(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-511871
(P2025-511871A)
(43)公表日　令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
Ａ６１Ｋ	*38/39*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/39	ＺＮＡ	４Ｃ０７６	
Ａ６１Ｐ	*1/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04		４Ｃ０８４	
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	４Ｃ０８７	
Ａ６１Ｋ	*35/36*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/36			
Ａ６１Ｋ	*35/22*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/22			

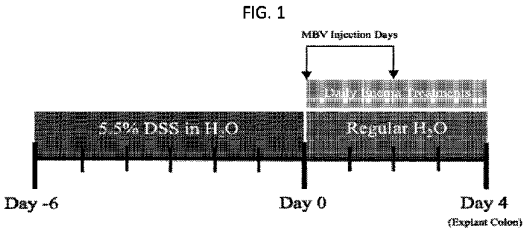
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全78頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-559436(P2024-559436)
(86)(22)出願日　令和5年4月7日(2023.4.7)
(85)翻訳文提出日　令和6年10月7日(2024.10.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/065525
(87)国際公開番号　WO2023/196970
(87)国際公開日　令和5年10月12日(2023.10.12)
(31)優先権主張番号　63/329,319
(32)優先日　令和4年4月8日(2022.4.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　504279968
ユニバーシティ オブ ピッツバーグ － オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイヤー エデュケイション
アメリカ合衆国 １５２６０ ペンシルバニア州，ピッツバーグ，サッカレイ アヴェニュー １３０，ガードナー スティール カンファレンス センター ファースト フロア
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ヒドロゲルに封入されたマトリックス結合ナノベシクル

(57)【要約】
細胞外マトリックス（ＥＣＭ）ヒドロゲルとマトリックス結合ナノベシクル（ＭＢＶ）とを含む組成物が本明細書に開示される。これらの組成物は、相乗効果をもたらし、被験体を処置するために有用である。一部の態様では、ａ）可溶化細胞外マトリックスと、ｂ）細胞外マトリックスに由来する外因性ＭＢＶであって、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない、外因性ＭＢＶとを含むＥＣＭヒドロゲルを含む組成物が開示される。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）可溶化細胞外マトリックス（ＥＣＭ）と、
ｂ）細胞外マトリックスに由来する外因性マトリックス結合ナノベシクル（ＭＢＶ）であって、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない、ＭＢＶと
を含む細胞外マトリックス（ＥＣＭ）ヒドロゲルを含む組成物であって、
前記外因性ＭＢＶが、前記ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり少なくとも約１×１０^{5}～１×１０^{20}個の粒子の濃度で存在し、
前記組成物が、
ｉ）ずり減粘であり、
ｉｉ）約５０Ｐａ～約２００Ｐａの貯蔵弾性率（Ｇ’）、および約５Ｐａ～約２０Ｐａの損失弾性率（Ｇ’’）を有し、３７℃におけるＧ’のＧ’’に対する比が、約４：１～約１５：１であり、かつ
ｉｉｉ）２４時間～１４日の５０％分解速度を有する、
組成物。
【請求項２】
前記ＥＣＭヒドロゲルが、音響的ヒドロゲルである、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記ＥＣＭヒドロゲルが、酵素的ヒドロゲルである、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
外因性酸性プロテアーゼおよび可溶化細胞外マトリックスを含む酸性溶液と、
細胞外マトリックスに由来する外因性ＭＢＶであって、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない、外因性ＭＢＶと
を含む組成物であって、
前記外因性ＭＢＶが、前記組成物中に、１ｍＬ当たり少なくとも約１×１０^{5}～約１×１０^{20}個の粒子の濃度で存在し、
前記酸性溶液が、２５℃を超える温度において、約７．０～約７．８の間のｐＨに中和されると、ゲルを形成する、
組成物。
【請求項５】
可溶化細胞外マトリックスと、
不活性化外因性酸性プロテアーゼと、
細胞外マトリックスに由来する外因性ＭＢＶであって、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない、外因性ＭＢＶと
を含む組成物であって、
前記外因性ＭＢＶが、前記組成物中に、１ｍＬ当たり少なくとも約１×１０^{5}～１×１０^{20}個の粒子の濃度で存在し、
前記組成物が、２５℃未満の温度では液相に入り、２５℃を超える温度ではゲル相に入り、
前記組成物が、約７～約７．８の間のｐＨを有する、
組成物。
【請求項６】
粉砕されたＥＣＭをさらに含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７】
前記外因性ＭＢＶが、前記組成物中に、約１×１０^{6}～１×１０$^{-}$の濃度で存在する、請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８】

前記可溶化ＥＣＭが、前記ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍｇ／ｍＬ～５００ｍｇ／ｍＬの量で存在する、請求項１～３または６～７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９】
前記可溶化ＥＣＭが、前記組成物中に、１ｍｇ／ｍＬ～５００ｍｇ／ｍＬの量で存在する、請求項４～７に記載の組成物。
【請求項１０】
前記可溶化ＥＣＭが、５ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬの量で存在する、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
前記ＥＣＭヒドロゲルまたは前記可溶化ＥＣＭが、インタクトなＥＣＭを含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
前記ＭＢＶが、膀胱、小腸、心臓、真皮、肝臓、腎臓、子宮、脳、血管、肺、骨、筋肉、膵臓、胎盤、胃、脾臓、結腸、脂肪組織、または食道の細胞外マトリックスに由来する、請求項１～１１のいずれかに記載の組成物。
【請求項１３】
前記ＭＢＶが、骨ＥＣＭにも心臓ＥＣＭにも由来しない、請求項１～１１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１４】
前記ＭＢＶが、膀胱、小腸、真皮、肝臓、腎臓、子宮、脳、血管、肺、筋肉、膵臓、胎盤、胃、脾臓、結腸、脂肪組織、または食道の細胞外マトリックスに由来する、請求項１～１１のいずれかに記載の組成物。
【請求項１５】
前記ＭＢＶが、膀胱マトリックス（ＵＢＭ）、小腸粘膜下組織（ＳＩＳ）、または膀胱粘膜下組織（ＵＢＳ）に由来する、請求項１～１１のいずれかに記載の組成物。
【請求項１６】
前記ＭＢＶが、ヒト、サル、ブタ、ウシ、またはヒツジから選択される哺乳動物の脊椎動物由来の細胞外マトリックスに由来する、請求項１～１５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１７】
前記ＥＣＭヒドロゲルが、膀胱、小腸、心臓、真皮、肝臓、腎臓、子宮、脳、血管、肺、骨、筋肉、膵臓、胎盤、胃、脾臓、結腸、脂肪組織、または食道の細胞外マトリックスに由来する、請求項１～１６のいずれかに記載の組成物。
【請求項１８】
前記ＥＣＭヒドロゲルが、膀胱マトリックス（ＵＢＭ）、小腸粘膜下組織（ＳＩＳ）、または膀胱粘膜下組織（ＵＢＳ）に由来する、請求項１～１６のいずれかに記載の組成物。
【請求項１９】
前記酸性プロテアーゼが、ペプシンもしくはトリプシン、またはこれらの組合せである、請求項４～１８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２０】
約７．２のｐＨを有する、請求項５～１９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２１】
７．２～７．４の範囲のｐＨを有する、請求項５～１９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２２】
前記可溶化ＥＣＭが、前記組成物中に、１０ｍｇ／ｍＬ～３０ｍｇ／ｍＬの間の量で存在する、請求項１～２１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項２３】
前記外因性ＭＢＶが、前記組成物中に、ａ）１ｍＬ当たり約1×10^{12}個の粒子；ｂ

）１ｍＬ当たり約１×１０^{11}個の粒子；ｃ）１ｍＬ当たり約１×１０^{10}個の粒子；ｄ）１ｍＬ当たり約１×１０^{9}個の粒子；または約１×１０^{8}～約１×１０^{11}の濃度で存在する、請求項１～２２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２４】

外用投与のために製剤化されたまたは浣腸として投与するために製剤化された、請求項１～２３のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２５】

炎症性腸疾患を有する被験体を処置するための方法であって、

前記被験体に、有効量の請求項１～２３のいずれか一項に記載の組成物を投与し、これにより、前記被験体における前記炎症性腸疾患を処置するステップ

を含む、方法。

【請求項２６】

前記組成物が、前記被験体の腸に浣腸によって投与される、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記組成物が、経口投与される、請求項２５に記載の方法。

【請求項２８】

前記被験体の結腸における炎症を減少させる、請求項２５～２７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２９】

前記被験体が、潰瘍性大腸炎を有する、請求項２５～２８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０】

前記被験体のメイヨースコアまたは潰瘍性大腸炎疾患活動指数スコアが、前記組成物の投与後に低下する、請求項２９に記載の方法。

【請求項３１】

前記スコアが、投与を受けてから１カ月以内、２カ月以内、３カ月以内、またはそれよりも後に低下する、請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】

前記被験体が、クローン病を有する、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３３】

前記被験体のクローン病活動指数スコアが、前記組成物の投与後に低下する、請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

前記クローン病活動指数スコアが、前記組成物を受けてから１カ月以内、２カ月以内、３カ月以内、またはそれよりも後に低下する、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

食道炎症を有する被験体を処置するための方法であって、

前記被験体の食道に、有効量の請求項１～２４のいずれか一項に記載の組成物を投与し、これにより、前記被験体における前記食道炎症を処置するステップ

を含む、方法。

【請求項３６】

前記組成物が前記食道に外用投与される、請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

前記被験体が、ヒトである、請求項２５～３６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３８】

前記組成物を前記被験体に投与すると、被験体の腸においてＭ１マクロファージと比較してＭ２マクロファージの数が増加する、請求項２５～３４または３７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３９】

前記被験体の腸が、前記被験体の結腸である、請求項３８に記載の方法。

【請求項４０】
前記組成物を前記被験体に投与すると、前記被験体の食道においてＭ１マクロファージと比較してＭ２マクロファージの数が増加する、請求項３５～３７のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、２０２２年４月８日に出願された米国特許仮出願第６３／３２９，３１９号への優先権およびその利益を主張する。
【０００２】
本開示の分野
本発明は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）組成物の分野に関し、具体的には、ＥＣＭヒドロゲルとマトリックス結合ナノベシクル（ＭＢＶ）の両方を含む組成物、およびこれらの組成物の使用に関する。
【０００３】
電子配列表への参照
電子配列表（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ．ｘｍｌ；サイズ：３，９５５バイト；および作成日：２０２３年４月６日）の内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００４】
背景
コラーゲン、ヒアルロン酸、絹フィブロイン、ラミニン、およびフィブロネクチン等の精製されたＥＣＭ構成成分で構成されるヒドロゲルが組織工学への適用に広く使用されている。しかし、これらの精製された、単一構成成分のＥＣＭバイオマテリアルは、ネイティブ組織ＥＣＭの複雑な生化学を欠く。全組織または臓器の脱細胞化により、ネイティブ組織ＥＣＭの生化学が保存されているＥＣＭを回収するための代替方法がもたらされる。脱細胞化されたＥＣＭの使用における主な進歩は、ヒドロゲルを形成する能力であり、これにより、脱細胞化されたＥＣＭの臨床的適応性が拡大したことである。しかし、ＥＣＭヒドロゲルの活性を増強する必要が依然としてある。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本開示の概要
ＥＣＭヒドロゲルおよびＭＢＶを含む組成物が本明細書に開示される。これらの組成物は、例えば炎症を減少させるための、相乗効果をもたらすものである。
【０００６】
一部の態様では、ａ）可溶化細胞外マトリックスと、ｂ）細胞外マトリックスに由来する外因性ＭＢＶであって、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない、外因性ＭＢＶとを含むＥＣＭヒドロゲルを含む組成物が開示される。外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり少なくとも約１×１０^{5}個～１×１０^{20}個の粒子の濃度で存在する。組成物は、ｉ）ずり減粘であり；ｉｉ）約５０Ｐａ～約２００Ｐａの貯蔵弾性率（ｓｔｏｒａｇｅ ｍｏｄｕｌｕｓ）（Ｇ’）、および約５Ｐａ～約２０Ｐａの損失弾性率（ｌｏｓｓ ｍｏｄｕｌｕｓ）（Ｇ’’）を有し、３７℃におけるＧ’のＧ’’に対する比が、約４：１～約１５：１であり、かつｉｉｉ）２４時間～１４日の５０％分解速度を有し得る。
【０００７】
他の態様では、外因性酸性プロテアーゼおよび可溶化細胞外マトリックス、例えばインタクトなＥＣＭを含む酸性溶液と、細胞外マトリックスに由来する外因性ＭＢＶであって

、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない、外因性ＭＢＶとを含む組成物が開示される。外因性ＭＢＶは、組成物中に、１ｍＬ当たり少なくとも約１×１０^{5}個～１×１０^{20}個の粒子の濃度で存在し、酸性溶液は、２５℃を超える温度において、約７．０～約７．８の間のｐＨに中和されると、ゲルを形成する。

【０００８】

さらなる態様では、可溶化細胞外マトリックス、例えばインタクトなＥＣＭと、非活性化または不活性化外因性酸性プロテアーゼと、細胞外マトリックスに由来する外因性ＭＢＶとを含む組成物が開示される。ＭＢＶは、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない。これらの外因性ＭＢＶは、組成物中に、１ｍＬ当たり少なくとも約１×１０^{5}～１×１０^{20}個の粒子の濃度で存在する。組成物は、２５℃未満の温度では液相に入り、２５℃を超える温度ではゲル相に入り、ｐＨは約７～約７．８の間である。ＥＣＭは、酸性プロテアーゼによって可溶化されていてもよい。

【０００９】

本発明の前述および他の特色および利点は、添付の図面を参照しつつ続けるいくつかの態様の次の詳細な説明から、さらに明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００１０】

【図１】図１は、研究動物において潰瘍性大腸炎を誘導し、処置レジメンを実施した研究の概略図を提供する。動物に、５．５％ＤＳＳ水を６日間与え、次いで、通常の水を４日目まで与えた。処置を、０日目から４日目まで、毎日の浣腸または０日目および２日目の注射として行った。４日目に結腸組織を試験動物から外植した。

【００１１】

【図２】図２Ａ～２Ｃは、例示的な浣腸送達調製物および手順を示す一連の写真である。図２Ａは、浣腸の実施に使用したＳＵＲＦＬＯ（登録商標）翼状注入カテーテルおよび針を取り除く切り取り位置を示す。図２Ｂは、針をカテーテルから切り取り、２つの印（黒色の矢印）をつけたことを示す。２つの印のうちの一方は、浣腸間で深度が一貫することを確実にするために末端から８ｃｍとし、他方は、材料が注射されたらカテーテルを水平に引き抜くことを確実にするために末端から４ｃｍとした。図２Ｃは、試験動物の肛門を通した結腸へのカテーテルの挿入、および浣腸材料５ｍＬのゆっくりとした送達の仕方を示すデジタル画像である。

【００１２】

【図３】図３は、各動物について、研究期間中、毎日測定した食物消費量（右）および水消費量（左）のグラフを提供する。

【００１３】

【図４】図４は、研究期間にわたる動物についての最初の体重に対する分率を示すグラフである。各動物の体重を毎日測定し、－６日目における動物の最初の体重に対して正規化した。

【００１４】

【図５】図５は、各動物について毎日スコア化した、糞の硬さの分率スコア（左）および糞中の血液含量の分率（右）のグラフを提供する。糞中の血液含量を、視覚的観察ならびにＣＯＬＯＳＣＲＥＥＮ（登録商標）ＥＳ Ｌａｂ Ｐａｃｋ Ｆｅｃａｌ Ｏｃｃｕｌｔテストを使用して決定し、スコア化した［０＝血液なし、２＝潜血、４＝肉眼的出血］。糞の硬さをスコア化した［０＝正常、２＝緩い、４＝下痢］。分率スコアを、個々のラットスコアを０日目に得たスコアに対して正規化することによって決定した。

【００１５】

【図６】図６は、結腸の長さ（左）および結腸外植片の肉眼的解剖学的スコア化（右）の棒グラフを提供する。左側の棒グラフについては、外植後に盲腸から直腸までの各結腸の長さを測定した。ＤＳＳを受けた全ての群が健康群よりも短い結腸を有すると思われた。

右側の棒グラフについては、外植した結腸を、肉眼で見える潰瘍形成および炎症の証拠について、盲検化された研究者がスコア化した。全ての処置群で疾患対照よりも低いスコア（より少ない疾患）が示された。

【００１６】

【図７】図７Ａ～７Ｇは、試験動物からのＨ＆Ｅ染色したラット結腸組織切片の組織学的分析の画像を提供する。図７Ａ～Ｆの画像は、図７Ｇに示されている大きな組織試料の切片の拡大図を提供する。図７Ａおよび７Ｇ（ｉ）は健康な動物からの画像である。図７Ｂおよび７Ｇ（ｉｉ）は疾患動物からの画像である。図７Ｃおよび７Ｇ（ｖｉ）は食塩水浣腸中のＭＢＶを受けた疾患動物からの画像である。図７Ｄおよび７Ｇ（ｉｉｉ）はＥＣＭヒドロゲル浣腸を受けた疾患動物からの画像である。図７Ｅおよび７Ｇ（ｖ）はＭＢＶが注入されたＥＣＭヒドロゲル浣腸を受けた疾患動物からの画像である。図７Ｆおよび７Ｇ（ｉｖ）はＭＢをｉ．ｖ．注射によって受けた疾患動物からの画像である。

【００１７】

【図８】図８Ａ～８Ｂは、エキソソーム、骨マイクロベシクル（ｂｏｎｅ　ｍｉｃｒｏｖｅｓｉｃｌｅ）（ＭＶ）およびＭＢＶの表面マーカーの比較を提供する。これらの図は、マウスエキソソーム、マウス骨マトリックスベシクル（骨ＭＶ）、およびマウスマトリックス結合ナノベシクル（ＭＢＶ）において認められる様々なマーカーのレベルを比較するＥＸＯ－ＣＨＥＣＫ（商標）Ｅｘｏｓｏｍｅ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ａｒｒａｙｓ（Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の結果を示す。図８Ａはアレイのデジタル画像を提供し、図８Ｂは、エキソソームと、骨ＭＶと、ＭＢＶとにおける、認められるマーカーのそれぞれの相対発現を示すグラフである。データから、表面マーカーのプロファイルに基づいて、ＭＢＶがエキソソーム、骨マイクロベシクル（ＭＶ）とは異なることが示される。下のパネルの棒グラフに示されている通り、ＭＢＶは、ＣＤ６３、ＥｐＣＡＭ、ＡＮＸＡ５、ＴＳＧ１０１、ＧＭ１３０、ＦＬＯＴ１、ＩＣＡＭ１、ＡＬＩＸ、およびＣＤ８１を発現しない、または、骨ＭＶもしくはエキソソームにおけるこれらのマーカーのレベルと比較して低い発現を有する。

【００１８】

【図９】図９は、骨ＭＶマーカーであるアネキシンＶおよび組織非特異的アルカリホスファターゼ（ＴＮＡＰ）が骨ＭＶによって発現されることを示すウエスタンブロットである。１７１１Ａ細胞から調製した溶解物を陽性対照として使用した。この実験の結果から、マトリックス結合ナノベシクル（ＭＢＶ）が、骨マイクロベシクルのマーカー、ＴＮＡＰおよびアネキシンＶのどちらの発現も一切ないことが示される。血漿エキソソームは、アネキシンＶは発現するが、ＴＮＡＰは発現しない。これらの結果から、ＭＢＶがエキソソームおよび骨マイクロベシクルのどちらとも明白に区別される。特に、使用したＭＢＶは筋組織から単離したものである。

【００１９】

【図１０】図１０は、マクロファージ活性化遺伝子発現の、エキソソーム、ＭＶおよびＭＢＶに対する異なる効果を示す棒グラフである。ＭＢＶは、差次的な免疫調節効果を有し、すなわち、ＭＢＶは、この効果を有さないエキソソームまたは骨ＭＶと比較した場合、Ｍ２マクロファージを増加させる。マウスから収集した骨髄由来マクロファージ（ＢＭＤＭ）を処理しなかったか（Ｍ０）、または以下の試験物品を用いて２４時間処理した：Ｍ１表現型を誘導するためのＩＦＮγ＋ＬＰＳ（Ｍ１）、Ｍ２様表現型を誘導するためのＩＬ－４（Ｍ２）、血漿由来のエキソソーム、１７Ａ細胞由来の骨ＭＶ、または筋肉から単離されたＭＢＶ。処理後、示されている遺伝子（Ａｒｇ、ＣＤ２０６、Ｆｉｘｘ、ＩＬ－６、ＩＮＯＳ、およびＴＮＦ）の発現の倍数変化（ｆｏｌｄ　ｃｈａｎｇｅ）をｑＰＣＲによって評価した。図１０は、ＭＢＶによる炎症促進マーカーＩＬ－６およびＴＮＦ－αの下方調節が、エキソソームおよび骨ＭＶによる同じ２種の炎症性メディエーターの下方調節とは明白に区別されることを示す。ＭＢＶは強力な抗炎症効果を有した；一方、エキソソームおよび骨ＭＶはこの効果を有さなかった。

【００２０】

【図１１】図１１Ａ～１１Ｅは、結腸の各処置群を表す組織学的（ヘマトキシリンおよびエオシン）画像の高倍率図である（疾患：図１１Ａ；ＥＣＭヒドロゲル浣腸：図１１Ｂ；ＭＢＶ＋ＰＢＳ浣腸：図１１Ｃ；ＭＢＶが注入されたＥＣＭヒドロゲル浣腸：図１１Ｄ；２重ＭＶ　ｉ．ｖ．注射：図１１Ｅ）。これらは各群についての結果の代表である。

【００２１】

【図１２－１】図１２Ａ～Ｅは、様々な層での処置試料におけるＭ２：Ｍ１マクロファージ比の定量化を示す棒グラフである：結腸（図１２Ａ）、粘膜（図１２Ｂ）、筋層（ｍｕｓｃｕｌａｒｉｓ）（図１２Ｃ）、および粘膜下組織（図１２Ｄ）。各処置についてのＣＤ６８＋細胞の定量化が図１２Ｅに示されている。

【図１２－２】同上。

【図１２－３】同上。

【発明を実施するための形態】

【００２２】

詳細な説明

ＭＢＶは、ＥＣＭの不可欠な構成成分であり、エキソソームとは別個であり、前臨床モデルにおいて過剰炎症を有効に向け直す（Hussey GS, et al. (2020) Lipidomics and RNA sequencing reveal a novel subpopulation of nanovesicle within extracellular matrix biomaterials. Sci Adv 6 (12): eaay4361；van der Merwe Y, et al. (2019) Matrix-bound nanovesicles prevent ischemia-induced retinal ganglion cell axon degeneration and death and preserve visual function. Sci Rep 9 (1): 3482）。一部の態様では、ＭＢＶは、免疫調節性ｍｉＲＮＡ、タンパク質、および脂質を含有し、マクロファージに急速に取り込まれ、シグナル伝達カスケードを誘発し、また、ＥＣＭに基づくバイオマテリアルの状況において十分に研究された現象である表現型切り替えに必須の遺伝子発現をモジュレートする（Hussey GS, et al. (2019) Matrix bound nanovesicle-associated IL-33 activates a pro-remodeling macrophage phenotype via a non-canonical, ST2-independent pathway. J Immunol Regen Med 3: 26-35；Huleihel L, et al. (2017) Macrophage phenotype in response to ECM bioscaffolds. Semin Immunol 29: 2-13）。さらに、一部の態様では、ＭＢＶの投与により、ＥＣＭに基づくバイオマテリアルの状況において以前に特徴付けられた現象である調節性Ｔ細胞（T_{REG}）の上方調節がもたらされる。ＭＢＶは、関節リウマチ、外傷性筋肉損傷、潰瘍性大腸炎、および食道がんを含む、厳しい環境下で修復性免疫応答を急速かつ有効に誘導する（Huleihel L, et al. (2017) Matrix-Bound Nanovesicles Recapitulate Extracellular Matrix Effects on Macrophage Phenotype. Tissue Eng Part A 23 (21-22): 1283-1294；Dziki JL, et al. (2016) Immunomodulation and Mobilization of Progenitor Cells by Extracellular Matrix Bioscaffolds for Volumetric Muscle Loss Treatment. Tissue Eng Part A 22 (19-20): 1129-1139；Keane TJ, et al. (2017) Restoring Mucosal Barrier Function and Modifying Macrophage Phenotype with an Extracellular Matrix Hydrogel：Potential Therapy for Ulcerative Colitis. J Crohns Colitis 11 (3): 360-368；Saldin LT, et al. (2019) Extracellular Matrix Degradation Products Downregulate Neoplastic Esophageal Cell Phenotype. Tissue Eng Part A 25 (5-6): 487-498）。

【００２３】

ＭＢＶ内に保存されたサイトカインカーゴは、修復性かつ調節性Ｍ２マクロファージを支持し、急性肺損傷後の細菌感染症および炎症を制御する（Liu Q, et al. (2019) IL-33-mediated IL-13 secretion by ST2+ T_{REG} controls inflammation after lung injury. JCI Insight 4 (6)）。ＥＣＭ生体足場は、筋骨格組織

、胃腸組織、泌尿生殖器組織およびＣＮＳ組織を伴う種々の臨床的適用において有用である（Badylak SF (2007) The extracellular matrix as a biologic scaffold material. Biomaterials. 28 (25): 3587-3593）。ＥＣＭは、組織同一性を規定する、各組織に常在する細胞の分泌される構造的および機能性分子からなる。このような異種足場は、有害な自然免疫応答または適応免疫応答を誘発せず、その代わりに、抗炎症性および修復性の自然免疫応答および適応免疫応答を支持する（Brown BN, et al. (2009) Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. Biomaterials. 30 (8): 1482-1491）。これらの天然に存在するバイオマテリアルの使用は、典型的には、機能的かつ部位に適した組織の（少なくとも）部分的な修復；「構成的リモデリング」と称される過程に関連付けられる（Badylak SF (2007) The extracellular matrix as a biologic scaffold material. Biomaterials. 28 (25): 3587-3593）。ＥＣＭ生体足場、またはＥＣＭ生体足場の分解生成物は、抗炎症性Ｍ２様マクロファージおよび２型ヘルパーＴ（Ｔｈ２）細胞応答を動員することによって組織修復を方向づけることが示されており、このような応答は、多くの場合、局所的な炎症および前駆細胞との構成的クロストークの低減に関連付けられる。

【００２４】

マトリックス結合ナノベシクル（ＭＢＶ）は、Ｍ２様の修復性かつ抗炎症性マクロファージ表現型を活性化する。ＭＢＶが、体液中に見出されるエキソソームとは別個の明確なクラスの細胞外ベシクルであることが研究で示されている（Hussey GS, et al. (2020) Lipidomics and RNA sequencing reveal a novel subpopulation of nanovesicle within extracellular matrix biomaterials. Sci Advances. 6 (12): eaay4361）。ＭＢＶは厳しい組織脱細胞化過程を経ても残存するので、種間にわたって組織および器官発生および恒常性における基本的な役割、ならびに傷害に対する組織応答における調節的な役割を果たし得る。ＭＢＶは、複数の、多様な組織供給源に由来し得る。ＭＢＶは豊富にあり、凍結乾燥することができ、高度に安定であり、また、気管への点滴注入または噴霧によって容易に投与することができる。

【００２５】

ＭＢＶは、リモデリング促進マクロファージ表現型の促進に対するＥＣＭの効果を再現し得る。ＭＢＶを用いた処置後の最も代表的な調節性／抗炎症性表現型は、マクロファージ遺伝子およびタンパク質発現、細胞表面マーカー、ならびに、観察される食作用活性、一酸化窒素（ＮＯ）産生、および抗菌活性によって決定される機能的能力であった。これは、ＥＣＭに基づく生体足場のマクロファージ表現型および機能に対する効果が記載された以前の報告と一致する（例えば、ＰＣＴ公開第ＷＯ２０１７／１５１８６２Ａ１号を参照されたい）。ＭＢＶは、ｍｉＲＮＡ、タンパク質、およびリン脂質カーゴの組合せによって免疫調節効果を発揮することが示されている。例えば、体液中に存在するエキソソームと比較して、ＭＢＶは、細胞外環境の炎症促進性／抗炎症性の状況に応じて異なるホスホリパーゼによって活性化される分解促進性（ｐｒｏ－ｒｅｓｏｌｖｉｎｇ）脂質メディエーターにおいて高度に富化されている（Hussey GS, et al. (2020) Lipidomics and RNA sequencing reveal a novel subpopulation of nanovesicle within extracellular matrix biomaterials. Sci Adv 6 (12): eaay4361）。さらに、ＭＢＶは、免疫細胞を修復性Ｍ２様表現型に方向づけるシグナルを伝達するＩＬ－３３の豊富かつ安定な供給源であり、一方で、損傷を受けた肺におけるT_{REG}による修復および調節性機能も刺激する（Liu Q, et al. (2019) IL-33-mediated IL-13 secretion by ST2+ T_{REG} controls inflammation after lung injury. JCI Insight 4 (6)）。ＩＬ－３３送達により、Ｈ１Ｎ１感染後の細菌重感染が、細菌クリアランスが改善されることによって減少する（Robinson KM, et al. (2018) Novel protective mechanism for interleukin-33 at the mucosal barrier during influenza-associated bacterial superinfe

ction. Mucosal immunology. 11 (1): 199-208）。さらに、ＭＢＶは、ｍｉＲＮＡ　１２５ｂ－５ｐ、１４３－３ｐ、および１４５－５ｐに富んでいる。マクロファージ内のこれらのｍｉＲＮＡの阻害は、抗炎症性／調節性表現型よりも炎症促進性表現型に一致する遺伝子およびタンパク質発現プロファイルに関連付けられる（Huleihel L, et al. (2017) Matrix bound nanovesicles recapitulate extracellular matrix effects on macrophage phenotype. Tissue Eng Part A）。ＭＢＶとＥＣＭヒドロゲルの両方を含む組成物が本明細書に開示される。

【００２６】

細胞外マトリックス（ＥＣＭ）ヒドロゲルとマトリックス結合ナノベシクル（ＭＢＶ）とを含む組成物が本明細書に開示される。これらの組成物は、相乗効果をもたらし、被験体を処置するために有用である。

【００２７】

用語

他に注記されていなければ、技術用語は、従来の使用法に従って使用される。分子生物学における多くの一般用語の定義は、Krebs et al. (eds.), Lewin's genes XII, published by Jones & Bartlett Learning, 2017に見出すことができる。以下の用語および方法の説明は、本開示をより良好に説明するため、および当業者に本開示の実施を手引きするために提供するものである。単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、文脈により明確に別段の規定がなされない限り、１つ、または１つよりも多くを指す。例えば、用語「１つのＭＢＶを含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ　ａ　ＭＢＶ）」は、単一または複数のＭＢＶを含み、「少なくとも１つのＭＢＶを含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ　ａｔ　ｌｅａｓｔ　ｏｎｅ　ＭＢＶ）」という句と等価とみなされる。用語「または（ｏｒ）」は、文脈によりそうでないことが明確に示されない限り、示されている選択要素のうちの単一の要素、または２つもしくはそれよりも多くの要素の組合せを指す。本明細書で使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」は、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」を意味する。したがって、「ＡまたはＢを含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ　Ａ　ｏｒ　Ｂ）」は、「Ａ、Ｂ、またはＡおよびＢを含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ　Ａ，　Ｂ，　ｏｒ　Ａ　ａｎｄ　Ｂ）」を意味し、追加的な要素は除外されない。別段の指定のない限り、組成物に関して示される分子量または分子質量の値、または割合は全て、おおよそであり、記述的目的のために提供されることがさらに理解されるべきである。本明細書で言及されるＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）受託番号の日付は、少なくとも早ければ２０２１年４月５日時点で入手可能な配列のものである。本明細書において引用されている参考文献、特許出願および刊行物、ならびにＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）受託番号は全て、参照により組み込まれる。別段の指定のない限り、「約」は、５パーセント以内を示す。矛盾する場合は、用語の説明を含む本明細書が支配する。本開示の様々な態様の検討を容易にするために、特定の用語について次の説明を示す：

【００２８】

酸性プロテアーゼ：ペプチド結合を切断する酵素であって、酸性ｐＨにおいて、ペプチド結合を切断する活性が増加する、酵素。例えばであって限定するものではないが、酸性プロテアーゼには、ペプシンおよびトリプシンが含まれ得る。

【００２９】

投与：選択された経路による被験体への組成物（例えば、ＭＢＶまたはＭＢＶを含む薬学的調製物等）の導入。経路は、局所的または全身性であってよい。例えば、選択された経路が静脈内である場合、組成物は、組成物を被験体の静脈に導入することにより投与される。選択された経路が局所的である場合、組成物は、組成物を被験体の組織に直接導入することにより投与することができる。

【００３０】

動物：生きている多細胞脊椎生物。このカテゴリーには、例えば、哺乳動物および鳥類が含まれる。用語「哺乳動物」は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方を含む。同様に、用語「被験体」は、ヒトおよび獣医学的被験体の両方を含む。

【００３１】
生体適合性：哺乳動物被験体に植え込まれたときに、被験体における有害応答を誘発しない、いずれかの材料。生体適合性材料は、個体に導入されたときに、その意図される機能を発揮することができ、該個体にとって有毒または傷害性でなく、その被験体におけるその材料の免疫学的拒絶を誘導することもない。
【００３２】
遠心分離：混合物に遠心力が加えられ、それにより、混合物のより高密度の構成成分が、混合物中の他のより低密度の構成成分と比べて遠心分離の軸から離れて移動する過程。混合物に加えられる力は、遠心分離ローターのスピードおよびスピン半径の関数である。大部分の適用では、スピンの力は、遠心管の底に集まる沈殿物（ペレット）をもたらし、残っている溶液は、「上澄み」または「上清」と適宜呼ばれる。他の同様の適用では、密度に基づく分離または「勾配遠心分離」技法は、所望の構成成分よりも高密度およびより低密度の両方の構成成分を含有する混合物からの特定の種の単離に使用される。
【００３３】
遠心分離ローターの円運動において、加えられる力は、スピンの半径および角速度の積であり、この力は、伝統的に、地表における重力による標準加速である「ｇ」に対応する加速と表される。加えられる遠心力は、「相対遠心力」（ＲＣＦ）と命名され、「ｇ」の倍数で表される。
【００３４】
粉砕する（Ｃｏｍｍｉｎｕｔｅ）（粉砕（ｃｏｍｍｉｎｕｔｉｏｎ）および粉砕すること（ｃｏｍｍｉｎｕｔｉｎｇ））：すりつぶすこと、ブレンドすること、破砕すること、薄切りにすること、製粉すること、または切ることによるものを含むがこれらに限定されない、大きな粒子をより小さな粒子に縮小するプロセス。ＥＣＭを粉砕することができると同時に、湿潤化形態、凍結形態、風乾形態、凍結乾燥形態、粉末化形態、またはシート形態を含むがこれらに限定されない、任意の形態にすることができる。「粉砕されたＥＣＭ」は、インタクトなコラーゲンを包含する。粉砕されたＥＣＭは、超音波、または、例えば酸性プロテアーゼ等のプロテアーゼを用いた酵素消化に供されていない。
【００３５】
接触：固体または液体の形態であってよい、直接的に物理会合した配置。
【００３６】
サイトカイン：用語「サイトカイン」は、ナノからピコモル濃度で体液性調節因子として作用し、正常または病理学的条件下のいずれかで、個々の細胞および組織の機能活性をモジュレートする可溶性タンパク質およびペプチドの多様な群の総称として使用される。このようなタンパク質は、また、直接的に細胞間の相互作用を媒介し、細胞外環境で起こる過程を調節する。サイトカインの例として、腫瘍壊死因子－α、インターロイキン（ＩＬ）－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、トランスフォーミング成長因子およびインターフェロン－γが挙げられるがこれらに限定されない。
【００３７】
診断：疾患をその徴候、症状および様々な検査の結果から同定するプロセス。そのプロセスによって到達した結論も「診断」と称される。一般に実施される診断検査の形態としては、限定するものではないが、血液検査、医用画像、および生検が挙げられる。
【００３８】
富化される：混合物中にあるナノベシクル等の目的の構成成分が、富化過程前と比較して、富化過程後に、該混合物中の他の構成成分の量に対する該構成成分の量の増加した比を有する過程。
【００３９】
細胞外マトリックス（ＥＣＭ）：組織内の細胞を囲みこれを支持する、構造タンパク質、特殊化タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンおよび成長因子が挙げられるがこれらに限定されない、構造的かつ機能的生体分子および／または生体高分子の複合混合物であり、他に断りがなければ、無細胞である。ＥＣＭ調製物は、本明細書に記載

