 내피 관 형성 분석 (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY)을 사용하여 측정하였다. 동결보존된 일차 인간 제대 정맥 내피 세포 (HUVEC) (Invitrogen Life Technologies)를 2% 저혈청 성장 보충제 (Invitrogen Life Technologies)가 보충된 배지 200PRF에서 6일 동안 75-cm 조직-배양 플라스크에서 성장시켰다. 그 후 세포를 보충제없이 배지를 함유하는 24 웰 조직 배양 플레이트에서 3 x 10⁴개의 밀도로 플레이팅하였다. 이어서, HUVEC 세포를 골수 미세세포 (약 100 μg)로 처리하였다. PBS를 비히클 대조군으로서 사용하였다. 처리된 세포를 37°C 및 5% CO₂에서 6시간 동안 배양하였다. 2 μg/ml 농도의 칼세인 AM 형광 염료를 관 형성의 시각화를 위해 사용하였다. 형광 이미지를 도립 IX81 올림푸스 현미경 (Olympus America, Center Valley, PA)으로 캡처하였다. 골수 MV는 비히클 (PBS) 대조군과 비교하여 유의적인 관 형성 능력을 보였다 (도 31 참조).

[0371] 성장 분석: 정상 성인 섬유아세포를 분석을 위해 성장 배지 (5% FBS, 1% 글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신)에서 24-웰 플레이트 (10000개 세포/웰) 상에 플레이팅하였다. 밤새 배양한 후, 3개의 웰을 무작위로 선택하고 세포를 NucBlue Live ReadyProbes 시약 (Invitrogen Life technologies)으로 염색하였다 (0일째). EVOS FL 자동 세포 이미징 시스템 (Invitrogen Life technologies)을 사용하여 형광 이미지를 캡처하였다. 섬유아세포에 골수 유래 미세세포 (약 100 μg) 또는 PBS (비히클 대조군)를 함유하는 신선한 배지를 제공급하고 3일 후 (3일째), 세포를 염색하고 이미지화하였다. 골수 유래 미세세포 처리된 섬유아세포는 비히클 대조군보다 상당히 큰 비율로 (0일째에 비해) 대략 3배 수로 증가하였다 (도 32, 패널 a 및 도 32,

패널 b).

[0372] **실시예 17: 표적 세포에의 생활성 물질의 EV-매개된 전달**

[0373] 본 발명의 특정 예시적인 실시양태에 따르면, 본원에 기술된 EV는 하나 이상의 생물활성제 (예를 들어, 콜라겐 VII 단백질 또는 펩티드, 콜라겐 VII mRNA, STAT3-신호전달 활성화제, 정준 Wnt 활성화제 등)를 표적 세포에 전달하는데 유용하다. 당해 실시예에는 야생형 섬유아세포와 비교하여 COL7A1 발현이 결핍된 RDEB 섬유아세포에의 EV의 전달을 입증한다. EV는 RDEB 섬유아세포에서 콜라겐 VII 발현을 자극하였다. EV는 또한 RDEB 섬유아세포에서 상처 치유와 관련된 마커의 발현을 자극하였다.

[0374] 도 44는 RDEB (Hallopeau-Siemens 타입)를 갖는 것으로 진단된 유아로부터 유래된 시험관내 세포주의 검증을 보여준다. BM-MSC와 RDEB 섬유아세포 사이에 세포 교환이 관찰되었다 (도 45). 콜라겐 VII는 BM-MSC EV와 공동-단리되었고 (도 46), COL7A1 mRNA는 MB-MSC EV가 풍부하였다 (도 47).

[0375] RDEB 섬유아세포를 1일째에 BM-MSC EV로 처리하고, 3일째에 세척하였으며, 6일째에 콜라겐 VII 발현의 증가를 보였다 (도 48). 화학선택적 결합 분석 ("click iT" 반응 화학을 이용함)은 BM-MSC EV로의 공동-처리 후 RDEB 섬유아세포로부터 새로운 콜라겐 VII를 생성하는 것으로 나타났다 (도 49). BM-MSC EV는 RDEB 섬유아세포의 상처 치유 (예를 들어, 증식 및 트립신-내성)와 관련된 시험관내 대리 분석을 증가시키는 것으로 나타났다 (도 50).

[0376] 임상 시험에서 화상 환자에게 염수로 전달된 BM-MSC는 수 시간 (4시간이 도시됨) 내에 염수에서 다수의 EV (CD63 양성)를 분비하는 것으로 나타났다 (도 51).

[0377] BM-MSC-매개 상처 치유 모델이 도 52에 제시되어 있다.

[0378] **실시예 18: 열성 이영양성 수포성 표피박리증의 치료에 있어서의 골수 증배엽 줄기 세포 유래 세포의 소포**

[0379] 동종 골수 유래 증배엽 줄기 세포 (BM-MSC)의 국소 및 정맥내 주사는 열성 이영양성 수포성 표피박리증 (RDEB)에서 상처 치유를 촉진하는 것으로 나타났다. 본 발명자들은 BM-MSC로부터 유래된 세포의 소포 (EV)(BM-MSC EV)가 BM-MSC에 기인한 치유 효과를 주로 담당하는 것으로 설명하였다. 본 발명자들은 또한 EV가 콜라겐 VII (Col VII)를 RDEB 세포로 이동시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 건강한 동종 기증자의 BM-MSC EV가 RDEB 환자의 상처에 국소적으로 적용되어 상처 치유를 향상시키면서 환자의 안전과 편안함을 극대화하는 최초의 임상 시험을 제안한다. EV로 치료하는 것은 유전 불안정 및 악성 형질전환의 위험이 훨씬 낮은 것을 포함하여 세포 요법을 능가하는 많은 이점을 갖는다. 본 발명자들은 30명의 RDEB 환자에서 국소적으로 적용된 동종 BM-MSC 유래 EV의 개방-표지 용량-증가 I상 연구를 위해 FDA 시험용 신약 (IND) 승인을 확보하고 임상 등급 BM-MSC EV를 제조할 것이다.

[0380] 구체적인 목표

[0381] 목표 1 - RDEB 환자에서 국소 적용된 BM-MSCEV의 I상 용량 증가 시험에 대해 FDA로부터 IND 승인 획득 및 최적의 임상 등급 BM-MSC-EV 제조

[0382] 본 발명자들은 I상 임상 시험에 사용하기 위해 기증자 BM-MSC EV 스크리닝, 선택 및 기능적 특성에 대한 특정 기준을 적용할 것이다. 이것은 이들이 특이적으로 RDEB와 관련되기 때문에 IND을 위한 EV 제조 및 생성물 특성의 세부사항 정의를 포함한다. 본 발명자들은 우리의 줄기 세포 기반 임상 시험에서 중요한 것으로 밝혀진 분석을 사용하고 수용자 RDEB 세포의 기능적 성능에 기초하여 BM-MSC EV에 대한 기증자를 평가할 것이다. 본 발명자들은 최적의 BM-MSC 기증자를 선정하고 우리의 시험에서 RDEB 환자의 치료에 사용될 BM-MSC EV를 제조할 것이다.

[0383] 목표 2 - 30명의 RDEB 환자에서 상처의 치료에 있어서 국소 동종 BM-MSC 유래 EV의 개방-표지 용량-증가 임상 시험 실시

[0384] 투여는 화상 환자에게 국소 적용된 BM-MSC의 PI 성공적 임상 시험을 기반으로 할 것이다. 각 그룹을 완성하기 위해 10명의 환자를 갖는 3개의 연속적으로 증가하는 투여 그룹이 있을 것이다. 투여 스케줄은 치료 0일째에 처음 이루어지고 매달 3회 추가 용량이 제공될 것이다 (3개월에 걸쳐 총 4회 치료). 일차 결과는 국소 적용된 BM-MSC EV의 안전성과 내약성을 평가할 것이고; 이차 결과는 상처 치유, 통증, 가려움증 및 미용술 (색소, 흉터 평가 및 조직 재생 증거를 포함함)을 평가할 것이다. Integrium 임상 시험 수탁 기관이 임상 시험을 도울 것이다.

- [0385] 연구 전략
- [0386] 목표 1 - RDEB 환자의 상처를 치료하기 위한 I상 임상 시험을 위한 국소 BM-MSC 유래 세포의 소포 (EV)의 사용에 대해 FDA로부터 IND 승인을 얻는다.
- [0387] 화상 및 저항성 만성 비치유성 상처에 골수 유래 줄기 및 선조 세포의 직접 적용은 상처 봉합 및 피부 재건을 초래한다. (지속기간이 1년 이상인) 만성 상처 환자는 골수 줄기 및 선조 세포로 치료되었다. MSC는 환자에게 제공된 세포의 대략 30%를 나타내었다. 모든 치료된 환자에서 치유의 증거가 관찰되었으며, 많은 환자들이 상처의 완전 봉합을 달성하였다. 일부 대상체들은 7년 이상 치유된 상태로 유지되었다 (결국 추적 검사에 실패함). 임상 결과 중에서 피부 재건이 주지되었고 상처 치유에 있어서 흉터가 없음이 임상적 및 조직학적 둘 다에서 주지되었다. 임상적으로, 치유된 상처의 봉합시 위축/함몰이 거의 없이 상처 층이 올라온다 (도 33). 조직학적 증거가 치료된 상처에서 피부 재건을 뒷받침한다.
- [0388] 현미경 관찰 결과는 증가된 콜라겐 형성 및 기질 침착을 포함하였다. 가장 놀라운 관찰 중에는 레티쿨린 및 탄성 섬유와 같은 구조의 복원이 있었다 (도 34). 이러한 섬유는 특징적으로 복잡하지 않은 급성 및 만성 상처의 치유시에도 상실된다. 전반적으로, 이러한 결과는 부작용없이, 치유되지 않은 상처에서 치유를 유도하고, 조직 용적 부족을 복원하며, 조직 재생을 자극하고, 국소적으로 적용된 골수 유래 줄기 세포를 사용하여 흉터를 크게 감소시키는 능력을 지지한다.
- [0389] 화상 상처에 국소적으로 적용된 동종 BM-MSC는 빠른 상피화, 흉터 감소, 색소의 회복 및 모낭의 재생의 증거를 보여주었다. 관련된 심각한 부작용이나 거부의 증거는 관찰되지 않았다. 조직 재생과 일치하는 여포 재생 (도 35)이 화상 상처에 BM-MSC를 국소 적용한 후에 주지되었다. 그러나, 모낭의 재생은 화상 손상의 비-처리 영역에서 관찰되지 않았다. 조직 재생을 나타내는 극적인 색소 재침착 (도 36)이 또한 관찰되었다.
- [0390] 이러한 상처는 전형적으로 오랜 (종종 영구적인) 기간의 화상 후 백반증을 겪기 때문에 환자에서 주지된 빠른 색소 재침착은 임의의 다른 치료 수단에서는 전례가 없는 것이다. 화상 피부의 탄력 회복 또한 놀라운 발견이었다 (도 37). 이러한 결과에 관해 특히 주목할 만한 것은 이들이 BM-MSC를 단지 단기간 국소 적용한 후에 발생한다는 것이다. 특히 이 기간 내에, 이러한 투여 수단에 의해 세포가 오래 생존하고/하거나 생착될 것 같지는 않다. 이것은 전달된 세포가 복잡한 메시지를 신속하게 전달하여 강력한 재생 및 치유 효과를 야기할 수 있음을 강력하게 나타낸다. 나이키드 사이토카인, 핵산 및 전사 인자는 화상 상처 환경에서 오래 생존하지 못하고 단일 인자가 이러한 복잡한 반응을 생성할 수 있는 것도 실현 가능하지 않다.
- [0391] 과학적 이론에 구속시키고자 함이 없이, 막 결합 EV가 이러한 임상 반응을 생성할 수 있다는 가설을 세웠다. 세포를 환자에게 전달하는 염수 비히클을 실험하면서 (세포 제거 후) 본 발명자들은 1.6×10^{11} EV 입자/mL 이상이 존재한다는 것을 발견하였으며, 환자에게 상당한 수의 EV를 전달하고 있음을 확인하였다. 환자에게 투여된 샘플 내의 EV는 온전하며 특징적인 EV 마커를 갖는다. 최근, 본 발명자들은 EV가 정상 및 만성 상처 섬유아세포 증식 및 이동을 자극하고 STAT3-매개된 표적 유전자의 활성화를 통해 혈관형성을 향상시킨다고 발표하였다 (Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, Salgado M, Van Badiavas E. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. Stem Cells Dev 2015;24:1635-47). 본 발명자들의 전임상 연구는 또한 상처 치유 및 조직 재생의 BM-MSC EV 자극을 강력하게 뒷받침한다 (도 38 및 39). 본 발명자들의 전임상 연구에서 신경 성장과 같은 조직 재생의 증거는 다른 수단으로는 실현되지 않았다. 특히, 본 발명자들의 전임상 연구는 다른 EV 단리방법은 소포를 손상시켜 바람직하지 않은 염증 반응의 생성을 초래한다는 것을 입증하였다. 본 발명자들의 신규한 방법은 EV를 손상시키지 않으며, 염증 반응의 생성 없이 빠른 치유를 유도하는 것으로 나타났다 (도 40). 예비 데이터에서는 이러한 소포가 전-치유 인자(pro-healing factor)를 전달하는 것 외에도 Col VII 단백질 및 기능적 COL7A1 mRNA를 RDEB 섬유아세포로 수송할 수 있는 것으로 나타났다 (도 41 및 42).
- [0392] 화학선택적 결합 반응 (Click iT® ThermoFisher)과 조합하여 Col VII 단백질을 포획하는 분석에서, 본 발명자들은 RDEB 섬유아세포가 실제로 (10 µg/mL 용량의) BM-MSC EV에 의해 유도되어 새로운 Col VII 단백질을 만든다는 것을 발견하였다 (도 42). BM-MSC EV는 RDEB 증식 및 트립신 소화에 대한 내성 둘 다를 상당히 향상시킨다 (도 43). 이들은 RDEB 전피 섬유아세포의 기능 획득 및 전-상처 치유 가능성을 평가하기 위해 사용되는 표준 분석이다. 이러한 데이터는 BM-MSC EV가 상처 치유를 개선할 수 있는 잠재력에 더하여 RDEB에 대해 이점을 갖는다는 증거를 제공한다. 임상 시험에 대한 IND 승인을 얻기 위해, PI가 이전 시험에서 성공적으로 협력한 계약된 GMP 제조 시설 내에 제조를 확립할 것이다. 일반적인 제조 요건을 충족하는 것 외에도, 본 발명자들은 RDEB