されている本技術分野で公知のプロセスにより供給源組織から細胞が除去されたことを意味する、「脱細胞化された」または「無細胞である」とみなすことができる。「ＥＣＭ由来ナノベシクル」、「マトリックス結合ナノベシクル」、「ＭＢＶ」または「ＥＣＭに由来するナノベシクル」等、「ＥＣＭ由来材料」とは、天然ＥＣＭまたは培養細胞によってＥＣＭが産生されるｉｎ　ｖｉｔｒｏ供給源から調製されたナノベシクルを意味する。「インタクトな細胞外マトリックス」および「インタクトなＥＣＭ」とは、限定するものではないが、本明細書に記載の粉砕されたＥＣＭ等の、コラーゲン、エラスチン、ラミニン、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、抗菌薬、化学誘引物質、サイトカイン、および増殖因子を含むがこれらに限定されない、細胞外マトリックスの構造的および非構造的生体分子の活性を保持する細胞外マトリックスを指す。ＥＣＭ内の生体分子の活性は、例えば、ＥＣＭの架橋結合および／または透析により、化学的にまたは機械的に除去することができる。インタクトなＥＣＭは、酵素的ＥＣＭヒドロゲルの作製における可溶化の前に、本質的に架橋および／または透析されていない、つまり、ＥＣＭは、透析および／もしくは架橋結合プロセス、またはＥＣＭの保存および取扱いの間に天然に起こるプロセス以外の条件に供されていない。したがって、実質的に架橋および／または透析された（本明細書に記載のＥＣＭの使用においてＥＣＭのゲル化および機能的特徴に実質的に影響を及ぼさない通常の様式以外で）ＥＣＭは、「インタクト」とはみなされない。

【００４０】

外因性：異なる供給源を起源とする。外因性ＭＢＶは、別々に産生、例えば、ＥＣＭ供給源から抽出され、ＥＣＭヒドロゲルに添加される。このＥＣＭヒドロゲル中には内因性ＭＢＶが存在していても存在していなくてもよい。外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲルの作製に使用されるＥＣＭと同じ組織に由来してもよく、異なる組織に由来してもよい。外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲルの作製に使用されるＥＣＭと同じ種に由来してもよく、または異なる種に由来してもよい。

【００４１】

ゲル：液体および固体の間の物質の状態であり、一般に、液体媒体において膨張した架橋されたポリマーネットワークとして定義される。典型的には、ゲルは、固体および液体の両方を含有する二相コロイド分散であり、固体の量は、「ゾル」と称される二相コロイド分散におけるものよりも大きい。したがって、「ゲル」は、液体の特性の一部（すなわち、形状が、弾力がありかつ変形可能である）および固体の特性の一部（例えば、形状が、二次元表面における三次元の維持に十分なほど別々である）を有する。「ゲル時間」とも称される「ゲル化時間」は、組成物が、適度なストレス下で非流動性になるのにかかる時間を指す。

【００４２】

ゲル化：ゾルからのゲルの形成。

【００４３】

ヒドロゲル：水が分散媒である、親水性であり、時にはコロイドゲルとして見出されるポリマー鎖のネットワーク。ヒドロゲルは、吸収性が高い天然または合成ポリマーネットワークである。ヒドロゲルはまた、天然組織と類似する程度の柔軟性も有する。「音響的」ヒドロゲル、例えば音響的ＥＣＭヒドロゲルは、超音波エネルギーを使用して産生される。これらのヒドロゲルの特徴は本明細書に開示される。ヒドロゲルに関しては、Ｇ’（貯蔵弾性率）は、典型的には、Ｇ’’（損失弾性率）よりも約１桁分だけ大きい。「酵素的」ＥＣＭヒドロゲルは、酵素消化されたＥＣＭによって産生される。酵素的ヒドロゲルの粘度は、約３７℃に近づく生理的温度に温めると増加する。例えば、酵素的ヒドロゲルは、注射液から３７℃未満の温度で形成され、それが３７℃の生理的温度でゲルを形成する。

【００４４】

炎症：炎症は、炎症性物質を隔離する機能を果たす、組織に対する傷害によって誘発される局在化した防御応答である。炎症は、病原体、損傷した細胞、または刺激物等の有害な刺激に対する血管組織の複雑な生物学的応答によって調整される。炎症は、傷害性刺激

を取り除くためならびに組織の治癒過程を開始するための生物による保護的試みである。炎症反応は、白血球が全身的、または炎症部位において局所的のいずれかで蓄積することを特徴とする。炎症反応は、白血球の数、多形核好中球（ＰＭＮ）の数、ＰＭＮ活性化の程度の尺度、例えば、ルミノール増強化学発光、または存在するサイトカインの量の尺度を測定することを含むがこれらに限定されない、多くの方法によって測定することができる。Ｃ反応性タンパク質は全身性炎症反応のマーカーである。

【００４５】

炎症性障害は、炎症により正常なまたは通常の生理機能が妨害される障害の属である。炎症性障害は、自己免疫障害（内因性抗原に対する不適切な炎症反応）、および外傷または外因性抗原に起因する炎症によって引き起こされる障害等の種々の状態を含んでよい。一次炎症性障害は、炎症自体によって引き起こされる疾患または障害である。二次炎症性障害は、別の障害の結果である炎症である。炎症は、炎症性障害、例えば、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）に至る可能性がある。

【００４６】

一部の態様では、炎症性疾患または障害、例えばＡＲＤＳを処置するために抗炎症薬を投与する。抗炎症薬としては、限定するものではないが、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ、例えば、アスピリン、イブプロフェン、およびナプロキセン）、抗ロイコトリエン薬、免疫選択的抗炎症性誘導体（ＩｍＳＡＩＤ）、生物活性化合物、ステロイド（例えば、コルチコステロイド等）、およびオピオイドが挙げられる。

【００４７】

単離された：「単離された」生物学的構成成分（核酸、タンパク質、細胞またはナノベシクル等）は、構成成分が天然に発生する場合の、生物の細胞における他の生物学的構成成分またはＥＣＭから離れて実質的に分離または精製されている。「単離された」核酸およびタンパク質は、標準精製方法によって精製された核酸およびタンパク質を含む。単離されたＭＢＶは、ＥＣＭの線維性材料から除去される。この用語は、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質ならびに化学合成された核酸も包含する。

【００４８】

等張性緩衝溶液：７．２～７．８の間のｐＨに緩衝され、等張性環境を促進するために平衡濃度の塩を有する溶液。

【００４９】

リシルオキシダーゼ（Ｌｏｘ）：コラーゲンおよびエラスチン前駆体におけるリシン残基からのアルデヒドの形成を触媒する銅依存性酵素。これらのアルデヒドは、反応性が高く、他のリシルオキシダーゼ由来アルデヒド残基と、または修飾されていないリシン残基と、自発的に化学反応する。ｉｎ　ｖｉｖｏでは、これによりコラーゲンおよびエラスチンの架橋結合がもたらされ、それがコラーゲン原線維の安定化において、ならびに成熟エラスチンの完全性および弾性のために役割を果たす。複雑な架橋結合がコラーゲン（３つのリシン残基から誘導されたピリジノリン）において、およびエラスチン（４つのリシン残基から誘導されたデスモシン）において形成され、これらは構造が異なる。Ｌｏｘ酵素をコードする遺伝子は、種々の生物からクローニングされている（Hamalainen et al., Genomics 11: 508, 1991；Trackman et al., Biochemistry 29: 4863, 1990；参照により本明細書に組み込まれる）。ヒトリシルオキシダーゼの配列の残基１５３～４１７および残基２０１～４１７が触媒機能のために重要であることが示されている。４種のＬｏｘ様アイソフォームが存在し、ＬｏｘＬ１、ＬｏｘＬ２、ＬｏｘＬ３およびＬｏｘＬ４と称される。

【００５０】

マクロファージ：細胞デブリ、異物、微生物およびがん細胞を貪食および分解する白血球細胞の１種。貪食におけるその役割に加えて、この細胞は、発生、組織維持および修復における、ならびにリンパ球等の免疫細胞を含む他の細胞を動員し影響を与えるという点から自然免疫および適応免疫の両方における重要な役割を果たす。マクロファージは、Ｍ

１およびＭ２と称されてきた表現型を含む、多くの表現型で存在し得る。主に炎症促進性の機能を果たすマクロファージは、Ｍ１マクロファージ（ＣＤ８６＋／ＣＤ６８＋）と呼ばれる一方、炎症を減少させ、組織修復を助長および調節するマクロファージは、Ｍ２マクロファージ（ＣＤ２０６＋／ＣＤ６８＋）と呼ばれる。マクロファージの様々な表現型を同定するマーカーは、種の間で異なる。マクロファージ表現型が、Ｍ１の端からＭ２の端に及ぶスペクトルによって表されることに留意されたい。Ｆ４／８０（接着性Ｇタンパク質共役型受容体Ｅ１（ＡＤＧＲＥ１）遺伝子によってコードされる）は、マクロファージマーカーである。どちらも参照により本明細書に組み込まれるＧＥＮＢＡＮＫ（登録商標）受託番号ＮＰ＿００１２４３１８１．１、２０１８年４月６日、およびＮＰ＿００１９６５、２０１８年３月５日を参照されたい。理論に束縛されることを望むものではないが、ＭＢＶは、マクロファージの表現型をモジュレートし、これによりＭ２様、調節性、またはリモデリング促進マクロファージの増加をもたらす能力を有すると考えられる。ＭＢＶのマクロファージに対する効果は、その全体が参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ公開第ＷＯ２０１７／１５１８６２Ａ１号においてさらに特徴付けられている。一部の態様では、本発明のＭＢＶを使用して、被験体におけるマクロファージのＭ２表現型を誘導し、Ｍ１マクロファージを阻害することができる。

【００５１】

マイクロＲＮＡ：典型的には、標的ｍＲＮＡ翻訳を抑圧することにより遺伝子発現を転写後調節する、約１７～約２５ヌクレオチド塩基の長さの小分子非コードＲＮＡ。より大量の特異的ｍｉＲＮＡが、より低レベルの標的遺伝子発現と相関することになるように、マイクロＲＮＡ（「ｍｉＲＮＡ」または「ｍｉＲ」）は、負の調節因子として機能することができる。３つの型のｍｉＲＮＡ、一次ｍｉＲＮＡ（ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ）、未熟ｍｉＲＮＡ（ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ）および成熟ｍｉＲＮＡが存在する。一次ｍｉＲＮＡ（ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ）は、約数百塩基～１ｋｂ超のステムループ構造の転写物として発現される。ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ転写物は、ステムループの基部付近のステムの両方の鎖を切断するドローシャと呼ばれるＲＮａｓｅ　ＩＩエンドヌクレアーゼによって、核内で切断される。ドローシャは、ずらした（ｓｔａｇｇｅｒｅｄ）カットでＲＮＡ二重鎖を切断し、５’リン酸および３’端における２ヌクレオチドオーバーハングを残す。切断産物である、未熟ｍｉＲＮＡ（ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ）は、折り返し（ｆｏｌｄ-ｂａｃｋ）様式で形成されたヘアピン構造を有する、約６０～約１１０ヌクレオチド長である。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、Ｒａｎ－ＧＴＰおよびエキスポーチン－５によって核から細胞質へと輸送される。ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡは、ダイサーと呼ばれる別のＲＮａｓｅ　ＩＩエンドヌクレアーゼによって、細胞質においてさらにプロセシングされる。ダイサーは、５’リン酸および３’オーバーハングを認識し、ステムループジャンクションにおいてループを切断除去して、ｍｉＲＮＡ二重鎖を形成する。ｍｉＲＮＡ二重鎖は、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）に結合し、そこで、アンチセンス鎖が優先的に分解され、センス鎖成熟ｍｉＲＮＡが、その標的部位へとＲＩＳＣを方向づける。生物学的に活性型のｍｉＲＮＡは成熟ｍｉＲＮＡであり、これは約１７～約２５ヌクレオチドの長さである。

【００５２】

ナノベシクル：直径約１０～約１，０００ｎｍのナノ粒子である細胞外小胞。ナノベシクルは、他の分子の中でも生物学的に活性なシグナル伝達分子（例えば、マイクロＲＮＡ、タンパク質）を保有する脂質膜結合した粒子である。一般に、ナノベシクルは、脂質二重層によって境界を定められ、生物学的分子が、二重層に封入されるおよび／または包埋され得る。よって、ナノベシクルは、原形質膜によって囲まれた内腔を含む。異なる種類の小胞は、直径、細胞下起源、密度、形状、沈降速度、脂質組成、タンパク質マーカー、核酸含量および細胞外マトリックス由来または分泌された等の起源に基づき区別することができる。ナノベシクルは、ＥＣＭ由来のマトリックス結合ナノベシクル（上述を参照）等、その起源および／またはｍｉＲ含量により同定することができる。

【００５３】

「エキソソーム」または「液相細胞外ベシクル（ＥＶ）」は、細胞によって分泌される

膜小胞であり、直径は１０～１５０ｎｍにわたる。一般に、後期エンドソームまたは多小胞体は、内向きの出芽および限定されたエンドソーム膜からこのような封入された小胞への小胞の切断によって形成された内腔内（intralumenal）小胞を含有する。続いて、このような内腔内小胞は、原形質膜との融合後のエキソサイトーシスにおいて、多小胞体内腔から細胞外環境、典型的には血液、脳脊髄液または唾液等の体液へと放出される。エキソソームは、膜のセグメントが陥入し、形質膜陥入されると、細胞内で作製される。より小型の小胞へと破壊され、最終的に細胞から排出される、内部移行されたセグメントは、タンパク質、ならびにｍＲＮＡおよびｍｉＲＮＡ等のＲＮＡ分子を含有する。血漿由来エキソソームの大部分は、リボソームＲＮＡを欠如する。細胞外マトリックス由来エキソソームは、特異的ｍｉＲＮＡおよびタンパク質構成成分を含み、血液、尿、唾液、精液および脳脊髄液等、実質的に全ての体液に存在することが示されてきた。エキソソームは、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ６３、ＣＤ８１、および／またはＣＤ９を発現し得、したがって、ＣＤ１１ｃ$^{+}$および／またはＣＤ６３$^{+}$および／またはＣ８１$^{+}$および／またはＣＤ９$^{+}$であり得る。エキソソームは、それらの表面上に高レベルのリシルオキシダーゼを有さない。

【００５４】

「ＥＣＭに由来するナノベシクル」、「マトリックス結合ナノベシクル」、「ＭＢＶ」または「ＥＣＭ由来ナノベシクル」は全て、細胞挙動に影響するタンパク質、脂質、核酸、増殖因子およびサイトカイン等、生物学的に活性なシグナル伝達分子を含有する、細胞外マトリックスに存在する、サイズが１０ｎｍ～１０００ｎｍにわたる同じ膜結合粒子を指す。これらの用語は、互換的であり、同じベシクルを指す。これらのナノベシクルは、ＥＣＭ内に包埋され、これに結合されており、表面に単に付着しているのでも体液中を自由に循環しているのでもない。これらのナノベシクルは、凍結融解、ならびにペプシン、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、プロテイナーゼＫ、およびコラゲナーゼ等のプロテアーゼによる消化、ならびに洗剤による消化等、厳しい単離条件に対して抵抗性である。ＭＢＶは、エキソソームを含む他の細胞外ベシクルとは別個であり、エキソソームとは別個のリン脂質組成を有する。ＭＢＶは、骨マトリックスベシクルとは別個であり、アルカリホスファターゼを発現しない。ある特定の状況では、ＭＢＶはまた、一般にエキソソームが持つと考えられるある特定のマーカーが存在しないことに基づいて、エキソソームとは区別され得る。

【００５５】

一部の態様では、ＭＢＶは、タンパク質発現または脂質含量の以下の特色のうちの１つまたは複数を特徴とする：

（ｉ）ＭＢＶは、ＣＤ６３および／もしくはＣＤ８１および／もしくはＣＤ９のうちの１つもしくは複数を発現しないか、またはエキソソーム等の他のベシクルと比較して低レベルもしくはかろうじて検出可能なレベルのＣＤ６３および／もしくはＣＤ８１および／もしくはＣＤ９（ＣＤ６３^{lo}および／もしくはＣＤ８１^{lo}および／もしくはＣＤ９^{lo}）を有し得る（例えば、実施例１を参照されたい）。ＭＢＶにおけるＣＤ６３および／またはＣＤ８１および／またはＣＤ９の低発現、かろうじて検出可能な発現、または発現の非存在を区別するために、種々の方法、例えば、ウエスタンブロッティングまたはフローサイトメトリー等の抗体に基づく方法を使用することができる（例えば、Bashashati and Brinkman, Adv Bioinformatics, 2009: 584603を参照されたい）。一部の態様では、ＣＤ６３および／またはＣＤ８１および／またはＣＤ９のＭＢＶにおける発現は、ＭＢＶにおけるＣＤ６３および／またはＣＤ８１および／またはＣＤ９の発現が、エキソソーム等の他のベシクルの平均発現を少なくとも１標準偏差または少なくとも２標準偏差下回る場合に、他のベシクルと比較して低いまたはかろうじて検出可能であるとみなされる；

（ｉｉ）ＭＢＶが、総リン脂質の少なくとも５５％が、ホスファチジルコリン（ＰＣ）とホスファチジルイノシトール（ＰＩ）の組合せで構成されるリン脂質含量を有する；

（ｉｉｉ）ＭＢＶが、総リン脂質の１０％またはそれ未満がスフィンゴミエリン（ＳＭ）で構成されるリン脂質含量を有する；

（ｉｖ）ＭＢＶが、総リン脂質の２０％またはそれ未満がホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）で構成されるリン脂質含量を有する；
（ｖ）ＭＢＶが、総リン脂質含量の１５％またはそれよりも多くがホスファチジルイノシトール（ＰＩ）で構成されるリン脂質含量を有する
ここで、パーセントは脂質濃度に対するパーセントを表す。

【００５６】

一部の態様では、ＭＢＶは、以下の特色の全てを特徴とする：
（ｉ）ＣＤ６３および／もしくはＣＤ８１および／もしくはＣＤ９のうちの１つもしくは複数を発現しないか、または低レベルもしくはかろうじて検出可能なレベルのＣＤ６３および／もしくはＣＤ８１および／もしくはＣＤ９（ＣＤ６３^{lo}および／もしくはＣＤ８１^{lo}および／もしくはＣＤ９^{lo}）を有する（上でさらに記載されている通り）；
（ｉｉ）総リン脂質の少なくとも５５％が、ホスファチジルコリン（ＰＣ）とホスファチジルイノシトール（ＰＩ）の組合せで構成されるリン脂質含量；
（ｉｉｉ）総リン脂質の１０％またはそれ未満がスフィンゴミエリン（ＳＭ）で構成されるリン脂質含量；
（ｉｖ）総リン脂質の２０％またはそれ未満がホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）で構成されるリン脂質含量；ならびに
（ｖ）総リン脂質含量の１５％またはそれよりも多くがホスファチジルイノシトール（ＰＩ）であるリン脂質含量。

【００５７】

一部の態様では、ＭＢＶは、以下の特色の全てを特徴とする：
（ｉ）総リン脂質の少なくとも５５％が、ホスファチジルコリン（ＰＣ）とホスファチジルイノシトール（ＰＩ）の組合せで構成されるリン脂質含量；
（ｉｉ）総リン脂質の１０％またはそれ未満がスフィンゴミエリン（ＳＭ）で構成されるリン脂質含量；
（ｉｉｉ）総リン脂質の２０％またはそれ未満がホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）で構成されるリン脂質含量；および
（ｉｖ）総リン脂質含量の１５％またはそれよりも多くがホスファチジルイノシトール（ＰＩ）であるリン脂質含量。

【００５８】

一部の態様では、ＭＢＶは、以下の特色のうちの１つまたは複数を特徴とする：
（ｉ）総リン脂質の少なくとも５５％が、ホスファチジルコリン（ＰＣ）とホスファチジルイノシトール（ＰＩ）の組合せで構成されるリン脂質含量；
（ｉｉ）総リン脂質の１０％またはそれ未満がスフィンゴミエリン（ＳＭ）で構成されるリン脂質含量；
（ｉｉｉ）総リン脂質の２０％またはそれ未満がホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）で構成されるリン脂質含量；および
（ｉｖ）総リン脂質含量の１５％またはそれよりも多くがホスファチジルイノシトール（ＰＩ）であるリン脂質含量。

【００５９】

一部の態様では、ＭＢＶは、以下の特色のうちの１つまたは複数を特徴とする：
（ｉ）検出可能なレベルのアルカリホスファターゼを含有しない；
（ｉｉ）検出可能なレベルのオステオポンチンを含有しない；
（ｉｉｉ）検出可能なレベルのオステオプロテゲリン（osteoprogeterin）を含有しない；
（ｉｖ）検出可能なレベルの補体Ｃ５を含有しない；かつ／または
（ｖ）検出可能なレベルのＣ反応性タンパク質を含有しない。

【００６０】

一部の態様では、ＭＢＶは、ＩＬ３３を含有し、ＩＬ３３$^{+}$である。

【００６１】

ＭＢＶが単離されるＥＣＭは、組織由来のＥＣＭであってもよく、培養下の細胞によって産生されたものであってもよく、商業的な供給源からから購入したものであってもよい。

【００６２】

薬学的に許容されるキャリア：特許請求された薬学的調製物に有用な薬学的に許容されるキャリアは従来のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences、E. W. Martin著、Mack Publishing Co.、Easton, PA、第１５版、１９７５年は、本明細書に開示された融合タンパク質の医薬品送達に適した組成物および製剤について記載する。

【００６３】

一般に、キャリアの性質は、用いられる特定の投与機序に依存する。例えば、非経口的製剤は通常、ビヒクルとして水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロール等、薬学的にかつ生理学的に許容される流体などを含む注射用流体を含む。固体組成物（例えば、粉剤・散剤（powder）、丸剤、錠剤またはカプセル剤の形態）のため、従来の無毒固体キャリアは、例えば、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムを含むことができる。生物学的に中性のキャリアに加えて、投与されるべき医薬調製物は、湿潤剤または乳化剤、保存料およびｐＨ緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはモノラウリン酸ソルビタン等、少量の無毒性補助物質を含有することができる。

【００６４】

医薬品：被験体または細胞に適切に投与された場合に所望の治療効果または予防効果を誘導することが可能な化学化合物または組成物。

【００６５】

リン脂質：２つの疎水性脂肪酸尾部と、リン酸基からなる親水性頭部とからなる構造を有する脂質のクラス。リン脂質の主要なクラスとして、ホスファチジルコリン（ＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、ホスファチジルイノシトール（ＰＩ）、ホスファチジルセリン（ＰＳ）、ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）、スフィンゴミエリン（ＳＭ）、カルジオリピン（ＣＬ）、ホスファチジン酸（ＰＡ）、およびビス－モノアシルグリセロホスフェート（ＢＭＰ）が挙げられる。リン脂質は、様々な方法で測定することができる。例えば、液体クロマトグラフィー－質量分析（ＬＣ－ＭＳ）に基づく網羅的リピドミクスおよび酸化還元リピドミクスを使用することができる。一部の態様では、特定のリン脂質含量は、総リン脂質（例えば、ＭＢＶ中の総リン脂質等）に対するパーセント濃度として示され、ここで、パーセント濃度は重量／重量（ｗ／ｗ）である。

【００６６】

ポリヌクレオチド：任意の長さの核酸配列（例えば、直鎖状配列等）。したがって、ポリヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドを包含し、染色体に見出される遺伝子配列も包含する。「オリゴヌクレオチド」は、ネイティブホスホジエステル結合によって連結した、複数の連結したヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、６ヌクレオチド～３００ヌクレオチドの間の長さのポリヌクレオチドである。オリゴヌクレオチド類似体は、オリゴヌクレオチドと同様に機能するが、天然に存在しない部分を有する部分を指す。例えば、オリゴヌクレオチド類似体は、変更された糖部分、またはホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド等の糖間連結等、天然に存在しない部分を含有し得る。天然に存在するポリヌクレオチドの機能的な類似体は、ＲＮＡまたはＤＮＡに結合することができ、ペプチド核酸（ＰＮＡ）分子を包含する。

【００６７】

予防：本明細書で使用される場合、疾患または障害が生じるのを防止するために設計され、使用される薬物または処置を指す。本明細書で使用される場合、用語「予防」および「防止」は、互換的に使用される。

【００６８】

精製された：用語「精製された」は、絶対純度を必要とするものではなく、相対的な用

語として意図されている。したがって、例えば、精製された核酸分子調製物は、言及される核酸が細胞内のその天然の環境の核酸よりも純粋である調製物である。例えば、核酸の調製物は、核酸が調製物の総タンパク質含量の少なくとも５０％に相当するように精製される。同様に、精製されたＭＢＶ調製物は、エキソソームが細胞を含む環境よりも純粋である調製物であり、細胞を含む環境にはマイクロベシクルおよびエキソソームが存在する。核酸またはＭＢＶの精製された集団は、約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％もしくは１００％を超えて純粋であるか、またはそれぞれ他の核酸もしくは細胞構成成分を含まない。

【００６９】

疾患の防止または処置：疾患の「防止」は、例えば疾患の素因を有することが分かっている人における疾患の発症を阻害することを指す。公知の素因を有する人の例は、疾患の家族歴を有する人、または対象に状態の素因を与える因子に曝露された人である。「処置」は、発症し始めた後の疾患または病理学的状態の徴候または症状を好転させる治療介入を指す。

【００７０】

可溶化ＥＣＭ：超音波キャビテーションまたは酵素消化により処理され、これにより、例えば、それぞれタンパク質凝集体の物理的破壊または消化による微小構造変化が引き起こされたＥＣＭ。

【００７１】

被験体：ヒト、ならびに、全ての脊椎動物、例えば哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、マウス、ウサギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、および爬虫類を含む非ヒト動物。当該記載の方法の一部の態様では、被験体は、ヒトである。「被験体」は、用語「患者」と互換的に使用される。被験体は、疾患もしくは障害、例えば、感染性疾患もしくは障害が発症するリスクが高いと診断された個体（例えば、免疫無防備状態の個体、医療従事者）、疾患もしくは障害、例えば、感染性疾患もしくは障害と診断された人、以前に疾患もしくは障害、例えば、感染性疾患もしくは障害に罹患した人、または疾患もしくは障害、例えば、感染性疾患もしくは障害の症状もしくは兆候について評価された個体であり得る。

【００７２】

治療有効量：処置される被験体の所望の効果の達成に十分な、ＭＢＶ等の特定の物質の数量。被験体に投与された場合に、所望のｉｎ　ｖｉｔｒｏ効果を達成することが示された標的組織濃度（例えば、肺における）を達成する投薬量が一般に使用される。

【００７３】

熱可逆性ヒドロゲル：ポリマー鎖の絡み合いに起因して形成されるヒドロゲルであり、特徴的なゲル化温度で粘度が変化する。本開示の音響的ＥＣＭヒドロゲルは、冷却するとゲル化（ゾルからゲルへの転移）を示す熱可逆性ヒドロゲルである。

【００７４】

外用適用：外用適用される薬剤は、特定の領域のみに適用され、全身には適用されない。特定の例では、組成物は、皮膚または眼に、止血が望まれる領域内に適用される。例えば、薬学的組成物を外用調製物として創傷、例えば、上皮創傷または欠損、例えば、外傷性創傷または手術創、例えば、皮膚または角膜擦過傷または外科的切開に適用することができる。

【００７５】

総リン脂質含量：「総リン脂質」または「総リン脂質含量」は、ＭＢＶに関して本明細書で使用される場合、所与の数量の単離されたＭＢＶ、すなわち、ＥＣＭから単離されたＭＢＶに存在する全てのリン脂質の合計を指す。ＭＢＶは、例えば、脱細胞化されたＥＣＭの酵素消化および分別遠心法によって単離することができる。総リン脂質含量は、ＬＣ－ＭＳに基づく網羅的リピドミクスおよび酸化還元リピドミクス等の方法によって決定することができる。総リン脂質含量は重量で測定される。総リン脂質含量に対するパーセンテージは、重量／重量ベースのパーセント濃度を指す

【００７６】
移植：それを必要とする被験体へのＭＢＶ等の生体適合性基材の配置。
【００７７】
処置すること（ｔｒｅａｔｉｎｇ）、処置（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）、および治療（ｔｈｅｒａｐｙ）：症状の緩和、寛解、軽減もしくは状態を患者がより耐えられるようにすること、変性もしくは減退を緩徐化すること、変性の最終点を衰弱の程度がより低いものにすること、または被験体の身体的もしくは精神的福祉を改善すること等、あらゆる客観的または主観的パラメータを含む、傷害、病理または状態の減弱または好転に関するあらゆる成功または成功の兆候。処置は、身体検査、神経学的検査、または精神医学的評価の結果を含む、客観的または主観的パラメータによって評価することができる。
【００７８】
超音波処理：周波数が２０ｋＨｚよりも高い超音波に曝露するプロセス。
【００７９】
概要
一部の態様では、ａ）可溶化細胞外マトリックスと；ｂ）細胞外マトリックスに由来する外因性マトリックス結合ナノベシクル（ＭＢＶ）であって、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない、ＭＢＶとを含む細胞外マトリックス（ＥＣＭ）ヒドロゲルを含む組成物が開示される。外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍｇ／ｍＬ未満の濃度で存在する。例えば、ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり少なくとも約１×１０^{5}～約１×１０^{20}個の粒子の濃度で存在し得る。別の例では、ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約１×１０^{6}～約１×１０^{12}個の粒子の濃度で存在し得る。
【００８０】
一部の態様では、ａ）可溶化細胞外マトリックスと；ｂ）細胞外マトリックスに由来する外因性マトリックス結合ナノベシクル（ＭＢＶ）であって、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない、ＭＢＶとを含む細胞外マトリックス（ＥＣＭ）ヒドロゲルを含む組成物が開示される。外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍｇ／ｍＬ未満の濃度で存在する。例えば、ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり少なくとも約１×１０^{5}～約１×１０^{20}個の粒子の濃度で存在し得る。一部の態様では、組成物は、以下の特色のうちの１つまたは複数を有する：ｉ）ずり減粘である；ｉｉ）約５０Ｐａ～約２００Ｐａの貯蔵弾性率（Ｇ’）、および約５Ｐａ～約２０Ｐａの損失弾性率（Ｇ’’）を有し、３７℃におけるＧ’のＧ’’に対する比が、約４：１～約１５：１である、かつ／または、ｉｉｉ）２４時間～１４日の５０％分解速度を有する。
【００８１】
一部の態様では、ａ）可溶化細胞外マトリックスと；ｂ）細胞外マトリックスに由来する外因性マトリックス結合ナノベシクル（ＭＢＶ）であって、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない、ＭＢＶとを含む細胞外マトリックス（ＥＣＭ）ヒドロゲルを含む組成物が開示される。外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍｇ／ｍＬ未満の濃度で存在する。例えば、ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり少なくとも約１×１０^{5}～約１×１０^{20}個の粒子の濃度で存在し得る。一部の態様では、組成物は、ｉ）ずり減粘であり；ｉｉ）約５０Ｐａ～約２００Ｐａの貯蔵弾性率（Ｇ’）、および約５Ｐａ～約２０Ｐａの損失弾性率（Ｇ’’）を有し、３７℃におけるＧ’のＧ’’に対する比が、約４：１～約１５：１であり、かつ、ｉｉｉ）２４時間～１４日の５０％分解速度を有する。一部の態様では、ＥＣＭヒドロゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、１ｍｇ／ｍＬ～５００ｍｇ／ｍＬの間である。一部の態様では、ＥＣＭヒドロゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、１ｍｇ／ｍＬ～４００ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～３５０ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～３００ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～２５０ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～２００ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～１５０ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍ

Ｌ、または１ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ、または５ｍｇ／ｍＬ～２５０ｍｇ／ｍＬ、または２０ｍｇ／ｍＬ～２００ｍｇ／ｍＬ、または５ｍｇ／ｍＬ～２００ｍｇ／ｍＬ、または５ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍＬである。さらなる態様では、ＥＣＭヒドロゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、約５ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌの間、例えば、約１０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、約２０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、約３０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、約４０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、約５ｍｇ／ｍｌ～約４０ｍｇ／ｍｌ、約５ｍｇ／ｍｌ～約３０ｍｇ／ｍｌ、約５ｍｇ／ｍｌ～約２０ｍｇ／ｍｇ、または約５ｍｇ／ｍｌ～約１０ｍｇ／ｍｌである。ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、または５００ｍｇ／ｍｌの濃度で含有し得る。非限定的な一例では、ＥＣＭヒドロゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、１０ｍｇ／ｍＬ～３０ｍｇ／ｍＬの間である。非限定的な一例では、ＥＣＭヒドロゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、４ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬの間である。一部の態様では、ＥＣＭヒドロゲルまたは可溶化ＥＣＭ中のＥＣＭは、約５～約１００ｍｇ／ｍＬ、例えば、５０～１００ｍｇ／ｍＬ、２５～７５ｍｇ／ｍＬ、６０～８０ｍｇ／ｍＬ、４０～６０ｍｇ／ｍＬ、５０～８０ｍｇ／ｍＬ、または約３０～約６０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在する。

【００８２】

一部の態様では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約1×10^{5}～約1×10^{18}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{5}～約1×10^{16}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{5}～約1×10^{14}個の粒子、または例えば１ｍＬ当たり約1×10^{5}～約1×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。一部の態様では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約1×10^{6}～約1×10^{20}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{6}～約1×10^{18}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{6}～約1×10^{16}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{6}～約1×10^{14}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{6}～約1×10^{12}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{7}～約1×10^{12}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{7}～約1×10^{11}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{8}～約1×10^{12}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{8}～約1×10^{11}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{9}～約1×10^{12}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{9}～約1×10^{11}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{10}～約1×10^{12}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{10}～約1×10^{11}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{11}～約1×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。非限定的な一例では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約1×10^{8}～1×10^{11}個の粒子の濃度で存在する。非限定的な一例では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約1×10^{5}～1×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。非限定的な一例では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約1×10^{6}～1×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。一部の態様では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約1×10^{6}個、約1×10^{7}個、約1×10^{8}個、約1×10^{9}個、約1×10^{10}個、約1×10^{11}個、約1×10^{12}個、約1×10^{14}個、約1×10^{16}個、約1×10^{18}個、または約1×10^{20}個の粒子の濃度で存在する。他の態様では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約5×10^{6}個、約5×10^{7}個、約5×10^{8}個、約5×10^{9}個、約5×10^{10}個、約5×10^{11}個、または約5×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。具体的で非限定的な例では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約1×10^{11}個の粒子の濃度で存在する。別の非限定的な例では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約1×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。さらなる非限定的な例では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約1×10^{10}個の粒子または１ｍＬ当たり約1×10^{9}個の粒子の濃度で存在する。一部の態様では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍＬ当たり約1×10^{6}～1×10^{18}個の粒子、例えば、約1×10^{6}～1×10^{14}個、約1×10^{10}～1×10^{14}個、

１×１０^{12}～１×１０^{18}個、１×１０^{14}～１×１０^{18}個、または１×１０^{10}～１×１０^{18}個の濃度で存在する。別の非限定的な例では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍｇ／ｍＬ未満、例えば、≦０．９ｍｇ／ｍＬ、≦０．８ｍｇ／ｍＬ、≦０．７ｍｇ／ｍＬ、≦０．６ｍｇ／ｍＬ、≦０．５ｍｇ／ｍＬ、≦０．４ｍｇ／ｍＬ、≦０．３ｍｇ／ｍＬ、≦０．２ｍｇ／ｍＬ、≦０．１ｍｇ／ｍＬ、≦９０μｇ／ｍＬ、≦８０μｇ／ｍＬ、≦７０μｇ／ｍＬ、≦６０μｇ／ｍＬ、≦５０μｇ／ｍＬ、≦４０μｇ／ｍＬ、≦３０μｇ／ｍＬ、≦２０μｇ／ｍＬ、または≦１０μｇ／ｍＬであるが、０μｇ／ｍＬを超える、例えば、０．１μｇ／ｍＬを超える、または０．５μｇ／ｍＬを超える、または１μｇ／ｍＬを超える濃度で存在する。