의 치료와 특별히 관련된 문제를 해결할 것이다. 본 발명자들은 EV의 잠재적인 재생전 활성을 최적화하기 위해 기증자 스크리닝 및 선정 기준을 확립할 것이다. BM-MSC EV 생성물 특성이 정의될 것이다. 이러한 매개변수는 단백질 농도, EV 크기 분포 (예를 들어, NanoSight NS300 사용), 표면 마커 특성화, 제조 동안 사용된 시약의 제거, 및 제품의 안정성 검사를 포함한다. 질량 분석 및 RNA 시퀀싱을 사용하여, 본 발명자들은 화물을 기능 분석 성능과 상관시키는 몇몇 BM-MSC EV 기증자의 단백질 및 RNA 카고 함량을 정의할 것이다. BM-MSC EV 기능적 활성은 RDEB 섬유아세포 증식 및 트립신 내성 분석을 포함하여 상처 치유 및 표현형의 반전에 대한 효능을 확립하기 위한 시험관내 연구를 포함하여 수용자 RDEB 세포에 대해 정의될 것이다. 추가로, 내피 혈관형성 검정은 시험관내에서 검사될 것이다.

[0393] 목표 2 - 30명의 RDEB 환자에서 상처의 치료에 있어서 국소 동종 BM-MSC 유래 EV의 개방-표지 용량-증가 임상 시험 실시

[0394] 접근법:

[0395] 임상 시험은 3개의 증량 치료 용량 그룹 (용량 수준당 10명의 환자)을 대상으로 하는 개방-표지 파일럿 연구이다. 연구자들은 치료를 위해 5 내지 50 cm²의 표적 병변을 확인할 것이다. 염수 중의 EV는 2차 표준 치료 상처 드레싱이 그 위에 놓여있는 1차 층으로서 얇은 실리콘 시트 드레싱 아래에 적용될 것이다. 대조군 상처는 실리콘 시트 아래에 염수로 치료될 것이다. 치료 빈도는 기준선, 4주, 8주 및 12주에 있을 것이다. 용량 수준은 PI의 화상 시험에서 투여된 수준으로부터 유도될 것이다. 치료군 및 대조군 상처의 디지털 이미지를 촬영할 것이다. 치료군 및 대조군 상처는 Silhouette® 장치를 사용하여 측정할 것이다.

[0396] 결과는 12주 동안 매월 평가될 것이다. 본 발명자들의 이전 경험을 감안할 때 본 발명자들은 치유시 50% 이상의 자극이 있을 것으로 예상된다. 임상적으로 그리고 실험실 변이의 관점에서, 본 발명자들은 합동 표준 편차를 20으로 가하였다. 여기서 이 범위의 차이를 조사하는 임상 연구에 대해 0.8의 통계적 검증력 (확률과 혼동하지 않아야 함)이 권장된다 (Breau RH, Carnat TA, Gaboury I. Inadequate statistical power of negative clinical trials in urological literature. The Journal of urology 2006;176:263-6; Ichihara K, Boyd JC. An appraisal of statistical procedures used in derivation of reference intervals. Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC 2010;48:1537-51). 실제로, 50%보다 큰 차이를 평가하려면 0.8보다 작은 통계적 검증력이 필요할 수 있다. 가능성 차이가 유의적이라고 불릴 확률이 α (I형 오류)로 표시되며 전형적으로 0.05의 임계 값을 가져야 하고, 이보다 낮으면 p 값이 유의한 것으로 간주된다. 실제 차이가 누락될 가능성 (II형 오류)은 β 로 명시된다. 현실적이라고 생각되는 이 값을 사용하여, 본 발명자들은 필요하게 될 다음 샘플 크기 (표 1)를 계산하였다. α 는 가능성 차이가 유의적이라고 불릴 확률을 가리킨다. 관습적으로, 임계 값은 0.05 (95% 신뢰 수준)이며, 이보다 낮으면 p 값이 유의한 것으로 간주된다. 표 1의 값은 양측 검정을 위한 것이다. 그룹당 10명 환자의 선택된 샘플 크기는 권장되는 0.8 내지 0.95를 훨씬 넘게 통계적 검증력을 증가시킬 때에도 아주 적당할 것이다. 이것은 본 발명자들이 필요로 하는 것보다 더 엄격하지만, 제안된 대상체의 수로 적절한 통계적 검증력을 갖도록 보장한다.

표 1					
검증력	β	환자의 수			
		$\alpha = 0.10$	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.02$	$\alpha = 0.01$
0.80	0.2	3	4	5	6
0.90	0.1	4	5	6	7
0.95	0.05	5	6	7	8

[0397]

[0398] 적격성 기준:

[0399] 주요 포함 기준은 다음을 포함한다: 스크리닝 시점에 12세 이상의 남성 및 여성 환자, 및 18세 미만인 경우 보호자가 동의한 경우; 임상 발표 및 조직학적 확인에 의해 정의된 바와 같이 RDEB 진단을 확인받음; 팔 및/또는 다리에 5 내지 50 cm²의 적어도 1개의 활성 상처를 가짐; 가입기 여성은 스크리닝시 음성 소변 또는 혈청 임신 검사를 받아야 하며 허용되는 형태의 산아 제한 (경구/임플란트/주사/경피 피임약, 자궁내 장치 또는 다른 형태의 산아 제한)을 사용하고 있어야 한다. 주요 배제 기준은 다음을 포함할 것이다: 감염의 임상적 증거; 어떤 이유론든 모든 종류의 동시 면역억제 요법.

[0400] 1차 결과 측정:

[0401] 다음의 1차 결과 측정이 평가될 것이다.

[0402] 1) 모든 부작용, 특히 치료와 관련이 있는 것으로 의심되는 모든 부작용에 대해 스크리닝 및 문서화함.

[0403] 2) 모든 보고된 관련 부작용의 특성화 및 분석.

[0404] 3) 자발적인 탈퇴 또는 치료 불내성으로 인해 중단된 참가자 평가.

[0405] 중요하게도, 본 출원에서, 본 발명자들은 상처 치유를 개선하고 가능하게는 RDEB 상처에 Col VII를 도입하기 위해 다중 용량으로 동종 BM-MSC로부터 유도된 EV의 사용을 제안하고 있다. EU 및 미국 임상 등록 기관은 BM-MSC 및 이들이 생성하는 파라크린 물질(EV 포함)을 사용하여 전 세계적으로 1,000건이 넘는 임상 시험을 열거하고 있으며 모든 연구의 대략 절반은 동종이계 공급원을 사용한다. 지금까지, 심각한 관련 부작용은 보고된 바 없다. 화상 환자에서 동종이계 BM-MSC를 사용한 본 발명자들의 시험에서, 본 발명자들은 충분한 양의 BM-MSC EV를 함유하는 것으로 알고 있는 전달된 물질에 대한 관련 부작용이나 면역 반응의 어떠한 증거도 검출하지 못했다. 본 발명자들의 연구에서 면역 반응의 분석은 혼합 림프구 반응에서 면역 반응의 미세한 준임상적 증거를 검출하는, FDA에 의해 승인된 민감한 ELISA 분석을 포함한다. 본 발명자들의 시험에서 다중 용량을 제공하였음에도 불구하고, 본 발명자들은 이러한 분석에서 어떠한 면역 반응도 검출하지 못했다. 그러나 BM-MSC는 이들이 생성하는 EV에 의해 매개되는 것으로 밝혀진 (Bruno S, Deregibus MC, Camussi G. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunology letters* 2015;168:154-8; Chen W, Huang Y, Han J, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. *Immunologic research* 2016;64:831-40; Li X, Liu L, Yang J, et al. Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation. *EBioMedicine* 2016;8:72-82) 면역 조절 특성을 갖는 것으로 알려져 있기 때문에 (Bartholomew A, Polchert D, Szilagyi E, Douglas GW, Kenyon N. Mesenchymal stem cells in the induction of transplantation tolerance. *Transplantation* 2009;87:S55-7; Siegel G, Schafer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2009;87:S45-9; Sundin M, Barrett AJ, Ringden O, et al. HSC T recipients have specific tolerance to MSC but not to the MSC donor. *J Immunother* 2009;32:755-64) 이것은 예상치 못한 것은 아니다. 본 발명자들은 우리 자신을 포함한 수많은 시험이 면역 반응 또는 거부의 증거없이 수년 동안 동종 중간엽 줄기 세포 기반 EV를 전달해왔음을 감안할 때 RDEB에 대한 EV 기반 치료법을 신중하게 추진하는 것이 정당하다고 믿는다. 본 발명자들은 물론 우리의 시험에서 잘 확립된 조치를 사용하여 면역 반응 또는 거부의 증거에 대해 환자를 면밀히 모니터링할 것이다. 본 발명자들이 최근에 BM-MSC EV가 Col VII를 전달하고 RDEB 세포가 Col VII를 생성하도록 유도할 수 있음을 발견함에 따라, 환자가 Col VII에 대한 항체를 개발할 가능성에 대한 의문이 제기되었다. 이것은 RDEB 환자에 대해 수행된 많은 임상 시험에서 우려되어 왔지만 Col VII 항체가 검출된 시험에서도 부작용을 입증하지는 못했다 (Petrof, *infra*). Col VII 단백질을 직접 투여하는 전임상 시험에서, Col VII에 대한 순환 항체가 검출된 경우에도, 질환의 악화, 물질형성 증가 및 피부에의 이들 항체의 결합이 관찰되지 않았다 (Riazifar, *infra*; Palazzi X, Marchal T, Chabanne L, Spadafora A, Magnol JP, Meneguzzi G. Inherited dystrophic epidermolysis bullosa in inbred dogs: A spontaneous animal model for somatic gene therapy. *J Invest Dermatol* 2000;115:135-7; South AP, Uitto J. Type VII Collagen Replacement Therapy in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa-How Much, How Often? *J Invest Dermatol* 2016;136:1079-81; Woodley DT, Cogan J, Wang X, et al. De novo anti-type VII collagen antibodies in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 2014;134:1138-40). RDEB 환자에서의 BM-MSC 시험은 또한 Col VII의 존재가 확립될 수 있고/있거나 항-콜라겐 항체가 검출될 수 있는 경우에도 질환의 악화, 물질형성 증가 또는 자가면역 유도의 증거를 입증하지 못했다 (El-Darouti M, Fawzy M, Amin I, et al. Treatment of dystrophic epidermolysis bullosa with bone marrow non-hematopoietic stem cells: a randomized controlled trial. *Dermatol Ther* 2016;29:96-100; Riazifar M, Pone EJ, Lotvall J, Zhao W. Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended Messages of Regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017;57:125-54; Petrof G, Lwin SM, Martinez-Queipo M, et al. Potential of Systemic Allogeneic Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Children with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* 2015;135:2319-21). RDEB 환자에서 Col VII의 화학적 (Woodley, *infra*) 및 골수 줄기 이식 (Wagner JE, Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, et al. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The New England journal of medicine* 2010;363:629-39) 유도된 발현 둘 다는 치료된 환자에서 유도된 항-Col VII 항체에 대한 어떠한 우려도 확립할 수 없었다. RDEB 환자의 절반 이상이 통상적으로 항체 생산을 담당하는 Col VII

의 주요 항원 부분을 발현하기 때문에 이것은 놀라운 일이 아니다 (Woodley DT, Cogan J, Hou Y, et al. Gentamicin induces functional type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. J Clin Invest 2017; Jones DA, Hunt SW, 3rd, Prisayanh PS, Briggaman RA, Gammon WR. Immunodominant autoepitopes of type VII collagen are short, paired peptide sequences within the fibronectin type III homology region of the noncollagenous (NC1) domain. J Invest Dermatol 1995;104:231-5; Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, et al. Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. J Clin Invest 1993;92:1831-9; Pfindner E, Uitto J, Fine JD. Epidermolysis bullosa carrier frequencies in the US population. J Invest Dermatol 2001;116:483-4).

[0406] 많은 RDEB 환자가 초점 역 모자이크 현상(focal reverse mosaicism) (온전한 Col VII를 함유하는 내구성있는 피부)을 겪는다는 발견은 또한 Col VII를 RDEB 환자에게 도입하는 것이 병원성 반응을 유발하지 않을 것이라는 강력한 증거를 제공한다. 그렇기는 하지만, Col VII 항체의 생산이 임상적으로 관련된 효과를 생성한다면, 후천성 수포성 표피박리증 (RDEB보다 훨씬 더 관리하기 쉬운 질환)의 형태와 더 유사할 것이다. 또한 본 발명자들이 줄기 세포가 아닌 EV 사용을 제안하고 있음을 지적할 필요가 있다. 줄기 세포는 생착 능력을 가지고 있으며 복구할 수 없다. EV는 독자 생존 가능하지 않고 지속될 수 없으며 복제되지 않는다. 따라서, 본 발명자들이 부작용 (항 Col VII 항체 역가 상승을 포함함)에 대한 증거 또는 의심을 검출한다면, 치료가 중단될 것이며 되돌릴 수 있다.

[0407] 2차 결과 측정:

[0408] 다음의 2차 결과 측정이 평가될 것이다:

[0409] 1) 체 표면적 지수 (BSAI) 변화에 기초한 물질/짓무름 감소.

[0410] 2) 표적 상처 크기 축소 또는 봉합. 상처 크기 감소는 EV 치료의 가능한 효능을 결정하기 위한 평가이다. 표적 상처는 정확하고 정밀하며 반복 가능한 상처 평가를 제공하는 비침습 레이저 기술을 사용하는 FDA-승인된 의료 기기 상처 이미징, 3D 측정 및 문서화 시스템인 Silhouette® (Aranz Medical)을 사용하여 측정될 것이다.

[0411] 3) 개별 징후의 의사 평가 - 이 척도는 물질과 짓무름, 삼출(oozing)/크로스팅(crusting)/진물(weeping), 소양증, 물질이 없는 주변 피부의 홍반 및 통증을 평가한다. 신체 부위는 머리/목, 상지, 몸통 및 하지를 포함할 것이다.

[0412] 4) 수포성 표피박리증 질환 활동성 및 흉터 지수 (EBDASI).

[0413] 5) VAS 통증 스코어 설문지 및 진통제 사용.

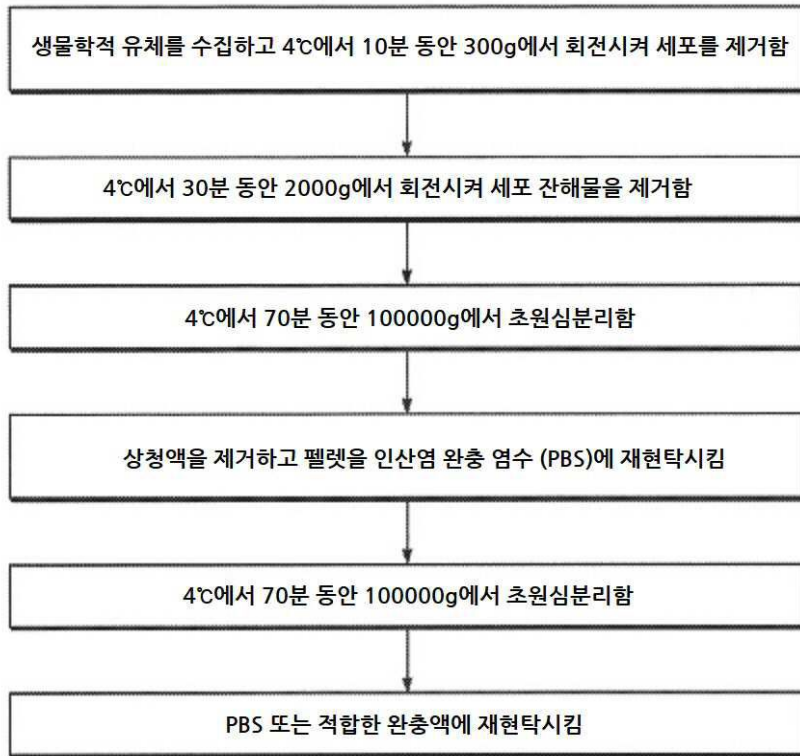
[0414] 6) ItchyQuant 척도 점수 (가려움을 평가를 위한 검증된 척도) (Haydek CG, Love E, Mollanazar NK, et al. Validation and Banding of the ItchyQuant: A Self-Report Itch Severity Scale. J. Invest. Dermatol. 2017;137:57-61.).

[0415] 7) 어린이 피부 삶의 질 지수 (CDLQI). 초기 시험 장소는 마이애미 대학 (세계적으로 유명한 소아 피부과 의사 Dr. Lawrence Schachner와 함께)이다. 이차 장소는 정해질 것이다.

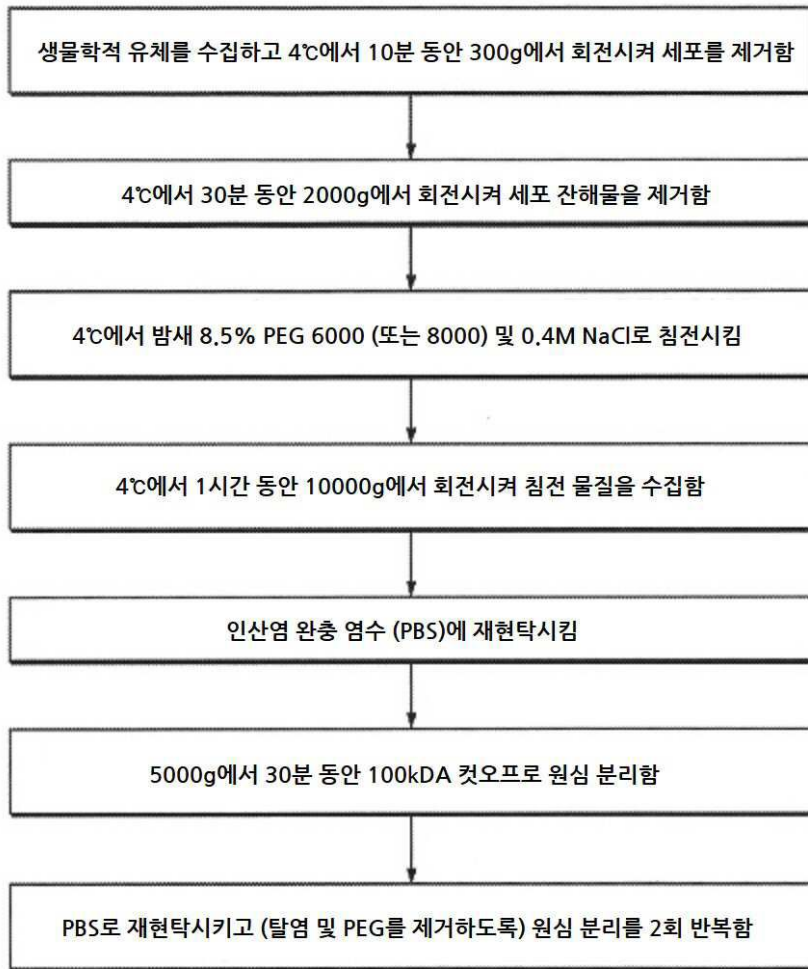
[0416] 본 발명의 다양한 측면이 실시예 및 바람직한 실시양태를 참조하여 위에 예시되었지만, 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허법의 원리하에 적절히 해석되는 다음의 청구 범위에 의해 정의됨을 인지할 것이다.