【００８３】

一部の態様では、組成物は、約５０Ｐａ～約２００Ｐａ、例えば、約７５Ｐａ～約２００Ｐａ、約１００Ｐａ～約２００Ｐａ、約１２５Ｐａ～約２００Ｐａ、約１５０Ｐａ～約２００Ｐａ、約１７５Ｐａ～約２００Ｐａ、約５０Ｐａ～約７５Ｐａ、約５０～約１００Ｐａ、約５０～約１２５Ｐａ、約５０～約１５０Ｐａ、または約５０～約１７５Ｐａの貯蔵弾性率（Ｇ’）を有する。組成物は、約５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０または２００Ｐａの貯蔵弾性率（ｓｔｏｒａｂｌｅ　ｍｏｄｕｌｕｓ）を有し得る。組成物は、約５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１１０、１１０～１２０、１２０～１３０、１３０～１４０、１５０～１５０、１５０～１６０、１６０～１７０、１７０～１８０、１８０～１９０または１９０～２００Ｐａの貯蔵弾性率（ｓｔｏｒａｂｌｅ　ｍｏｄｕｌｕｓ）を有し得る。

【００８４】

さらなる態様では、組成物は、約５Ｐａ～約２０Ｐａ、例えば、約１０Ｐａ～約２０Ｐａ、約１５～約２０Ｐａ、約５Ｐａ～約１０Ｐａ、約５Ｐａ～約１５Ｐａの損失弾性率（Ｇ’’）を有する。組成物は、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０Ｐａの損失弾性率を有し得る。

【００８５】

さらなる態様では、組成物の３７℃におけるＧ’のＧ’’に対する比は、約４：１～約１５：１である。一部の態様では、組成物のＧ’のＧ’’に対する比は、約４：１～約５：１、約４：１～約６：１、約４：１～約７：１、約４：１～約８：１、約４：１～約９：１、約４：１～約１０：１、約４：１～約１１：１、約４：１～約１２：１、約４：１～約１３：１、または約４：１～約１４：１であり得る。他の態様では、組成物のＧ’のＧ’’に対する比は、約５：１～約１５：１、約６：１～約１５：１、約７：１～約１５：１、約８：１～約１５：１、約９：１～約１５：１、約１０：１～約１５：１、約１１：１～約１５：１、約１２：１～約１５：１、約１３：１～約１５：１、または約１４：１～約１５：１であり得る。組成物のＧ’のＧ’’に対する比は、約４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１または１５：１であり得る。

【００８６】

他の態様では、組成物は、ずり減粘であり、したがって、注射による送達のしやすさは、注射の速度（例えば、ｍｌ／秒）が増すにしたがって容易になる。一部の非限定的な例では、せん断速度（１／秒で表される）が増すにしたがって粘度（Ｐａ＊秒で表される）が低下する。

【００８７】

さらなる態様では、組成物は、２４時間～１４日の５０％分解速度を有する。組成物は、約１～約１３日間、約１～約１２日、約１～約１１日、約１～約１０日、約１～約９日、約１～約８日、約１～約７日、約１～約６日、約１～約５日、約１～約４日、約１～約３日、約１～約２日の５０％分解速度を有し得る。組成物は、約２～約１４日、約３～約１４日、約４～約１４日、約５～約１４日、約６～約１４日、約７～約１４日、約８～約１４日、約９～約１４日、約１０～約１４日、約１１～約１４日、約１２～約１４日、ま

たは約１３～約１４日の５０％分解速度を有し得る。組成物は、約１日、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、約７日、約８日、約９日、約０１日、約１１日、約１２日、約１３日、または約１４日の５０％分解速度を有し得る。解剖学的部位への送達後のヒドロゲルからのＭＢＶの放出速度は、ヒドロゲルの分解プロファイル、解剖学的部位、および組織の炎症の程度に依存し得る。

【００８８】

一部の態様では、ＥＣＭヒドロゲルは、音響的ＥＣＭヒドロゲルであり得る。本出願に従った使用に適した音響的ヒドロゲルは、例えば、参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ公開第ＷＯ２０２０／１８６０８２号に開示されている。他の態様では、ＥＣＭヒドロゲルは、酵素的ＥＣＭヒドロゲルであり得る。本出願に従った使用に適した酵素的ＥＣＭヒドロゲルは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，３６１，５０３号に開示されている。

【００８９】

他の態様では、外因性酸性プロテアーゼおよび可溶化細胞外マトリックス、例えば、可溶化されたインタクトなＥＣＭを含む酸性溶液と；細胞外マトリックスに由来する外因性ＭＢＶであって、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない、外因性ＭＢＶとを含む組成物が開示される。外因性ＭＢＶは、組成物中に、１ｍｇ／ｍＬ未満の量で存在する。例えば、ＭＢＶは、組成物中に、１ｍｌ当たり約１×１０^{5}～約１×１０^{20}個の粒子の量で存在し、酸性溶液は、２５℃を超える温度において、約７．０～約７．８の間のｐＨに中和されると、ゲルを形成する。一部の態様では、酸性プロテアーゼは、ペプシンおよび／またはトリプシンである。一部の態様では、組成物のｐＨは、７．０未満である。

【００９０】

さらなる態様では、酸性プロテアーゼによって消化された可溶化細胞外マトリックス、例えばインタクトなＥＣＭと、非活性化外因性酸性プロテアーゼと、細胞外マトリックスに由来する外因性ＭＢＶとを含む組成物が開示される。ＭＢＶは、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない。これらの外因性ＭＢＶは、組成物中に、１ｍｇ／ｍＬ未満の量で存在する。例えば、ＭＢＶは、組成物中に、１ｍｌ当たり約１×１０^{5}～約１×１０^{20}個の粒子の量で存在する。組成物は、２５℃未満の温度では液相に入り、２５℃を超える温度ではゲル相に入り、７～７．８の間、例えば、約７．２～約７．８、約７．３～７．８、７．４～７．８または約７．５～７．８のｐＨを有する。組成物は、例えば、約７．２、約７．３、約７．４、約７．５または約７．６のｐＨを有し得る。一部の態様では、酸性プロテアーゼは、ペプシンおよび／またはトリプシンである。他の態様では、組成物は、約７．２のｐＨを有する。さらなる態様では、組成物は、７．２～７．４の範囲内、例えば、約７．２、７．３または７．４のｐＨを有する。

【００９１】

一部の態様では、本開示の組成物中の可溶化ＥＣＭの量は、１ｍｇ／ｍＬ～５００ｍｇ／ｍＬの間である。一部の態様では、本開示の組成物中の可溶化ＥＣＭの量は、１ｍｇ／ｍＬ～４００ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～３５０ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～３００ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～２５０ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～２００ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～１５０ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ、または５ｍｇ／ｍＬ～２５０ｍｇ／ｍＬ、または２０ｍｇ／ｍＬ～２００ｍｇ／ｍＬ、または５ｍｇ／ｍＬ～２００ｍｇ／ｍＬ、または５ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍＬである。さらなる態様では、本開示の組成物中の可溶化ＥＣＭの量は、約５ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌの間、例えば、約１０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、約２０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、約３０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、約４０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、約５ｍｇ／ｍｌ～約４０ｍｇ／ｍｌ、約５ｍｇ／ｍｌ～約３０ｍｇ／ｍｌ、約５ｍｇ／ｍｌ～約２０ｍｇ／ｍｇ、または約５ｍｇ／ｍｌ～約１０ｍｇ／ｍｌである。本開示の組成物は、可溶化ＥＣＭを、約５

、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、または５００ｍｇ／ｍｌの濃度で含有し得る。非限定的な一例では、本開示の組成物中の可溶化ＥＣＭの量は、１０ｍｇ／ｍＬ～３０ｍｇ／ｍＬの間である。非限定的な一例では、本開示の組成物中の可溶化ＥＣＭの量は、４ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬの間である。一部の態様では、本開示の組成物または可溶化ＥＣＭ中のＥＣＭは、約５～約１００ｍｇ／ｍＬ、例えば、５０～１００ｍｇ／ｍＬ、２５～７５ｍｇ／ｍＬ、６０～８０ｍｇ／ｍＬ、４０～６０ｍｇ／ｍＬ、５０～８０ｍｇ／ｍＬ、または約３０～約６０ｍｇ／ｍＬの濃度で存在する。

【００９２】

一部の態様では、外因性ＭＢＶは、本開示の組成物中に、１ｍＬ当たり約1×10^{5}～約1×10^{20}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{5}～約1×10^{18}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{5}～約1×10^{16}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{5}～約1×10^{14}個の粒子、または例えば１ｍＬ当たり約1×10^{5}～約1×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。一部の態様では、外因性ＭＢＶは、本開示の組成物中に、１ｍＬ当たり約1×10^{6}～約1×10^{20}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{6}～約1×10^{18}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{6}～約1×10^{16}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{6}～約1×10^{14}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{6}～約1×10^{12}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{7}～約1×10^{12}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{7}～約1×10^{11}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{8}～約1×10^{12}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{8}～約1×10^{11}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{9}～約1×10^{12}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{9}～約1×10^{11}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{10}～約1×10^{12}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{10}～約1×10^{11}個の粒子、例えば１ｍＬ当たり約1×10^{11}～約1×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。非限定的な一例では、外因性ＭＢＶは、本開示の組成物中に、１ｍＬ当たり約1×10^{8}～1×10^{11}個の粒子の濃度で存在する。非限定的な一例では、外因性ＭＢＶは、本開示の組成物中に、１ｍＬ当たり約1×10^{5}～1×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。非限定的な一例では、外因性ＭＢＶは、本開示の組成物中に、１ｍＬ当たり約1×10^{6}～1×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。一部の態様では、外因性ＭＢＶは、本開示の組成物中に、１ｍＬ当たり約1×10^{6}、1×10^{7}、1×10^{8}、1×10^{9}、1×10^{10}、1×10^{11}、1×10^{12}、1×10^{14}、1×10^{16}、1×10^{18}、または約1×10^{20}個の粒子の濃度で存在する。他の態様では、外因性ＭＢＶは、本開示の組成物中に、１ｍＬ当たり約5×10^{6}個、約5×10^{7}個、約5×10^{8}個、約5×10^{9}個、約5×10^{10}個、約5×10^{11}個、または約5×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。具体的で非限定的な例では、外因性ＭＢＶは、本開示の組成物中に、１ｍＬ当たり約1×10^{11}個の粒子の濃度で存在する。別の非限定的な例では、外因性ＭＢＶは、本開示の組成物中に、１ｍＬ当たり約1×10^{12}個の粒子の濃度で存在する。さらなる非限定的な例では、外因性ＭＢＶは、本開示の組成物中に、１ｍＬ当たり約1×10^{10}個の粒子または１ｍＬ当たり約1×10^{9}個の粒子の濃度で存在する。一部の態様では、外因性ＭＢＶは、本開示の組成物中に、１ｍＬ当たり約1×10^{6}～1×10^{18}個の粒子、例えば、約1×10^{6}～1×10^{14}個、約1×10^{10}～1×10^{14}個、1×10^{12}～1×10^{18}個、1×10^{14}～1×10^{18}個、または1×10^{10}～1×10^{18}の粒子の濃度で存在する。別の非限定的な例では、外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲル中に、１ｍｇ／ｍＬ未満、例えば、≦０．９ｍｇ／ｍＬ、≦０．８ｍｇ／ｍＬ、≦０．７ｍｇ／ｍＬ、≦０．６ｍｇ／ｍＬ、≦０．５ｍｇ／ｍＬ、≦０．４ｍｇ／ｍＬ、≦０．３ｍｇ／ｍＬ、≦０．２ｍｇ／ｍＬ、≦０．１ｍｇ／ｍＬ、≦９０μｇ／ｍＬ、≦８０μｇ／ｍＬ、≦７０μｇ／ｍＬ、≦６０μｇ／ｍＬ、≦５０μｇ／ｍＬ、≦４０μｇ／ｍＬ、≦３０μｇ／ｍＬ、≦２０μｇ／ｍＬ、または≦１０μｇ／ｍＬであるが、０μｇ／ｍＬを超える、例えば、０．１μｇ／ｍＬを超える、または０．５μｇ／ｍＬを超える、

または１μｇ／ｍＬを超える濃度で存在する。

【００９３】

一部の態様では、本開示の組成物のＥＣＭヒドロゲル、または可溶化ＥＣＭは、膀胱、小腸、心臓、真皮、肝臓、腎臓、子宮、脳、血管、肺、骨、筋肉、膵臓、胎盤、胃、脾臓、結腸、脂肪組織、または食道の細胞外マトリックスに由来する。さらなる態様では、本開示の組成物のＥＣＭヒドロゲル、または可溶化ＥＣＭは、膀胱マトリックス（ＵＢＭ）、小腸粘膜下組織（ＳＩＳ）、または膀胱粘膜下組織（ＵＢＳ）に由来する。さらなる態様では、本開示の組成物のＥＣＭヒドロゲル、または可溶化ＥＣＭは、ヒト、サル、ブタ、ウシ、またはヒツジから選択される哺乳動物の脊椎動物に由来する。さらに他の態様では、本開示の組成物のＥＣＭヒドロゲル、または可溶化ＥＣＭは、非ヒト哺乳動物に由来する。一部の態様では、本開示の組成物のＥＣＭヒドロゲル、または可溶化ＥＣＭは、ＵＢＭに由来しない。

【００９４】

一部の態様では、ＭＢＶは、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、ＭＢＶは、検出可能なアルカリホスファターゼを含有しない。一部の態様では、ＭＢＶにおいてＣＤ６３、ＣＤ８１、および／またはＣＤ９の発現を検出することはできない。したがって、一部の態様では、ＭＢＶは、ＣＤ６３および／またはＣＤ８１および／またはＣＤ９を発現しない。具体的な一例では、ナノベシクルにおいてＣＤ６３、ＣＤ８１、およびＣＤ９を検出することはできない。他の態様では、ＭＢＶは、ウエスタンブロットによって検出可能なもの等、かろうじて検出可能なレベルのＣＤ６３、ＣＤ８１、およびＣＤ９を有する。これらのＭＢＶは、ＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}ＣＤ９^{lo}である。他の態様では、ＭＢＶは、ＣＤ６３、ＣＤ８１、またはＣＤ９のうちの１つまたは複数を検出可能なレベルでは発現しない。さらなる態様では、ＭＢＶは、検出可能なアルカリホスファターゼ、オステオポンチン、オステオプロテゲリン、補体Ｃ５、および／またはｃ反応性タンパク質を含有しない。

【００９５】

さらなる態様では、ＭＢＶ、例えば外因性ＭＢＶは、膀胱、小腸、心臓、真皮、肝臓、腎臓、子宮、脳、血管、肺、骨、筋肉、膵臓、胎盤、胃、脾臓、結腸、脂肪組織、および／または食道の細胞外マトリックスに由来する。さらなる態様では、ＭＢＶ、例えば外因性ＭＢＶは、膀胱、小腸、真皮、肝臓、腎臓、子宮、脳、血管、肺、筋肉、膵臓、胎盤、胃、脾臓、結腸、脂肪組織、および／または食道の細胞外マトリックスに由来する。具体的で非限定的な例では、ＭＢＶ、例えば外因性ＭＢＶは、膀胱マトリックス（ＵＢＭ）、小腸粘膜下組織（ＳＩＳ）、または膀胱粘膜下組織（ＵＢＳ）に由来する。一態様では、ＭＢＶ、例えば外因性ＭＢＶは、真皮に由来する。別の態様では、ＭＢＶ、例えば外因性ＭＢＶは、ＵＢＭに由来する。さらなる態様では、ＭＢＶ、例えば外因性ＭＢＶは、ヒト、サル、ブタ、ウシ、またはヒツジから選択される哺乳動物の脊椎動物由来の細胞外マトリックスに由来する。具体的で非限定的な例では、ＭＢＶ、例えば外因性ＭＢＶは、非ヒト哺乳動物に由来する。一部の態様では、ＭＢＶ、例えば外因性ＭＢＶは、骨ＥＣＭに由来しない。一部の態様では、ＭＢＶ、例えば外因性ＭＢＶは、心臓（ｈｅａｒｔ）（心臓（ｃａｒｄｉａｃ））ＥＣＭに由来しない。一部の態様では、ＭＢＶ、例えば外因性ＭＢＶは、心臓（ｈｅａｒｔ）（心臓（ｃａｒｄｉａｃ））ＥＣＭまたは骨ＥＣＭに由来しない。

【００９６】

一部の態様では、組成物は、粉砕されたＥＣＭを含んでよい。他の態様では、組成物は、トレハロースを含んでよい。

【００９７】

本開示の組成物は、外用投与用に製剤化することができる。これらの外用組成物は、炎症を処置するために有用である。例えば、本開示の組成物を、食道の炎症、例えば食道炎または食道の潰瘍を処置するために使用することができる。一態様では、本発明の組成物を、食道組織をコーティングするように外用適用する。本開示の組成物を、痔瘻を処置す

るために使用することができる。本開示の組成物を粘膜下クッション（ｓｕｂｍｕｃｏｓａｌ　ｃｕｓｈｉｏｎ）として使用することができる。

【００９８】

炎症性腸疾患、または食道炎症を有する被験体を処置するための方法が本明細書に開示される。これらの方法は、被験体の患部臓器に、有効量の本開示の組成物を外用投与し、これにより、被験体における炎症性腸疾患または食道炎症を処置することを含む。一部の態様では、被験体は炎症性腸疾患を有し、患部臓器は腸である。他の態様では、被験体は潰瘍性大腸炎を有し、患部臓器は結腸である。さらなる態様では、被験体は食道炎症を有し、患部臓器は食道である。一部の非限定的な例では、被験体はヒトである。

【００９９】

組成物を、喉または胃の炎症または創傷、例えば、胃潰瘍または喉の潰瘍に罹患している被験体の喉または胃に本明細書に開示される組成物を外用適用することにより、喉または胃における炎症を処置するため、または創傷治癒を促進するために使用することもできる。組成物は、経腸投与によって、例えば、口により、または例えばカテーテルもしくは内視鏡を用いる外科手技によって適用することによって、または炎症、潰瘍、もしくは創傷の部位への局所的な投与を達成する注射によって、外用適用することができる。

【０１００】

細胞外マトリックス（ＥＣＭ）に由来するマトリックス結合ナノベシクル

ＥＣＭに由来するナノベシクル（マトリックス結合ナノベシクル、「ＭＢＶ」とも称される）は、参照により本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ公開第ＷＯ２０１７／１５１８６２、ＷＯ２０１８／２０４８４８、およびＷＯ２０１９／２１３４８２号に一般に記載されている。ＭＢＶが細胞外マトリックスに包埋されていることが開示されている。これらのＭＢＶは、単離することができ、生物学的に活性である。ＭＢＶは、ＣＤ６３およびＣＤ８１を発現しないかまたはＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}であり、かつアルカリホスファターゼを含有しない。ＭＢＶは、ＩＬ－３３を含有し得る。これらのＭＢＶを治療目的で使用することができる。一部の態様では、ＭＢＶは、アルカリホスファターゼ、オステオポンチン、オステオプロテゲリン、補体Ｃ５、および／またはｃ反応性タンパク質を含有しない。

【０１０１】

細胞外マトリックスは、哺乳動物組織内の細胞を囲みこれを支持する、また、他に断りがなければ、無細胞である、構造タンパク質、特殊化タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンおよび成長因子が挙げられるがこれらに限定されない、構造および機能的な生体分子および／または生体高分子の複合混合物である。一般に、開示されているＭＢＶは、いずれかの種類の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）に包埋されており、この位置から単離され得る。したがって、ＭＢＶは、ＥＣＭの表面上には剥離可能に存在せず、エキソソーム（細胞外ベシクルまたはＥＶとしても公知）ではない。

【０１０２】

細胞外マトリックスは、例えばであって限定するものではないが、これらそれぞれの全体を参照により組み込まれる、米国特許第４，９０２，５０８号；同第４，９５６，１７８号；同第５，２８１，４２２号；同第５，３５２，４６３号；同第５，３７２，８２１号；同第５，５５４，３８９号；同第５，５７３，７８４号；同第５，６４５，８６０号；同第５，７７１，９６９号；同第５，７５３，２６７号；同第５，７６２，９６６号；同第５，８６６，４１４号；同第６，０９９，５６７号；同第６，４８５，７２３号；同第６，５７６，２６５号；同第６，５７９，５３８号；同第６，６９６，２７０号；同第６，７８３，７７６号；同第６，７９３，９３９号；同第６，８４９，２７３号；同第６，８５２，３３９号；同第６，８６１，０７４号；同第６，８８７，４９５号；同第６，８９０，５６２号；同第６，８９０，５６３号；同第６，８９０，５６４号；および同第６，８９３，６６６号に開示されている。しかし、ＥＣＭは、いずれかの組織から、または培養細胞によってＥＣＭが産生されるいずれかのｉｎ　ｖｉｔｒｏ供給源から産生することができ、ネイティブＥＣＭの１種または複数種のポリマー構成成分（構成物）を含む

。ＥＣＭ調製物は、供給源組織または培養物から細胞が除去されたことを意味する、「脱細胞化された」または「無細胞である」とみなすことができる。

【０１０３】

一部の態様では、ＥＣＭは、脊椎動物から、例えば、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ等を含むがこれらに限定されない、哺乳動物の脊椎動物から単離される。ＥＣＭは、限定するものではないが、膀胱、腸（例えば、小腸または大腸等）、心臓、真皮、肝臓、腎臓、子宮、脳、血管、肺、骨、筋肉、膵臓、胎盤、胃、脾臓、結腸、脂肪組織、または食道を含む、任意の臓器または組織に由来し得る。具体的で非限定的な例では、細胞外マトリックスは、食道組織、膀胱（例えば、膀胱マトリックスまたは膀胱粘膜下組織等）、小腸粘膜下組織、真皮、臍帯、心膜、心臓組織、または骨格筋から単離される。ＥＣＭは、例えばであって限定するものではないが、粘膜下、上皮基底膜、固有層等を含む、臓器から得られるいずれかの部分または組織を含むことができる。非限定的な一態様では、ＥＣＭは、膀胱から単離される。一部の態様では、ＥＣＭは、ヒト被験体に由来する。他の態様では、ＥＣＭは、ブタ被験体に由来する。一部の態様では、ＥＣＭは、ブタＥＣＭではない。一部の態様では、ＥＣＭは、ブタＵＢＭではない。

【０１０４】

ＥＣＭは、基底膜を含んでも含まなくてもよい。別の非限定的な態様では、ＥＣＭは、基底膜の少なくとも部分を含む。ＥＣＭ材料は、毛細血管内皮細胞または線維細胞等、元の組織を構成していた細胞エレメントの一部を保持しても保持しなくてもよい。一部の態様では、ＥＣＭは、基底膜表面および非基底膜表面の両方を含有する。

【０１０５】

一部の態様では、ＥＣＭは、ブタ膀胱（膀胱マトリックスまたはＵＢＭとしても公知）から収集される。簡潔に説明すると、ＥＣＭは、ブタ等の哺乳動物から膀胱組織を除去し、脂肪組織を含む残存外部結合組織をトリミングすることにより調製される。水道水による反復洗浄によって残尿は全て除去される。組織は、先ず組織を脱上皮化溶液、例えばであって限定するものではないが、高張性食塩水（例えば、１．０Ｎ食塩水）に１０分間～４時間に及ぶ期間浸漬することにより離層される。高張性食塩水溶液への曝露は、基礎をなす基底膜から上皮細胞を除去する。任意選択で、カルシウムキレート剤を食塩水溶液に添加することができる。初期離層手順後に残っている組織は、上皮基底膜および上皮基底膜の反内腔側（abluminal）の組織層を含む。相対的に脆弱な上皮基底膜は、内腔表面における何らかの機械的擦過によって必ず損傷され、除去される。この組織は次に、反内腔側組織の大部分を除去するが、上皮基底膜および固有層を維持するためのさらなる処置に付される。外側漿膜、外膜、粘膜筋層（tunica muscularis mucosa）、粘膜下層（tunica submucosa）および大部分の粘膜筋板は、機械的擦過によってまたは酵素処置の組合せ（例えば、トリプシンまたはコラゲナーゼを使用）と続く水和および擦過によって、残っている脱上皮化組織から除去される。これらの組織の機械的除去は、例えばであって限定するものではないが、Ａｄｓｏｎ－Ｂｒｏｗｎ鉗子およびＭｅｔｚｅｎｂａｕｍハサミによる腸間膜組織の除去と、湿らせたガーゼに包まれたメスの柄または他の強固な物体による長軸方向の拭き取り動作を使用した、筋層および粘膜下層の拭き取りによって達成される。切刃、レーザーおよび他の組織分離方法が関与する自動ロボット手順も企図される。これらの組織が除去された後に、その結果得られたＥＣＭは、上皮基底膜および下位の固有層から主になる。

【０１０６】

別の態様では、ＥＣＭは、ブタ膀胱組織を擦過して、メスの柄および湿らせたガーゼによる長軸方向の拭き取り動作を使用して漿膜および筋層の両方を含む外層を除去することにより調製される。組織セグメントの外転後に、同拭き取り動作を使用して、基礎をなす組織から粘膜の内腔部分が離層される。粘膜下の穿孔を防止するように注意を払う。これらの組織が除去された後に、その結果得られたＥＣＭは、粘膜下層から主になる（参照により本明細書に組み込む米国特許第９，２７７，９９９号の図２を参照）。

【０１０７】

ＥＣＭは、粉末として調製することもできる。かかる粉末は、その全体を参照により本明細書に組み込む、Gilbertら、Biomaterials ２６巻（２００５年）１４３１～１４３５頁の方法に従って作製することができる。例えば、ＵＢＭシートを凍結乾燥し、次いで液体窒素中に浸すために、切り刻んで小型のシートにすることができる。次に、急速凍結した材料を細かく砕き、粒子をロータリーナイフミル内に置くのに十分なほど小さくして、そのミル内で、ＥＣＭを粉末化する。同様に、ＥＣＭ組織内のＮａＣｌを沈殿させることにより、材料を均一なサイズの粒子へと破砕し、これを急速凍結し、凍結乾燥し、粉末化することができる。

【０１０８】

非限定的な一態様では、ＥＣＭは、小腸粘膜下組織またはＳＩＳに由来する。市販の調製物として、ＳＵＲＧＩＳＩＳ（商標）、ＳＵＲＧＩＳＩＳ－ＥＳ（商標）、ＳＴＲＡＴＡＳＩＳ（商標）およびＳＴＲＡＴＡＳＩＳ－ＥＳ（商標）（Ｃｏｏｋ Ｕｒｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｃ．；Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、Ｉｎｄ．）ならびにＧＲＡＦＴＰＡＴＣＨ（商標）（Ｏｒｇａｎｏｇｅｎｅｓｉｓ Ｉｎｃ．；Ｃａｎｔｏｎ Ｍａｓｓ．）が挙げられるがこれらに限定されない。別の非限定的な態様では、ＥＣＭは、真皮に由来する。市販の調製物として、ＰＥＬＶＩＣＯＬ（商標）（欧州ではＰＥＲＭＡＣＯＬ（商標）として売られる；Ｂａｒｄ、Ｃｏｖｉｎｇｔｏｎ、Ｇａ．）、ＲＥＰＬＩＦＯＲＭ（商標）（Ｍｉｃｒｏｖａｓｉｖｅ；Ｂｏｓｔｏｎ、Ｍａｓｓ．）およびＡＬＬＯＤＥＲＭ（商標）（ＬｉｆｅＣｅｌｌ；Ｂｒａｎｃｈｂｕｒｇ、Ｎ．Ｊ．）が挙げられるがこれらに限定されない。別の態様では、ＥＣＭは、膀胱に由来する。市販の調製物として、ＵＢＭ（ＡＣｅｌｌ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ；Ｊｅｓｓｕｐ、Ｍｄ．）が挙げられるがこれに限定されない。

【０１０９】

ＭＢＶは、下に開示されている方法を使用して、細胞外マトリックスから得る（これから放出させる）ことができる。例えば、ＭＢＶは、その内容が全ての目的に関して参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１９／０１１７８３７号に開示されている方法に従って、細胞外マトリックスから得ることができる。一部の態様では、ＥＣＭを、ペプシン、コラゲナーゼ、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、および／またはプロテイナーゼＫ等の酵素を用いて消化し、ＭＢＶを単離する。他の態様では、グリシンＨＣＬ、クエン酸、水酸化アンモニウム等の溶液のｐＨを変化させることにより、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ等が挙げられるがこれらに限定されない、キレート剤の使用により、塩化カリウム（ＫＣｌ）、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、ヨウ化ナトリウム、チオシアン酸ナトリウム等が挙げられるがこれらに限定されない、塩の使用によるイオン強度および／もしくはカオトロピック効果により、またはグアニジンＨＣｌもしくは尿素のような変性条件にＥＣＭを曝露することにより、ＭＢＶを、ＥＣＭから放出させ、かつ分離する。

【０１１０】

ＭＢＶは、膀胱、小腸、心臓、真皮、肝臓、腎臓、子宮、脳、血管、肺、骨、筋肉、膵臓、胎盤、胃、脾臓、結腸、脂肪組織、および／または食道の細胞外マトリックスに由来し得る。具体的で非限定的な例では、ＭＢＶは、膀胱マトリックス（ＵＢＭ）、小腸粘膜下組織（ＳＩＳ）、または膀胱粘膜下組織（ＵＢＳ）に由来する。一態様では、ＭＢＶは、真皮に由来する。別の態様では、ＭＢＶは、ＵＢＭに由来する。さらなる態様では、ＭＢＶは、ヒト、サル、ブタ、ウシ、またはヒツジから選択される哺乳動物の脊椎動物由来の細胞外マトリックスに由来する。具体的で非限定的な例では、ＭＢＶは、非ヒト哺乳動物に由来する。一部の態様では、ＭＢＶは、骨ＥＣＭに由来しない。一部の態様では、ＭＢＶは、心臓（ｈｅａｒｔ）（心臓（ｃａｒｄｉａｃ））ＥＣＭに由来しない。一部の態様では、ＭＢＶは、心臓（ｈｅａｒｔ）（心臓（ｃａｒｄｉａｃ））ＥＣＭまたは骨ＥＣＭに由来しない。特定の態様では、ＭＢＶは、ペプシン、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、プロテイナーゼＫ、塩類溶液、および／またはコラゲナーゼ、またはこれらの組合せ等の酵素を用いたＥＣＭの消化後に調製される。ＥＣＭを凍結融解することもでき、機械的分解に供することもできる。

【０１１１】
一部の態様では、ＭＢＶにおいてＣＤ６３、ＣＤ８１、および／またはＣＤ９の発現を検出することはできない。したがって、一部の態様では、ＭＢＶは、ＣＤ６３および／またはＣＤ８１および／またはＣＤ９を発現しない。具体的な一例では、ナノベシクルにおいてＣＤ６３、ＣＤ８１、およびＣＤ９を検出することはできない。他の態様では、ＭＢＶは、ウエスタンブロットによって検出可能なもの等、かろうじて検出可能なレベルのＣＤ６３、ＣＤ８１、およびＣＤ９を有する。これらのＭＢＶは、ＣＤ６３^{lo}ＣＤ８１^{lo}ＣＤ９^{lo}である。他の態様では、ＭＢＶは、ＣＤ６３、ＣＤ８１、またはＣＤ９のうちの１つまたは複数を検出可能なレベルでは発現しない。他の態様では、ＭＢＶは、ＣＤ６３、ＣＤ８１、またはＣＤ９のうちの１つまたは複数をかろうじて検出可能なレベルで発現する。当業者は、ＣＤ６３^{lo}および／またはＣＤ８１^{lo}および／またはＣＤ９^{lo}であるＭＢＶを、例えば、ＣＤ６３、ＣＤ８１、およびＣＤ９に特異的に結合する抗体を使用して容易に同定することができる。低レベルのこれらのマーカーを、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）等の手順および蛍光標識された抗体を使用して確立して、少量および多量のＣＤ６３、ＣＤ８１、およびＣＤ９の閾値を決定することができる。ＭＢＶはｉｎｖｉｖｏにおいてＥＣＭに結合しており、生体液中には見出されないので、本開示のＭＢＶは、生体液中に存在していることに起因してＥＣＭの表面に一過性に付着し得るエキソソーム等のナノベシクルとは異なる。

【０１１２】
ＭＢＶは、例えばエキソソームと比較して、特有なリン脂質含量を有する。一部の態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８５％、または９０％、または約５０％～９０％、５０％～６５％、５０％～６０％、５０％～７０％、６０％～７０％、６０％～９０％、または７０％～９０％のホスファチジルコリン（ＰＣ）とホスファチジルイノシトール（ＰＩ）の組合せである。具体的な態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、少なくとも５５％のホスファチジルコリン（ＰＣ）とホスファチジルイノシトール（ＰＩ）の組合せである。具体的な態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、少なくとも６０％のホスファチジルコリン（ＰＣ）とホスファチジルイノシトール（ＰＩ）の組合せである。一部の態様では、ＭＢＶのリン脂質含量は、８：１未満（例えば、７：１未満、６：１未満、５：１未満、４：１未満、３：１未満、または２：１未満）のホスファチジルコリン（ＰＣ）のホスファチジルイノシトール（ＰＩ）に対する比で構成される。一部の態様では、ＭＢＶのリン脂質含量は、０．５～１：１の範囲内、または１：０．５～１の範囲内、または０．５～１：２の範囲内、または２：０．５～１の範囲内、または０．８～１：１の範囲内、または１：０．８～１の範囲内のホスファチジルコリン（ＰＣ）のホスファチジルイノシトール（ＰＩ）に対する比で構成される。一態様では、ＭＢＶのリン脂質含量は、約１：１のホスファチジルコリン（ＰＣ）のホスファチジルイノシトール（ＰＩ）に対する比で構成される。具体的な態様では、ＭＢＶのリン脂質含量は、約０．９：１のホスファチジルコリン（ＰＣ）のホスファチジルイノシトール（ＰＩ）に対する比で構成される。

【０１１３】
一部の態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、１５％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％またはそれ未満、または約５％～１０％、５％～１５％、１０％～１５％、または８％～１２％のスフィンゴミエリン（ＳＭ）である。具体的な態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、１０％またはそれ未満のスフィンゴミエリン（ＳＭ）である。一部の態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、１５％またはそれ未満のスフィンゴミエリン（ＳＭ）、１４％またはそれ未満のスフィンゴミエリン、１３％またはそれ未満のスフィンゴミエリン、１２％またはそれ未満のスフィンゴミエリン、１１％またはそれ未満のスフィンゴミエリン、１０％またはそれ未満のスフィンゴミエリン、９％またはそれ未満のスフィンゴミエリン、８％またはそれ未満のスフィンゴミエリン、７％またはそれ未満のスフィンゴミエリン、６％またはそれ未満のスフィンゴミエリン、５％またはそれ未満のスフィンゴミエリン、または４％またはそれ未満のスフィンゴミエリンである。