도면

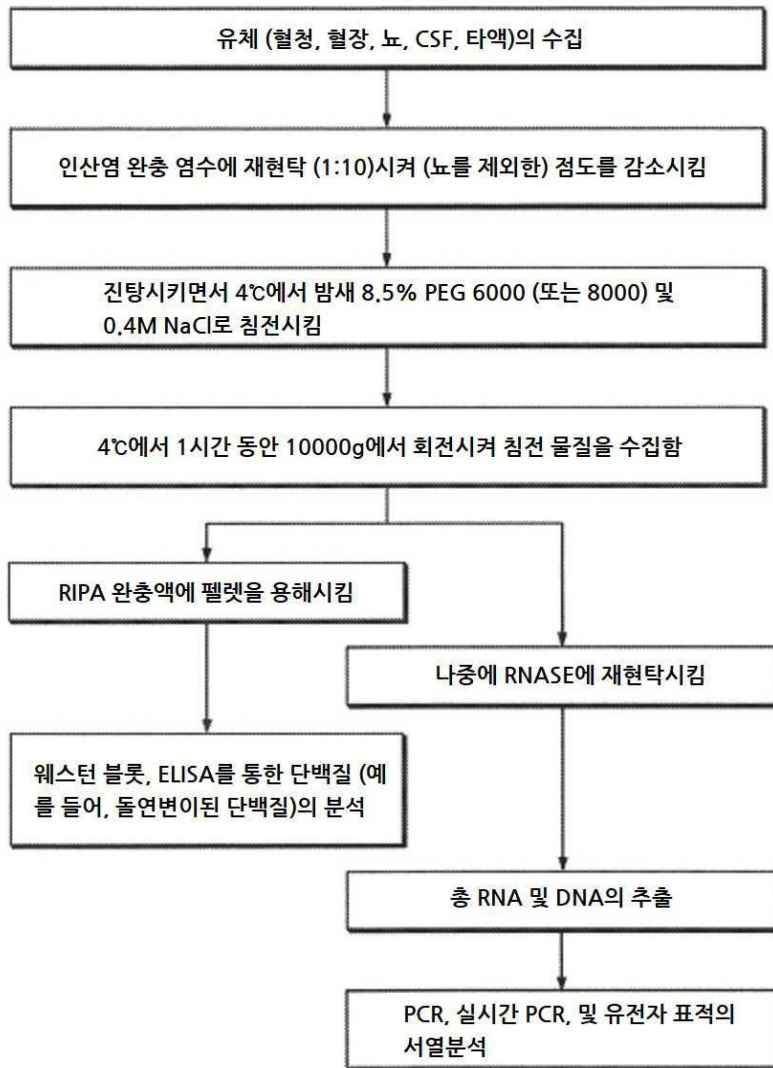
도면1



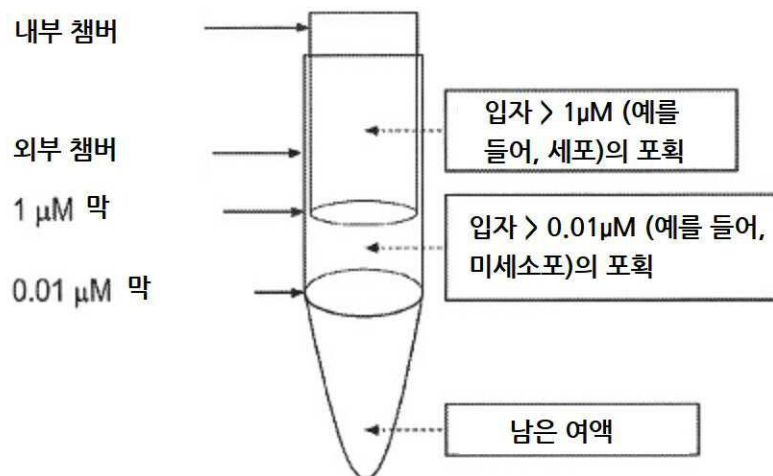
도면2



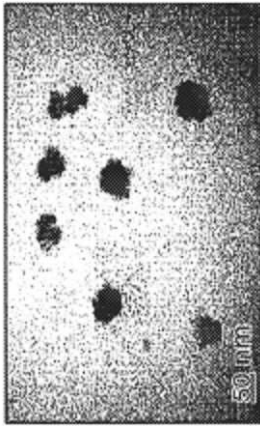
도면3



도면4



도면5



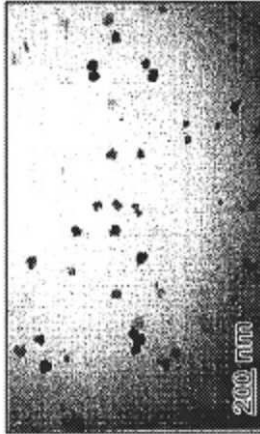
180000x

도 5B



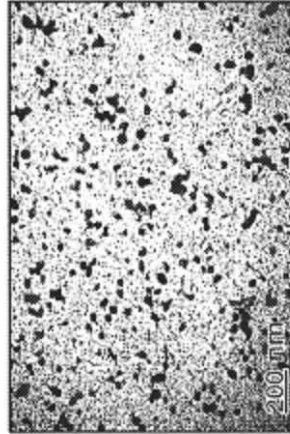
180000x

도 5D



64000x

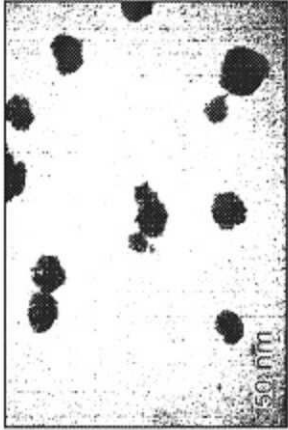
도 5A



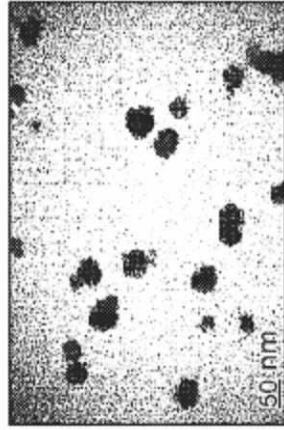
64000x

도 5C

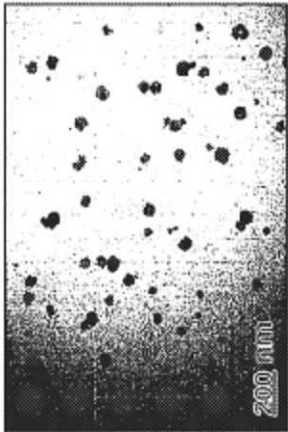
도면6



도 6B



도 6D

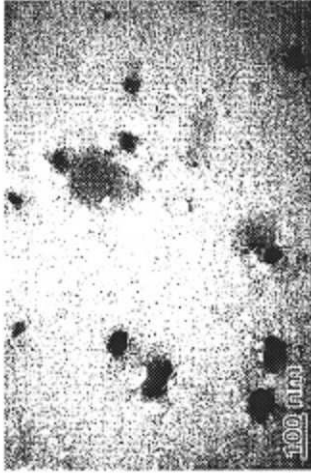


도 6A

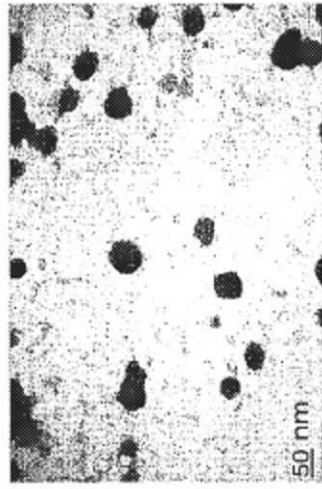


도 6C

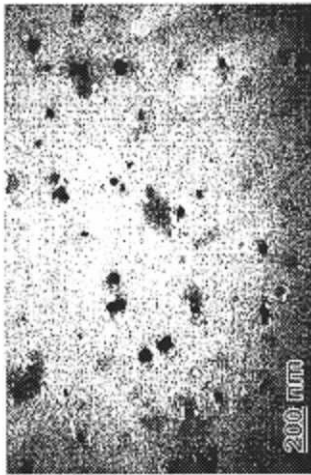
도면7



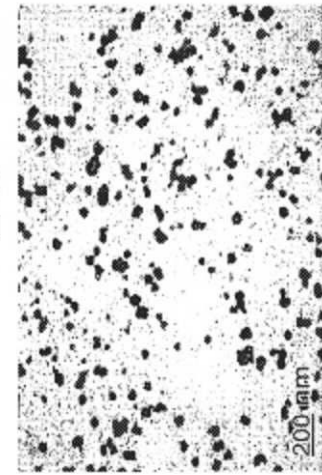
도 7B



도 7D

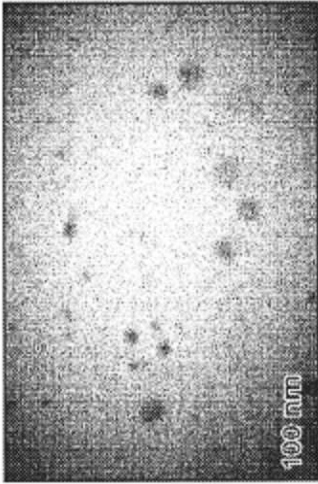


도 7A

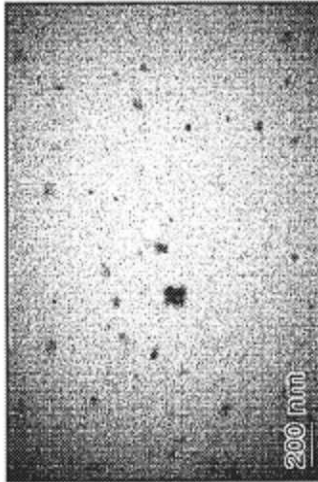


도 7C

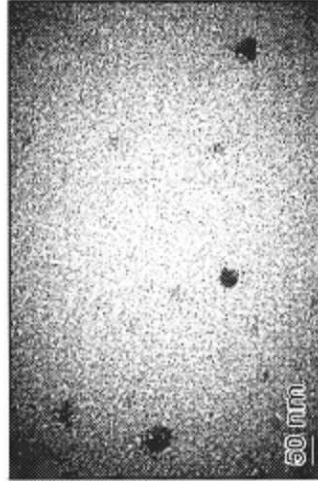
도면8



도 8B

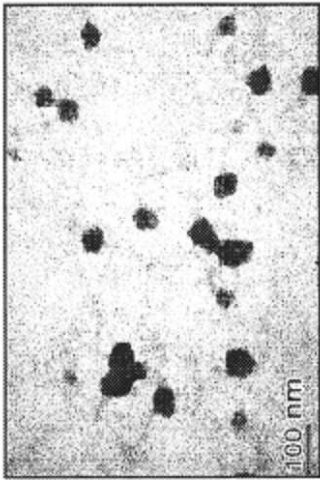


도 8A

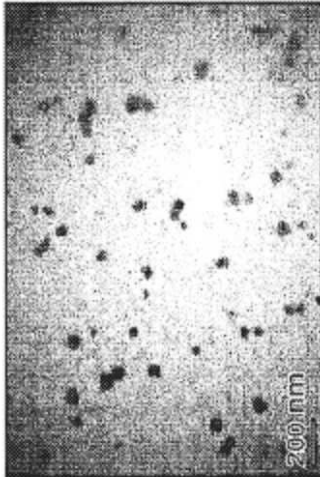


도 8C

도면9



도 9B

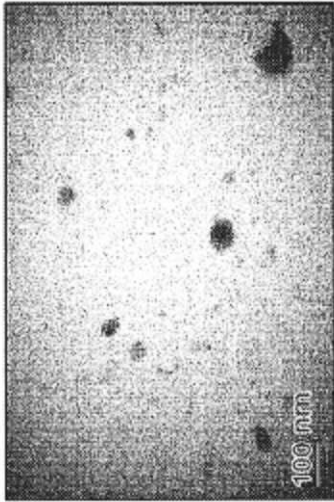


도 9A

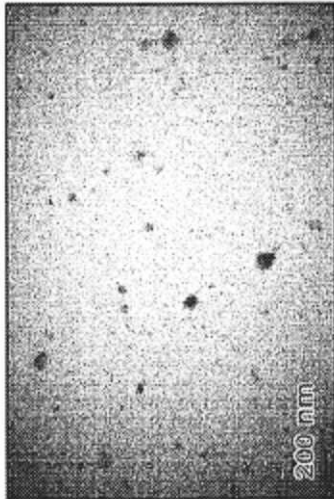


도 9C

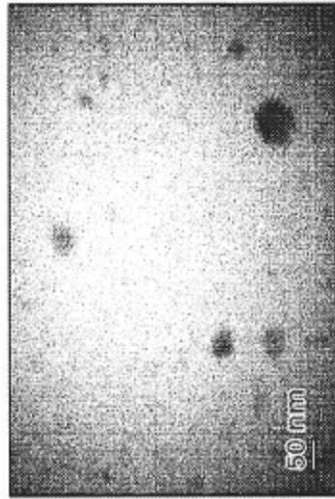