【０１１４】
一部の態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、または１０％もしくはそれ未満、または約１０％～２０％、１５％～２０％、１４％～１８％、もしくは１２％～１６％のホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）である。具体的な態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、２０％またはそれ未満のホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）である。
【０１１５】
一部の態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、５％、１０％、１２％、１５％、１８％、２０％、２５％、もしくは３０％もしくはそれよりも多い、または約５％～３０％、１０％～２０％、１０～２５％、１５％～２５％、もしくは１２％～１８％のホスファチジルイノシトール（ＰＩ）である。具体的な態様では、ＭＢＶは、１５％またはそれよりも多くのホスファチジルイノシトール（ＰＩ）のリン脂質含量を含む。
【０１１６】
具体的な態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、１５％またはそれよりも多くのホスファチジルイノシトール、２０％またはそれ未満のホスファチジルエタノールアミン、および１０％またはそれ未満のスフィンゴミエリンを含む。具体的な態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、１５％またはそれよりも多くのホスファチジルイノシトールおよび２０％またはそれ未満のホスファチジルエタノールアミンである。具体的な態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、１５％またはそれよりも多くのホスファチジルイノシトールおよび１０％またはそれ未満のスフィンゴミエリンである。具体的な態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、２０％またはそれ未満のホスファチジルエタノールアミンおよび１０％またはそれ未満のスフィンゴミエリンを含む。具体的な態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、１５％よりも多くのホスファチジルイノシトール、２０％またはそれ未満のホスファチジルエタノールアミン、１０％またはそれ未満のスフィンゴミエリン、および少なくとも５５％のホスファチジルイノシトールとホスファチジルコリンの組合せである。一態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、少なくとも５５％のホスファチジルコリン（ＰＣ）とホスファチジルイノシトール（ＰＩ）の組合せおよび１０％またはそれ未満のスフィンゴミエリン（ＳＭ）である。具体的な態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、少なくとも５５％のホスファチジルイノシトールとホスファチジルコリンの組合せおよび１５％よりも多くのホスファチジルイノシトールである。具体的な態様では、ＭＢＶの総リン脂質含量は、５５％のホスファチジルイノシトールとホスファチジルコリンの組合せおよび２０％またはそれ未満のホスファチジルエタノールアミンである。
【０１１７】
ＭＢＶは、リシルオキシダーゼ（Ｌｏｘ）も含んでよい。一般に、ＥＣＭに由来するナノベシクルは、エキソソームよりもＬｏｘ含量が多い。Ｌｏｘは、ＭＢＶの表面上に発現される。Ｎａｎｏ－ＬＣ　ＭＳ／ＭＳプロテオミクス分析を使用して、Ｌｏｘタンパク質を検出することができる。Ｌｏｘの定量化を実施することができる（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるHill RC, et al., Mol Cell Proteomics. 2015; 14 (4): 961-73を参照されたい）。
【０１１８】
ある特定の態様では、ＭＢＶは、１つまたは複数のｍｉＲＮＡを含む。具体的で非限定的な例では、ＭＢＶは、ｍｉＲ－１４３、ｍｉＲ－１４５およびｍｉＲ－１８１のうちの１つ、２つ、または３つ全てを含む。ＭｉＲ－１４３、ｍｉＲ－１４５およびｍｉＲ－１８１は、本技術分野で公知である。
【０１１９】
ｍｉＲ－１４５核酸配列は、参照により本明細書に組み込まれる、ＭｉＲｂａｓｅ受託番号ＭＩ０００００４６１に提供される。ｍｉＲ－１４５核酸配列は、ＣＡＣＣＵＵＧＵＣＣＵＣＡＣＧＧＵＣＣＡＧＵＵＵＵＣＣＣＡＧＧＡＡＵＣＣＣＵＵＡＧＡＵＧＣＵＡＡＧＡＵＧＧＧＧＡＵＵＣＣＵＧＧＡＡＡＵＡＣＵＧＵＵＣＵＵＧＡＧＧＵＣＡＵＧＧＵＵ（配列番号１）である。ｍｉＲ－１８１核酸配列は、参照により本明細書に組み込まれる、

ｍｉＲｂａｓｅ受託番号ＭＩ０００００２６９に提供される。ｍｉＲ－１８１核酸配列は、ＡＧＡＡＧＧＧＣＵＡＵＣＡＧＧＣＣＡＧＣＣＵＵＣＡＧＡＧＧＡＣＵＣＣＡＡＧＧＡＡＣＡＵＵＣＡＡＣＧＣＵＧＵＣＧＧＵＧＡＧＵＵＵＧＧＧＡＵＵＵＧＡＡＡＡＡＡＣＣＡＣＵＧＡＣＣＧＵＵＧＡＣＵＧＵＡＣＣＵＵＧＧＧＧＵＣＣＵＵＡ（配列番号２）である。ｍｉＲ－１４３核酸配列は、参照により本明細書に組み込まれる、ＮＣＢＩ受託番号ＮＲ＿０２９６８４．１、２０１８年３月３０日に提供される。ｍｉＲ－１４３核酸配列をコードするＤＮＡは、ＧＣＧＣＡＧＣＧＣＣ　ＣＴＧＴＣＴＣＣＣＡ　ＧＣＣＴＧＡＧＧＴＧ　ＣＡＧＴＧＣＴＧＣＡ　ＴＣＴＣＴＧＧＴＣＡ　ＧＴＴＧＧＧＡＧＴＣ　ＴＧＡＧＡＴＧＡＡＧ　ＣＡＣＴＧＴＡＧＣＴ　ＣＡＧＧＡＡＧＡＧＡ　ＧＡＡＧＴＴＧＴＴＣ　ＴＧＣＡＧＣ（配列番号３）である。

【０１２０】

投与後、ＭＢＶは、被験体のマクロファージにおけるＦ４／８０（マクロファージマーカー）およびＣＤ－１１ｂの発現を維持させる。ナノベシクルで処置されたマクロファージは、主にＦ４／８０＋Ｆｉｚｚ１＋であり、これはＭ２表現型を示す。

【０１２１】

本明細書に開示されるＭＢＶは、医薬送達のための組成物に製剤化することができる。ＭＢＶは、参照により本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ公開第ＷＯ２０１７／１５１８６２号にさらに開示および記載されている。

【０１２２】

ＥＣＭからのＭＢＶの単離

ＭＢＶを産生するために、上記の通り、ＥＣＭを、目的の任意の細胞に産生させることもでき、商業的供給源からのものを利用することもできる。ＭＢＶは、処置される被験体と同じ種から産生することもでき、異なる種から産生することもできる。一部の態様では、これらの方法は、酵素でＥＣＭを消化して、消化されたＥＣＭを産生するステップを含む。具体的な態様では、ＥＣＭは、ペプシン、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、コラゲナーゼ、メタロプロテイナーゼ、および／もしくはプロテイナーゼＫ、またはこれらの組合せのうちの１つまたは複数で消化される。具体的で非限定的な例では、ＥＣＭは、エラスターゼおよび／またはメタロプロテイナーゼのみで消化される。別の非限定的な例では、ＥＣＭは、コラゲナーゼおよび／またはトリプシンおよび／またはプロテイナーゼＫで消化されない。他の態様では、ＥＣＭは、洗剤で処理される。さらなる態様では、この方法は、酵素の使用を含まない。具体的で非限定的な例では、この方法は、塩化カリウム等、塩等、カオトロピック剤またはイオン強度を利用して、ＭＢＶを単離する。追加的な態様では、ＥＣＭを操作して、ＭＢＶ単離に先立ちＭＢＶ含量を増加させることができる。ＭＢＶをＥＣＭから単離するための技法は、例えば、その内容が全ての目的に関して参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１９／０１１７８３７号に記載されている。ＭＢＶを単離するための技法は、同じく参照により本明細書に組み込まれる、Quijano et al., Tissue Eng Part C Methods. 2020 Oct; 26 (10): 528-540にも開示されている。

【０１２３】

一部の態様では、ＥＣＭは、酵素で消化される。ＥＣＭは、約１２～約３６時間等、約１２～約４８時間、酵素で消化することができる。ＥＣＭは、約１２、約２４、約３６または約４８時間、酵素で消化することができる。具体的で非限定的な一例では、ＥＣＭは、室温にて酵素で消化される。しかし、消化は、約４℃で、または約４℃～２５℃の間のいずれかの温度で行うことができる。一般に、ＥＣＭは、コラーゲン原線維を除去するのに十分な、いずれかの長さの時間、およびいずれかの温度にて、酵素で消化される。消化過程は、組織供給源に応じて変動し得る。任意選択で、ＥＣＭは、酵素による消化の前または後のいずれかで、凍結および融解することにより処理される。ＥＣＭは、イオン性洗剤および／または非イオン性洗剤を含む洗剤で処理することができる。

【０１２４】

次に、消化されたＥＣＭは、遠心分離等により処理されて、原線維不含上清を単離する

。一部の態様では、消化されたＥＣＭは、例えば、第１のステップの場合、約３００～約１０００ｇで遠心分離される。よって、消化されたＥＣＭは、約４００ｇ、約４５０ｇ、約５００ｇまたは約６００ｇ等、約４００ｇ～約７５０ｇで遠心分離することができる。この遠心分離は、約１０、約１１、約１２、約１４、約１４または約１５分間等、約１０～約１２分間等、約１０～約１５分間、行うことができる。消化されたＥＣＭを含む上清が採取される。

【０１２５】

一部の態様では、ＭＢＶは、Ｌｏｘを含む。一部の態様では、このようなＭＢＶを単離するための方法は、エラスターゼおよび／またはメタロプロテイナーゼで細胞外マトリックスを消化して、消化された細胞外マトリックスを産生するステップと、消化された細胞外マトリックスを遠心分離して、コラーゲン原線維レムナントを除去し、これによって、原線維不含上清を産生するステップと、原線維不含上清を遠心分離して、固体材料を単離するステップと、固体材料をキャリアに懸濁させるステップとを含む。

【０１２６】

一部の態様では、消化されたＥＣＭは、第２のステップの場合、約２０００ｇ～約３０００ｇで遠心分離することもできる。よって、消化されたＥＣＭは、約２，０００ｇ、２，５００ｇ、２，７５０ｇまたは３，０００ｇ等、約２，５００ｇ～約３，０００ｇで遠心分離することができる。この遠心分離は、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約２６、約２７、約２８、約２９または約３０分間等、約２０～約２５分間等、約２０～約３０分間、行うことができる。消化されたＥＣＭを含む上清が採取される。

【０１２７】

追加的な態様では、消化されたＥＣＭは、第３のステップの場合、約１０，０００～約１５，０００ｇで遠心分離することができる。よって、消化されたＥＣＭは、約１０，０００ｇ、１１，０００ｇまたは１２，０００ｇ等、約１０，０００ｇ～約１２，５００ｇで遠心分離することができる。この遠心分離は、約２５～約３０分間、例えば、約２５、約２６、約２７、約２８、約２９、約３０、約３１、約３２、約３３、約３４、約３５、約３６、約３７、約３８、約３９または約４０分間等、約２５～約４０分間、行うことができる。消化されたＥＣＭを含む上清が採取される。　これらの遠心分離ステップのうち１、２または全３種は、独立的に利用することができる。一部の態様では、全３種の遠心分離ステップが利用される。遠心分離ステップは、２、３、４または５回等、反復することができる。一態様では、全３種の遠心分離ステップは、３回反復される。

【０１２８】

一部の態様では、消化されたＥＣＭは、約５００ｇで約１０分間、遠心分離される、約２，５００ｇで約２０分間、遠心分離される、および／または約１０，０００ｇで約３０分間、遠心分離される。全３種のステップ等、これらのステップ（複数可）は、３回等、２、３、４または５回反復される。よって、非限定的な一例では、消化されたＥＣＭは、約５００ｇで約１０分間、遠心分離される、約２，５００ｇで約２０分間、遠心分離される、および約１０，０００ｇで約３０分間、遠心分離される。これら３種のステップは、３回反復される。これにより、原線維不含上清が産出される。　次に、原線維不含上清を遠心分離して、ＭＢＶを単離する。一部の態様では、原線維不含上清は、約１００，０００ｇ～約１５０，０００ｇで遠心分離される。よって、原線維不含上清は、約１００，０００ｇ、約１０５，０００ｇ、約１１０，０００ｇ、約１１５，０００ｇまたは約１２０，０００ｇ等、約１００，０００ｇ～約１２５，０００ｇで遠心分離される。この遠心分離は、約７０～約８０分間、例えば、約６０、約６５、約７０、約７５、約８０、約８５または約９０分間等、約６０～約９０分間、行うことができる。非限定的な一例では、線維不含上清は、約１００，０００ｇで約７０分間、遠心分離される。ＭＢＶである固体材料が採取される。次に、このようなＭＢＶは、バッファー等が挙げられるがこれらに限定されない、いずれかの目的のキャリアに再懸濁させることができる。

【０１２９】

さらなる態様では、ＥＣＭは、酵素で消化されない。このような方法では、ＥＣＭは、

リン酸緩衝食塩水等、等張性食塩水溶液に懸濁される。続いて、塩の最終濃度が約０．１Ｍを超えるように、懸濁液に塩が添加される。濃度は、例えば、最大約３Ｍ、例えば、約０．１Ｍ塩～約３Ｍまたは約０．１Ｍ～約２Ｍであってよい。塩は、例えば、約０．１Ｍ、０．１５Ｍ、０．２Ｍ、０．３Ｍ、０．４Ｍ、０．７Ｍ、０．６Ｍ、０．７Ｍ、０．８Ｍ、０．９Ｍ、１．０Ｍ、１．１Ｍ、１．２Ｍ、１．３Ｍ、１．４Ｍ、１．５Ｍ、１．６Ｍ、１．７Ｍ、１．８Ｍ、１．９Ｍまたは２Ｍであってよい。一部の非限定的な例では、塩は、塩化カリウム、塩化ナトリウムまたは塩化マグネシウムである。他の態様では、塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、ヨウ化ナトリウム、チオシアン酸ナトリウム、ナトリウム塩、リチウム塩、セシウム塩またはカルシウム塩である。

【０１３０】

一部の態様では、ＥＣＭは、約１５分間～約１時間、約３０分間～約１時間または約４５分間～約１時間等、約１０分間～約２時間、塩溶液に懸濁される。ＥＣＭは、約１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５または１２０分間、塩溶液に懸濁させることができる。ＥＣＭは、約４℃～約２５℃または約４℃～約３７℃等が挙げられるがこれらに限定されない、４℃～約５０℃の温度で塩溶液に懸濁させることができる。具体的で非限定的な例では、ＥＣＭは、約４℃で塩溶液に懸濁される。他の具体的で非限定的な例では、ＥＣＭは、約２２℃または約２５℃（室温）で塩溶液に懸濁される。さらなる非限定的な例では、ＥＣＭは、約３７℃で塩溶液に懸濁される。

【０１３１】

一部の態様では、方法は、約０．４Ｍ超の塩濃度で細胞外マトリックスをインキュベートするステップと；消化された細胞外マトリックスを遠心分離して、コラーゲン原線維レムナントを除去し、上清を単離するステップと；上清を遠心分離して、固体材料を単離するステップと；固体材料をキャリアに懸濁させ、これにより、細胞外マトリックスからＭＢＶを単離するステップとを含む。

【０１３２】

塩溶液におけるインキュベーションの後に、ＥＣＭを遠心分離して、コラーゲン原線維を除去する。一部の態様では、消化されたＥＣＭは、約２０００ｇ～約５０００ｇで遠心分離することもできる。よって、消化されたＥＣＭは、約２，５００ｇ、約３，０００ｇ、３，５００、約４，０００ｇまたは約４，５００ｇ等、約２，５００ｇ～約４，５００ｇで遠心分離することができる。具体的で非限定的な一例では、遠心分離は、約３，５００ｇにおいてである。この遠心分離は、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約２６、約２７、約２８、約２９、約３０分間、約３１、約３２、約３３、約３４または約３５分間等、約２５～約３５分間等、約２０～約４０分間、行うことができる。次に上清が採取される。

【０１３３】

追加的な態様では、次に、上清は、第３のステップの場合、約１００，０００～約１５０，０００ｇで遠心分離することができる。よって、消化されたＥＣＭは、約１００，０００ｇ、１１０，０００ｇまたは１２０，０００ｇ等、約１００，０００ｇ～約１２５，０００ｇで遠心分離することができる。この遠心分離は、約１時間～約３時間、例えば、約３０分間、約４５分間、約６０分間、約９０分間または約１２０分間（２時間）等、約３０分間～約２．５時間、行うことができる。固体材料が採取され、緩衝食塩水等の溶液に懸濁され、これにより、ＭＢＶが単離される。

【０１３４】

さらに他の態様では、ＥＣＭは、リン酸緩衝食塩水等が挙げられるがこれに限定されない、等張性緩衝塩溶液に懸濁される。遠心分離または他の方法を使用して、大きい粒子を除去することができる（以下を参照）。次に、限外濾過を利用して、ＥＣＭからＭＢＶを単離し、粒子は、約１０ｎｍ～約３００ｎｍの間等、約１０～約１，０００ｎｍの間等、約１０ｎｍ～約１０，０００ｎｍの間である。

【０１３５】

具体的で非限定的な例では、等張性緩衝食塩水溶液は、約０．１６４ｍＭの総塩濃度および約７．２～約７．４のｐＨを有する。一部の態様では、等張性緩衝食塩水溶液は、約０．００２７Ｍ　ＫＣｌ等、０．００２Ｍ　ＫＣｌ～約０．１６４Ｍ　ＫＣＬを含む（リン酸緩衝食塩水におけるＫＣＬの濃度）。次に、この懸濁液が超遠心分離によって処理される。

【０１３６】

等張性緩衝塩溶液におけるインキュベーション後に、ＥＣＭを遠心分離して、コラーゲン原線維を除去する。一部の態様では、消化されたＥＣＭは、約２０００ｇ～約５０００ｇで遠心分離することもできる。よって、消化されたＥＣＭは、約２，５００ｇ、約３，０００ｇ、３，５００、約４，０００ｇまたは約４，５００ｇ等、約２，５００ｇ～約４，５００ｇで遠心分離することができる。具体的で非限定的な一例では、遠心分離は、約３，５００ｇにおいてである。この遠心分離は、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約２６、約２７、約２８、約２９、約３０分間、約３１、約３２、約３３、約３４または約３５分間等、約２５～約３５分間等、約２０～約４０分間、行うことができる。

【０１３７】

微量濾過および遠心分離を使用および組み合わせて、懸濁液から大きい分子量の材料を除去することができる。一態様では、２００ｎｍ超等、大きいサイズの分子材料は、微量濾過を使用して除去される。別の態様では、大きいサイズの材料は、遠心分離の使用により除去される。第３の態様では、微量濾過および超遠心分離の両方を使用して、大きい分子量の材料を除去する。約１０，０００ｎｍ超、約１，０００ｎｍ超、約５００ｎｍ超または約３００ｎｍ超の材料等、大きい分子量の材料が、懸濁されたＥＣＭから除去される。

【０１３８】

次に、微量濾過の流出液または上清は、限外濾過に付される。よって、約１０，０００ｎｍ未満、約１，０００ｎｍ未満、約５００ｎｍ未満または約３００ｎｍ未満の粒子を含む流出液が採取および利用される。次に、この流出液は、３，０００～１００，０００の分子量カットオフ（ＭＷＣＯ）を有する膜による限外濾過に付される。本実施例において１００，０００ＭＷＣＯが使用された。

【０１３９】

細胞外マトリックス（ＥＣＭ）ヒドロゲルの調製

任意の型の細胞外マトリックスを使用して、哺乳動物ＥＣＭヒドロゲルを産生することができる（ＥＣＭに関する米国特許第４，９０２，５０８号；同第４，９５６，１７８号；同第５，２８１，４２２号；同第５，３５２，４６３号；同第５，３７２，８２１号；同第５，５５４，３８９号；同第５，５７３，７８４号；同第５，６４５，８６０号；同第５，７７１，９６９号；同第５，７５３，２６７号；同第５，７６２，９６６号；同第５，８６６，４１４号；同第６，０９９，５６７号；同第６，４８５，７２３号；同第６，５７６，２６５号；同第６，５７９，５３８号；同第６，６９６，２７０号；同第６，７８３，７７６号；同第６，７９３，９３９号；同第６，８４９，２７３号；同第６，８５２，３３９号；同第６，８６１，０７４号；同第６，８８７，４９５号；同第６，８９０，５６２号；同第６，８９０，５６３号；同第６，８９０，５６４号；および同第６，８９３，６６６号を参照されたい）。ある特定の態様では、ＥＣＭは、脊椎動物から、例えばであって限定するものではないが、ヒト、サル、ウマ、ブタ、ウシおよびヒツジを含むがこれらに限定されない、哺乳動物から単離される。具体的で非限定的な例では、ＥＣＭは、ブタのものである。

【０１４０】

ＥＣＭは、膀胱、腸（例えば、小腸または大腸等）、心臓、腎臓、子宮、脳、血管、肺、骨、筋肉、膵臓、胃、脾臓、脂肪組織、肝臓、食道および真皮を限定することなく含む、任意の臓器または組織に由来し得る。ＥＣＭは、細胞培養物から得ることができる。一態様では、ＥＣＭは、膀胱から単離される。別の態様では、ＥＣＭは、食道に由来する。

別の態様では、ＥＣＭは、真皮に由来する。別の態様では、ＥＣＭは、小腸粘膜下組織（ＳＩＳ）に由来する。ＥＣＭは、ＥＣＭの基底膜部分を含んでも含まなくてもよい。ある特定の態様では、ＥＣＭは、基底膜の少なくとも一部分を含む。ＥＣＭを産生するために、組織を脱細胞化して、例えば供給源組織または臓器に由来する細胞および細胞材料を除去することができる。ＥＣＭが、例えば本明細書に開示されるヒドロゲル構成成分として被験体に植え込まれる場合等、免疫応答を防止するために脱細胞化された材料を使用することが望ましい。ＥＣＭを使用してヒドロゲルを形成する場合等、細胞材料の除去により、このような免疫応答を防止する。

【０１４１】

米国特許第８，３６１，５０３号（その全体が全ての目的に関して参照により本明細書に組み込まれる）には、膀胱組織を擦過して、メスの柄および湿らせたガーゼによる長手方向の拭き取り動作を使用して漿膜および筋層の両方を含む外層を除去することにより調製される、ブタ膀胱ＥＣＭ等の膀胱ＥＣＭの調製が開示されている。組織セグメントの外転後に、同拭き取り動作を使用して、基礎をなす組織から粘膜の内腔部分が離層される。一部の態様では、粘膜下組織の穿孔を防止するように注意を払う。これらの組織が除去された後に、その結果得られたＥＣＭは、粘膜下層から主になる。

【０１４２】

皮膚ＥＣＭからのヒドロゲルの産生は、参照により本明細書に組み込まれる、Wolf et al., Biomaterials 33: 7028-7038, 2012に開示されている。食道組織からのＥＣＭの産生は、例えば、どちらも参照により本明細書に組み込まれる、Badylak et al. J Pediatr Surg. 35 (7): 1097-103, 2000およびBadylak et al., J Surg Res. 2005 September; 128 (1): 87-97, 2005に開示されている。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第６，８９３，６６６号には、膀胱、皮膚、食道および小腸からのＥＣＭの産生が開示されている。ＥＣＭは、これらの組織のいずれから産生されてもよい。

【０１４３】

市販のＥＣＭ調製物を使用することもできる。一態様では、ＥＣＭは、小腸粘膜下組織またはＳＩＳに由来する。市販の調製物として、ＳＵＲＧＩＳＩＳ（商標）、ＳＵＲＧＩＳＩＳ－ＥＳ（商標）、ＳＴＲＡＴＡＳＩＳ（商標）、およびＳＴＲＡＴＡＳＩＳ－ＥＳ（商標）（Ｃｏｏｋ Ｕｒｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｃ．；Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、Ｉｎｄ．）およびＧＲＡＦＴＰＡＴＣＨ（商標）（Ｏｒｇａｎｏｇｅｎｅｓｉｓ Ｉｎｃ．；Ｃａｎｔｏｎ Ｍａｓｓ．）が挙げられるがこれらに限定されない。別の態様では、ＥＣＭは、真皮に由来する。市販の調製物として、ＰＥＬＶＩＣＯＬ（商標）（欧州ではＰＥＲＭＡＣＯＬ（商標）として販売されている；Ｂａｒｄ、Ｃｏｖｉｎｇｔｏｎ，Ｇａ．）、ＲＥＰＬＩＦＯＲＭ（商標）（Ｍｉｃｒｏｖａｓｉｖｅ；Ｂｏｓｔｏｎ、Ｍａｓｓ．）およびＡＬＬＯＤＥＲＭ（商標）（ＬｉｆｅＣｅｌｌ；Ｂｒａｎｃｈｂｕｒｇ、Ｎ．Ｊ．）が挙げられるがこれらに限定されない。別の態様では、ＥＣＭは、膀胱に由来する。市販の調製物として、ＵＢＭ（Ａｃｅｌｌ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ；Ｊｅｓｓｕｐ，Ｍｄ．）が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１４４】

ＥＣＭを調製するための組織は、多種多様な仕方で収集することができ、収集したら、収集された組織の種々の部分を使用することができる。ＥＣＭはまた、食道および小腸から調製されており、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Keane et al., Tissue Eng. Part A, 21(17-18): 2293-2300, 2015を参照されたい。食道ＥＣＭは、粘膜および粘膜下組織を外筋層から機械的に分離し、粘膜層を、トリプシンを含む緩衝液で消化し、続いてスクロース、ＴＲＩＴＯＮ（登録商標）－Ｘ１００（登録商標）、デオキシコール酸、過酢酸およびＤＮＡｓｅに曝露することによって調製することができる。小腸粘膜下組織（ＳＩＳ）は、インタクトな小腸から粘膜の表層、漿膜、および外筋層を機械的に除去し、粘膜下組織、粘膜筋板、および緻密層基底部をインタクトなまま残すことによって調製することができる。次いで、ＳＩＳを過酢酸で処理する。例示的

なプロトコールは、Keane et al.に提供されている。皮膚ヒドロゲルは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Wolf et al, J Biomed Mater Res A. 2013. 35 (25): 6838-49. PMID:23873846. PMCID:3808505に開示されている通り産生することができる。

【０１４５】

一態様では、収集されたブタ膀胱からＥＣＭを単離して、膀胱マトリックス（ＵＢＭ）を調製する。過剰な結合組織および残尿を膀胱から除去する。漿膜、外筋層、粘膜下層および大部分の粘膜筋板を、機械的擦過によって、または酵素処理、湿潤化（ｈｙｄｒａｔｉｏｎ）、および擦過の組合せによって除去することができる。これらの組織の機械的除去は、外層（特に反内腔側平滑筋層）およびさらには粘膜の内腔部分（上皮層）を除去するための長手方向の拭き取り動作を使用した擦過によって達成することができる。これらの組織の機械的除去は、例えば、Ａｄｓｏｎ－Ｂｒｏｗｎ鉗子およびＭｅｔｚｅｎｂａｕｍハサミによる腸間膜組織の除去と、湿らせたガーゼに包まれたメスの柄または他の剛性の物体による長手方向の拭き取り動作を使用した、筋層および粘膜下層の拭き取りによって達成される。粘膜の上皮細胞は、組織を脱上皮化溶液、例えばであって限定するものではないが、高張性食塩水に浸漬することによって解離することもできる。その結果得られたＵＢＭは、粘膜の基底膜および隣接する固有層を含み、それをさらに過酢酸で処理し、凍結乾燥させ、粉末化する。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第８，３６１，５０３号を参照されたい。

【０１４６】

真皮切片をＥＣＭヒドロゲルの調製に使用することができる。参照により本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ出願第２０１５／１５１６４７２８号を参照されたい。具体的で非限定的な例では、真皮を、０．２５％トリプシン／１％ＴＲＩＴＯＮ（登録商標）－Ｘ（登録商標）－１００（すなわち、ＳＤＳなし）を用い、以下の溶液中、ボルテックス振とう機で室温、３００ＲＰＭで脱細胞化することができる：０．２５％トリプシン、６時間、１×；脱イオン水、１５分間、３×；７０％エタノール、１０～１２時間、１×；３％H_2O_2、１５分間、１×、脱イオン水、１５分間、２×；０．２６％ＥＤＴＡ／０．６９％Ｔｒｉｓ中１％ＴＲＩＴＯＮ（登録商標）－Ｘ（登録商標）－１００、６時間、１×、および次いで一晩、１×；脱イオン水、１５分間、３×；０．１％過酢酸／４％エタノール、２時間、１×；ＰＢＳ、１５分間、２×；および最終的に脱イオン水、１５分間、２×。次いで、真皮シートを凍結乾燥させ、その後、Ｗａｒｉｎｇブレンダーおよびｗｉｌｅｙ Ｍｉｌｌを＃２０メッシュスクリーンと共に使用して粒子の形態に変える。

【０１４７】

一部の態様では、先ず上皮細胞を、先ず組織を脱上皮化溶液、例えば、高張性食塩水に、例えばであって限定するものではないが、１．０Ｎ食塩水、１０分間～４時間に及ぶ期間浸漬することにより離層させることができる。高張性食塩溶液への曝露により、基礎をなす基底膜から上皮細胞が有効に除去される。初期離層手順後に残っている組織は、上皮基底膜および上皮基底膜の反内腔側の組織層を含む。次に、この組織を、反内腔側組織の大部分を除去するが上皮基底膜は除去しないさらなる処理に供する。外側漿膜、外膜、平滑筋組織、粘膜下層および大部分の粘膜筋板を、機械的擦過によって、または酵素処理、湿潤化、および擦過の組合せによって残っている脱上皮化組織から除去する。

【０１４８】

一部の態様では、ＥＣＭ自体を、過酢酸への曝露、低線量ガンマ線、気体プラズマ滅菌、エチレンオキシド処理または電子ビーム処理を含むがこれらに限定されない、いくつもの標準的技法によって滅菌することができる。より典型的には、ＥＣＭの滅菌は、０．１％（ｖ／ｖ）過酢酸、４％（ｖ／ｖ）エタノール、および９５．９％（ｖ／ｖ）滅菌水に２時間浸漬することによって得られる。残留過酢酸を、ＰＢＳ（ｐＨ＝７．４）で２回、１５分間洗浄し、滅菌水で２回、１５分間洗浄することによって除去する。ＥＣＭ材料を、プロピレンオキシドまたはエチレンオキシド処理、ガンマ線照射処理（０．０５～４ｍＲａｄ）、気体プラズマ滅菌、過酢酸滅菌、または電子ビーム処理によって滅菌すること

ができる。ＥＣＭはまた、タンパク質材料の架橋結合を引き起こすグルタルアルデヒドによる処理によって滅菌することができるが、この処理は、材料を、ゆっくりと再吸収されるかまたは一切再吸収されないように実質的に変更し、構成的リモデリングではなく瘢痕組織形成または封入によりよく似た、異なる型の宿主リモデリングを駆動するものである。タンパク質材料の架橋結合は、カルボジイミドまたは脱水素熱処理または光酸化法でも誘導され得る。米国特許第８，３６１，５０３号に開示されている通り、ＥＣＭを、０．１％（ｖ／ｖ）過酢酸（ａ）、４％（ｖ／ｖ）エタノール、および９６％（ｖ／ｖ）滅菌水に２時間浸漬することによって消毒する。次いで、ＥＣＭ材料をＰＢＳ（ｐＨ＝７．４）で２回、１５分間洗浄し、脱イオン水で２回、１５分間洗浄する。

【０１４９】

一般に、目的の組織の単離後、脱細胞化を、様々な方法、例えばであって限定するものではないが、高張性食塩水、過酢酸、ＴＲＩＴＯＮ（登録商標）－Ｘ（登録商標）または他の洗剤への曝露によって実施する。滅菌と脱細胞化を同時に行うことができる。例えばであって限定するものではないが、上記の過酢酸による滅菌を脱細胞化のためにも使用することができる。次いで、ＥＣＭを乾燥、凍結乾燥（フリーズドライ）または風乾することができる。乾燥させたＥＣＭを、裂くこと、製粉すること、切ること、すりつぶすこと、およびせん断することを含むがこれらに限定されない方法によって粉砕することができる。粉砕されたＥＣＭを、例えばであって限定するものではないが、凍結またはフリーズドライした状態ですりつぶすことまたは製粉すること等の方法によってさらに処理して、粉末化された形態にすることもできる。

【０１５０】

哺乳動物ＥＣＭは市販もされている。これらとしては、ＡＶＩＴＥＮＥ（商標）、ＭＩＣＲＯＭＡＴＲＩＸ（登録商標）およびＸＥＮＭＡＴＲＩＸ（商標）が挙げられる。これらの市販製品を使用して、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルを産生することもできる。

【０１５１】

音響的ＥＣＭヒドロゲル

一部の態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルを調製するために、粉砕されたＥＣＭ、例えば、哺乳動物ＥＣＭを液体中に希釈する。ＥＣＭは、粉砕前に凍結乾燥されていてもされていなくてもよい。ＥＣＭを、例えば、ＥＣＭをすりつぶすこと、刻むことまたは切ることによって粉砕することができる。粉砕されたＥＣＭは、約１０μｍ～約５０００μｍ、約１０μｍ～約４０００μｍ、約１０μｍ～約３０００μｍ、約１０μｍ～約２０００μｍ、約１０μｍ～約１０００μｍ、約１０μｍ～約５００μｍ、約３０μｍ～約３００μｍ、約４０～約４００μｍ、約２５μｍ～約５００μｍ、約５０μｍ～約５００μｍ、約１００μｍ～約３００μｍ、約１０μｍ～約５０μｍ、または約１０μｍ～約１００μｍの範囲の小片を有するはずである。一態様では、ＥＣＭは、約１０μｍ～約１０００μｍの範囲を有する小片で提供される。別の好ましい態様では、ＥＣＭは、約１０μｍ～約２０００μｍの範囲を有する小片で提供される。非限定的な一例では、小片は、約３０μｍ～約３００μｍの範囲を有する。液体は、中性ｐＨ、例えば、ｐＨ約７．０～約７．６、例えば約７．１～約７．５、例えば約７．２～約７．４、例えば約７．０～７．２、例えば約７．０～７．４、例えば約７．１、７．２、７．３、７．４、７．５または７．６の緩衝液であってよい。ＥＣＭを、例えば、限定されないが、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）またはトリス緩衝食塩水等の等張性緩衝食塩溶液中に希釈することができる。一部の態様では、緩衝食塩溶液の容量オスモル濃度は約２９０ｍＯｓｍ／Ｌである。液体は水であってよい。一部の態様では、溶液を標的ｐＨにするため、またはゲルのｐＨおよびイオン強度を生理的ｐＨおよびイオン条件等の標的レベルに維持するために、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）を含むがこれらに限定されない等張性緩衝液を使用することができる。これにより液体ＥＣＭ溶液が形成される。

【０１５２】

音響的ヒドロゲルを調製するための方法は、一般に、ペプシン、トリプシン、またはヒアルロニダーゼを含む酸性プロテアーゼの使用もＥＣＭ組織の酵素消化も一般に伴わない

。参照により本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ出願第ＷＯ２０１５／１６４７２８号を参照されたい。一般に、液体中の可溶化ＥＣＭは酸性プロテアーゼと接触しない。

【０１５３】

音響的技法、例えば超音波周波数を適用することによって細胞外マトリックスヒドロゲルを調製する方法は、その内容が全ての目的に関して参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０２２／０１４３２６５号に見出すことができる。一部の態様では、ＥＣＭを、液体中、約２５ｍｇ／ｍｌを超える濃度で利用する。ＥＣＭを、緩衝液等の液体中、約２５ｍｇ／ｍｌ～約６００ｍｇ／ｍｌの濃度で利用することができる。適切な濃度として、約２５ｍｇ／ｍｌ～約３００ｍｇ／ｍｌ、約２５ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌ、および約２５ｍｇ／ｍｌ～約１５０ｍｇ／ｍｌも挙げられる。ＥＣＭを、緩衝液等の液体中、約５０ｍｇ／ｍｌ～６００ｍｇ／ｍｌの濃度で利用することができる。適切な濃度として、約５０ｍｇ／ｍｌ～約３００ｍｇ／ｍｌ、約５０ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌ、および約５０ｍｇ／ｍｌ～約１５０ｍｇ／ｍｌも挙げられる。適切な濃度として、約２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、および２００ｍｇ／ｍｌが挙げられる。例示的な濃度として、約２５ｍｇ／ｍｌ、１００ｍｇ／ｍｌ、および１５０ｍｇ／ｍｌが挙げられる。非限定的な一例では、ＥＣＭは、液体中、約２５ｍｇ／ｍｌ～約１５０ｍｇ／ｍｌの濃度である。非限定的な一例では、ＥＣＭは、液体中、１００ｍｇ／ｍｌの濃度である。

【０１５４】

緩衝食塩溶液等の液体中のＥＣＭを超音波周波数で処理する。一態様では、超音波の周波数は約２０ｋＨｚ～約１００ｋＨｚである。液体中のＥＣＭを周波数約２０ｋＨｚ～約３０ｋＨｚ、約２０Ｈｚ～約４０ｋＨｚ、約２０ｋＨｚ～約５０ｋＨｚ、約２０ｋＨｚ～約６０ｋＨｚ、約２０ｋＨｚ～約７０ｋＨｚ、約２０ｋＨｚ～約８０ｋＨｚ、または約２０ｋＨｚ～約９０ｋＨｚの超音波を用いて処理することができる。液体中のＥＣＭを周波数約２０ｋＨｚ、３０ｋＨｚ、４０ｋＨｚ、５０ｋＨｚ、６０ｋＨｚ、７０ｋＨｚ、８０ｋＨｚ、９０ｋＨｚまたは１００ｋＨｚの超音波を用いて処理することができる。非限定的な一例では、液体中のＥＣＭを周波数約２０ｋＨｚの超音波を用いて処理することができる。

【０１５５】

緩衝食塩溶液等の液体中のＥＣＭを超音波で少なくとも２０秒間、例えば、少なくとも３０秒間処理する。緩衝食塩溶液等の液体中のＥＣＭを超音波で少なくとも６０秒間処理する。一部の態様では、液体中のＥＣＭを超音波で少なくとも６０秒間～約１時間処理する。さらなる態様では、液体中のＥＣＭを超音波で少なくとも６０秒間～約３０分間処理する。さらなる態様では、液体中のＥＣＭを超音波で少なくとも３０秒間～約３０分間処理する。さらなる態様では、液体中のＥＣＭを超音波で少なくとも６０秒間～約１５分間処理する。さらなる態様では、液体中のＥＣＭを超音波で少なくとも３０秒間～約１５分間処理する。一部の態様では、液体中のＥＣＭを超音波で少なくとも６０秒間～約１０分間処理する。一部の態様では、液体中のＥＣＭを超音波で少なくとも３０秒間～約１０分間処理する。一部の態様では、液体中のＥＣＭを超音波で少なくとも６０秒間～約５分間処理する。一部の態様では、液体中のＥＣＭを超音波で少なくとも３０秒間～約５分間処理する。液体中のＥＣＭを超音波で約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９または６０分間処理することができる。一部の態様では、液体中のＥＣＭを超音波を用いてパルスで本明細書において列挙されている総時間にわたって処理する。したがって、一部の態様では、緩衝食塩溶液等の液体中のＥＣＭを、少なくとも約３０秒間の長さ、例えば、約３０秒間、約４０秒間または

約６０秒間の長さ等のパルスで処理する。緩衝食塩溶液等の液体中のＥＣＭを、超音波で１回、２回、３回、４回、５回、６回、７回、８回、９回、１０回処理することができ、したがって、処理の総時間は、６０秒間～１時間、または列挙されている総時間のいずれかである。食塩溶液等の液体中のＥＣＭを、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９または６０秒間処理することができる。食塩溶液等の液体中のＥＣＭを少なくとも３０秒間処理することができる。一般に、複数回の処理を使用する場合、それらの処理は、１時間未満の期間内に行う。例示的な方法は、超音波の３０秒間のパルス、続いて３０～４５秒間の無処理、続いて別の処理である。この処理を２回、３回、４回、５回、６回、７回、８回、９回または１０回またはそれよりも多く適用する。１つの例示的な非限定的な方法は、約２０ｋＨｚ等の３０秒間の超音波について６回のパルス、続いて４５秒間休止（ｏｆｆ）（６回の反復にわたり）、合計３分間、超音波を用いて処理する。

【０１５６】

超音波の振幅は、約２０μｍ～約３２０μｍであり得る。一般に、振幅は、超音波を発生するために使用されるプローブの中心からの尺度である。プローブの振動面の振幅は、プローブの完全に伸びた状態での位置と完全に縮んだ状態での位置の間の距離であり、ミクロン（μｍ）で測定される。一部の態様では、振幅は、約３０μｍ～約２００μｍである。さらなる態様では、振幅は、約３６μｍ～約１８０μｍである。振幅は、約３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１５０、１６０、７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０または３００μｍであり得る。一部の態様では、振幅は、約３０～４０μｍ、４０～５０μｍ、５０～６０μｍ、６０～７０μｍ、７０～８０μｍ、８０～９０μｍ、９０～１００μｍ、１００～１１０、１１０～１２０μｍ、１２０～１３０μｍ、１３０～１４０μｍ、１４０～１５０μｍ、１５０～１６０μｍ、１６０～１７０μｍ、１７０～１８０μｍ、１８０～１９０μｍ、１９０～２００μｍ、２００～２１０μｍ、２１０～２２０μｍ、２２０～２３０μｍ、２３０～２４０μｍ、２４０～２５０μｍ、２５０～２６０μｍ、２６０～２７０μｍ、２７０～２８０μｍ、２８０～２９０μｍまたは２９０～３００μｍであり得る。具体的で非限定的な一例では、超音波の周波数は約２０ｋＨｚであり、振幅は約３６μｍ～約１８０μｍである。さらなる非限定的な例では、超音波の周波数は約２０ｋＨｚであり、振幅は約３６μｍ～約１８０μｍであり、処理は合計で約１、２、３、４、または５分間、例えば約３分間にわたる。超音波処理は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０分間にわたり得る。超音波処理は、約３０秒間～約５分間にわたり得る。超音波処理は、例えば、約１～約５分間にわたり得る。超音波処理は、約１～約１０分間にわたり得る。超音波処理は、例えば、１～約２０分間にわたり得る。さらなる態様では、超音波処理は、約１時間未満、約３０分間未満、約２０分間未満、または約１０分間未満にわたり得る。一部の態様では、超音波処理は、少なくとも３０秒間にわたり得る。他の態様では、超音波処理は、約１０分間～約２４時間、例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、または２４時間にわたり得る。一部の態様では、超音波処理は最大４８時間にわたり得る。

【０１５７】

一部の態様では、液体中のＥＣＭは、約３０℃～約４３℃の範囲の温度で超音波を用いて処理される。一態様では、液体中のＥＣＭは、約３５℃～約４０℃の範囲の温度で超音波を用いて処理される。一態様では、液体中のＥＣＭは、約３６℃～約３８℃の範囲の温度で超音波を用いて処理される。別の態様では、液体中のＥＣＭは、約３７℃またはそれを超える範囲の温度、例えば、約３７℃～約５５℃、例えば約３７℃～約５０℃、例えば約３７℃～約４５℃、例えば約３７℃～約４０℃の温度で超音波を用いて処理される。液

体中のＥＣＭは、約３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、または５５℃の温度で超音波を用いて処理される。さらなる態様では、液体中のＥＣＭは、約３８℃超、例えば約３８℃～約５０℃、例えば約３８℃～約４５℃、例えば約３８℃～約４０℃で超音波を用いて処理される。

【０１５８】

複数の態様では、超音波を用いた処理により、音響的ＥＣＭヒドロゲルが生じる。音響的ＥＣＭヒドロゲルは、一般に、３７℃付近でゾルからゲルへの相転移を受け、したがって、３７℃超では液相に転移し、３７℃未満ではゲル相に転移する。３７℃では、音響的ＥＣＭヒドロゲルは、ゲルと類似するのに十分に粘性であるが、温度が上昇して３７℃を超えると、ゲルがゾルに転移する。音響的ＥＣＭヒドロゲルは、温度が３７℃未満に低下するとゲルを形成する（ゾルからゲルへの転移）。したがって、一部の態様では、超音波処理後、音響的ＥＣＭヒドロゲルを３７℃未満の温度、例えば約４℃～約３６℃に冷却する。音響的ＥＣＭヒドロゲルを室温まで冷却することができ、室温は一般に約２５℃である。一部の態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルを約１５℃～約２５℃に冷却する。音響的ＥＣＭヒドロゲルを約２３℃～約２７℃に冷却することができる。音響的ＥＣＭヒドロゲルを約４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０℃に冷却して、ゲル相を誘導することができる。

【０１５９】

一部の態様では、超音波処理に先立ち、外因性ＭＢＶをＥＣＭ溶液に添加することができる。さらに他の態様では、超音波処理後に、外因性ＭＢＶを音響的ＥＣＭヒドロゲルに添加することができる。ヒドロゲルのゲルへの転移の前に（例えば、ＥＣＭヒドロゲルが液相における間に）、外因性ＭＢＶをＥＣＭヒドロゲルに添加することができ；したがって、一態様では、外因性ＭＢＶを音響的ＥＣＭヒドロゲルに３７℃を超える温度で添加して、外因性ＭＢＶを含有する本明細書に開示される音響的ヒドロゲルを含む組成物を産生する。別の態様では、外因性ＭＢＶを音響的ＥＣＭヒドロゲルに、ＥＣＭヒドロゲルがゲル相にある間に、例えば、３７℃未満の温度で添加する。例えば、外因性ＭＢＶを含む音響的ＥＣＭヒドロゲルが本明細書に開示される。

【０１６０】

一部の態様では、音響的哺乳動物ＥＣＭヒドロゲルが開示され、ここで、ヒドロゲルは、熱可逆性であり、ヒドロゲルは、約３７℃を下回る温度では固体（ゲル）相にあり、３７℃を超える温度では液体（ゾル）相にある。音響的ヒドロゲルは、本明細書に開示される方法のいずれかを使用して産生することができる。一部の態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルの貯蔵弾性率（Ｇ’）は損失弾性率（Ｇ’’）よりも約１桁分高い。さらなる態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルの粘度は、約１５～約３７℃の温度において、例えば、約１５、１５、１６、１７、１８、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、および／または３６℃において、応力が増加すると低下する。さらなる態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルの粘度は、室温で、および／または約２３℃～約２７℃および／または約１５℃～約２５℃で応力が増加すると低下する。一態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルのゲルからゾルへの転移は約３７℃で起こり、したがって、ヒドロゲルは体温で十分に粘性であるので、ヒドロゲルを粘膜下クッションとして使用することができる。

【０１６１】

これらの音響的ＥＣＭヒドロゲルは、上に開示されている任意の哺乳動物ＥＣＭから作製することができる。具体的で非限定的な例では、ＥＣＭは、ヒトＥＣＭである。他の非限定的な例では、ＥＣＭは、膀胱ＥＣＭ、小腸粘膜下ＥＣＭ、食道ＥＭＣ、または皮膚ＥＣＭである。一態様では、ＥＣＭは、膀胱ＥＣＭである。別の態様では、ＥＣＭは、皮膚ＥＣＭである。さらに別の態様では、ＥＣＭは、食道ＥＣＭである。ＥＣＭの供給源は、例えば、ブタ、ウシ、またはヒツジであってよい。

【０１６２】
一部の態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルは、ＥＣＭを約２５ｍｇ／ｍｌ～約６００ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。さらなる態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルは、ＥＣＭを約２０ｍｇ／ｍｌ～約６００ｍｇ／ｍｌ、約２５ｍｇ／ｍｌ～約３００ｍｇ／ｍｌ、約２５ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌ、および約２５ｍｇ／ｍｌ～約１５０ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。さらなる態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルは、ＥＣＭを、液体中、例えば緩衝液中、約５０ｍｇ／ｍｌ～６００ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。音響的ＥＣＭヒドロゲルのＥＣＭ濃度は、約５０ｍｇ／ｍｌ～約３００ｍｇ／ｍｌ、約５０ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌ、約５０ｍｇ／ｍｌ～約１５０ｍｇ／ｍｌ、約５０～１００ｍｇ／ｍｌ、または約１００～１５０ｍｇ／ｍｌであってもよい。一部の非限定的な例では、音響的ＥＣＭヒドロゲルは、ＥＣＭを、約２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、および２００ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。一部の非限定的な例では、音響的ＥＣＭヒドロゲルは、ＥＣＭを、約２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～４０、４０～４５、４５～５０、５０～５５、５５～６０、６０～６５、６５～７０、７０～７５、７５～８０、８０～８５、８５～９０、９０～９５、９５～１００、１００～１０５、１０５～１１０、１１０～１１５、１１５～１２０、１２０～１２５、１２５～１３０、１３０～１３５、１３５～１４０、１４０～１４５、１４５～１５０、１５０～１５５、１５５～１６０、１６０～１６５、１６５～１７０、１７０～１７５、１７５～１８０、１８０～１８５、１８５～１９０、１９０～１９５、および１９５～２００ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。例示的な非限定的なＥＣＭの濃度として、約２５ｍｇ／ｍｌ、１００ｍｇ／ｍｌ、および１５０ｍｇ／ｍｌも挙げられる。非限定的な一例では、音響的ＥＣＭヒドロゲルは、ＥＣＭを約２５ｍｇ／ｍｌ～約１５０ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。一態様では、ＥＣＭ濃度は約１００ｍｇ／ｍｌである。
【０１６３】
一部の態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルは、ＥＣＭの濃度が約１５０ｍｇ／ｍＬの場合、１５℃において約１４００Ｐａ＊ｓの粘度および２５℃の温度で約４００Ｐａ＊ｓの粘度を有する。他の態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルは、ＥＣＭの濃度が約１５０ｍｇ／ｍＬの場合、１５℃においておよそ２７００Ｐａ＊ｓ、２５℃においておよそ８００Ｐａ＊ｓ、３７℃において６００Ｐａ＊ｓの貯蔵弾性率を有する。
【０１６４】
液相における音響的ＥＣＭヒドロゲルを、３次元鋳型に入れてから冷却すること、またはＴＥＦＬＯＮ（登録商標）シート上に広げてフィルムを形成することができる。音響的ＥＣＭヒドロゲル中のＥＣＭが高濃度であること（５０～６００ｍｇ／ｍｌ）により、非常に薄いシート、例えば、４ミクロンの薄さのシートを形成することが可能になる。音響的ＥＣＭヒドロゲルは、４ミクロンを超える任意のサイズに、かつ任意の２次元または３次元形状に形作ることができる。一部の態様では、厚さ約４～約１０ミクロン、例えば、厚さ約４、５、６、７、８、９、または１０ミクロンのシートを形成する。音響的ＥＣＭヒドロゲルは、円柱、球体、楕円体、円盤、シート、立方体、直方体、錐体、三角形または長方形の角柱、ならびに中空球体、中空楕円体、および開口中空円柱等を含むがこれらに限定されない、任意の３次元形状に形成することができる。音響的ＥＣＭヒドロゲルは、例えば、シリンジに入れ、シリンジからゲルまたはゾル相のいずれかで押し出すことにより、注射剤として使用することもできる。
【０１６５】
一部の態様では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを、約０．１ｍｇ／ｍｌを超える濃度で含む。哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを約０．１ｍｇ／ｍｌ～約１，０００ｍｇ／ｍｌの濃度で含んでよい。適切な濃度として、約１ｍｇ／ｍｌ～約１，０００ｍｇ／ｍｌ、１ｍｇ／ｍｌ～約５００ｍｇ／ｍｌ、１ｍｇ／ｍｌ～約３００ｍｇ／ｍｌ、１ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌ、約１ｍｇ／ｍｌ～約１００

ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ～１００ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌ、約１００ｍｇ／ｍｌ～約５００ｍｇ／ｍｌ、約５０ｍｇ／ｍｌ～約１５０ｍｇ／ｍｌ、約２０ｍｇ／ｍｌ～約７０ｍｇ／ｍｌ、約４ｍｇ／ｍｌ～約２０ｍｇ／ｍｌ、または約４０ｍｇ／ｍｌ～約６６ｍｇ／ｍｌの可溶化ＥＣＭも挙げられる。哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを、緩衝液等の液体中、約１０ｍｇ／ｍｌ～約５００ｍｇ／ｍｌの濃度で含んでよい。哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、１０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、および２００ｍｇ／ｍｌの可溶化ＥＣＭを含んでよい。例示的な濃度として、約２０ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌ、６６ｍｇ／ｍｌ、７０ｍｇ／ｍｌ、および１５０ｍｇ／ｍｌの可溶化ＥＣＭが挙げられる。非限定的な一例では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを約２０ｍｇ／ｍｌ～約７０ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。非限定的な一例では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを約４０ｍｇ／ｍｌまたは約６６ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。非限定的な一例では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを約１０ｍｇ／ｍｌ～約１００ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。非限定的な一例では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを約５０ｍｇ／ｍｌ～約１５０ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。非限定的な一例では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを約１０ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。非限定的な一例では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを約１０ｍｇ／ｍｌ～約５００ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。

【０１６６】

例示的な濃度として、約２０ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌ、６６ｍｇ／ｍｌ、７０ｍｇ／ｍｌ、および１５０ｍｇ／ｍｌの可溶化ＥＣＭが挙げられる。非限定的な一例では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、約２０ｍｇ／ｍｌ～約７０ｍｇ／ｍｌの可溶化ＥＣＭを含む。非限定的な一例では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、約４０ｍｇ／ｍｌまたは約６６ｍｇ／ｍｌの可溶化ＥＣＭを含む。

【０１６７】

一部の態様では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを約２５ｍｇ／ｍｌ～約６００ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。さらなる態様では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを約２０ｍｇ／ｍｌ～約６００ｍｇ／ｍｌ、約２５～約５００ｍｇ／ｍｌ、約２５～約４００ｍｇ／ｍｌ、約２５ｍｇ／ｍｌ～約３００ｍｇ／ｍｌ、約２５ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌ、および約２５ｍｇ／ｍｌ～約１５０ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。さらなる態様では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを約５０ｍｇ／ｍｌ～６００ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを、約５０ｍｇ／ｍｌ～約３００ｍｇ／ｍｌ、約５０ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌ、約５０ｍｇ／ｍｌ～約１５０ｍｇ／ｍｌ、約５０～１００ｍｇ／ｍｌ、または約１００～１５０ｍｇ／ｍｌの濃度で含んでもよい。一部の非限定的な例では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭを約２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～４０、４０～４５、４５～５０、５０～５５、５５～６０、６０～６５、６５～７０、７０～７５、７５～８０、８０～８５、８５～９０、９０～９５、９５～１００、１００～１０５、１０５～１１０、１１０～１１５、１１５～１２０、１２０～１２５、１２５～１３０、１３０～１３５、１３５～１４０、１４０～１４５、１４５～１５０、１５０～１５５、１５５～１６０、１６０～１６５、１６５～１７０、１７０～１７５、１７５～１８０、１８０～１８５、１８５～１９０、１９０～１９５、および１９５～２００ｍｇ／ｍｌの濃度で含む。

【０１６８】

一部の態様では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルとトレハロースとを含む組成物を産生する。さらなる態様では、組成物は、約０．１ｍｇ／ｍｌ～約７００ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含む。一部の態様では、組成物は、約１ｍｇ／ｍｌのトレハロース～約７００

ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含む。さらなる態様では、組成物は、５０ｍｇ／ｍｌ～約５００ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含む。他の態様では、組成物は、約１０ｍｇ／ｍｌのトレハロース～約６００ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ～約５００ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ～約４００ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ～約３００ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌ、または約１０ｍｇ／ｍｌ～約１００ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含む。さらなる態様では、組成物は、約０．１～約１００ｍｇ／ｍｌのトレハロース、約０．１～約１０ｍｇ／ｍｌのトレハロース、または約０．１～約１ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含んでよい。さらなる態様では、組成物は、約５０ｍｇ／ｍｌ～約４００ｍｇ／ｍｌのトレハロース、約５０ｍｇ／ｍｌ～約３００ｍｇ／ｍｌのトレハロース、約５０ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌのトレハロース、または約５０ｍｌ／ｍｌ～約１００ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含んでよい。一部の態様では、組成物は、約２０ｍｇ／ｍｌ～約７０ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含む。一部の態様では、組成物は、約１０ｍｇ／ｍｌ～約１００ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含む。一部の態様では、組成物は、１５～３０ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含む。一部の態様では、組成物は、６０～７０ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含む。一部の態様では、組成物は、２０ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含む。一部の態様では、組成物は、６６ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含む。他の態様では、組成物は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、６６、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、または６００ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含んでよい。他の態様では、組成物は、約１００ｍｇ／ｍｌ～約７００ｍｇ／ｍｌのトレハロース、例えば、約１００、１５０、２０、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、または６００ｍｇ．ｍｌのトレハロースを含む。さらなる態様では、組成物は、約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９または１ｍｇ／ｍｌのトレハロースを含んでよい。

【０１６９】

さらなる態様では、組成物は、可溶化ＥＣＭ、追加的な粉砕された哺乳動物ＥＣＭ、および必要に応じてトレハロースを含む哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルを含む。粉砕されたＥＣＭは、超音波で処理されておらず、ヒドロゲル中に可溶化されていない。粉砕されたＥＣＭは、哺乳動物ＥＣＭヒドロゲルも含む組成物に対する別個の添加剤である。組成物は、体積当たりの重量（ｗ／ｖ）で約１～約３０％の、音響的ＥＣＭヒドロゲル中に可溶化されていない粉砕されたＥＣＭを含んでよい。理論に束縛されることなく、粉砕されたＥＣＭは、一般に、インタクトなコラーゲン粒子を有するが、一方、音響的ＥＣＭヒドロゲルは、超音波によって破壊されたコラーゲンを有し、その結果、可溶性コラーゲン含量が増加している（Hussey et al., Ultrasonic cavitation to prepare ECM hydrogels Acta Biomater. 2020 May;108:77-86、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。したがって、追加的な粉砕された哺乳動物ＥＣＭを含有する音響的ＥＣＭヒドロゲル組成物は、インタクトなコラーゲンと破壊されたコラーゲンの両方を含む。

【０１７０】

組成物は、約５％～約３０％ｗ／ｖ、約１０％～約３０％、約１５％～約３０％、約２０％～約３０％、約２５％～約３０％、約１％～約２０％、約５％～約２０％、約１０％～約２０％、約１５％～約２０％、約１０％～約２０％、または約１５％～約２０％の粉砕されたＥＣＭ（ｗ／ｖ）を含んでよい。組成物は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、または３０％の粉砕されたＥＣＭ（ｗ／ｖ）を含んでよい。組成物は、１％以下、２％以下、３％以下、４％以下、５％以下、６％以下、７％以下、８％以下、９％以下、１０％以下、１５％以下、２０％以下、２５％以下、または３０％以下の粉砕されたＥＣＭ（ｗ／ｖ）を含んでよい。組成物は、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、または３０％の粉砕されたＥＣＭ（ｗ／ｖ）を含んでよい。

【０１７１】

粉砕されたＥＣＭは、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルと同じ種に由来し得る。具体的

で非限定的な一例では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルと粉砕されたＥＣＭはどちらもブタのものである。他の非限定的な例では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルと粉砕されたＥＣＭはどちらもヒトのものである。

【０１７２】

粉砕されたＥＣＭは、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルと同じまたは異なる組織に由来し得る。一態様では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルと粉砕されたＥＣＭは同じ組織に由来する。一態様では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルおよび粉砕されたＥＣＭは皮膚ＥＣＭである。一態様では、哺乳動物音響的ＥＣＭヒドロゲルおよび粉砕されたＥＣＭはブタ皮膚ＥＣＭである。

【０１７３】

組成物を被験体への適用に先立ち滅菌することができる。組成物を、濾過および放射線照射を含む当業者に公知の任意の方法を使用して滅菌することができる。一部の態様では、組成物を、ｅビームまたはガンマ線等の電離放射線を用いて滅菌する。組成物を、ガンマ線を使用して滅菌することができ、例えば、組成物を、１０～５０ｋＧｙの照射、例えば、１５～４５ｋＧｙの照射、２０～４０ｋＧｙの照射、または１０～３０ｋＧｙの照射を使用して滅菌する。一部の非限定的な例では、組成物を、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５または５０ｋＧｙの照射を使用して滅菌する。一般に、組成物を、検出可能な生存可能な病原体、例えば、これらに限定されないが、ウイルスおよび細菌等の非存在を達成するために十分な時間にわたって滅菌する。

【０１７４】

酵素的ＥＣＭヒドロゲル

ＥＣＭヒドロゲルを調製する方法は、例えば、その内容が全ての目的に関して参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第８，３６１，５０３号に開示されている。任意の型の細胞外マトリックス組織を使用して、本明細書に開示される方法において使用することができるヒドロゲルを産生することができる（ＥＣＭに関する米国特許第４，９０２，５０８号；同第４，９５６，１７８号；同第５，２８１，４２２号；同第５，３５２，４６３号；同第５，３７２，８２１号；同第５，５５４，３８９号；同第５，５７３，７８４号；同第５，６４５，８６０号；同第５，７７１，９６９号；同第５，７５３，２６７号；同第５，７６２，９６６号；同第５，８６６，４１４号；同第６，０９９，５６７号；同第６，４８５，７２３号；同第６，５７６，２６５号；同第６，５７９，５３８号；同第６，６９６，２７０号；同第６，７８３，７７６号；同第６，７９３，９３９号；同第６，８４９，２７３号；同第６，８５２，３３９号；同第６，８６１，０７４号；同第６，８８７，４９５号；同第６，８９０，５６２号；同第６，８９０，５６３号；同第６，８９０，５６４号；および同第６，８９３，６６６号を参照されたい）。ある特定の態様では、ＥＣＭは、脊椎動物から、例えばであって限定するものではないが、ヒト、サル、ウマ、ブタ、ウシおよびヒツジを含むがこれらに限定されない、温血哺乳動物の脊椎動物から単離される。具体的で非限定的な例では、ＥＣＭは、ブタまたはヒトのものである。

【０１７５】

ＥＣＭは、膀胱、腸、肝臓、食道および真皮を限定することなく含む、任意の臓器または組織に由来し得る。例えば、ＥＣＭは、膀胱、小腸、心臓、真皮、肝臓、腎臓、子宮、脳、血管、肺、骨、筋肉、膵臓、胎盤、胃、脾臓、結腸、脂肪組織、および／または食道に由来し得る。ＥＣＭは、細胞培養物から得ることができる。一態様では、ＥＣＭは、膀胱から単離される。別の態様では、ＥＣＭは、食道に由来する。ＥＣＭは、ＥＣＭの基底膜部分を含んでも含まなくてもよい。ある特定の態様では、ＥＣＭは、基底膜の少なくとも一部分を含む。

【０１７６】

一部の態様では、米国特許第８，３６１，５０３号（参照により本明細書に組み込まれる）と同様に、ブタ膀胱ＥＣＭ等の膀胱ＥＣＭを、メスの柄および湿らせたガーゼによる長手方向の拭き取り動作を使用して膀胱組織を擦過して、漿膜および筋層の両方を含む外

層を除去することによって調製する。組織セグメントの外転後に、同拭き取り動作を使用して、基礎をなす組織から粘膜の内腔部分が離層される。一部の態様では、粘膜下組織の穿孔を防止する。これらの組織が除去された後に、その結果得られたＥＣＭは、粘膜下層から主になる。脱細胞化された皮膚ＥＣＭからのヒドロゲルの産生は、参照により本明細書に組み込まれる、Wolf et al., Biomaterials 33: 7028-7038, 2012に開示されている。食道組織からのＥＣＭの産生は、例えば、どちらも参照により本明細書に組み込まれる、Badylak et al. J Pediatr Surg. 35 (7): 1097-103, 2000およびBadylak et al., J Surg Res. 2005 September; 128 (1): 87-97, 2005に開示されている。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第６，８９３，６６６号には、膀胱、皮膚、食道および小腸からのＥＣＭの産生が開示されている。

【０１７７】

市販のＥＣＭ調製物を本明細書に記載の方法、デバイスおよび組成物に使用することもできる。一態様では、ＥＣＭは、小腸粘膜下組織またはＳＩＳに由来する。市販の調製物として、ＳＵＲＧＩＳＩＳ（商標）、ＳＵＲＧＩＳＩＳ－ＥＳ（商標）、ＳＴＲＡＴＡＳＩＳ（商標）、およびＳＴＲＡＴＡＳＩＳ－ＥＳ（商標）（Ｃｏｏｋ Ｕｒｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｃ．；Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、Ｉｎｄ．）およびＧＲＡＦＴＰＡＴＣＨ（商標）（Ｏｒｇａｎｏｇｅｎｅｓｉｓ Ｉｎｃ．；Ｃａｎｔｏｎ Ｍａｓｓ．）が挙げられるがこれらに限定されない。別の態様では、ＥＣＭは、真皮に由来する。市販の調製物として、ＰＥＬＶＩＣＯＬ（商標）（欧州ではＰＥＲＭＡＣＯＬ（商標）として販売されている；Ｂａｒｄ、Ｃｏｖｉｎｇｔｏｎ、Ｇａ．）、ＲＥＰＬＩＦＯＲＭ（商標）（Ｍｉｃｒｏｖａｓｉｖｅ；Ｂｏｓｔｏｎ、Ｍａｓｓ．）およびＡＬＬＯＤＥＲＭ（商標）（ＬｉｆｅＣｅｌｌ；Ｂｒａｎｃｈｂｕｒｇ、Ｎ．Ｊ．）が挙げられるがこれらに限定されない。別の態様では、ＥＣＭは、膀胱に由来する。市販の調製物として、ＵＢＭ（Ａｃｅｌｌ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ；Ｊｅｓｓｕｐ、Ｍｄ．）が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１７８】

ＥＣＭを調製するための組織は、多種多様な仕方で収集することができ、収集したら、収集された組織の種々の部分を使用することができる。ＥＣＭが食道および小腸からも調製されており、このＥＣＭからヒドロゲルが調製されている、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Keane et al., Tissue Eng. Part A, 21(17-18): 2293-2300, 2015を参照されたい。食道ＥＣＭは、外筋層から粘膜および粘膜下組織を機械的に分離し、粘膜層を、トリプシンを含む緩衝液で消化し、続いてスクロース、ＴＲＩＴＯＮ（登録商標）－Ｘ１００（登録商標）、デオキシコール酸、過酢酸およびＤＮＡｓｅに曝露させることによって調製することができる。小腸粘膜下組織（ＳＩＳ）は、インタクトな小腸から粘膜の表層、漿膜、および外筋層を機械的に除去し、粘膜下組織、粘膜筋板、および緻密層基底部をインタクトなまま残すことによって調製することができる。次いで、ＳＩＳを過酢酸で処理する。例示的なプロトコールは、Keane et al.に提供されている。皮膚ヒドロゲルは、例えば、参照により本明細書に組み込まれるWolf et al, J Biomed Mater Res A. 2013. 35 (25): 6838-49. PMID: 23873846. PMCID: 3808505に開示されている通り産生することができる。

【０１７９】

一態様では、収集されたブタ膀胱からＥＣＭを単離して、膀胱マトリックス（ＵＢＭ）を調製する。過剰な結合組織および残尿を膀胱から除去する。漿膜、外筋層、粘膜下層および大部分の粘膜筋板を、機械的擦過によって、または酵素処理、湿潤化、および擦過の組合せによって除去することができる。これらの組織の機械的除去は、外層（特に反内腔側平滑筋層）およびさらには粘膜の内腔部分（上皮層）を除去するための長手方向の拭き取り動作を使用した擦過によって達成することができる。これらの組織の機械的除去は、例えば、Ａｄｓｏｎ－Ｂｒｏｗｎ鉗子およびＭｅｔｚｅｎｂａｕｍハサミと、湿らせたガーゼに包まれたメスの柄または他の剛性の物体による長手方向の拭き取り動作を使用した

、筋層および粘膜下層の拭き取りによる腸間膜組織の除去によって達成される。粘膜の上皮細胞は、組織を脱上皮化溶液、例えばであって限定するものではないが、高張性食塩水に浸漬することによって解離することができる。その結果得られたＵＢＭは、粘膜の基底膜および隣接する固有層を含み、それをさらに過酢酸で処理し、凍結乾燥させ、粉末化する。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第８，３６１，５０３号を参照されたい。

【０１８０】

真皮切片を酵素的ＥＣＭヒドロゲルの調製に使用することができる。参照により本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ出願第２０１５／１５１６４７２８号を参照されたい。具体的で非限定的な例では、真皮を、０．２５％トリプシン／１％Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００（すなわち、ＳＤＳなし）を用い、以下の溶液中、ボルテックス振とう機で室温、３００ＲＰＭで脱細胞化することができる：０．２５％トリプシン、６時間、１×；脱イオン水、１５分間、３×；７０％エタノール、１０～１２時間、１×；３％H_2O_2、１５分間、１×、脱イオン水、１５分間、２×；０．２６％ＥＤＴＡ／０．６９％Ｔｒｉｓ中１％Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００、６時間、１×、次いで、一晩、１×；脱イオン水、１５分間、３×；０．１％過酢酸／４％エタノール、２時間、１×；ＰＢＳ、１５分間、２×；および最終的に脱イオン水、１５分間、２×。次いで、真皮シートを凍結乾燥させ、その後、ＷａｒｉｎｇブレンダーおよびＷｉｌｅｙ　Ｍｉｌｌを＃２０メッシュスクリーンと共に使用して粒子の形態に変える。

【０１８１】

一部の態様では、先ず上皮細胞を、先ず組織を脱上皮化溶液、例えば、高張性食塩水に、例えばであって限定するものではないが、１．０Ｎ食塩水、１０分間～４時間に及ぶ期間浸漬することにより、離層させることができる。高張性食塩溶液への曝露により、基礎をなす基底膜から上皮細胞が有効に除去される。初期離層手順後に残っている組織は、上皮基底膜および上皮基底膜の反内腔側の組織層を含む。次に、この組織を、反内腔側組織の大部分を除去するが上皮基底膜は除去しないさらなる処理に供する。外側漿膜、外膜、平滑筋組織、粘膜下層および大部分の粘膜筋板を、機械的擦過によって、または酵素処理、湿潤化、および擦過の組合せによって残っている脱上皮化組織から除去する。

【０１８２】

ＥＣＭを、過酢酸への曝露、低線量ガンマ線、気体プラズマ滅菌、エチレンオキシド処理または電子ビーム処理を含むがこれらに限定されない、いくつもの標準的技法によって滅菌することができる。より典型的には、ＥＣＭの滅菌は、０．１％（ｖ／ｖ）過酢酸、４％（ｖ／ｖ）エタノール、および９５．９％（ｖ／ｖ）滅菌水に２時間浸漬することによって得られる。残留過酢酸を、ＰＢＳ（ｐＨ＝７．４）で２回、１５分間洗浄し、滅菌水で２回、１５分間洗浄することによって除去する。ＥＣＭ材料を、プロピレンオキシドまたはエチレンオキシド処理、ガンマ線照射処理（０．０５～４ｍＲａｄ）、気体プラズマ滅菌、過酢酸滅菌、または電子ビーム処理によって滅菌することができる。ＥＣＭはまた、タンパク質材料の架橋結合を引き起こすグルタルアルデヒドによる処理によって滅菌することができるが、この処理は、材料を、ゆっくりと再吸収されるかまたは一切再吸収されないように実質的に変更し、構成的リモデリングではなく瘢痕組織形成または封入によりよく似た、異なる型の宿主リモデリングを駆動するものである。タンパク質材料の架橋結合は、カルボジイミドまたは脱水素熱処理または光酸化法でも誘導され得る。米国特許第８，３６１，５０３号に開示されている通り、ＥＣＭを、０．１％（ｖ／ｖ）過酢酸（ａ）、４％（ｖ／ｖ）エタノール、および９６％（ｖ／ｖ）滅菌水に２時間浸漬することによって消毒する。次いで、ＥＣＭ材料をＰＢＳ（ｐＨ＝７．４）で２回、１５分間洗浄し、脱イオン水で２回、１５分間洗浄する。

【０１８３】

目的の組織の単離後、脱細胞化を、様々な方法、例えばであって限定するものではないが、高張性食塩水、過酢酸、ＴＲＩＴＯＮ（登録商標）－Ｘ（登録商標）または他の洗剤への曝露によって実施する。滅菌と脱細胞化を同時に行うことができる。例えばであって

限定するものではないが、上記の過酢酸による滅菌がＥＣＭの脱細胞化にも役立ち得る。脱細胞化されたＥＣＭを次いで、乾燥、凍結乾燥（フリーズドライ）または風乾することができる。乾燥させたＥＣＭを、裂くこと、製粉すること、切ること、すりつぶすこと、およびせん断することを含むがこれらに限定されない方法によって粉砕することができる。粉砕されたＥＣＭを、例えばであって限定するものではないが、凍結またはフリーズドライした状態ですりつぶすことまたは製粉すること等の方法によってさらに処理して、粉末化された形態にすることもできる。可溶化ＥＣＭ組織を調製するために、粉砕されたＥＣＭを、酸性溶液中で酸性プロテアーゼで消化して、消化物溶液を形成する。酸性プロテアーゼは、トリプシンおよび／またはペプシン、例えば、またはこれらの組合せであってよい。

【０１８４】

一態様では、脱細胞化されたＥＣＭ材料を酸性プロテアーゼによって部分的に消化する。一実施例では、脱細胞化されたＥＣＭ材料を、１ｍｇ／ｍＬの凍結乾燥され粉末化されたＥＣＭ材料の０．０１ＭのＨＣｌ中１ｍｇ／ｍＬのペプシンによる４８時間にわたる消化ほど完全には消化しない。別の例では、脱細胞化されたＥＣＭ材料を、１０ｍｇ／ｍＬの凍結乾燥され粉末化されたＥＣＭ材料の０．０１ＭのＨＣｌ中１ｍｇ／ｍＬのペプシンによる４８時間にわたる消化ほど完全には消化しない。さらなる一態様では、ＥＣＭ材料中のヒアルロン酸を、消化されていないＥＣＭ材料と比較して５０％未満、４０％未満、３０％未満、２５％未満、２０％未満または１０％未満に消化する。参照により本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ出願第ＷＯ２０１５／１６４７２８号を参照されたい。