도면10



도 10B

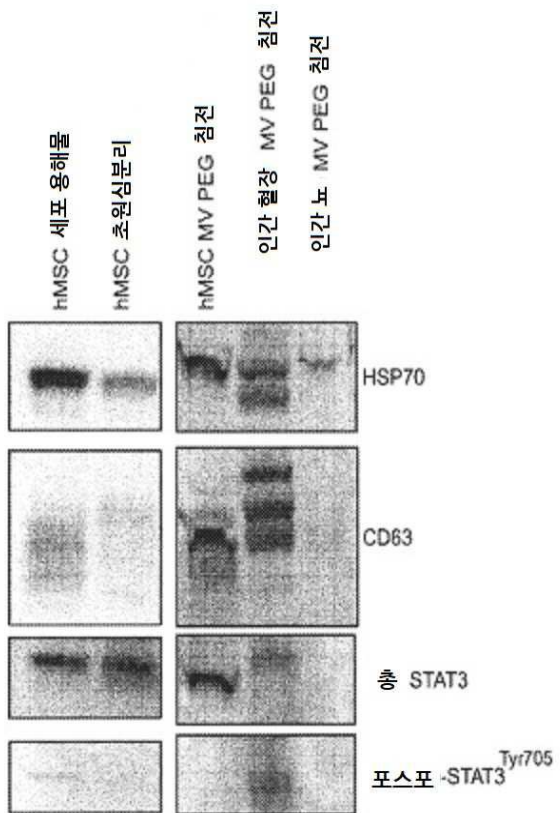


도 10A

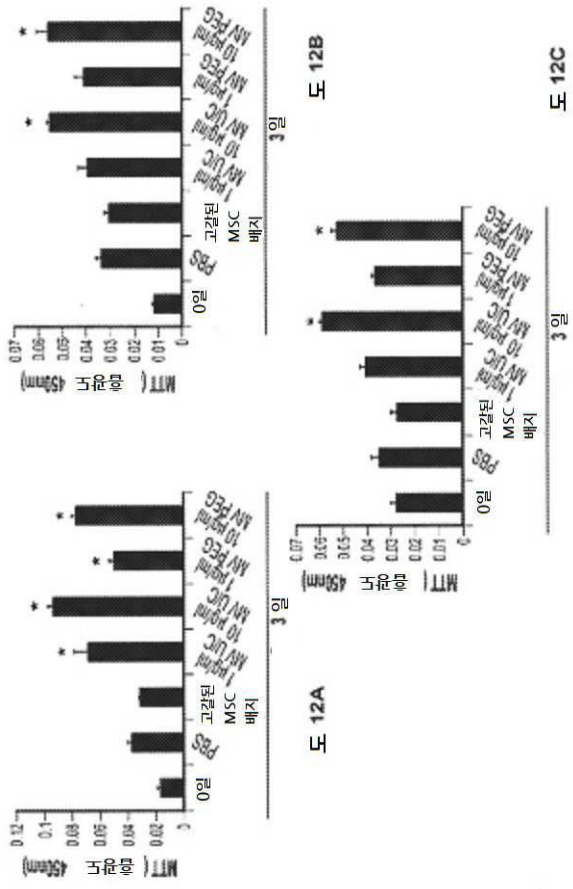


도 10C

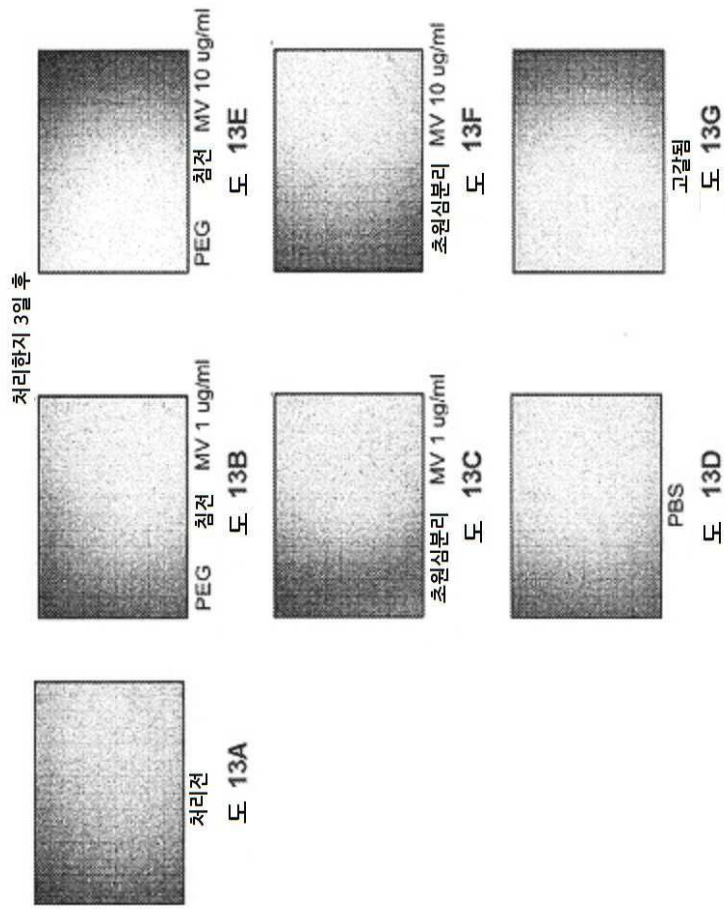
도면11



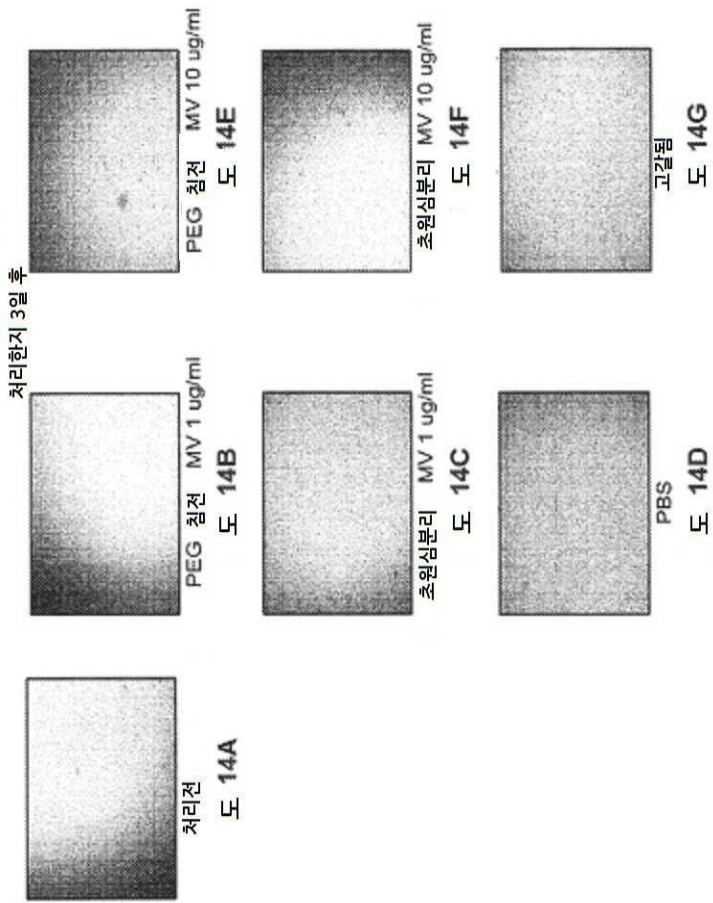
도면12



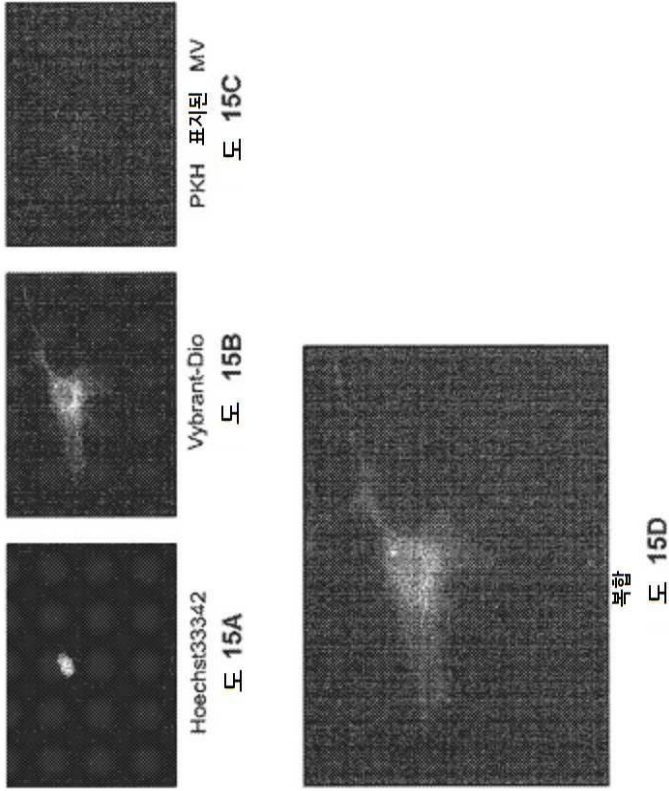
도면13



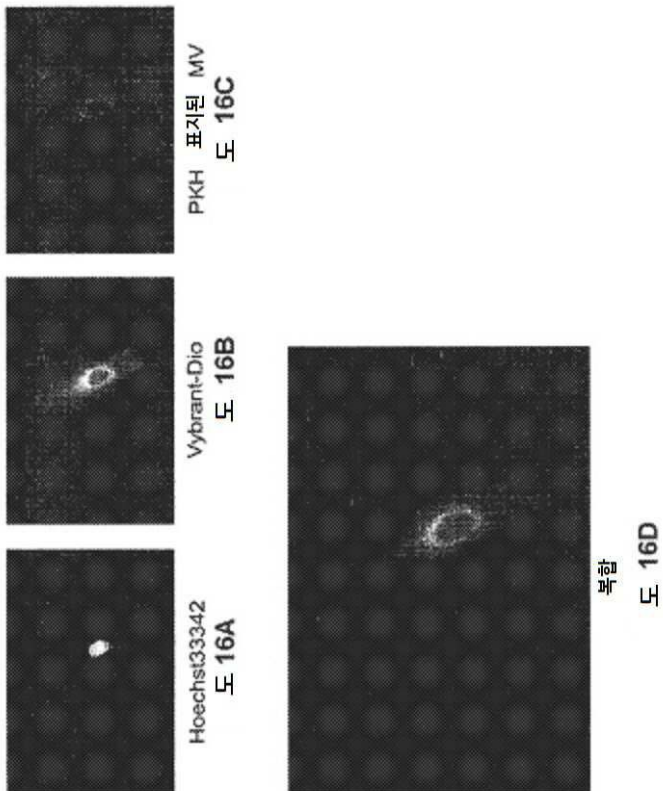
도면14



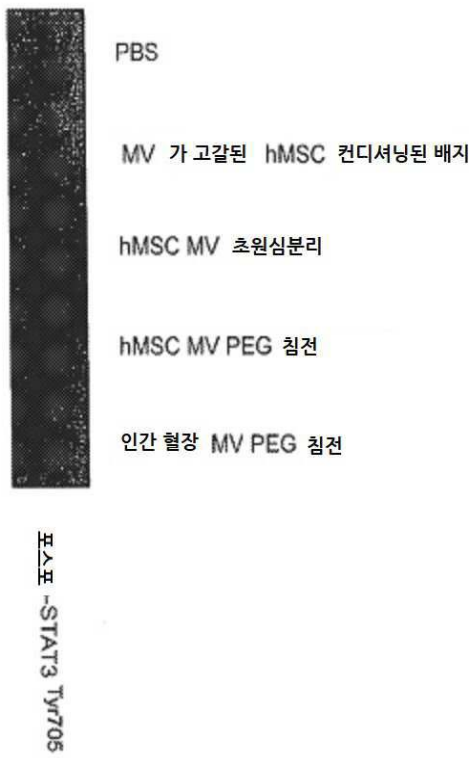
도면15



도면16



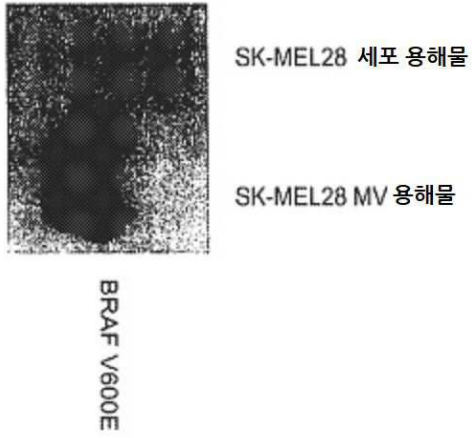
도면17



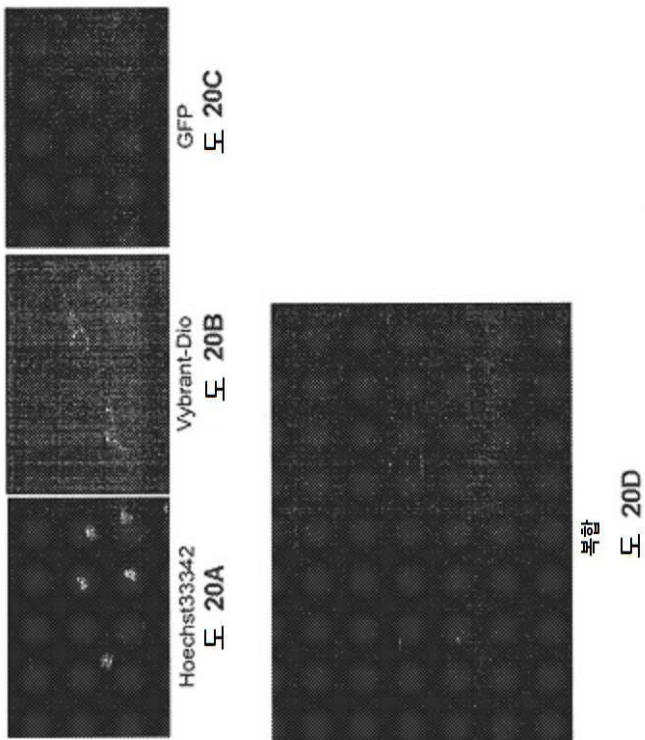
도면18



도면19



도면20



도면21



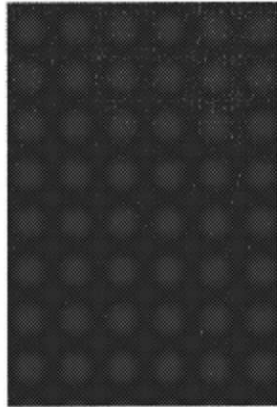
GFP 발현 MSC로부터
유래된 MV
도 21C



Vybrant-DiO
도 21B



Hoechst33342
도 21A



복합

도 21D

도면22



도 22B



도 22D



도 22A



도 22C

도면23



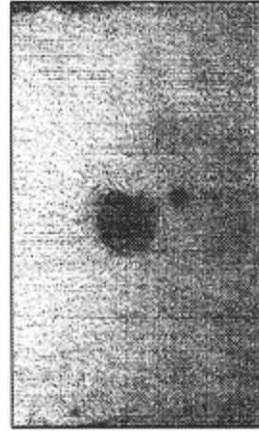
도 23B



도 23D



도 23A

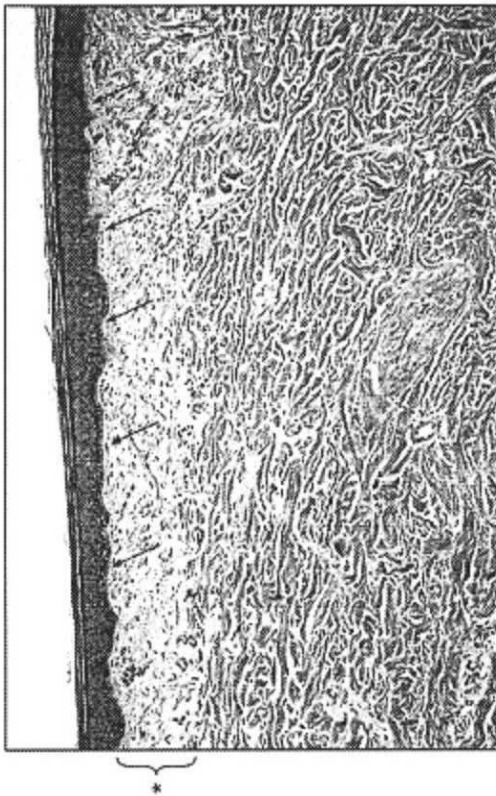


도 23C

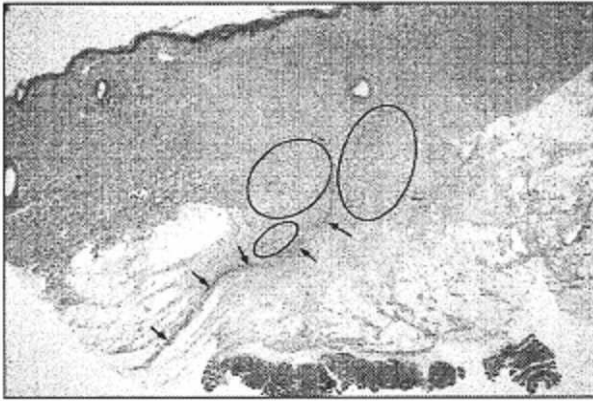
도면24



도면25



도면26



도 5: 28일째에 본 발명의 방법에 의해 제조된 MV로 처리된 전층 상처 (12.5X)
 화살표는 재형성 상처 내로의 새로운 신경 성장을 예시한다.
 신경 성장은 혈관형성과 관련된다 - 원형 영역에 강조됨
 이러한 결과는 조직 재생을 잘 나타낸다.
 이것은 대조군 또는 초원심분리된 MV 처리된 상처에서는 관찰된 바 없다.