【０１８５】

ＥＣＭの消化物溶液を、典型的には、室温で絶えず撹拌しながらある特定の時間量にわたって保持する。ＥＣＭ消化物をすぐに使用することもでき、－２０℃で保管するまたは例えばであって限定するものではないが、－２０℃または－８０℃で凍結させることもできる。したがって、ＥＣＭ消化物を可溶化形態で保持することができる。ヒドロゲルを可溶化形態で保持するための方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、２０１６年９月１０日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ１６／５２２６１号に開示されている。

【０１８６】

ＥＣＭが可溶化されたら（典型的には、実質的に完全に）、溶液のｐＨを７．２～７．８の間に、および一態様によるとｐＨ７．４に、上昇させる。ｐＨを約７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７または７．８に上昇させることができる。溶液のｐＨを上昇させるために、ＮａＯＨを含む、ヒドロキシルイオンを含有する塩基等、塩基を使用することができる。同様に、溶液を標的ｐＨにするため、または、ゲルのｐＨおよびイオン強度を生理的ｐＨおよびイオン条件等の標的レベルに維持することを補助するために、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）を含むがこれらに限定されない、等張性緩衝液等、緩衝液を使用することができる。これにより、可溶化ＥＣＭヒドロゲルである「プレゲル」溶液が形成される。中和された消化物溶液（プレゲル、可溶化ＥＣＭヒドロゲル）をより下限臨界溶液温度でゲル化することができる。参照により本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ公開第２０１５／１６４７２８号を参照されたい。

【０１８７】

ＥＣＭヒドロゲルは、温度が上昇するとゲルを形成する（ゾルからゲルへの転移）。リバースゲル（ｒｅｖｅｒｓｅ　ｇｅｌ）の下限臨界溶液温度（ＬＣＳＴ）は、リバースゲル化（ｒｅｖｅｒｓｅ－ｇｅｌｌｉｎｇ）ポリマーがその溶媒（例えば、水または水性溶媒）中で可溶性である温度を下回る温度である。温度が上昇してリバースゲルのＬＣＳＴを超えると、ヒドロゲルが形成される。ポリマーのリバースゲル化（ｒｅｖｅｒｓｅ　ｇｅｌａｔｉｏｎ）の一般的な概念およびそのＬＣＳＴとの関係は化学分野で広く知られている。本明細書に記載のＥＣＭゲルは、例えば、下記の通り脱細胞化されたインタクトなＥＣＭから、ＥＣＭ材料を酸性プロテアーゼで消化し、材料を中和してプレゲルを形成し、プレゲルの温度を、プレゲルのＬＣＳＴを上回るまで上昇させて、プレゲルをゲル化さ

せて、例えばヒドロゲルを形成することによって調製される。酸性プロテアーゼ消化物の溶液からゲルへの転移温度は、典型的には、１０℃～４０℃の範囲およびその間の任意の増分または範囲、例えば、２０℃～３５℃に入る。例えば、プレゲルを３７℃に温めて、ヒドロゲルを形成することができる。例えば、プレゲル。

【０１８８】

したがって、ＥＣＭは、典型的には、哺乳動物組織、例えば、限定するものではないが、膀胱、食道、または小腸のうちの１つに由来し得る。具体的で非限定的な一例では、ＥＣＭは、膀胱に由来する。一態様によると、組織から調製された脱細胞化されたＥＣＭ材料を酸性プロテアーゼによる部分的もしくは完全な消化に先立ち透析しない、かつ／または、酸性プロテアーゼによる消化後、中和され消化されたＥＣＭ材料のゲル化前に透析しない。

【０１８９】

非限定的な一態様では、ＥＣＭを凍結乾燥させ、粉砕する。次いで、ＥＣＭを酸性溶液中で酸性プロテアーゼにより可溶化して、消化されたＥＣＭ、例えば膀胱ＥＣＭを産生する。酸性プロテアーゼは、限定するものではないが、ペプシンまたはトリプシン、またはこれらの組合せであってよい。次いで、ＥＣＭを、プロテアーゼに好適または最適な酸性ｐＨ、例えば約ｐＨ２超、またはｐＨ２～４で、例えば、０．０１ＭのＨＣｌ溶液中で可溶化することができる。ＥＣＭは、典型的には、混合（撹拌（ｓｔｉｒｒｉｎｇ）、撹拌（ａｇｉｔａｔｉｏｎ）、混合（ａｄｍｉｘｉｎｇ）、ブレンド、回転、傾斜等）しながら、組織型に応じて約１２～約４８時間にわたって（例えば、下の実施例を参照されたい）可溶化される。ＥＣＭヒドロゲルは、（ｉ）細胞外マトリックスを粉砕するステップと、（ｉｉ）インタクトな、透析されていないまたは架橋されていない細胞外マトリックスを酸性溶液中で酸性プロテアーゼにより消化することによって可溶化して、消化物溶液を産生するステップと、（ｉｉｉ）消化物溶液のｐＨをｐＨ７．２～７．８の間に上昇させて、中和された消化物溶液（プレゲル溶液）を産生するステップと、（ｉｖ）溶液をゲル化するステップとによって調製される。

【０１９０】

したがって、酸性溶液中で酸性プロテアーゼにより酵素消化されたＥＣＭの、外因性ＭＢＶを含有する組成物が開示される。例えばｐＨ７．０～７．８に中和した場合、かつ約３７℃に温めた場合、組成物はゲルを形成し、プロテアーゼは不活性化される。一態様では、外因性ＭＢＶは、骨にも心臓組織にも由来しない。さらなる態様では、組成物中の外因性ＭＢＶの濃度は、５ｍｇ／ｍＬよりも高い。

【０１９１】

例えばｐＨ７．０～７．８の中性溶液中の酵素消化されたＥＣＭの組成物も開示され、ここで、溶液は、不活性化された酸性プロテアーゼ、例えば、不活性化されたペプシンおよび／もしくはトリプシン、またはその活性型ではＥＣＭの消化に適する別の不活性化された酸性プロテアーゼを含有し、組成物は、外因性ＭＢＶも含有する。溶液は、約３７℃に温めると、ゲルを形成する。一態様では、外因性ＭＢＶは、骨にも心臓組織にも由来しない。さらなる態様では、組成物中の外因性ＭＢＶの濃度は、５ｍｇ／ｍＬよりも高い。酸性プロテアーゼは、例えばｐＨの変化に起因して不活性化または非活性化され得る。

【０１９２】

さらなる態様では、ＥＣＭヒドロゲルを遠心分離することができ、可溶性画分を採取する。ＥＣＭヒドロゲルを分画するための例示的な方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ公開第ＷＯ２０１５／１６４７２８号に開示されている。このＰＣＴ公開に開示されている方法は、組織から調製された脱細胞化されたＥＣＭ材料をペプシン等の酸性プロテアーゼにより部分的にまたは完全に消化するステップと、消化されたＥＣＭ材料をｐＨ７．０～８．０、７．２～７．８または７．４に中和するステップと、中和された、消化されたＥＣＭ材料を、その下限臨界溶液温度を上回る温度でゲル化するステップと、ゲル化したＥＣＭ材料を遠心分離して、ペレットおよび上清を産生するステップと、上清とペレットを分離し、これにより、ＥＣＭ材料の構造的画分と可溶性画分を分

離するステップとを含む。

【０１９３】

ＥＣＭヒドロゲルは、下限臨界溶液温度を上回る温度、例えば約３７℃の温度に曝露すると、ゲルを形成する。「プレゲル」形態のＥＣＭヒドロゲル（可溶化ＥＣＭヒドロゲル）は、例えばであって限定するものではないが、－２０℃または－８０℃で凍結し、保管することができる。「プレゲル」形態のＥＣＭヒドロゲルは、約２５℃等、室温で保管することができる。一部の非限定的な例では、ＥＣＭヒドロゲルは、３７℃未満、例えば、２５℃、２４℃、２３℃、２２℃、２１℃、２０℃、１９℃、１８℃、１７℃、１６℃、１５℃、１４℃、１３℃、１２℃、１１℃、１０℃、９℃、８℃、７℃、６℃、５℃、４℃ではプレゲル形態である。ＥＣＭヒドロゲルは、保管のために凍結させることができ、したがって、０℃未満で保管することができる。本明細書で使用される場合、用語「プレゲル形態」または「プレゲル」は、ｐＨが上昇しているが、ゲル化していないＥＣＭヒドロゲルを指す。例えばであって限定するものではないが、プレゲル形態のＥＣＭヒドロゲルのｐＨは７．２～７．８の間である。一部の態様では、可溶化ＥＣＭヒドロゲルを本明細書に開示される方法に使用する。ヒドロゲルを可溶化形態で保持するための方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、２０１６年９月１０日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ１６／５２２６１号に開示されている。一部の態様では、本明細書に記載の任意の方法によって調製されたＥＣＭ組成物を生体適合性基材に吸収させる、その上に吸着させる、または他の方法で、その上もしくは中に分散させる。生体適合性基材の非限定的な例としては、メッシュ、織られていない、脱細胞化された組織、ポリマー組成物、ポリマー構造、細胞成長足場、インプラント、整形外科インプラント、および眼内レンズ、縫合糸、血管内インプラント、ステント、および移植片が挙げられる。本明細書に記載の組成物は、絆創膏等の織られていない材料、縫合糸、セラミック、金属、またはポリマーインプラント等のインプラント、例えば、人工器官、人工血管または他の方法で改変された血管、弁、眼内レンズ、または組織インプラントに任意の適切な方法によって適用するまたは組み入れることができる。本明細書で使用される場合、用語「コーティングする」、ならびに「コーティングされた」および「コーティング」等の関連する同族語は、無機構造を本明細書に記載の組成物によって部分的にまたは全体的に覆うことを含むプロセスを指す。例えばであって限定するものではないが、無機構造の可溶化画分でのコーティングは、注ぐこと、包埋、層形成、浸漬、噴霧等の方法を含み得る。超音波処理を使用して、無機構造のコーティングを補助することができる。

【０１９４】

有用な組成物は、外因性ＭＢＶを含有する、「酵素的」ＥＣＭヒドロゲルであるＥＣＭヒドロゲルを含む。外因性ＭＢＶは、ＥＣＭヒドロゲルの生物活性特性を富化させ、被験体に投与されたまたは植え込まれた際の炎症の低減ならびに組織成長および修復の増強に関するそれらの治療有効性を改善するために添加される。酵素的ＥＣＭヒドロゲルは、可溶化ＥＣＭから作製される。可溶化ＥＣＭ組織を調製するために、粉砕されたＥＣＭを酸性溶液中で酸性プロテアーゼにより消化して、消化物溶液を形成する。本明細書で使用される場合、用語「酸性プロテアーゼ」は、ペプチド結合を切断する酵素を指し、ここで、酵素は、ペプチド結合を切断する活性が酸性ｐＨにおいて増加する。例えばであって限定するものではないが、酸性プロテアーゼは、ペプシンおよびトリプシンを含み得る。一態様では、ＥＣＭを粉砕に先立ち凍結乾燥する。

【０１９５】

ＥＣＭの消化物溶液を、典型的には、室温で絶えず撹拌しながらある特定の時間量にわたって保持する。ＥＣＭ消化物は、すぐに使用することもでき、または－２０℃で保管するもしくは例えばであって限定するものではないが、－２０℃もしくは－８０℃で凍結させることもできる。「プレゲル」溶液を形成するために、消化物溶液のｐＨをｐＨ７．２～７．８の間に上昇させる。ｐＨは、塩基または等張性緩衝溶液の１つまたは複数、例えばであって限定するものではないが、ＮａＯＨまたはＰＢＳ、ｐＨ７．４を添加することによって上昇させることができる。この方法は、典型的には、ゲル化に先立ち透析ステッ

プを含まず、典型的には、３７℃において、同等のコラーゲンまたは透析されたＥＣＭ調製物よりも緩徐にゲル化する、より完全なＥＣＭ様マトリックスが得られる。したがって、このゲルは、患者への注射により適したものであり、また、限定するものではないが、サイトカイン等、多くのネイティブな可溶性因子が保持されることに起因して、ネイティブなＥＣＭの品質がより保持されたものである。

【０１９６】

本明細書で使用される場合、用語「等張性緩衝溶液」は、ｐＨ７．２～７．８の間に緩衝されており、等張性環境を促進するために平衡濃度の塩を有する溶液を指す。本明細書で使用される場合、用語「塩基」は、ｐＨが７よりも大きい任意の化合物または化合物の溶液を指す。例えばであって限定するものではないが、塩基は、アルカリ性水酸化物またはアルカリ性水酸化物の水溶液である。ある特定の態様では、塩基は、ＮａＯＨまたはＰＢＳ中ＮａＯＨである。

【０１９７】

この「プレゲル」溶液は、適切に温和な温度、例えばであって限定するものではないが、約３７℃でインキュベートされた時点でゲル化し得る。プレゲルは、例えばであって限定するものではないが、－２０℃または－８０℃で凍結させ、保管することができる。本明細書で使用される場合、用語「プレゲル溶液」または「プレゲル」は、ｐＨが上昇した消化物溶液を指す。例えばであって限定するものではないが、プレゲルのｐＨは７．２～７．８の間である。本発明のＥＣＭヒドロゲル組成物は、不活性化された酸性プロテアーゼを含んでよい。本発明のＥＣＭヒドロゲル組成物のｐＨは７．２～７．８の間であってよい。「プレゲル」は、外因性ＭＢＶを含有してよい。一態様では、外因性ＭＢＶは、心臓ＥＣＭにも骨ＥＣＭにも由来しない。

【０１９８】

ＥＣＭヒドロゲル、消化物溶液またはプレゲルは、可溶化ＥＣＭを１ｍｇ／ｍＬ～５００ｍｇ／ｍＬの間の濃度で含有してよい。一部の態様では、ＥＣＭヒドロゲル、消化物溶液またはプレゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、１ｍｇ／ｍＬ～４００ｍｇ／ｍＬの間、例えば、１ｍｇ／ｍＬ～３５０ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～３００ｍｇ／ｍＬ、または１ｍｇ／ｍＬ～２５０ｍｇ／ｍＬまたは１ｍｇ／ｍＬ～２００ｍｇ／ｍＬまたは１ｍｇ／ｍＬ～１５０ｍｇ／ｍＬまたは１ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍＬまたは１ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ、または５ｍｇ／ｍＬ～２５０ｍｇ／ｍＬまたは２０ｍｇ／ｍＬ～２００ｍｇ／ｍＬまたは５ｍｇ／ｍＬ～２００ｍｇ／ｍＬまたは５ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍＬである。さらなる態様では、ＥＣＭヒドロゲル、消化物溶液またはプレゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、約５ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌの間、例えば、約１０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、約２０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、例えば、約３０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、約４０ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌ、約５ｍｇ／ｍｌ～約４０ｍｇ／ｍｌ、約５ｍｇ／ｍｌ～約３０ｍｇ／ｍｌ、約５ｍｇ／ｍｌ～約２０ｍｇ／ｍｇ、または約５ｍｇ／ｍｌ～約１０ｍｇ／ｍｌである。例えば、ＥＣＭヒドロゲル、消化物溶液またはプレゲルは、可溶化ＥＣＭを約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、または５００ｍｇ／ｍｌの濃度で含有してよい。非限定的な一例では、ＥＣＭヒドロゲル、消化物溶液またはプレゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、１０ｍｇ／ｍＬ～３０ｍｇ／ｍＬの間である。別の非限定的な例では、ＥＣＭヒドロゲル、消化物溶液またはプレゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、１ｍｇ／ｍＬ～２０ｍｇ／ｍＬの間である。さらに別の非限定的な例では、ＥＣＭヒドロゲル、消化物溶液またはプレゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、４ｍｇ／ｍＬ～２０ｍｇ／ｍＬの間である。別の非限定的な例では、ＥＣＭヒドロゲル、消化物溶液またはプレゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、１ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬの間である。一部の態様では、ＥＣＭヒドロゲル、消化物溶液またはプレゲル中の可溶化ＥＣＭの量は、約５～約１００ｍｇ／ｍＬ、例えば、５０～１００ｍｇ／ｍＬ、２５～７５ｍｇ／ｍＬ、６０～８０ｍｇ／ｍＬ、４０～６０ｍｇ／ｍＬ、５０～８０ｍｇ／ｍＬ、または約３０～約６０ｍｇ／ｍＬである。

【０１９９】
追加的な検討事項
一部の態様では、開示される組成物を生体適合性基材に吸収させる、その上に吸着させる、または他の方法で、その上もしくは中に分散させる。生体適合性基材の非限定的な例としては、メッシュ、織られていない、脱細胞化された組織、ポリマー組成物、ポリマー構造、細胞成長足場、インプラント、整形外科インプラント、および眼内レンズ、縫合糸、血管内インプラント、ステント、および移植片が挙げられる。一部の態様では、基材は、合成されたものである。他の態様では、基材は、天然のものである。本開示の組成物は、絆創膏等の織られていない材料、縫合糸、セラミック、金属、またはポリマーインプラント等のインプラント、例えば、人工器官、人工血管または他の方法で改変された血管、弁、眼内レンズ、または組織インプラントに任意の適切な方法によって適用するまたは組み入れることができる。本明細書で使用される場合、用語「コーティングする」、ならびに「コーティングされた」および「コーティング」等の関連する同族語は、無機構造を本明細書に記載の組成物によって部分的にまたは全体的に覆うことを含むプロセスを指す。例えばであって限定するものではないが、液相における開示される組成物による無機構造のコーティングは、注ぐこと、包埋、層形成、浸漬、噴霧等の方法を含み得る。
【０２００】
別の態様では、開示される組成物を、液相において、生体適合性の構造材料、例えば、金属、水酸化カルシウム、リン酸カルシウムもしくは炭酸カルシウム等の無機カルシウム化合物、またはセラミック組成物の上にコーティングする。適切な金属の非限定的な例は、コバルト－クロム合金、ステンレス鋼合金、チタン合金、タンタル合金、チタン－タンタル合金であり、様々なグレードのＣＰ　Ｔｉ（市販の純チタン）またはＴｉ　６Ａｌ４Ｖ（９０％ｗｔ．のＴｉ、６％ｗｔ．のＡｌおよび４％ｗｔ．のＶ）、ステンレス鋼３１６、ニチノール（ニッケル－チタン合金）、ヒドロキシアパタイトでコーティングされたチタン合金を限定することなく含む、モリブデン、タンタル、ニオブ、ジルコニウム、鉄、マンガン、クロム、コバルト、ニッケル、アルミニウムおよびランタン等、非金属構成成分および金属構成成分の両方を包含し得る。金属は、高い強度、柔軟性、および生体適合性に起因して有用である。金属はまた、複雑な形状に形成することができ、また、多くが、生物学的環境において腐食に抵抗し得、摩耗が低減し、組織を損傷させない。限定するものではないが、アラゴナイト等、セラミックス、カルシウム化合物を含む、他の組成物。金属、セラミックスおよび／または他の材料の組合せも有用であり得る。
【０２０１】
任意の有用な薬剤を本明細書に記載の任意の組成物と混合する、共送達する、共適用する、または他の方法で組み合わせることができる。例えばであって限定するものではないが、有用な薬剤として、インターフェロン、インターロイキン、ケモカイン、モノカイン、ホルモン、凝固薬、化学療法薬および抗生物質が挙げられる。
【０２０２】
処置部位における感染の潜在性を低減するために、抗生物質または抗菌剤を組成物に添加することができる。細菌の細胞壁を標的とするもの（例えば、ペニシリンおよびセファロスポリン）もしくは細胞膜を標的とするもの（例えば、ポリミキシン）、または必須の細菌酵素に干渉するもの（例えば、キノロンおよびスルホンアミド）を含む、種々の抗生物質が公知である。抗生物質としては、クリンダマイシン、エリスロマイシン、テトラサイクリン、ミノサイクリン、ドキシサイクリン、ペニシリン、アンピシリン、カルベニシリン、メチシリン、セファロスポリン、バンコマイシン、およびバシトラシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、フシジン酸、シプロフロキサシンおよび他のキノロン、スルホンアミド、トリメトプリム、ダプソン、イソニアジド、テイコプラニン、アボパルシン、シナシッド、バージニアマイシン、セフォタキシム、セフトリアキソン、ピペラシリン、チカルシリン、セフェピム、セフピロム、リファンピシン、ピラジナミド、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、エンロフロキサシン、アミカシン、ネチルマイシン、イミペネム、メロペネム、リネゾリド、薬学的に許容されるその塩

、およびそのプロドラッグが挙げられるがこれらに限定されない。抗菌剤は、環状リポペプチド（例えば、ダプトマイシン等）、グリシルサイクリン（例えば、チゲサイクリン等）、およびオキサゾリジノン（例えば、リネゾリド等）も包含する。抗生物質は、狭域または広域スペクトル抗生物質であってよい。抗生物質は、グラム陰性またはグラム陽性菌を標的とし得る。マクロライド系抗生物質（例えば、エリスロマイシン等）、サルファ系抗生物質（例えば、スルファセタミド等）、環状ペプチド（例えば、バシトラシン、ポリミキシン等）、シュードモン酸（ｐｓｅｕｄｏｍｏｎｉｃ　ａｃｉｄ）（例えば、ムピロシン等）、アミノグリコシド（例えば、ネオマイシン等）、またはキノロン（例えば、シプロフロキサシンもしくはオフロキサシン等）、ニトロイミダゾール（例えば、メトロニダゾール等）、または薬物の組合せ（例えば、バシトラシン／ポリミキシンまたはネオマイシン／ポリミキシンＢ／バシトラシン等）等、外用抗生物質が含まれ得る。

【０２０３】

さらに、不快感を最小限にするために、リドカイン等の局所麻酔薬を組成物に添加することができる。組成物ならびに処置される特定の患者および病態に適合する限りは、任意の適切な添加剤を利用することができる。

【０２０４】

一部の態様では、組成物、例えば滅菌組成物は、５Ｆｒ／１６Ｇカテーテルによって注射可能である。一態様では、組成物は、５Ｆｒ／１６Ｇカテーテルによって、室温で、または室温および約３７℃の両方で注射可能である。

【０２０５】

使用方法

マクロファージは、傷害後の正常な治癒、および正常な組織発生の重要な調節因子であることが示されている。本開示の組成物は、マクロファージ表現型に対するＥＣＭ全体の効果を再現し、Ｍ２様、調節性、またはリモデリング促進マクロファージの増加をもたらすことができる。したがって、調節性Ｍ２マクロファージを誘導するため等、マクロファージ表現型を改変するために本明細書に開示される組成物のいずれを使用することもできる。例えば、音響的ＥＣＭヒドロゲルであるかまたは酵素的ＥＣＭヒドロゲルであるかにかかわらず、ＥＣＭヒドロゲルを外因性ＭＢＶと組み合わせて、マクロファージ表現型を改変するための組成物をもたらすことができる。

【０２０６】

一部の態様では、治療有効量の本明細書に開示される組成物を投与し、これにより、被験体におけるＭ２マクロファージを誘導することにより、被験体におけるＭ２マクロファージを誘導するための方法が開示される。さらなる態様では、被験体におけるＭ１（炎症促進性）マクロファージを減少させるための方法が開示される。この方法は、治療有効量の開示される組成物を投与し、これにより、被験体におけるＭ１マクロファージを阻害するステップを含む。被験体は、ヒトおよび獣医学被験体を含む、任意の目的の被験体であってよい。

【０２０７】

本開示の組成物は、被験体における病変における止血を増加させる。したがって、凝固を加速するおよび／または創傷の出血時間を短縮するための方法も開示される。一部の態様では、外因性ＭＢＶを含有する音響的ＥＣＭヒドロゲルを被験体に投与した後、約１０～約１００秒以内、例えば、約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０または１００秒以内に止血が誘導される。本開示の組成物は、脳卒中を処置するために有用である。

【０２０８】

一部の態様では、治療有効量の組成物を、被験体における止血を誘導すべき部位に局所的に投与することができる。被験体は、創傷を有し得る。創傷は、外部創傷であってもよく、患者の外側からでは実現できない内部創傷であってもよい。本開示の組成物は、あらゆる型の創傷における止血剤として有用である。この方法は、なんらかの創傷を有する被験体等、目的の被験体のいずれか１例を選択するステップを含み得る。

【０２０９】
一部の態様では、炎症または創傷を有する被験体を処置するための方法が開示される。この方法は、治療有効量の組成物を炎症または創傷に局所的に適用するステップを含む。一部の態様では、炎症または創傷は、潰瘍等、胃内にある。一部の態様では、炎症または創傷は、例えば、潰瘍等、喉内にある。本明細書に開示される組成物は、炎症もしくは創傷の領域または胃内の炎症または潰瘍に、局所投与、例えば、外用投与、注射によって、または経口摂取によって、または経腸投与方式によって適用することができる。一部の非限定的な例では、被験体は、例えば、これだけに限定されないが、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、または関節リウマチ等、炎症性障害を有する。この方法は、ＥＣＭヒドロゲルを組織表面に適用するステップを含み得る。

【０２１０】
例えば、被験体に、有効量の、本明細書に開示される外因性ＭＢＶを含有するＥＣＭヒドロゲル組成物を投与することにより、被験体における潰瘍性大腸炎またはクローン病等の炎症性腸疾患を処置するための方法が開示される。組成物は、被験体、例えばヒト被験体に、例えば、浣腸によって、経口摂取によって、腸への局所投与、例えば局所注射によって、または全身投与によって、例えば静脈内投与によって投与することができる。例えば、投与は、経腸、例えば、口からであってよい。例えば、投与は、浣腸による腸に直接的なものであってよい。組成物は、腸における、潰瘍性大腸炎、またはクローン病等の炎症性腸疾患に付随する炎症を低減させるために十分な量で投与される。例えば、組成物は、腸における炎症を、組成物を投与する前の炎症のレベルと比較して低減させる量で投与される。組成物は、被験体に、例えば、毎週、２週間ごとに、毎月、２カ月ごとに、または３カ月ごとに投与され得る。この方法により、炎症性腸疾患に付随する症状も低減し得る。

【０２１１】
本開示の組成物および方法を、クローン病を処置するために使用することができる。回腸結腸クローン病、クローン結腸炎、胃十二指腸クローン病、および空回腸炎（ｊｅｊｕｎｏｉｌｅｉｔｉｓ）を含む、種々の型のクローン病を本開示の方法および組成物を使用して処置することができる。免疫系機能障害（例えば、自己免疫または自然免疫障害）、遺伝因子、腸内細菌の変化、および環境因子に起因するクローン病等、作用因子に起因するクローン病を処置することができる。様々な技法を使用して、クローン病を有する被験体を同定することができる。例えば、クローン病についての検査として、内視鏡検査（例えば、結腸内視鏡検査等）、イメージング（例えば、バリウムフォロースルーＸ線、ＣＴスキャン、およびＭＲＩスキャンを使用するもの等）、ならびに血液検査（例えば、鉄、ビタミンＤ、またはビタミンＢ１２の欠乏；赤血球沈降速度（ＥＳＲ）；およびＣ反応性タンパク質レベルを同定するため）を挙げることができる。本明細書に開示される組成物を投与する方法により、クローン病の重症度または再燃頻度を低減させることができる。この方法により、クローン病の臨床的寛解および内視鏡的寛解ももたらされ得る。例えば、一部の態様では、本開示の組成物の投与により、クローン病活動指数（ＣＤＡＩ）の、処置前のスコアと比較した低下がもたらされる。一態様では、患者は、ＣＤＡＩスコアの１５０未満への低下を経験し、寛解を経験する。別の態様では、患者は、ＣＤＡＩスコアの４５０未満またはそれよりも低いスコアへの低下を経験する（４５０またはそれよりも高いスコアにより重症疾患が示される）。別の態様では、患者は、開示される方法に従った処置を受けた結果として、ＣＤＡＩの少なくとも７０点の低下を経験する（治療応答を示す）。例えば、別の態様では、患者は、処置の結果として、本開示の組成物の投与時点から、投与から１カ月間、２カ月間、または３カ月間またはそれよりも長くにわたって低下したままである、ＣＤＡＩの少なくとも７０点の低下を経験する（治療応答を示す）。一態様では、被験体は、本開示の組成物の投与時点から、投与から１カ月間、２カ月間、または３カ月間にわたって低下したままである、ＣＤＡＩスコアの低下を経験する。一態様では、被験体のＣＤＡＩスコアは、開示される組成物で処置されて１カ月以内、２カ月以内、または３カ月以内に低下する。一態様では、クローン病の処置における治療効果は

、治療過程の持続時間を超えて、例えば、１カ月、２カ月、３カ月、４カ月、５カ月、６カ月またはそれよりも長く延長する。

【０２１２】

本開示の組成物を、潰瘍性大腸炎を有する被験体を処置するために使用することができる。様々な技法を使用して、潰瘍性大腸炎の被験体を同定することができる。例えば、潰瘍性大腸炎の検査として、全血球計算（例えば、貧血もしくは血小板増加症を同定するため）、電解質もしくは腎機能検査（例えば、低カリウム血症、低マグネシウム血症、もしくは腎前性腎不全を同定するため）、肝機能検査（例えば、原発性硬化性胆管炎を同定するため）、Ｘ線、尿検査、便培養（例えば、寄生生物もしくは感染因子を同定するため）、赤血球沈降速度もしくはＣ反応性タンパク質測定（例えば、炎症を同定するため）、またはＳ状結腸鏡検査（例えば、大腸の潰瘍を同定するため）を挙げることができる。一部の実施例では、臨床的な大腸炎活動指数を使用して、潰瘍性大腸炎の重症度を評価することができる。一部の態様では、本開示の組成物を経口投与によって投与する。本開示の組成物は、局所的に、例えば、消化管または腸に、例えば、経腸的にまたは浣腸または注射によって投与することができる。この方法により、潰瘍性大腸炎の重症度または再燃の頻度を低下させることができる。この方法により、潰瘍性大腸炎疾患の臨床的寛解および内視鏡的寛解ももたらされ得る。例えば、一部の態様では、本開示の組成物の投与により、潰瘍性大腸炎についてのメイヨースコアまたは潰瘍性大腸炎疾患活動指数（ＵＣＤＡＩ）の処置前のスコアと比較した低下がもたらされる。一態様では、患者は、メイヨースコアの２またはそれ未満への低下を経験し、寛解を経験する。別の態様では、患者は、メイヨースコアの５またはそれ未満への低下を経験する。別の態様では、患者は、メイヨースコアの１０未満への低下を経験する。一態様では、被験体は、本開示の組成物の処置を受けてからある特定の期間内、例えば、投与から１カ月以内、２カ月以内、または３カ月以内に、メイヨースコアまたはＵＣＤＡＩスコアの低下を経験する。一態様では、潰瘍性大腸炎の処置における治療効果は、治療過程の持続時間を超えて、例えば、処置を受けた時点から１カ月、２カ月、３カ月、４カ月、５カ月、６カ月またはそれよりも長く延長する。

【０２１３】

本開示の組成物は、クローン病または潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患を処置するために、被験体の胃腸管におけるＭ２マクロファージの数、比、または割合をＭ１マクロファージと比較して増加させることにおいて有効であり得る。例えば、被験体を本開示の組成物で処置すると、被験体の胃腸管、例えば結腸におけるＭ２マクロファージのＭ１マクロファージに対する数、割合、または比が増加する。この増加は、例えば、本明細書に開示される組成物の投与から少なくとも１週間、２週間、または１カ月以内に起こり得る。

【０２１４】

結果として、例えば、本明細書に開示される組成物および方法で処置すると、被験体の胃腸組織、例えば結腸組織の病理組織学的評価で示される炎症および疾患に特徴的な表現型特色（例えば、粘膜の破壊、上皮細胞の密集層の非存在、固有層および粘膜下組織における細胞充実性の増加）が少なくなり、健康な腸組織、例えば結腸組織により特徴的な表現型特色（例えば、インタクトな粘膜筋板、健康な密集層粘膜上皮細胞の存在、ならびに固有層および粘膜下組織における正常な細胞充実性）が多くなる。他の非限定的な例では、被験体は、臓器移植レシピエント、移植片対宿主病を有する被験体、心筋梗塞を有する被験体、または手術創もしくは非外科的外傷性創傷を有する被験体等であるがこれらに限定されない、創傷を有する被験体である。したがって、それを必要とする個体における創傷治癒を加速するおよび／または止血を増加させるための方法であって、治療有効量の本明細書に開示される組成物を投与するステップを含む、方法が開示される。投与は、創傷またはグラフトの部位に対する局所的なものであってよい。

【０２１５】

組成物は、任意の創傷部位に、止血を増加させるおよび／または創傷治癒を増加させるために適用することができる。創傷は、皮膚の創傷、または、眼を含むがこれらに限定されない、任意の表面上の創傷であってよい。方法はまた、静脈循環系還流の機能障害、お

よび／または不全症に起因する慢性静脈下腿潰瘍等の虚血および虚血傷害に起因する創傷にも提供される。したがって、本方法では、皮膚または眼への外用投与を利用することができる。

【０２１６】

一般に、これらの適用では、組成物を外用投与のために製剤化する。ヒドロゲルは、任意の臓器の組織表面に適用することができる。例えば、食道炎を処置するために、本明細書に開示される組成物を食道に適用することができる。本開示の組成物を食道炎に罹患している被験体に投与する、例えば、食道に投与すると、食道の炎症を低減することができる。さらに、本開示の組成物は、食道炎を処置するために、被験体の食道におけるＭ２マクロファージの数、比、または割合をＭ１マクロファージと比較して増加させることにおいて有効であり得る。例えば、被験体を本開示の組成物で処置すると、被験体の食道組織におけるＭ２マクロファージのＭ１マクロファージに対する数、割合、または比が増加する。この増加は、例えば、本明細書に開示される組成物の投与から少なくとも１週間以内、２週間以内、または１カ月以内に起こり得る。

【０２１７】

皮膚創傷等の創傷を治癒させるための外用組成物が本明細書に開示される。処置に適するこれらの創傷は、表在性であり得る、または深い、皮膚真皮および表皮の損傷を伴うものであり得る。創傷は、手術創であってもよい。したがって、被験体における創傷治癒を促進する、および／または被験体における凝固を促進する（止血を増加させる）ための方法が提供される。

【０２１８】

組成物は、例えば、シート、プラグ等、外用調製物として、または包帯材もしくは絆創膏の一部として、標的位置に直接適用することができる。絆創膏および創傷被覆材に組成物を含有させることができる。これらは、組成物を、任意の所望の他の添加剤と共に、絆創膏または創傷被覆材に適用することによって調製することができる。これらのシート、プラグ、絆創膏または包帯材を、凝固時間を短縮するため、および／または創傷治癒を増加させるために使用することができる。音響的ヒドロゲルは、創傷治癒を促進するために、標的位置への注射によって、例えば、ゲル相にある固体として投与することができる、または、投与に先立ち、温度を３７℃を上回るように上昇させ、したがって、ヒドロゲルを液相で投与することができる。

【０２１９】

組成物は、単回適用することができる。あるいは、音響的ＥＣＭヒドロゲルを、患部に周期的に、創傷の性質に応じて、典型的には、毎日約１回～約１０回、例えば、約３日間～約１４日間の期間にわたって、適用することができる。一部の場合では、組成物を無制限に適用することが望ましいこともある。例えば、音響的ＥＣＭヒドロゲルであるかまたは酵素的ＥＣＭヒドロゲルであるかにかかわらず、ＥＣＭヒドロゲルを、外因性ＭＢＶと組み合わせて、被験体の身体の組織に、その組織が、皮膚のような外部のものであるか、または、結腸、小腸、食道、喉または胃等、内部のものであるかにかかわらず、局所的に、例えば外用に、適用することができる。

【０２２０】

一部の態様では、組成物により、止血および／または創傷治癒が、標準値、処置なしで、またはＥＣＭヒドロゲル単独もしくはＭＢＶ単独での処置により達成される創傷治癒または止血の速度等、対照と比較して少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも１００％、または少なくとも２００％増加する。

【０２２１】

本開示の組成物は、手術創および他の意図的な介入の処置に使用することもでき、その場合、外科手術の完了直後に組成物を適用することができる。手術創、切除術創、真皮および表皮の損傷が伴う深い創傷、眼組織創傷、歯組織創傷、口腔創傷、糖尿病性潰瘍、皮

膚潰瘍、肘潰瘍、動脈潰瘍、静脈うっ血性潰瘍、ならびに熱曝露または化学物質に起因する熱傷を含む創傷の治癒を刺激し、創傷部位における止血を増加させるための方法が提供される。

【０２２２】

被験体は、ヒトまたは獣医学被験体を含む任意の目的の哺乳動物被験体であってよい。被験体は、小児被験体または成体被験体、例えば、若年、中年、もしくは高齢成体被験体であってよい。ヒトでは、成体被験体は１８歳より上であり、若年成体は約１８～約３５歳であり、中年成体は、一般に、約３５～約５５歳であるとみなされ、年配（または高齢）ヒト被験体は、約５５歳より年長、例えば、６０歳より年長、６５歳より年長、７０歳より年長、７５歳より年長または８０歳より年長である。

【０２２３】

被験体は、創傷が正常な速度で治癒する被験体であってもよく、または治癒が損なわれた被験体であってもよい。いくつかの苦痛および状態は、治癒機能障害（ｈｅａｌｉｎｇ ｉｍｐａｉｒｍｅｎｔ）をもたらし得る。これらとして、糖尿病（例えば、ＩＩ型糖尿病）、ステロイドおよび他の薬理学的作用物質の両方による処置、ならびに虚血性遮断または傷害（末梢血管疾患または外傷性血管閉塞におけるもの等）が挙げられる。異常な創傷治癒を誘導する状態としては、尿毒症、栄養障害、ビタミン欠乏、肥満症、感染症、免疫抑制、ならびにステロイド、放射線療法、ならびに抗悪性腫瘍薬および代謝拮抗薬を用いた全身性処置に付随する合併症が挙げられるがこれらに限定されない。創傷治癒を損なうことが示されているステロイドとして、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、デキサメタゾン、およびメチルプレドニゾロンが挙げられる。オクトレオチド酢酸塩等の非ステロイド化合物も創傷治癒を損なうことが示されている（Waddell et al., Am. Surg. 63: 446 449, 1997）。

【０２２４】

被験体は、凝固障害を有していてよい、または、ワルファリンまたはＰＬＡＡＶＩＸ（登録商標）等であるがこれだけに限定されない抗凝固薬を用いた処置を受けていてよい。被験体は、第ＩＩ因子、第Ｖ因子、第ＶＩＩ因子、第Ｘ因子、または第ＸＩＩ因子欠乏を有していてよい。被験体は、血友病Ａ、血友病Ｂ、フォンヴィルブランド病、フィブリノーゲンまたはプロトロンビンの欠乏または構造異常を有していてよい。したがって、一部の態様では、これらの被験体が処置のために選択される。

【０２２５】

創傷床への皮膚グラフト（skin graft）の接着性を増加させて、創傷床からの上皮再形成を刺激するための方法も本明細書に提供されている。グラフトの種類として、次のものが挙げられるがこれらに限定されない：自家皮膚グラフト、人工皮膚、同種異系移植片、自家皮膚グラフト、自家表皮グラフト、無血管性（avacular）グラフト、Ｂｌａｉｒ－Ｂｒｏｗｎグラフト、骨グラフト、胚胎組織移植片（brephoplastic graft）、皮膚グラフト（cutis graft）、遅延グラフト、真皮グラフト、表皮グラフト、筋膜グラフト、全層グラフト、異種グラフト、異種移植片、同種グラフト、増殖性移植片、層状グラフト、メッシュグラフト、粘膜グラフト、Ｏｌｌｉｅｒ－Ｔｈｉｅｒｓｃｈグラフト、大網（omenpal）グラフト、パッチグラフト、有茎グラフト、浸透性グラフト、分層植皮片、中間層移植片。この方法は、グラフトを有する被験体に、治療有効量の本明細書に開示される組成物を投与し、これにより、グラフトの接着性および忍容性を増加させ、かつ細菌成長を制御または排除するステップを含む。一部の態様では、組成物で処理した細胞または組織を被験体に移植する。具体的で非限定的な一例では、組成物を、移植に先立ち、皮膚グラフト等のグラフトに投与する。

【０２２６】

擦過または化学的傷害による疱疹および熱傷を処置するための方法も提供される。このような方法は、皮膚または内臓の処置を含む。このような方法は、例えば、化学療法薬による処置もしくはシクロホスファミドによる処置による卵巣傷害；放射線もしくは化学療法誘発性膀胱炎；または高用量化学療法誘発性腸管傷害の処置を含む。この方法は、水疱

または熱傷の治癒を促進するため、および細菌成長を低減または排除するために、被験体に治療有効量の本明細書に開示される組成物を投与するステップを含む。

【０２２７】

個体における外科手技に起因する吻合および他の創傷の治癒を促進するための方法が提供される。これらの方法は、吻合または他の外科手術の後および／または最中の有効量の本明細書に開示される組成物の投与を含む。吻合術は、例えば、腸の中央部が除去され、残っている部分が一体に連結されて、腸管を再構成する場合の、２個の管状構造の接続である。皮膚性治癒とは異なり、吻合創傷の治癒過程は一般に、視界が不明瞭である。さらに、創傷治癒は、少なくとも胃腸管において、合併症の非存在下で急速に起こる；しかし、合併症は多くの場合、追加的な外科手術による矯正を要求する（Thornton and Barbul, Surg. Clin. North Am. 77: 549 573 (1997)）。この方法は、吻合創傷治癒を必要とする被験体を選択するステップを含み得る。被験体は、上記の状態のうちの１つに起因して創傷治癒が損なわれた被験体であってもよく、上に列挙されている状態のいずれも有さない被験体等、正常な創傷治癒を有する被験体であってもよい。

【０２２８】

一部の態様では、外科的癒着、例えば、通常は接続していない組織または臓器を結合する瘢痕組織の帯の形成を処置または防止するために組成物を使用する。外因性ＭＢＶを含有するＥＣＭヒドロゲルを含む本明細書に開示される組成物を、癒着が望ましくない組織の表面上または組織の間に、例えば、外科手技の間の外用適用、または注射によって配置することができる。外科手技は、ヘルニア手技、帝王切開、虫垂切除術、または結腸、直腸もしくは肛門等の胃腸管の任意の部分の切除等、腹部外科手技であってよい。例えば、本開示の組成物を、腹壁およびヘルニアの原因である組織または臓器、例えば、小腸、大腸、または胃に適用する。帝王切開後の癒着を防止するために、本開示の組成物を子宮および周囲組織に適用する。

【０２２９】

一部の態様では、組成物を滅菌に供する。滅菌は、組成物から病原体による夾雑が十分に除かれていること、および、ヒトまたは動物の体への植え込み等の医学的使用に適したものであることを確実にするために重要である。ガンマ線照射、エチレンオキシド、超臨界CO_2、過酸化水素気体プラズマ、またはオゾン等の方法が滅菌のために適切であり得るが、本技術分野で公知の他の滅菌方法も同様に適し得る。ガンマ線による滅菌は、許容される滅菌方法である。

【０２３０】

粘膜下クッションとしての使用

内視鏡検査は、侵襲性の外科手術を行うことなく、身体の中空臓器または腔の内部を内視鏡と呼ばれる機器を用いて検査することを可能にする手順である。内視鏡検査は、出血している血管の焼灼、ポリープ、腺腫および小さな腫瘍の除去、生検の実施、または外来物体の除去等、外科手技のために使用され得る。内視鏡手順は、胃腸管内、気道、耳、尿路、雌生殖系、ならびに、小切開を通じて、通常閉じた体腔、例えば、腹腔または骨盤腔（腹腔鏡検査）、関節内部（関節鏡検査）、および胸部の臓器（胸腔鏡検査および縦隔鏡検査）において実施することができる。内視鏡検査は、上部胃腸管または下部胃腸管において実施することができる。内視鏡は、診断または治療目的で中空臓器または一部分（例えば、膀胱、食道、胃または腸等）の内部を可視化するための、照明が付いた通常は光ファイバーの柔軟または剛性の管状機器であり、典型的には、機器（例えば、鉗子、電気メス、内視鏡用注射針またはハサミ等）の通過を可能にするため、または生検試料の取り出しを容易にするために、１つまたは複数のワーキングチャネルを有する。内視鏡は、遠位部分に適切なランプおよびイメージングデバイスを含み、口、肛門、耳、鼻等、体の天然に存在する開口部を通じて、または外科的小切開を通じて挿入することができる。内視鏡手順を用いて検査することができる体の臓器または腔が多種多様であることを考慮して、いくつかの型の特殊化された内視鏡、例えば、喉頭鏡、胸腔鏡、血管内視鏡、大腸内視鏡、腸鏡、Ｓ状結腸鏡、直腸鏡、肛門直腸鏡、肛門鏡、関節鏡、鼻鏡、腹腔鏡、子宮鏡、脳

鏡、腎臓鏡、食道鏡、気管支鏡、胃内視鏡、羊水鏡（ａｍｎｉｏｓｃｏｐｅ）、膀胱鏡が存在する。

【０２３１】

内視鏡手順は、上部胃腸管および下部胃腸管を含む消化管内に広範に適用される。例えば、内視鏡手順は、胃腸腔を覆う粘膜を検査するため、ならびに、炎症性組織、ポリープ、偽ポリープ、鋸歯状病変、腺腫、潰瘍形成、異形成、前新生物および新生物形成、ならびに腫瘍等、小さなおよび大きな病理学的病変を検出するため使用することができる。内視鏡手順は、生検および病理的病変（ポリープ、腺腫、異形成、前新生物および新生物形成、腫瘍）の除去のために使用することができる。外科的介入は、胃腸内視鏡検査において病理学的病変を除去するために一般に使用される２つの型の内視鏡的切除手順を含む：内視鏡的粘膜切除術（ＥＭＲ）および内視鏡的粘膜下層剥離術（ＥＳＤ）。これらの２つの技法は、胃腸ポリープ、腺腫、異形成、およびリンパ節転移のリスクが最小である初期がんに対する最小限の侵襲性での処置を可能にするものである。

【０２３２】

被験体のある臓器の領域由来の固有筋層（ｍｕｓｃｕｌａｒｉｓ　ｐｒｏｐｒｉａ）から粘膜および粘膜下組織を切断するための方法が本明細書に開示される。臓器は、胃腸管内のもの、例えば、食道、十二指腸、胃、小腸、大腸（結腸）または直腸であってよい。臓器は、膀胱、口腔－呼吸器系の臓器（肺、喉（咽頭）、舌、鼻道、副鼻腔）、皮膚、または子宮および膣管であってよい。特定の組織の例は、呼吸器上皮、鼻上皮、皮膚または表皮組織および子宮上皮である。１つの例示的な臓器は食道である。別の例示的な臓器は結腸である。この方法は、粘膜および粘膜下組織を有し、悪性または前悪性病変等の表在性病変が形成され得る任意の臓器に対して有用である。

【０２３３】

これらの方法は、被験体の臓器内に、本開示の外因性ＭＢＶを含有するＥＣＭヒドロゲルの組成物を粘膜下注射して、臓器の領域における粘膜下組織と基礎をなす固有筋層との間にクッションを形成するステップを含む。一態様では、臓器は、食道ではない。別の態様では、臓器は、食道である。別の態様では、臓器は、大腸（結腸）である。この方法は、内視鏡的粘膜切除術（ＥＭＲ）または内視鏡的粘膜下層剥離術（ＥＳＤ）であり得る。

【０２３４】

ＥＭＲは、胃腸（ＧＩ）管の表層（粘膜および粘膜下組織）に限局している無茎性または平らな新生物を除去するために開発された内視鏡的技法である。ＥＭＲは、典型的には、２ｃｍよりも小さい病変の除去、またはより大きな病変の漸次除去に使用される。ＥＭＲはまた、正確な病理学的病期分類のための切除検体の評価においても重要な役割を果たす。ポリープ切除術とは対照的に、ＥＭＲでは、流体作用剤、一般に、生理食塩（ＮＳ）液を粘膜下層に注射することによって病変を筋層から持ち上げることが伴う。ＥＭＲはまた、リンパ節転移のリスクを決定するために正確な病理組織学的病期分類のための検体を得るためにも有用である。ＥＭＲでは、腸壁粘膜下組織の中央またはより深い部分を通して切除することによって患部粘膜の完全な除去が可能になる。様々なＥＭＲ技法が記載されており、スネアによる切除を伴う４つの方法が一般に使用されている：（１）注射し、切り取る方法；（２）注射し、持ち上げ、切り取る方法；（３）キャップアシストＥＭＲ（ＥＭＲＣ）；および（４）結紮を用いるＥＭＲ（ＥＭＲＬ）。注射し、切り取る技法では、外因性ＭＢＶを含有するＥＣＭヒドロゲル組成物の粘膜下流体クッションを創出することによって疾患粘膜を筋層から持ち上げ、捕捉し、電気スネアを使用して縛り、次いで、切除する。しかし、薄い粘膜下層への注射は、繊細なプロセスであり、注射された溶液は迅速に散逸し、平らなくぼんだ病変は突き出た病変と比較してスネアで捕捉することが難しく、また、大きなまたは扱いにくく位置した病変は除去することが難しい場合がある（Ｕｒａｏｋａ　ｅｔ　ａｌ., Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ, Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ ２００８: ２ １３１-１３８）。注射補助ＥＭＲは大きく平らな結腸ポリープに対して頻繁に使用されている。

【０２３５】

内視鏡的粘膜下層剥離術（ＥＳＤ）は、より大きな病変を除去するために特別に開発された。電気メスを使用して病変を粘膜下層に沿って直接切断し、それにより、より一層大きな病変の一括切除がもたらされる。ＥＳＤは、ある特定のがんステージの処置に関して従来の外科手術に置き換わると予測されているが、穿孔および出血合併症の率が従来のＥＭＲよりも高いので、内視鏡的技能の程度が高く、ＥＭＲよりも経験が必要とされる。ＥＳＤでは、ＩＴナイフ（ｉｎｓｕｌａｔｉｏｎ－ｔｉｐｐｅｄ ｄｉａｔｈｅｒｍｉｃ ｋｎｉｆｅ）、ニードルナイフ、フックナイフ、フレックスナイフ、三角ナイフ（ｔｒｉａｎｇｌｅ ｔｉｐｐｅｄ ｋｎｉｆｅ）、フラッシュナイフ、スプラッシュニードル、およびＳＴフード（ｓｍａｌｌ－ｃａｌｉｂｅｒ ｔｉｐ ｔｒａｎｓｐａｒｅｎｔ ｈｏｏｄ）等、多数の電気メスを使用することができる。これらのメスを高周波数電気外科的電流（ＨＦＥＣ）発生装置と共に使用することができる。ＥＳＤは、３つのステップ：（１）粘膜下クッションを形成して、病変を筋層から挙上させるために、外因性ＭＢＶを含有するＥＣＭヒドロゲル組成物等の材料を注射するステップ；（２）病変の粘膜周囲を切り取るステップ；および（３）病変の真下の粘膜下組織の結合組織を切断するステップを特徴とする（参照により本明細書に組み込まれる、Kakushima et al., Wold J. Gstroenterol. 14 (9): 2962-2967, 2008を参照されたい）。様々な粘膜下注射液が以前に開発されており、ＥＭＲの間に使用するために十分であることが示されているが、長時間にわたるＥＳＤ手順への導入には、粘膜下層剥離の間の切り取り線の同定を補助するためにより長持ちする溶液が必要である（Uraoka et al., Drug Design, Development and Therapy 2008: 2 131-138）。本開示の方法はこの必要を満たす。

【０２３６】

粘膜下組織クッションへの流体の注射により、除去される組織を、例えばスネアを用いた標的病変の捕捉の直前に隔離することが容易になり、これにより、熱傷ならびに穿孔および出血のリスクが低下する一方で、切除も容易になるので、粘膜下注射をＥＭＲにおいて使用する。溶液が十分な持続時間にわたって所定の位置に保持されなければならず、また、スネアで捕らえることを容易にするために半球状の形状を形成する必要があるので、粘膜下注射はＥＭＲ手順において重要な役割を果たす。さらに、十分に高い粘膜下挙上により、ＥＳＤ手順の間の安全な粘膜下切り取りがもたらされる（Uraoka et al., Drug Design, Development and Therapy 2008: 2 131-138）。さらに、手順により炎症が生じるので、何らかのクッションが手順部位に保持されることには、抗炎症特性があるはずである。外因性ＭＢＶを含むＥＣＭヒドロゲルの本開示の組成物により、狭窄が軽減され、再上皮化が促進される。本開示の方法はこの必要も満たす。

【０２３７】

一部の態様では、本開示の組成物は、抗炎症特性を有し、かつ、安価、無毒性で、注射が容易であり、高さのある長続きする粘膜下クッションをもたらすものである。組成物をゲル状態で注射部位に投与して、クッションを形成する。クッションを、手順の間に、一部のヒドロゲルが基礎をなす固有筋層上に留まるように切断することができ、これにより、治癒が補助される。本開示の組成物は、切除された粘膜／粘膜下組織の除去によって創出された創傷が閉じるのを容易にする。一部の態様では、手順はＥＳＤである。他の態様では、手順はＥＭＲである。

【０２３８】

生理食塩溶液（ＮＳ）および希釈剤溶液（例えば、ＥＬＥＶＩＥＷ（商標）、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第９，２２６，９９６号を参照されたい）が内視鏡的切除のための粘膜下クッションとして使用されているが、これらの溶液の固有の特徴により、溶液が迅速に分散するので、適切な粘膜下流体クッションを生じさせること、所望の高さを維持すること、およびクッションを所望の位置に保持することが難しい。さらに、ＥＳＤでは、粘膜／粘膜下組織が除去されると、これらの作用剤は基礎をなす固有筋層上に保持されない。さらに、これらの作用剤では、例えば炎症の低減による治癒過程の補助がなされない。外因性ＭＢＶを含有するＥＣＭヒドロゲルを含む開示される組成物の使

用はこれらの必要を満たす。

【０２３９】

本明細書に開示される、ＭＢＶが組み入れられたＥＣＭヒドロゲル等の組成物は、任意のＥＳＤまたはＥＳＲに使用することができる。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，３６４，５８０号に開示されている通り、内視鏡用注射針は、長くてよく（最大約２３０ｃｍ）、遠位注射針を有する内部注射管がスライド可能に配置された比較的長いカテーテルを含むデバイスである。近位作動ハンドルが、カテーテルおよび注射管に、必要であれば一方を他方に対して移動させるためにつながっている。注射管への流体のアクセスは、典型的にはハンドル上のリアコネクターによってもたらされる。内視鏡用注射針デバイスは、典型的には、内視鏡のワーキングチャネルを通じて注射部位に送達される。内視鏡ワーキングチャネルの内腔を損傷から保護するために、注入針デバイスのハンドルを操作して、遠位注射針をカテーテルの内腔に引き込んでからデバイスを内視鏡に挿入する。これにより、デバイスが内視鏡の内腔を移動する際に注射針の尖った先端が露出することが防止される。内視鏡用注射針デバイスの遠位末端が注射部位に位置付けられたら、ハンドルを再度操作して、注射針をカテーテルの内腔から遠位に移動させる。最も遠位の位置まで進めた場合、注射針の露出部分はおよそ４～６ｍｍの長さになる。

【０２４０】

注射部位に刺したら、通常、注射針のハンドルに接続されたルアーロックフィッティングを備えた５ｍｌ～１０ｍｌのシリンジに含有されたＥＣＭヒドロゲル（例えば、酵素的にまたは音響的に産生されたＥＣＭヒドロゲル）およびＭＢＶを含む組成物を、注射管および針を通して、粘膜下組織と基礎をなす固有筋層の間等、注射部位に送達することができる。

【０２４１】

内視鏡手順の間に一般に使用される注射針および他の付属品、例えば、ポリープ切除用のスネア、クリッピングデバイス、生検鉗子および同様のものは、通常ワーキングチャネルまたは操作チャネルと呼ばれる内視鏡の１つまたは複数の特定のチャネルを通過する。ＧＩ内視鏡検査に使用される内視鏡の型に応じて（例えば、胃内視鏡、腸鏡、大腸内視鏡、十二指腸内視鏡、Ｓ状結腸鏡および同様のもの）、ワーキングチャネルの内径は相当変動し得る。しかし、ＧＩ内視鏡検査に使用される最も一般的な内視鏡は、内径が約２ｍｍ～約５ｍｍまでの範囲のワーキングチャネルを有する。一般に、内視鏡付属品の製造者は、全てのワーキングチャネルに適合する外径を有する付属品を製造する。一部の態様では、内視鏡用注射針、カテーテルの外径は、約１．９、２．０、２．１、２．２または２．３ｃｍ等、１．９ｍｍ～２．３ｍｍにわたる。したがって、内部注射管が外側のカテーテル内に含有されることを考慮すると、その内径は通常１ｍｍまたはそれ未満である。ゲルまたは液体の形態の本開示のＥＣＭヒドロゲルは、これらのカテーテルを容易に通過することができる。

【０２４２】

ＥＣＭヒドロゲルおよび外因性ＭＢＶを含む組成物は、内視鏡的切除手順において次のように使用することができる：ある体積のヒドロゲルをその一次容器からシリンジを用いて吸い取り、適切な体積の前記ヒドロゲルを、内視鏡のワーキングチャネルに挿入された内視鏡用注射針を用いて表在粘膜層の直下に注射して、組成物を粘膜下層内に置き、それが所定の位置でクッションになる：粘膜表面が挙上することにより、内視鏡医が、内視鏡手順の実行中に見出される粘膜病変に対して、病変が平らであり、したがって、腸内腔、食道内腔、または胃内腔等の内腔中に突き出ていない場合であっても、容易な切除を実施することが可能になる。体温では、音響的ＥＣＭヒドロゲルは、液相に転移中の、粘性であるがまだ流動性のゲルであり、この手順のために表在粘膜層の下に容易に注射して、クッションを形成することができる。ゲル－ゾル転移には時間がかかるので、クッションは切除を行うための十分な時間にわたって所定の位置に留まる。外因性ＭＢＶを含有する酵素的ＥＣＭヒドロゲルも、体温で凝固し始めて、組織の切除のための十分な支持をもたらし、所定の位置に留まって切除部位の治癒を促進するので、このような内視鏡手順に適す

る。
【０２４３】
クッション中に少なくとも１つの色素を存在させることにより、内視鏡医が粘膜の真下の構造（例えば、粘膜下層および外筋壁）を可視化するのを補助することができ、これにより、切除手順を実施している内視鏡医が前記構造に損傷を引き起こし得るリスクが低減する。色素の使用により、クッション腔および粘膜基底の可視化を可能にすることができる。粘膜表面から病変を除去することにより粘膜創傷が生じる。注射された体積の薬学的組成物によって生成されたクッションの持続により、再注射を必要とせずに内視鏡的切除手順を実施することが可能になる。音響的ＥＣＭヒドロゲルを、被験体の臓器内の目的の領域、例えば、病変または腫瘍の領域に粘膜下注射して、臓器の領域における粘膜下組織と基礎をなす固有筋層との間にクッションを形成する。クッションを、組成物の一部が基礎をなす固有筋層上に維持されるように切断することができ、治癒過程が補助される。
【０２４４】
本開示の方法は、例えば、食道において有用である。非限定的な例では、この方法は、食道癌または腺癌を食道から切断する方法を含む。別の非限定的な例では、この方法は、バレット食道を有する被験体の食道から粘膜および粘膜下組織を切断するステップを含む。これらの態様では、ＥＣＭヒドロゲルは、膀胱ＥＣＭ、小腸粘膜下（ＳＩＳ）ＥＣＭ、食道ＥＣＭ、気管ＥＣＭ、肝臓ＥＣＭまたは皮膚ＥＣＭから作製されたものであってよい。
【０２４５】
本開示の方法はまた、他の臓器においても有用である。臓器は、胃腸管の臓器等、任意の目的の臓器であってよい。臓器は、上部胃腸管内のもの、例えば、咽頭、舌または口であってよい。臓器は、膀胱、膣管、または子宮であってよい。一部の態様では、臓器は、結腸、十二指腸、胃、盲腸、結腸、Ｓ状結腸、直腸、小腸または大腸である。非限定的な一例では、臓器は、胃、小腸または大腸であり、この方法は、癌腫または腺癌を胃から切断する方法を含む。さらなる非限定的な例では、臓器は結腸であり、この方法は、ポリープまたは癌腫を結腸から切断するステップを含む。これらの態様では、組成物は、膀胱、小腸粘膜下、食道、気管、肝臓または皮膚の音響的ＥＣＭヒドロゲルであってよい音響的ＥＣＭヒドロゲルを含んでよい。ＭＢＶは同じまたは異なる供給源に由来してよい。
【０２４６】
本明細書に開示される、ＥＣＭヒドロゲルおよび外因性ＭＢＶを含む組成物は、粘膜下クッションとして適用するために、それがゲル化する温度またはそれを下回る温度で維持される。
【０２４７】
ＥＣＭヒドロゲル（例えば、音響的ヒドロゲル）および外因性ＭＢＶを含む組成物を、例えば、投与に先立ち、約４℃で、またはおよそ室温で維持することができる。一態様では、音響的ＥＣＭヒドロゲルを、例えば、４℃～３７℃未満、または４℃～２５℃の温度で投与することができる。一態様では、組成物を３７℃未満の温度で投与する。次いで、有効量の組成物はゲルとして利用される。音響的ＥＣＭヒドロゲルおよび外因性ＭＢＶを含む組成物は、およそ３７℃の温度である被験体の組織においてゲルとして留まる。一態様では、外因性ＭＢＶを伴う音響的ＥＣＭヒドロゲルのゲルからゾルへの転移は、約３７℃であり、したがって、組成物は体温で十分に粘性であるので、組成物を粘膜下クッションとして使用することができる。
【０２４８】
一部の態様では、ヒドロゲル中のＥＣＭ濃度は、２５ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌ、例えば、約２５ｍｇ／ｍｌ～約１００ｍｇ／ｍｌである。他の態様では、ヒドロゲル中のＥＣＭ濃度は、約５０～約１５０ｍｇ／ｍｌ、例えば、約７５～約１２５ｍｇ／ｍｌ、例えば、約７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０または１２５ｍｇ／ｍｌである。具体的で非限定的な例では、ヒドロゲル中のＥＣＭ濃度は、約１００ｍｇ／ｍｌである。

【０２４９】
組成物は、室温で、低温（例えば、約４℃）でまたは凍結して（例えば、約－２０℃）のいずれかで、凍結乾燥形態で提供し、被験体内の目的の解剖学的領域に投与する直前に再構成することができる。
【０２５０】
本開示の方法は、ヒトおよび獣医学被験体を含む任意の被験体において有用である。被験体は、任意の年齢であってよい。被験体は、成体または若年であってよい。一態様では、ＥＣＭヒドロゲルを含む組成物を臓器の標的組織に注射して、クッションを形成し、次いでそれを必要に応じて切除手順等の内視鏡的外科手技に供する。ＥＣＭは、処置される被験体と同じ種に由来し得る、または異なる種に由来し得る。一部の態様では、被験体は、ヒトであり、ＥＣＭヒドロゲルおよび／またはＭＢＶは、ヒトまたはブタＥＣＭに由来する。他の態様では、ＥＣＭヒドロゲルおよび／またはＭＢＶは、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシに由来する。ＥＣＭはまた、商業的供給源からのものであってもよい。一部の態様では、ＥＣＭヒドロゲルおよびＭＢＶは、一部の態様では、ブタまたはヒト組織等であるがこれらに限定されない、任意の哺乳動物組織に由来し得、一部の非限定的な例では、膀胱、小腸、または食道に由来する。
【０２５１】
本開示の方法は、被験体の腸管の臓器の領域由来の固有筋層から粘膜および粘膜下組織を切断する注射を必要とするので、侵襲性である。一部の態様では、組成物は、消化管の臓器、例えば食道等の臓器の表面には適用されない。本開示の方法は、食道において使用することができるが、他の組織において使用することもできる。他の態様では、組成物は臓器の表面に適用される。
【０２５２】
本明細書に開示される方法のいずれかは、被験体の臓器にＥＣＭヒドロゲルおよび外因性ＭＢＶを含む薬学的組成物を粘膜下注射して、臓器の領域における粘膜下組織と基礎をなす固有筋層との間にクッションを形成するステップを含み得る。組成物はゲル化し、基礎をなす固有筋層から粘膜および粘膜下組織を切断し、被験体の臓器の領域における炎症を阻害する。組成物をゲルとして内視鏡的にまたはカテーテルによって投与することができる。一部の態様では、臓器は、食道、結腸、胃、盲腸、結腸、Ｓ状結腸、直腸、小腸または大腸である。組成物をゲルまたはゾルとして、同様に内視鏡的にまたはカテーテルによって投与することができる。
【０２５３】
一部の態様では、切除手順は、内視鏡的粘膜切除術または食道内視鏡的粘膜下層剥離術（ｅｓｏｐｈａｇｅａｌ　ｅｎｄｏｓｃｏｐｉｃ　ｓｕｂｍｕｃｏｓａｌ　ｄｉｓｓｅｃｔｉｏｎ）であり、この方法は、食道癌または腺癌を食道から切断する方法を含む。さらなる態様では、この方法は、異形成を有する患者の食道から粘膜および粘膜下組織を切断するステップを含む。さらなる態様では、この方法は、バレット食道を有する被験体の食道から粘膜および粘膜下組織を切断するステップを含む。
【０２５４】
一部の態様では、切除手順は、内視鏡的粘膜切除術または内視鏡的粘膜下層剥離術である。さらなる態様では、臓器は、胃、小腸または大腸であり、この方法は、ポリープ、癌腫または腺癌を結腸から切断する方法を含む。さらなる態様では、この方法は、異形成を有する患者の臓器から粘膜および粘膜下組織を切断するステップを含む。具体的で非限定的な例では、この方法は、結腸からポリープまたは癌腫を切断するステップを含む。
【０２５５】
この方法はまた、クッション上で内視鏡的切除手順を実施するステップも含み得る。一部の態様では、この方法は、食道の基礎をなす固有筋層上にヒドロゲルが保持され、粘膜および粘膜下組織が食道の領域から除去されるようにクッションを分割するステップを含む。一部の非限定的な例では、基礎をなす固有筋層上に保持されるヒドロゲルクッションの一部が食道における炎症促進性マクロファージの活性化を下方調節する。

【０２５６】
以下の実施例は、本開示のある特定の態様の特定の特色を例示するために提供されるものであり、特許請求の範囲は例示される特色に限定されないものとする。
【実施例】
【０２５７】
（実施例１）
潰瘍性大腸炎の処置
ＥＣＭヒドロゲルとＭＢＶを組み合わせて使用することの効果を実証するために、ラットにおいてＤＳＳ誘発潰瘍性大腸炎後の結腸の治癒を評価する研究を実施した。
【０２５８】
研究設計の概要
研究集団は、雌Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット１５匹であった。ラットを、健康な対照群（Ｎ＝３）またはデキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）処置群（Ｎ＝１２）に無作為に割り当てた。ＤＳＳに曝露させた動物をさらに５つのサブグループに分けた：（１）無処置対照（Ｎ＝３）、（２）ＭＢＶ浣腸（Ｎ＝２）、ＥＣＭヒドロゲル浣腸（Ｎ＝２）、ＭＢＶが注入された皮膚ＥＣＭ音響的ヒドロゲル浣腸（Ｎ＝２）、および複数回のＭＢＶの静脈内注射（Ｎ＝３）。
表1．実験群および説明
【表１】

処置	動物数 (N)	説明
DSS 誘発なし(陰性対照)	3	健康な結腸を有する動物
無処置(陽性対照)	3	5.5% DSS を用いた誘発を行い、処置を行わなかった動物
MBV 浣腸	2	0日目、1日目、2日目、3日目にMBV + PBS を浣腸で与えた
ECM ヒドロゲル浣腸	2	0日目、1日目、2日目、3日目に皮膚ECMヒドロゲルを浣腸で与えた
MBVが注入されたヒドロゲル浣腸	2	0日目、1日目、2日目、3日目にMBVが注入された皮膚音響的ヒドロゲルを浣腸で与えた
複数回のMBVのIV注射	3	0日目および2日目に $3.3x10^{11}$ 個の粒子を含有するMBV注射を静脈内に与えた

【０２５９】
ラットを、飲料水中の５．５％デキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）に曝露させ、処置を行うまで６日間、自由な飲水を継続することにより、ラットにおける潰瘍性大腸炎（ＵＣ）を誘導した。疾患誘発全体を通して、動物を、体重減少、食物および水の消費量、糞の硬さ、ならびに糞中の血液含量について評価した。図１に示されているレジメンで処置を行い、４日目に組織学的分析のために動物の結腸を外植した。
【０２６０】
詳細な手順
動物および管理：動物研究は、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ’ｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅにより定められた実験動物の人道的処置に関する全ての規則に従って実施した。８～１２週齢の雌Ｓｐｒａｇｕｅ Ｄａｗｌｅｙラットを認定ベンダー（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｓ）から入手した。輸送後、ラットを７～１０日間にわたって環境に順応させた。動物を標準的な実験条件下、２１～２３℃の温度および１２時間の暗／明サイクルで飼育した。ラットに食物および水を自由に摂らせた。研究の際は、適切なデータ収集のために

動物を個々に飼育した。

【０２６１】

デキストラン硫酸ナトリウムの調製および投与：デキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）塩（分子量３６，０００～５０，０００）をＭＰ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌから入手した。オートクレーブ処理した水道水中５．５％ＤＳＳ溶液を調製し、６日間、自由な飲水によって投与した。

【０２６２】

ＭＢＶ単離：ブタ膀胱細胞外マトリックス（ｕｂＥＣＭ）粉末をＥＣＭ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｗａｒｒｅｎｄａｌｅ、ＰＡ）から入手した。ＵＢＭ－ＥＣＭ粉末の酵素消化を３７℃で３時間にわたって実施した（１×ＰＢＳ中、０．０５ｍｇ／ｍＬのＬｉｂｅｒａｓｅ、５ｍＭの$CaCl_2$）。酵素消化されたＥＣＭを４℃、１０，０００×ｇで３０分間の遠心分離に供した。上清を２８，０００×ｇで７０分間超遠心分離した。ペレットをＰＢＳで１回洗浄し、次いで、粒子を含まない１×ＰＢＳ中に再懸濁させた。ＭＢＶ懸濁物の平均粒子サイズおよび濃度を、ＮａｎｏＳｉｇｈｔ ＮＳ５００を使用したＮａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅ Ｔｒａｃｋｉｎｇ Ａｎａｌｙｓｉｓ（ＮＴＡ）によって決定した。ＭＢＶ懸濁物（２３８ｎｍ、１ｍＬ当たり１．１０×10^{12}個の粒子）を使用するまで－２０℃で保管した。

【０２６３】

ＭＢＶ浣腸：ＭＢＶ懸濁物の体積を１×ＰＢＳ中５ｍＬまで増加させ、５ｍＬのシリンジに入れ、濃度を１ｍＬ当たり１．３８×10^{11}個の粒子、または浣腸当たり６．９×10^{11}個の粒子にした。

【０２６４】

皮膚ＥＣＭ音響的ヒドロゲル浣腸：皮膚ＥＣＭ粉末はＥＣＭ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｗａｒｒｅｎｄａｌｅ、ＰＡ）から供給された。ＰＢＳ中皮膚ＥＣＭ粉末の５０ｍｇ／ｍＬ溶液を、ＥＣＭを４０％振幅で５分間超音波処理することによって産生した。次いで、溶液を５ｍＬのシリンジに添加し、４℃で静置した。体積５ｍＬの皮膚ＥＣＭ音響的ヒドロゲルを含有するシリンジを使用するまで４℃で保管した。

【０２６５】

ＭＢＶが注入された皮膚ＥＣＭ音響的ヒドロゲル浣腸：皮膚ＥＣＭ粉末はＥＣＭ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｗａｒｒｅｎｄａｌｅ、ＰＡ）から供給された。ＰＢＳ中皮膚ＥＣＭ粉末の５０ｍｇ／ｍＬ溶液を作製し、４０％振幅で５分間超音波処理した。５～１０分間室温で冷却した後、ＭＢＶ懸濁物５ｍＬを、超音波処理した溶液３５ｍＬに添加し、穏やかに混合し、ＭＢＶ濃度を１ｍＬ当たり１．３８×10^{11}個の粒子にした。次いで、溶液を５ｍＬのシリンジに添加し、ゲル化させ、浣腸当たり６．９×10^{11}個の粒子を得た。ヒドロゲルを含有するシリンジを使用するまで４℃で保管した。