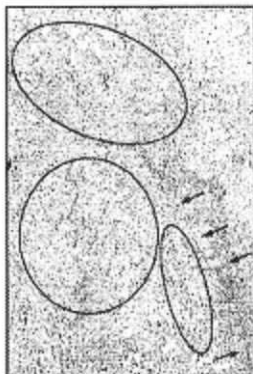
도면27



도 27B

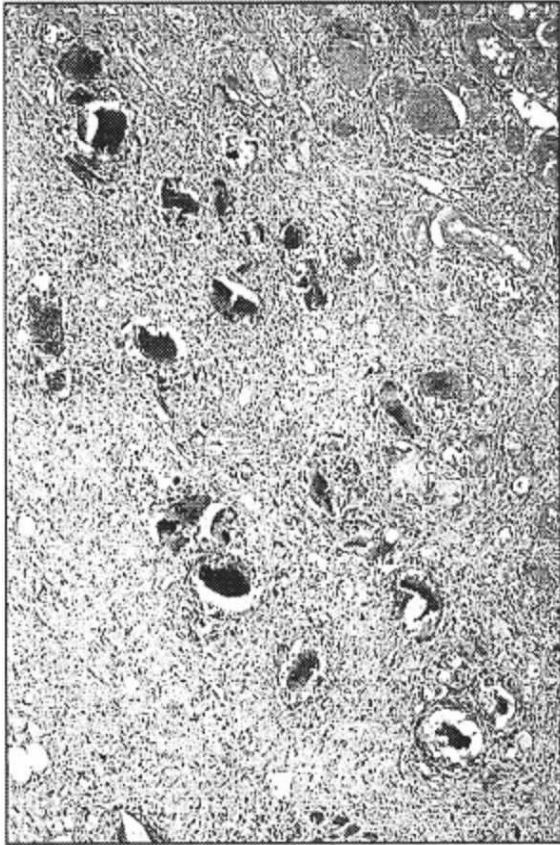


도 27C

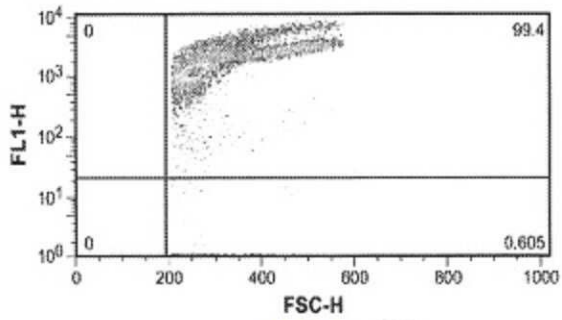


도 27A

도면28

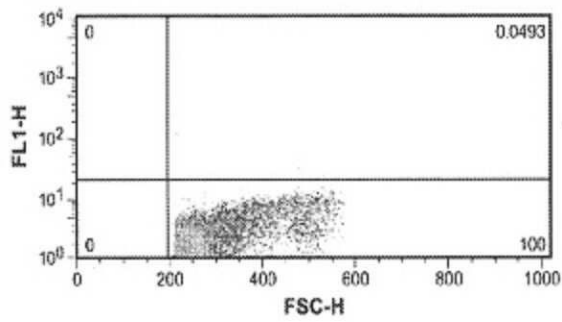


도면29



양성 대조군 : GFP

도 29A



실험 1

도 29B

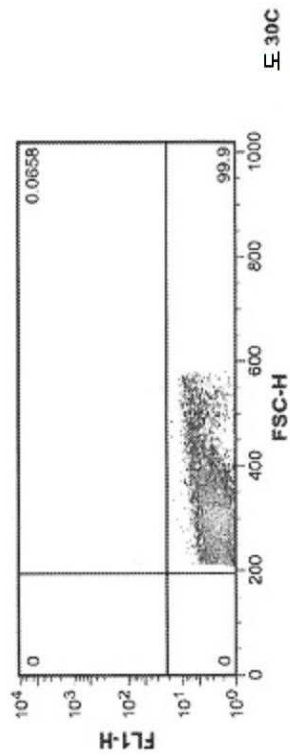
도면30



도 30B

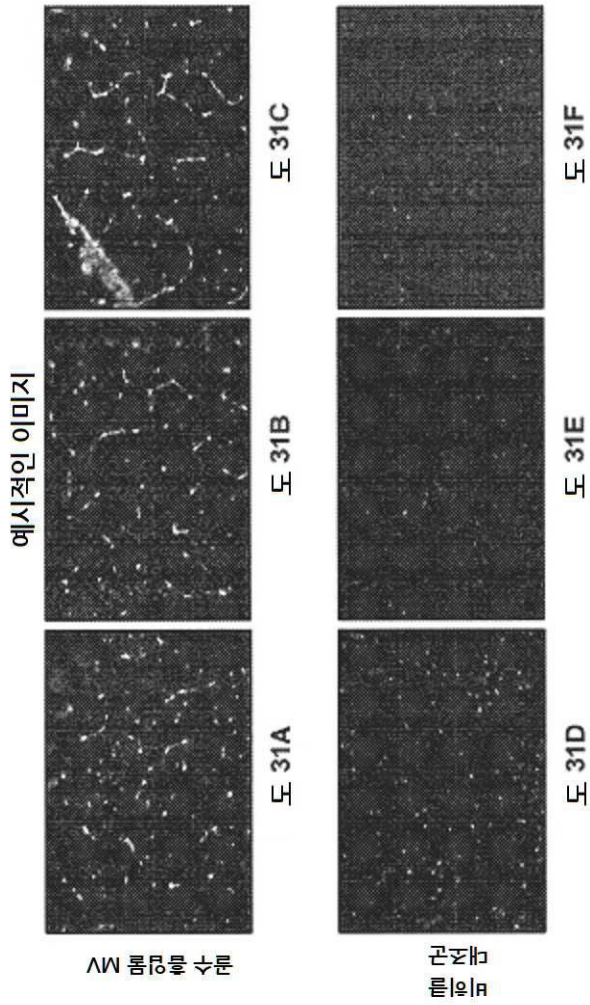


도 30A

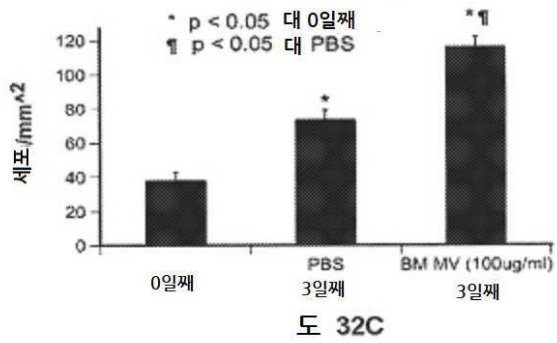
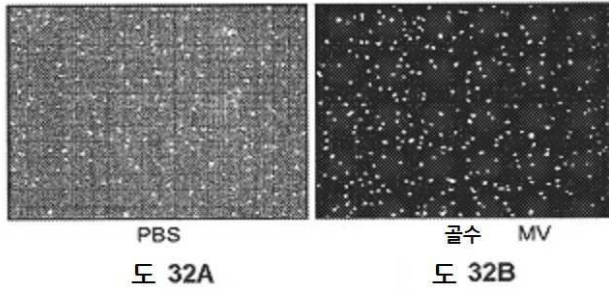


도 30C

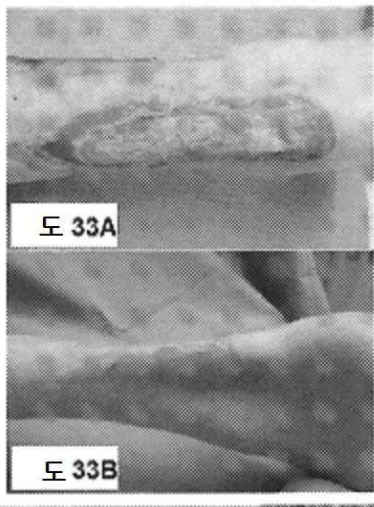
도면31



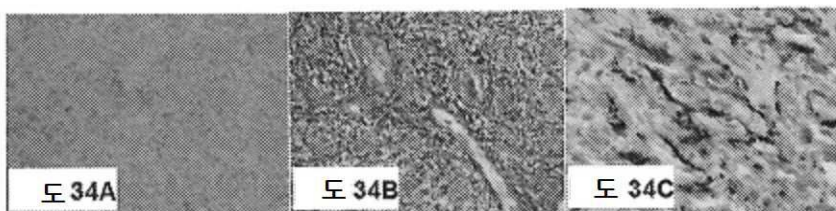
도면32



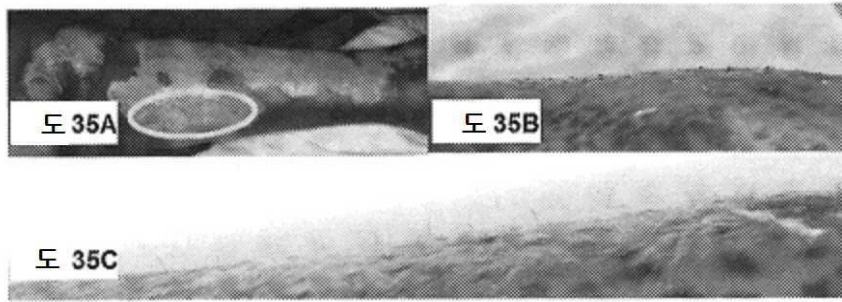
도면33



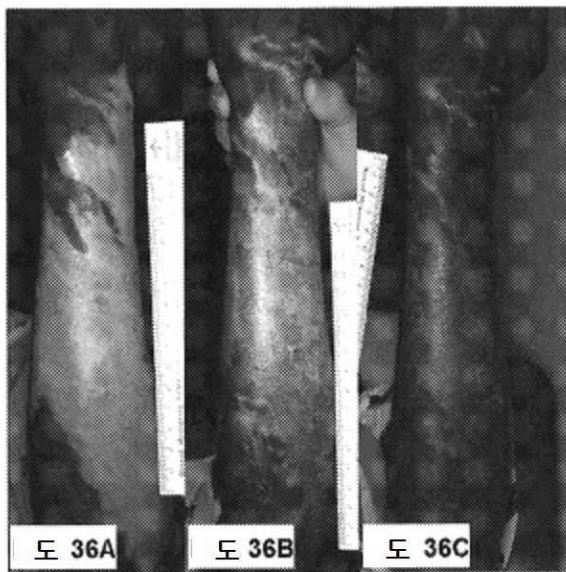
도면34



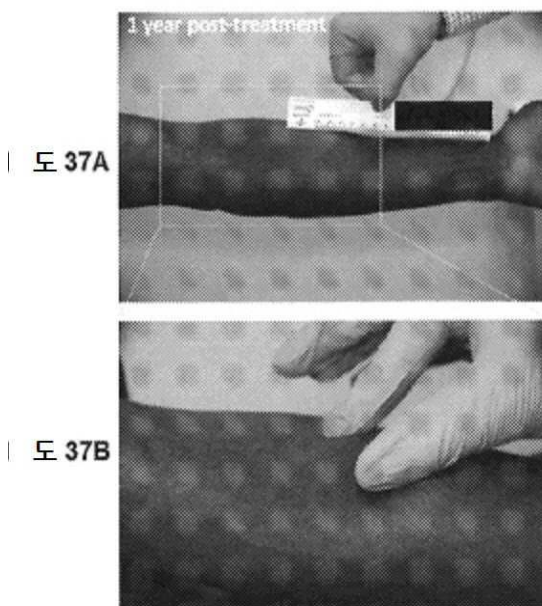
도면35



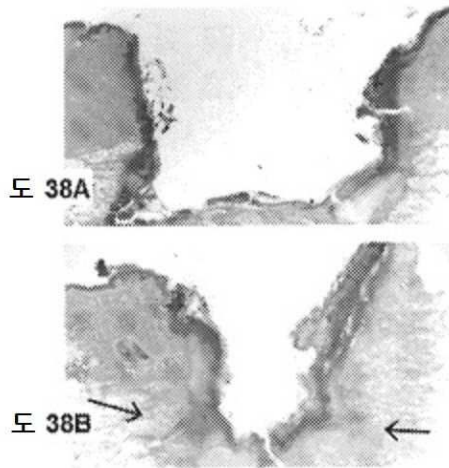
도면36



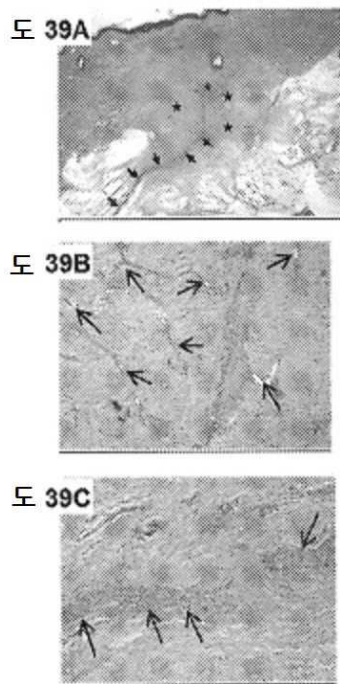
도면37



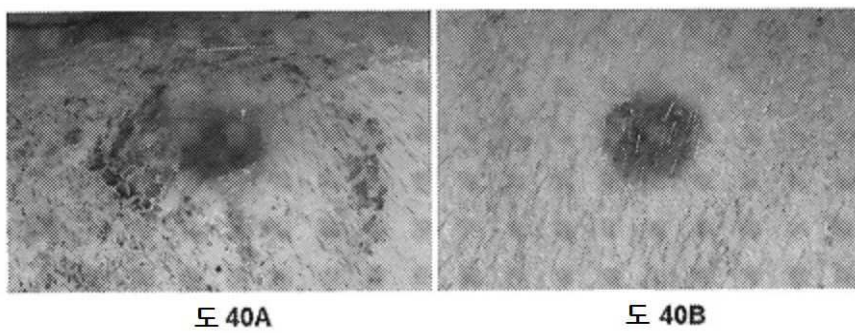
도면38



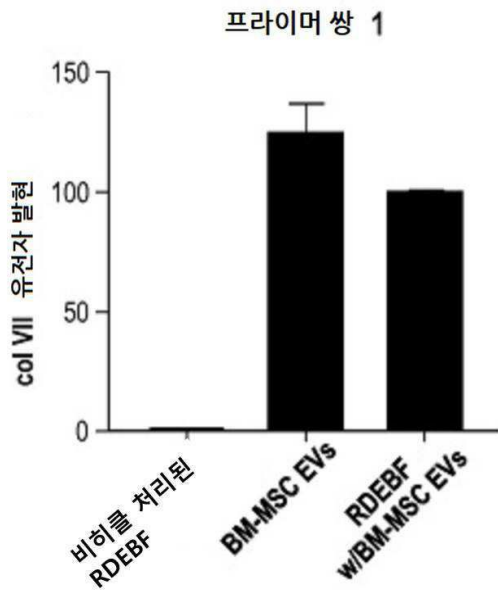
도면39



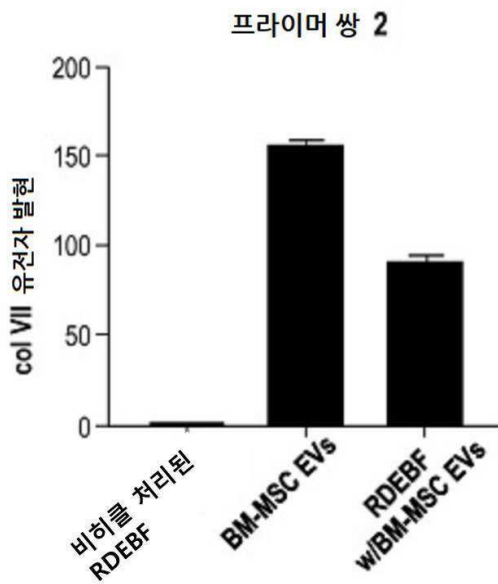
도면40



도면41

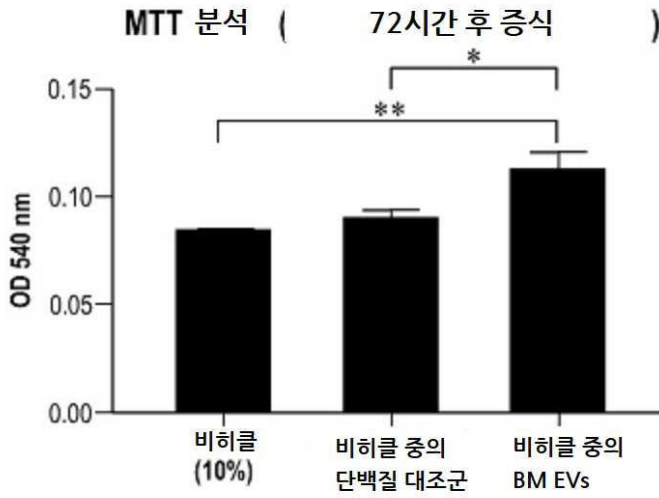


도 41A

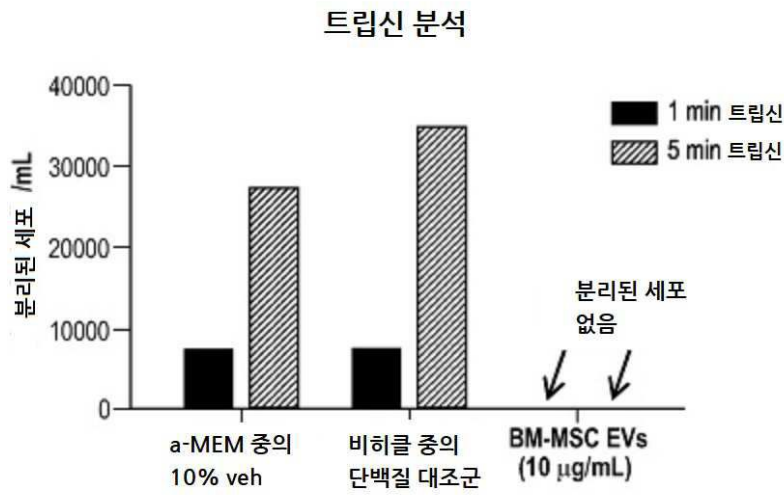


도 41B

도면43

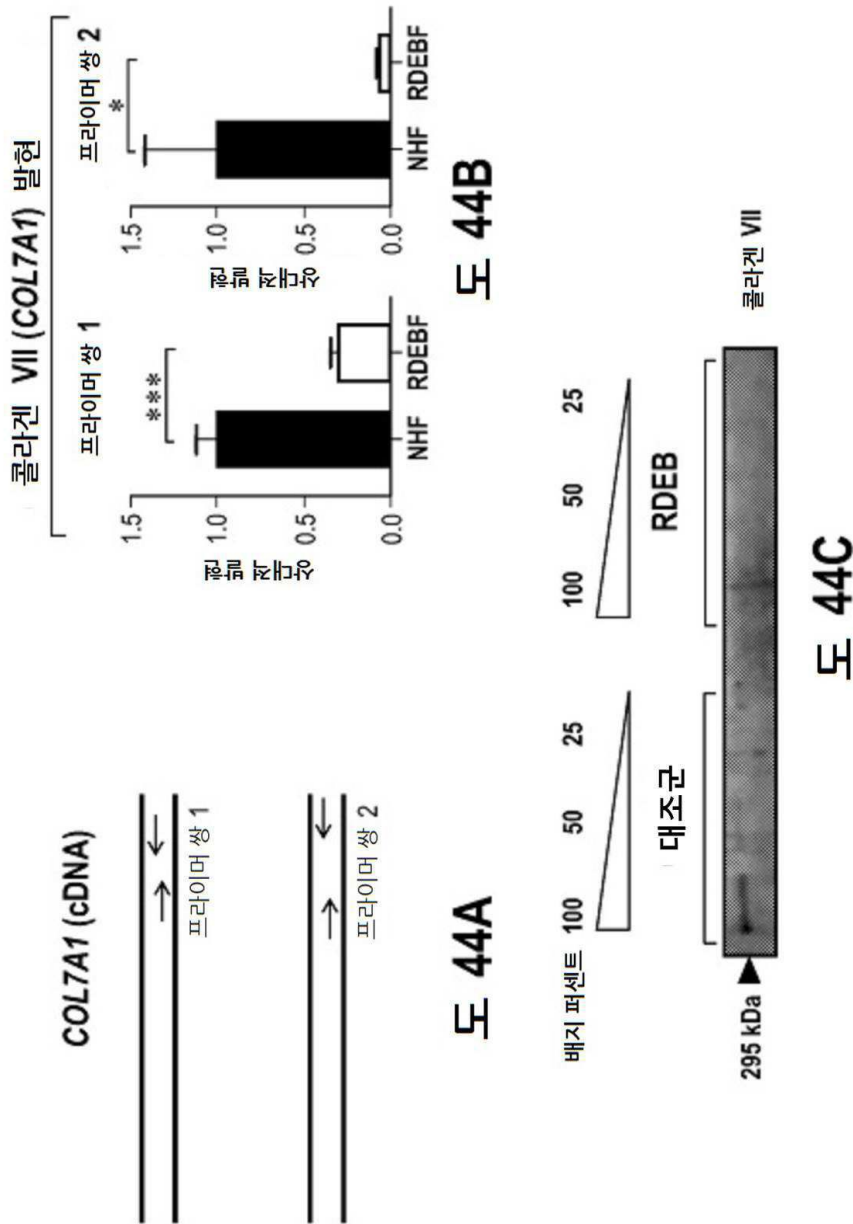


도 43A

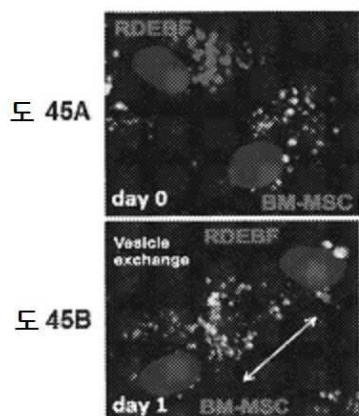


도 43B

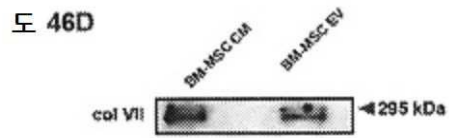
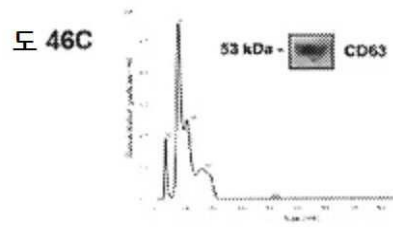
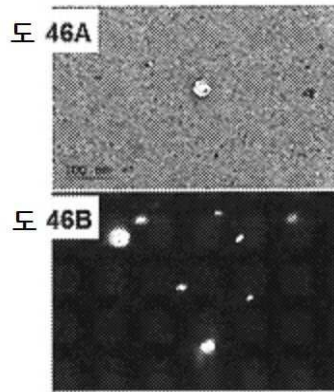
도면44



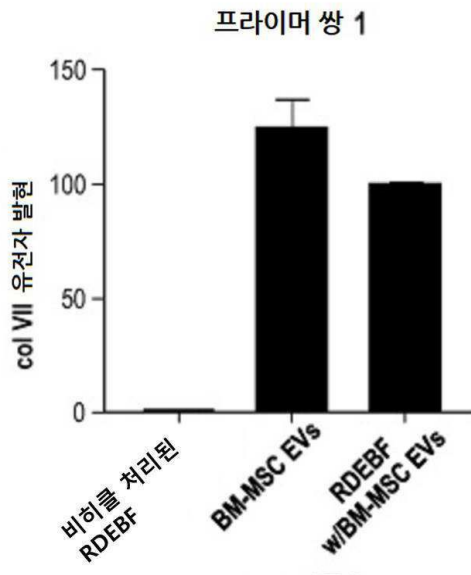
도면45



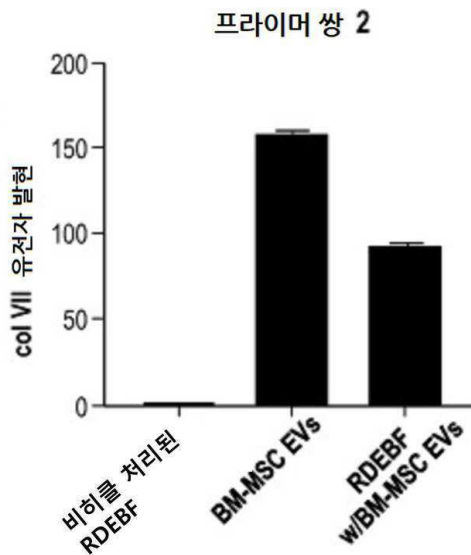
도면46



도면47



도 47A



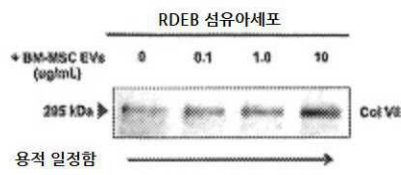
도 47B

도면48

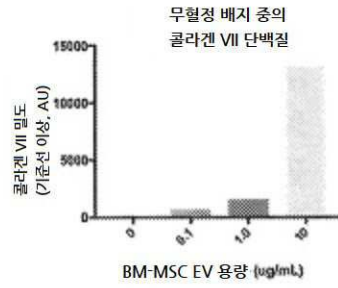
도 48A



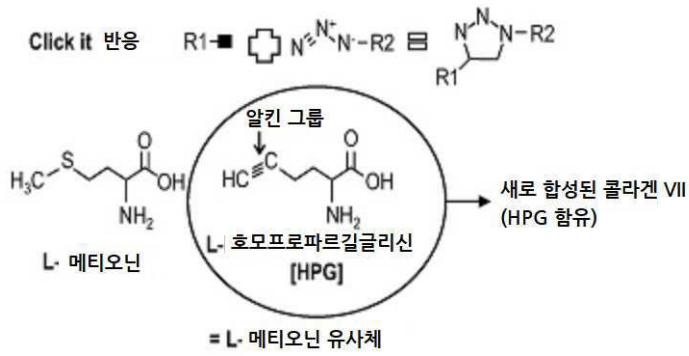
도 48B



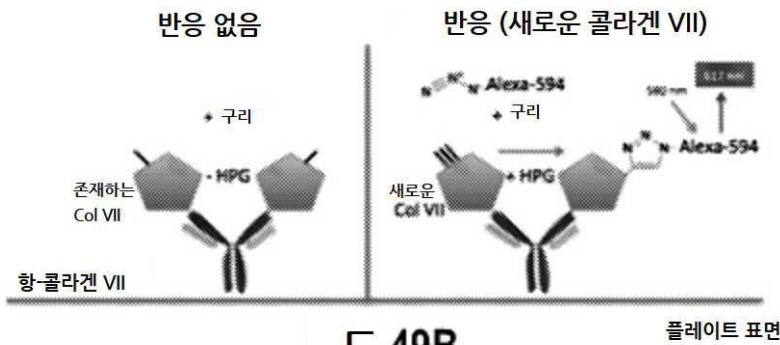
도 48C



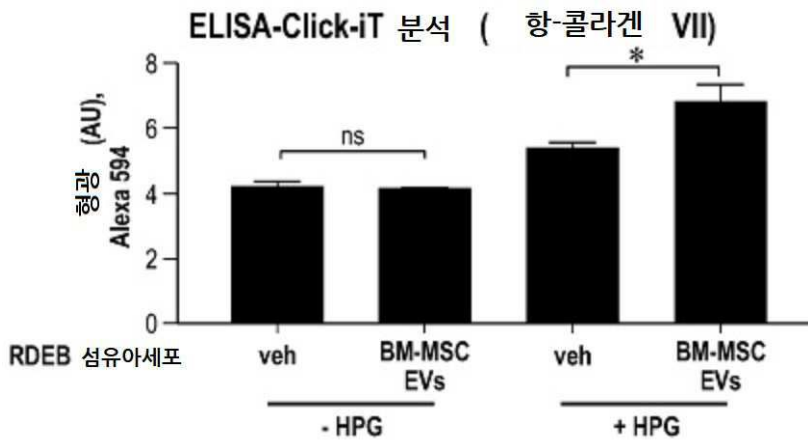
도면49



도 49A

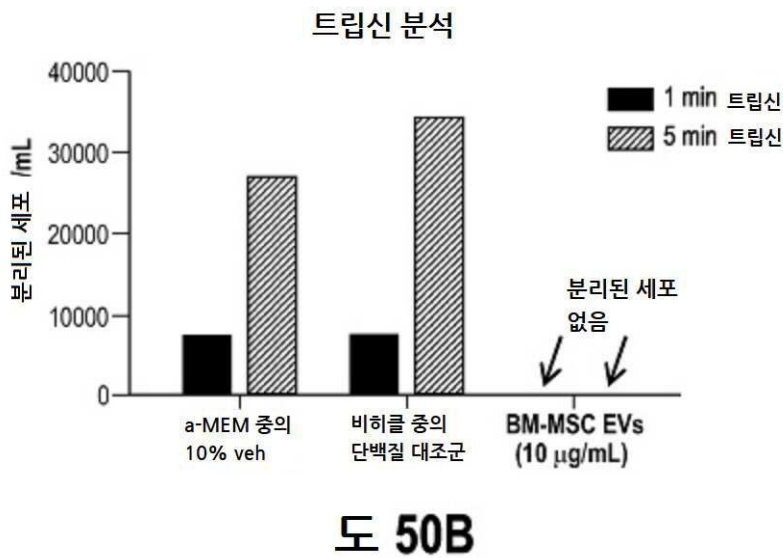
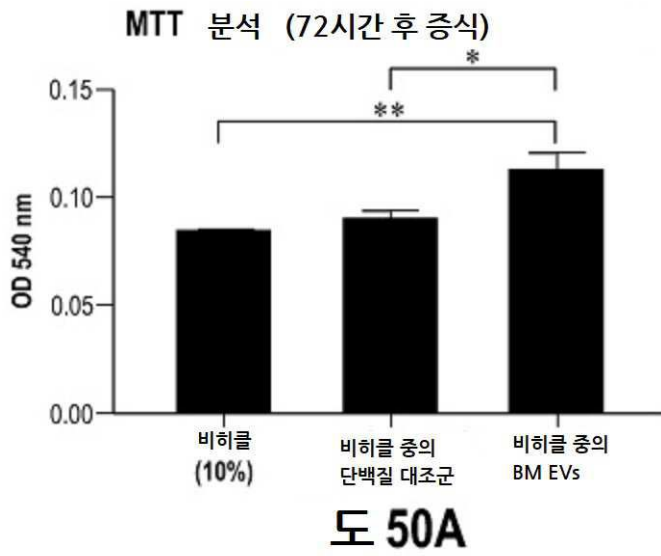


도 49B

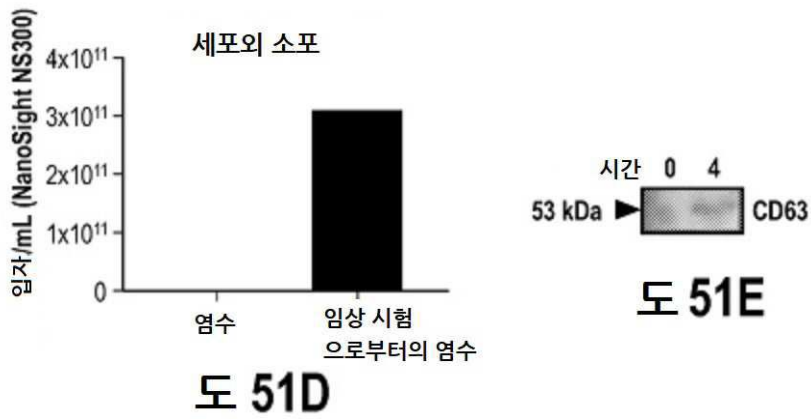
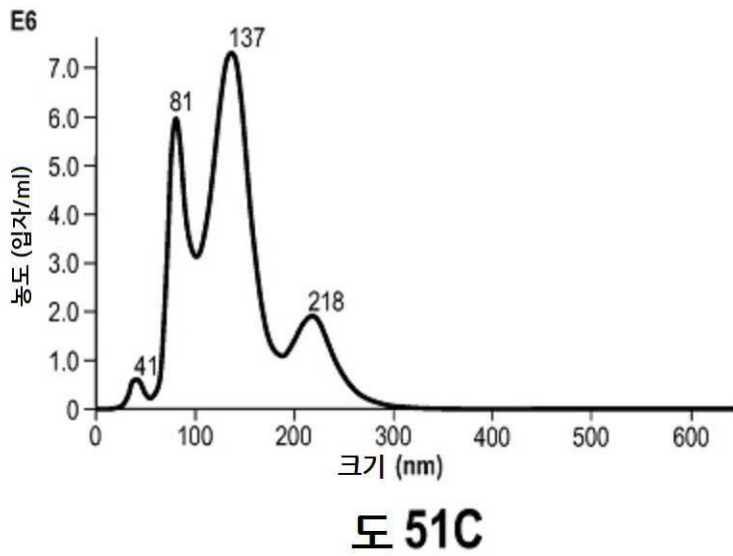
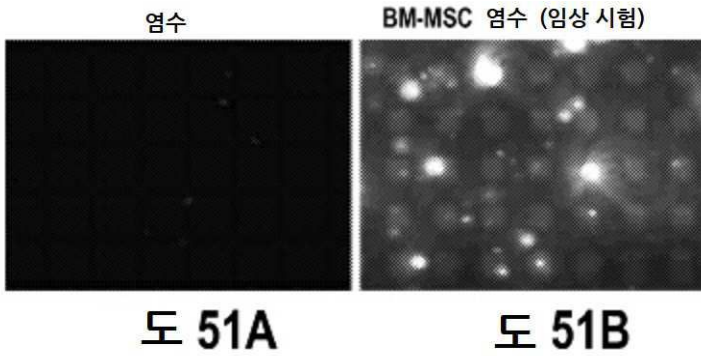


도 49C

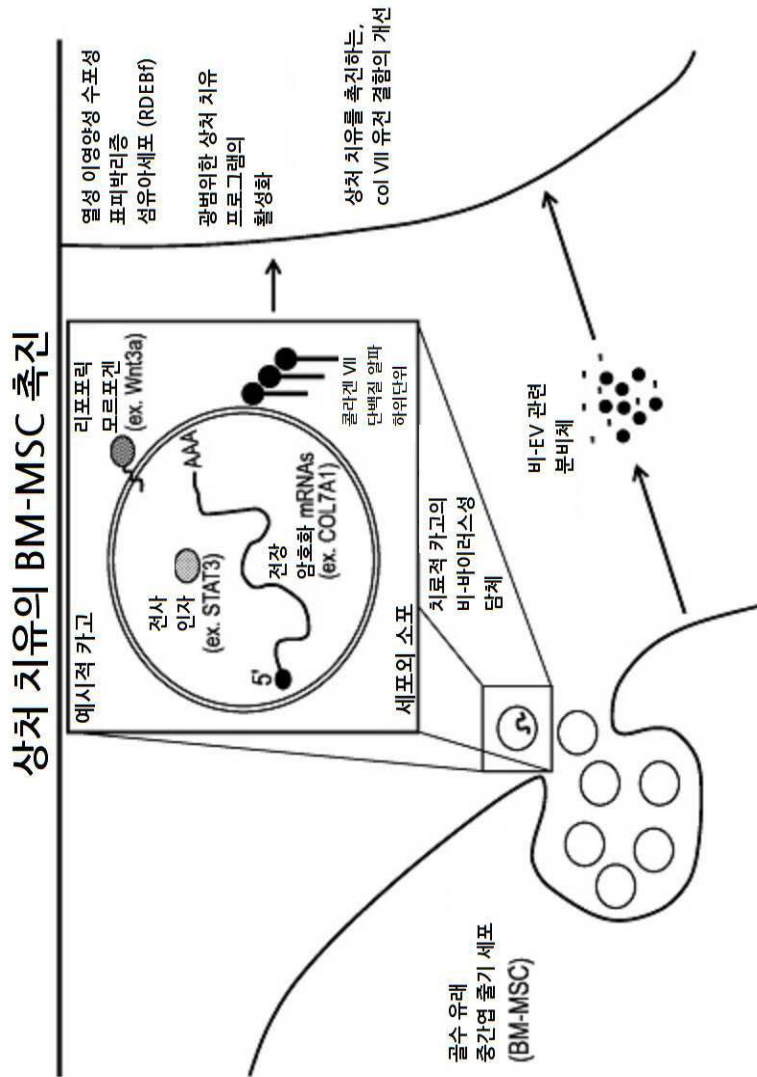
도면50



도면51



도면52



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITY OF MIAMI

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF EPIDERMOLYSIS

BULLOSA

<130> 605226: AGL-001USCIPWO

<140> PCT/US2018/052213

<141> 2018-09-21

<150> 15/712,294

<151> 2017-09-22

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

agacctcaca gtaaaaatag gtga 24

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

ctgatgggac ccaactccatc 20

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

gaagacctca cagtaaaaat aggtg 25

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 4

ctgatgggac ccaactccatc 20