【０２６６】

ＭＢＶ静脈内注射：１×ＰＢＳ中ＭＢＶ懸濁物、体積３００μＬを、１ｍＬ当たり１．１０×10^{12}個の粒子、または注射当たり３．３×10^{11}個の粒子を含有する１ｍＬのシリンジに入れた。

【０２６７】

浣腸送達：ラットを、０．５～５％イソフルランを吸入させることで麻酔し、フレキシブルＳＵＲＦＬＯ（登録商標）翼状注入カテーテル（Ｔｅｒｕｍｏ、ＯＤ＝２ｍｍ）を用いて浣腸を投与した（図２Ａ～Ｃ）。浣腸溶液を、カテーテルに付着させたシリンジを利用し、結腸の長さに沿って投与した；具体的には、肛門まで８ｃｍのところから開始し、カテーテルを徐々に取り出しながらおよその総注入時間６０秒間で投与した。シリンジは指定の処置材料を合計５ｍＬ含有した。浣腸送達の速度および浣腸材料の体積は、結腸の近位から遠位までの完全なカバレッジを確実にするよう意図したものであった。処置群は、５．５％ＤＳＳを飲料水から除去した後すぐに開始して、４日間、毎日浣腸を受けた。

【０２６８】

ＭＢＶ注射送達：ラットを、０．５～５％イソフルランを吸入させることで麻酔し、体

積３００ｕＬの材料を外側尾静脈に投与した。注射は、適切な群に、５．５％ＤＳＳを飲料水から除去した直後、およびＤＳＳ除去の２日後に行った。

【０２６９】

生存中の観察：訓練を受けた人員が以下のデータを毎日記録した：（１）食物消費量、（２）水消費量、（３）動物の体重、（４）糞の硬さ、（５）糞中の血液の存在。糞を硬さ（０＝正常、２＝緩い、４＝下痢）および血液の存在（０＝なし、２＝潜血、４＝肉眼的出血）に基づいてスコア化した。潜血をＣｏｌｏＳｃｒｅｅｎ ＥＳ Ｌａｂ Ｐａｃｋ Ｆｅｃａｌ Ｏｃｃｕｌｔ Ｔｅｓｔｓを使用して試験した。

【０２７０】

結腸外植プロトコール：図１に示されている通り、動物を４日目に 殺した。Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ（ＡＶＭＡ）に従い、CO_2吸入およびその後の頸部脱臼によって安楽死を達成した。安楽死後、結腸を、正中線切開によりアクセスすることによって切除した。直腸から盲腸に及ぶ結腸を長手方向に切開して内腔面を露出させ、ＰＢＳですすいだ後、組織の肉眼的スコア化を行った。外植した結腸を撮影し、スコア化した。結腸の遠位８ｃｍを１０％中性緩衝ホルマリン中、２日間にわたって固定し、パラフィン包埋および組織切片化（５ｕｍ）にかけた。試料をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、代表的な画像を取得し、組織学的検査およびスコア化を実施した。

【０２７１】

結腸組織の肉眼的スコア化：結腸を損傷について表２に概略されている測定基準に従って肉眼で評価した。スコアの決定は処置群について盲検化された研究者が行った。

表2．肉眼的解剖学的スコア化の基準

【表２】

スコア	外見
0	正常
1	限局性の充血、潰瘍なし
2	炎症、潰瘍なし
3	1部位における潰瘍形成、および炎症
4	2部位またはそれよりも多くの部位の潰瘍形成、および炎症
5	結腸の長さに沿って1cmを超えて広がった、複数部位における潰瘍形成
6-10	損傷面積が結腸に沿って2cmを超えて広がっている場合、1cmごとにスコアを1点増加させた

【０２７２】

組織学的評価：外植した組織を、顕微鏡分析のために、以前に記載されている通り処理した。Ｈ＆Ｅ染色した切片を、表３に記載されている通り、結腸組織の形態的変化についてスコア化した。各組織切片について、潰瘍形成の程度、軽度の粘膜炎症、重度の粘膜炎症、軽度の粘膜下炎症、および重度の粘膜下炎症について別々のスコアを付けた。スコアの決定は、処置群について盲検化された研究者が行った。スコア化を均一にするために、スコア化基準が定義され、例が示されたガイダンス文書を各スコアラーに提供した。

表3．Ｈ&Ｅ染色した切片の組織学的スコア化の基準

【表３】

基準		スコア	説明	
潰瘍形成	存在するか?	0	なし	
粘膜炎症	軽度	1	1-10%	
	重度	2	11-30%	
粘膜下炎症	軽度	3	31-60%	
	重度	4	61-100%	

【０２７３】

免疫蛍光染色によるマクロファージ分析：外植した結腸を、マクロファージの免疫蛍光染色によって分析した。スライドを、一連のキシレンおよびエタノール洗浄、続いて水洗浄によって脱パラフィンした。クエン酸塩抗原賦活化緩衝液（１０ｍＭのクエン酸塩、ｐＨ６．０）を高出力のマイクロ波中に１５分間置くことによって組織切片の抗原賦活化を促進し、硫酸銅緩衝液（１０ｍＭの$CuSO_4$、５０ｍＭの酢酸アンモニウム）中で冷却した。ブロッキング溶液（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ－ｆｒｅｅ　Ｂｌｏｃｋｉｎｇ　Ｂｕｆｆｅｒ、４％ヤギ血清、２％ＢＳＡ、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）；Ｐｉｅｒｃｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ－ｆｒｅｅ　Ｂｌｏｃｋｉｎｇ　Ｂｕｆｆｅｒ）をスライド上でそれぞれ１０分間インキュベートした。次いで、組織を一次抗体（ヤギ抗ＣＤ２０６　１：１００；ウサギ抗ＴＮＦα　１：１００；マウス抗ＣＤ６８　１：１００）と共にマイクロ波に中～低出力設定で３分間当て、３分間インキュベートし、続いてＴＢＳ－Ｔで洗浄した。二次抗体（ウサギ抗ヤギＨＲＰ　１：１００；ヤギ抗ウサギＨＲＰ　１：１００；ヤギ抗マウスＨＲＰ　１：１００）を組織と共にマイクロ波に中～低出力設定で３分間当て、３分間インキュベートし、続いて洗浄した。オパール試薬（緑色、赤色、および青色、適切な希釈剤中１：１００）を組織と共に暗所で１０分間インキュベートし、続いて洗浄した。抗原賦活化および抗体インキュベーションを各染料について繰り返した。ＤＲＡＱ５を核マーカーとして使用した。次いで、組織切片を退色防止試薬を用いて封入し、イメージングを行った。

【０２７４】

結果－生存中の観察

食物および水の消費量：各ラットが消費した食物および水を－５日目から４日目まで毎日測定した（図３）。水の摂取は、１日目に疾患誘発を受けた群では、ＤＳＳ水を除去し、通常の水を受けた後、増加したと思われる。全体的に、食物消費量は試験全体を通して安定なままであった。

【０２７５】

体重変化：ラットを－６日目から４日目まで１日１回秤量した。個々のラットの体重を、それらの－６日目における開始時体重に対して正規化した（図４）。ラットをＤＳＳに曝露させた最初の３日間で全体的に体重が減少したと思われる。全体的に、ＤＳＳ水を除去し、処置を開始したら体重が安定化したと思われた。

【０２７６】

糞の硬さおよび血液含量：各ラットについて糞の硬さおよび血液スコアを毎日決定した。どちらの測定基準のスコア化方式も、スコアが高いほど疾患レベルが高いことを示す。糞の硬さおよび血液含量に関する個々のラットのスコアを、０日目に得られたスコアに対して正規化して、疾患誘発の終了時から処置の終了時までの変化を決定した（図５）。全ての処置群で疾患進行の緩和が実証されたと思われた。

【０２７７】

臨床的および組織学的転帰

外植後、盲腸から直腸までの結腸の長さを疾患活動性の指標として測定した。結腸が短いほど疾患の状態がより重症であることに対応する。全体的に、予測通り、ＤＳＳを受けた全ての動物が、健康な対照よりも短い結腸を有すると思われた。結腸を、充血、炎症お

よび潰瘍形成の証拠について肉眼で検査した。全体的に、図６に示されている通り、処置を受けた動物では無処置の動物よりも肉眼的スコアが低いと思われた。

【０２７８】

組織学的分析が図７Ａ～７Ｇに示されており、また、以下に詳細に考察する。

【０２７９】

正常かつ健康な結腸組織：図７Ａおよび図７Ｇ（ｉ）に示されている結腸組織は、健康な動物から収集したものであり、上皮細胞の密集層を伴う均一に厚い粘膜を特徴とする。固有層は正常な細胞充実性を有し、明確に画定された基礎をなす粘膜筋板が存在する。粘膜下組織は、正常な数の単核細胞を含有し、その大多数が静止状態のマクロファージである。最も深部の層は、外筋層と称される厚い筋層である。この組織切片は、正常かつ健康な結腸組織の代表である。

【０２８０】

疾患結腸：図７Ｂおよび図７Ｇ（ｉｉ）に示されている結腸組織は、５．５％ＤＳＳで６日間処置され、その後、治療介入を受けていない動物から収集したものである。粘膜の形態が著しく破壊されていた。粘膜上皮の再生および粘膜層の正常なバリア機能の修復の試みの証拠として、広範に散乱した粘膜上皮細胞の小さなクラスターが存在した。正常かつ健康な結腸とは異なり、いかなる上皮細胞の密集層も存在しなかった。固有層は細胞充実性が増加しており、これは、組織傷害に対する宿主炎症反応および毒性結腸内容物の浸潤を示す。通常は粘膜と基礎をなす粘膜下組織を分離している粘膜筋板層の顕著な破壊が認められた。固有層および粘膜下組織のどちらの細胞充実性も著しく増加しており、疾患結腸の粘膜下層内にリンパ系細胞が蓄積した小結節を２つ見ることができる（濃い円形の領域）。外筋層は正常である（全ての検体に関して同様に）。

【０２８１】

ＥＣＭヒドロゲル処置群：図７Ｄおよび図７Ｇ（ｉｉｉ）に示されている結腸組織は、皮膚ＥＣＭから作製されたＥＣＭ音響的ヒドロゲルで処置された動物から収集したものである。疾患結腸群と比較した粘膜上皮細胞の数の増加によって証明される通り、結腸粘膜の部分的な復旧が認められる。固有層および粘膜下組織の細胞充実性は疾患群のものよりも低いが、正常な結腸群ほどは低くない。明白に画定でき、インタクトな粘膜筋板が認められる。この組織学的外観は、結腸粘膜の部分的な治癒を表す。

【０２８２】

ＭＢＶ＋食塩水処置群：この群からの結腸組織の組織学的外観は、図７Ｃおよび図７Ｇ（ｖｉ）に示されている通り、ＥＣＭヒドロゲル処置群と非常に類似していた。結腸粘膜の部分的な復旧、インタクトな粘膜筋板の維持、およびわずかに増加した数のマクロファージを含有する粘膜下組織が認められた。

【０２８３】

ＥＣＭヒドロゲル＋ＭＢＶ処置群：この群からの例示的な組織は図７Ｅおよび図７Ｇ（ｖ）に示されており、注目すべき、粘膜、粘膜筋板および粘膜下組織のほぼ完全な置き換えを示す。疾患結腸群とは明らかに異なっていた。粘膜上皮細胞集団のほぼ完全な置き換え、ならびに固有層および粘膜下組織のほぼ正常な細胞充実性が認められた。粘膜筋板はインタクトである。驚くべきことに、かつ予想外に、ＥＣＭヒドロゲル＋ＭＢＶ群からの組織学的検体は、正常かつ健康な結腸粘膜とほぼ区別不可能であり、これにより、ＥＣＭヒドロゲル＋ＭＢＶの組合せが、ＥＣＭヒドロゲルまたはＭＢＶ単独では浣腸または静脈内投与のいずれでも見られなかった、結腸組織の治癒に対する相乗的な影響を有したことが示される。

【０２８４】

まとめ：いかなる方法でもＥＣＭを受けなかった群では、顕著な破壊的転帰が誘発され、結腸粘膜置き換えに関する最小の修復の試みのみが伴った。疾患のみの群では置き換えがあったとしても最小であったのと対照的に、全てのＭＢＶ群で結腸粘膜の部分的な置き換えが示された。ＥＣＭヒドロゲルとＭＢＶの組合せにより、結腸粘膜のほぼ完全な修復が誘導された。ＩＶ　ＭＢＶプラスＥＣＭヒドロゲルの組合せは、他の全てのＭＢＶ群の

結果をはるかにしのいだ。

【０２８５】

さらなる組織学的評価

上記の処置した組織の組織学的試料を顕微鏡により高倍率で評価し、視覚的観察から、処置試料では疾患試料よりも炎症が少ないことが示された。処置した動物は、陰窩の存在および組織化との関連で、定性的に、より健康な粘膜を有すると思われた。ヘマトキシリンおよびエオシン染色試料の視覚的観察により、ＥＣＭヒドロゲルとＭＢＶの組合せで処置した試料（図１１Ｄ）では、十分に組織化された腸陰窩および最小の細胞浸潤によって示される、より健康な粘膜および粘膜下組織が示された。疾患試料では（図１１Ａ）、多くの領域で腸陰窩が完全になくなっていたが、一方、処置試料では（図１１Ｂ～１１Ｅ）、細胞は、健康な（図７Ａ）結腸粘膜および粘膜下組織において一般に見られる配向および構造に再組織化し始めていると思われた。

【０２８６】

さらに、図１１Ｄにおいて実証されている通り、ＭＢＶが注入されたＥＣＭヒドロゲルのラット結腸への局所投与の効果により、組織学によって実証された通り、ＭＢＶ＋ＰＢＳの局所投与（図１１Ｃ）またはＥＣＭヒドロゲル単独での局所投与（図１１Ｂ）よりも健康な粘膜および粘膜下がもたらされ、これにより、この組合せが結腸の治癒に関して相乗効果を有し得ることが示唆される。

【０２８７】

ＭＢＶ処理によりマクロファージのＭ２またはリモデリング促進表現型に向かうモジュレーションが示される

ＭＢＶは、マクロファージを治癒促進性、抗炎症性表現型に向けてモジュレートすることが以前に示されている。これを、ＤＳＳ誘発潰瘍性大腸炎の処置においてさらに実証した。処置したラットからの様々な組織層全体を通したＭ２：Ｍ１マクロファージ比が図１２Ａ～１２Ｅにおいてさらに実証されている。データから、全身ＭＢＶ投与またはＥＣＭヒドロゲル－ＭＢＶの組合せの浣腸により、ＥＣＭヒドロゲル浣腸単独またはＭＢＶ浣腸単独と比較して、結腸組織における劇的に高いＭ２：Ｍ１比が促進されたことが示される。ＭＢＶヒドロゲル浣腸で処置した結腸組織におけるＭ２：Ｍ１比は、ＭＢＶ浣腸またはヒドロゲル浣腸単独で処置した結腸組織に対する効果よりも大きく（それらを足したとしても大きく）、これにより、ＭＢＶとヒドロゲルの組合せが、結腸組織におけるマクロファージのＭ２表現型に向けたモジュレーションに対する、したがって、Ｍ２：Ｍ１マクロファージ比に対する相乗効果を有することが示唆される。結腸全体を通してＭ２細胞およびＭ１細胞を計数することに加えて（図１２Ａ）、結腸組織の様々な組織学的層内のＭ２（ＣＤ６８＋、ＣＤ２０６＋）またはＭ１（ＣＤ６８＋、ＴＮＦａ＋）マクロファージの数も計数した（すなわち、粘膜、筋層、粘膜下組織、それぞれ図１２Ｂ、図１２Ｃ、および図１２Ｄを参照されたい）。全体的に、データから、ＭＢＶをＥＣＭヒドロゲルに添加することにより、Ｍ２：Ｍ１比に対して単に相加的ではなく、相乗的な効果が得られることが示される。さらに、全身的にまたはＥＣＭヒドロゲル中でのいずれかで投与されたＭＢＶは、ＣＤ６８＋細胞の数を劇的に減少させ（図１２Ｅ）、これにより、それらの組織におけるマクロファージの総数が減少したことが示される。

【０２８８】

まとめ

上で実証された通り、試験中の疾患進行を、水消費量、食物消費量、体重、糞の硬さ、および糞中の血液の存在を含む、生存中の観察により追跡した。体重の減少、糞の硬さスコアの増加、および血便の存在により、試験動物におけるＤＳＳ誘発潰瘍性大腸炎の刺激が上首尾であることが確認された。

【０２８９】

全体的に、データから、生存中の観察、組織学的分析、およびマクロファージ極性化分析に基づいて、外因性ＭＢＶが添加されたＥＣＭヒドロゲルが、ＤＳＳ誘発潰瘍性大腸炎（ＵＣ）ラットモデルにおける治癒速度の増加をもたらすことが示される。生存中の観察

から、全ての処置群で疾患対照と比較して速い回復が示された。肉眼的スコア化および組織学により、結腸における疾患の重症度がより低いことを示す生存中の観察が肉眼でかつ顕微鏡レベルで確認された。処置群における粘膜および粘膜下組織の組織化および密度がより低レベルの炎症および腸陰窩の存在による高レベルの粘膜の組織化を伴う治癒速度の増加の兆候が示された。処置群におけるマクロファージは、疾患群のみよりも大きなリモデリング表現型へのシフトを示し、これにより、処置に起因した治癒速度の増加の能力および結果がさらに確認される。

【０２９０】

上記の試験の結果から、ＭＢＶが注入されたＥＣＭヒドロゲルが、腸の炎症性疾患、例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患を処置するための強力な治療的潜在性を有することが示唆される。

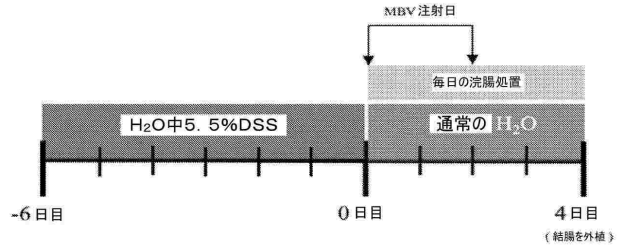
【０２９１】

本発明者らの発明の原理を適用することができる多くの可能性のある態様を考慮して、例示された態様は単に本発明の例であり、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではないことが認識されるべきである。そうではなく、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。したがって、本発明者らは、これらの特許請求の範囲の範囲および主旨に入る全てが本発明者らの発明であることを主張する。

【図面】

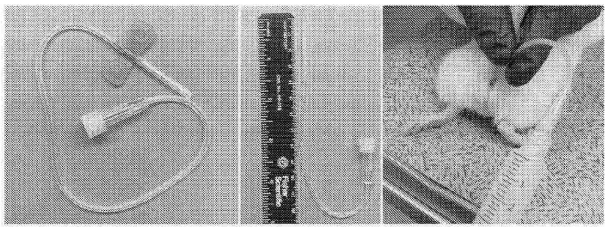
【図１】

FIG. 1

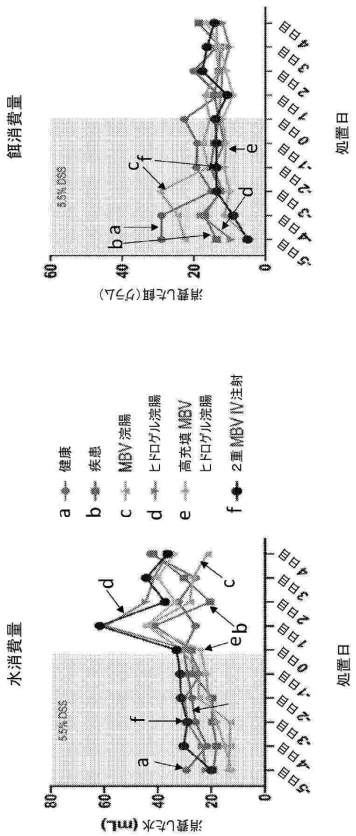


【図２】

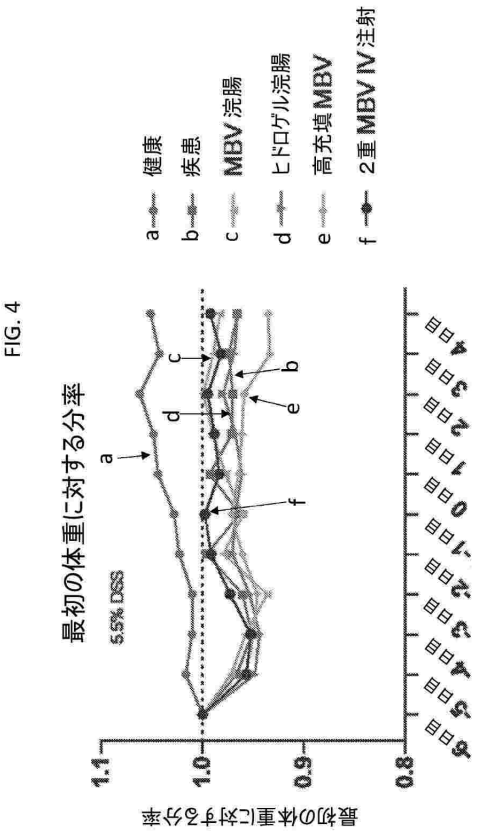
FIG. 2A FIG. 2B FIG. 2C



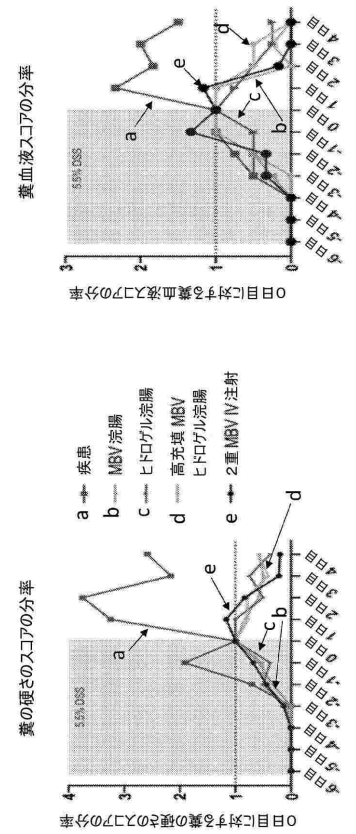
【図３】


FIG. 3
水消費量
消費した水 (mL)
処置日
餌消費量
消費した餌 (グラム)
5.5% DSS
a 健康
b 疾患
c MBV 浣腸
d ヒドロゲル浣腸
e 高充填 MBV
ヒドロゲル浣腸
f 2重 MBV IV注射

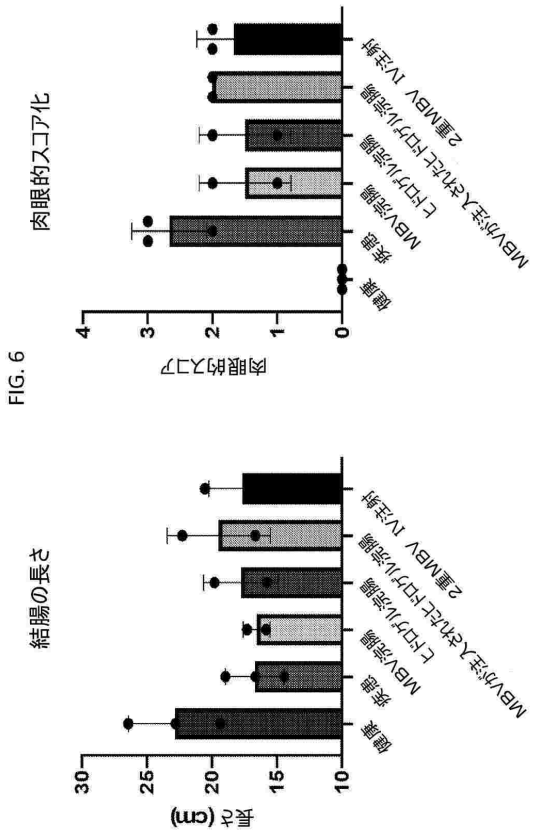
【図４】


FIG. 4
最初の体重に対する分率
5.5% DSS
a 健康
b 疾患
c MBV 浣腸
d ヒドロゲル浣腸
e 高充填 MBV
f 2重 MBV IV注射

【図５】


FIG.5
糞の硬さのスコアの分率
0日目に対する糞の硬さのスコアの分率
糞血液スコアの分率
0日目に対する糞血液スコアの分率
5.5% DSS
a 疾患
b MBV浣腸
c ヒドロゲル浣腸
d 高充填 MBV
ヒドロゲル浣腸
e 2重 MBV IV注射

【図６】


FIG. 6
結腸の長さ
長さ (cm)
肉眼的スコア化
肉眼的スコア
健康
疾患
MBV浣腸
ヒドロゲル浣腸
高充填MBV ヒドロゲル浣腸
2重MBV IV注射

【図７】

FIG. 7A

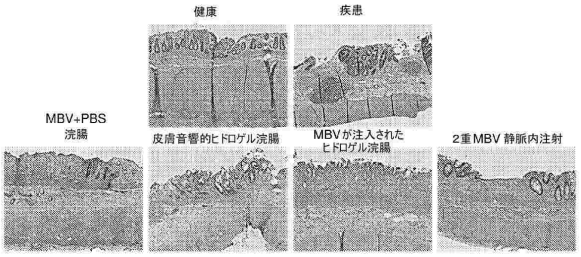
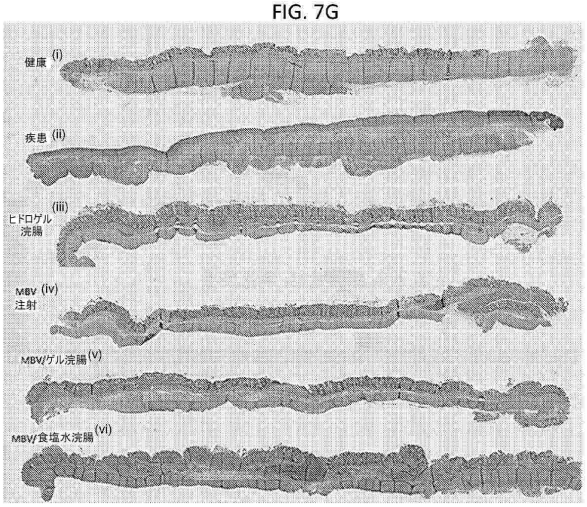


FIG. 7B FIG. 7C FIG. 7D FIG. 7E FIG. 7F

FIG. 7G



【図８】

FIG. 8A

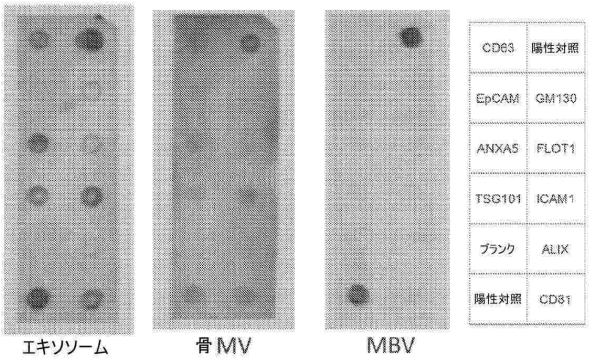
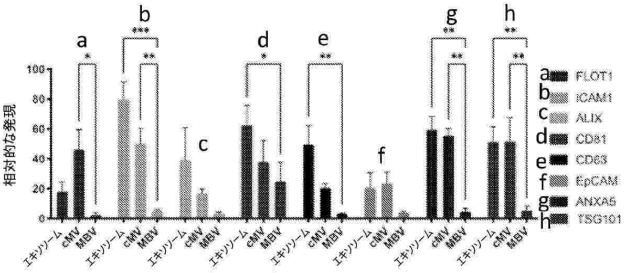
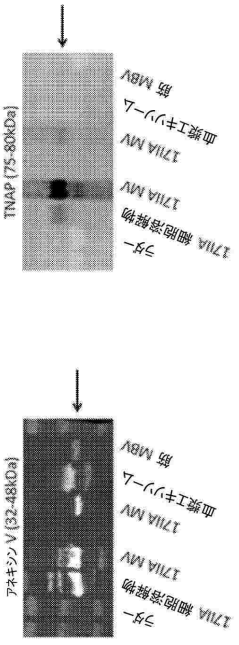


FIG. 8B



【図９】

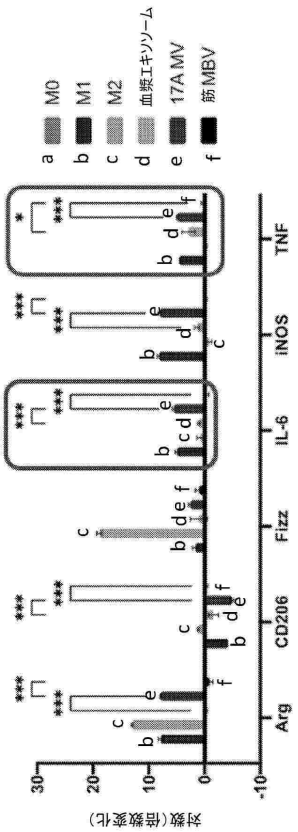
FIG. 9



レーン	試料名	濃度	添加体積	添加質量
1	17A 溶解物対照 (Napierala lab)	2130 μg/mL	4.7μL	10μg
2	17IIA MV 対照 (Napierala lab)	不明	10μL	不明
3	71IIA MV	458.1 μg/mL	10μL	4.581μg
4	血漿エキソソーム	501.0 μg/mL	10μL	5.010μg
5	筋 MBV	745.6 μg/mL	10μL	7.1456μg

【図１０】

FIG. 10



【図１１】

FIG. 11A

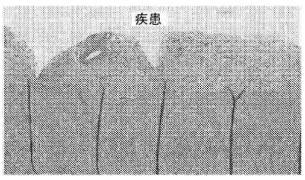
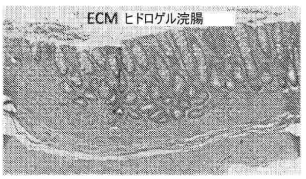


FIG. 11B



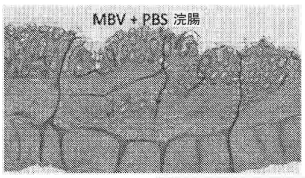


FIG. 11C



FIG. 11D

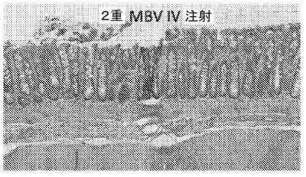


FIG. 11E

【図１２－１】

FIG. 12A

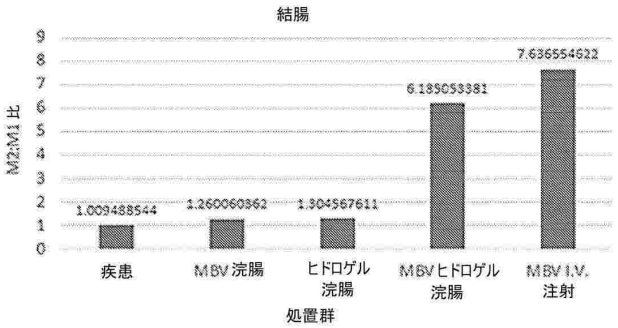
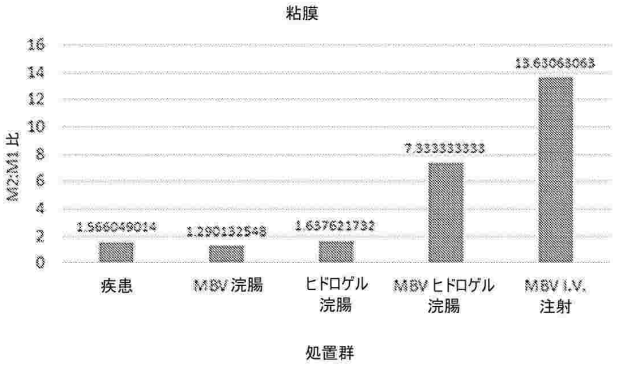


FIG. 12B



【図１２－２】

FIG. 12C

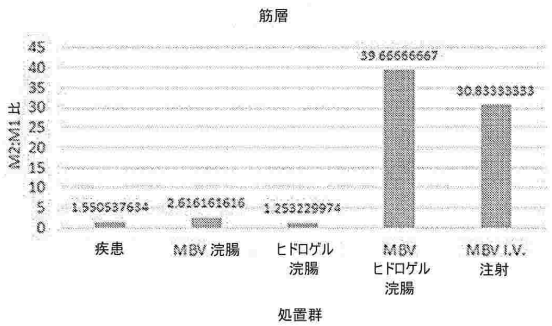
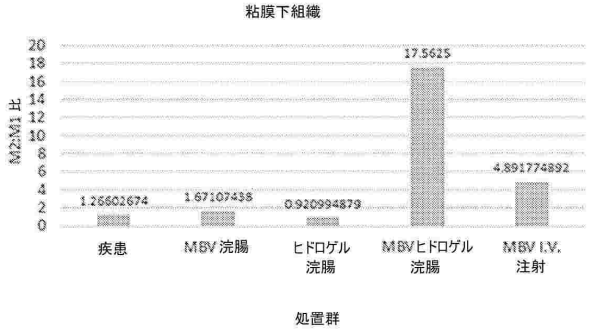
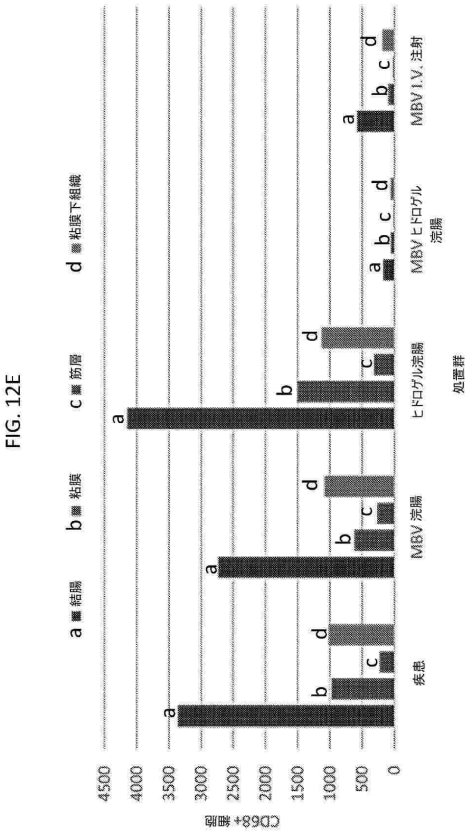


FIG. 12D



【図１２－３】

FIG. 12E



【配列表】
20255118710000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/065525

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/22 (2015.01) A61K 9/00 (2006.01) A61K 9/06 (2006.01) A61K 9/51 (2006.01) A61K 35/12 (2015.01) A61K 35/36 (2015.01) A61K 35/38 (2015.01) A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01) A61P 1/04 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PATENW (based on EPODOC, WPIAP and the English full-text databases), MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE: Solubilized extracellular matrix, ECM, matrix bound nanovesicle, MBV, acoustic ECM, enzymatic ECM, hydrogel, exogenous MBV, CD63, CD81 and similar terms. Internal databases provided by IP Australia, DOCDB, DWPI, PubMed, Espacenet (Worldwide database), ClinicalTrials.gov: Applicant/Inventor and keyword search.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] See patent family annex

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 May 2023	30 May 2023
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	**Authorised officer** Lauren Howitt AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6225 6130

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/US2023/065525
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/151862 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH – OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 08 September 2017 See Examples 1-15, page 10, line 14, page 35, lines 15-34, page 43, lines 10-12, page 48, lines 11-15, page 49, lines 1-22, page 50, lines 13-22, Figure 18, claims 35-40	1-24
X	WO 2019/213482 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH – OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 07 November 2019 See page 17, lines 3-4, Examples 1-10, page 22, lines 11-17	1-24
A	WO 2022/055559 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 17 March 2022 See page 8, lines 21-30, page 14, lines 23-32, Examples 1-3, Figure 5	1-24
A	WO 2018/161034 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 07 September 2018 See Examples 1-2, Figure 9	1-24
A	WO 2020/186082 A1 (UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 17 September 2020 See Examples 1-9	1-24
A	HULEIHEL, L. et al., "Matrix-Bound Nanovesicles Recapitulate Extracellular Matrix Effects on Macrophage Phenotype", Tissue Engineering: Part A. 2017, Vol. 23, No. 21-22, pages 1283-1294 See Abstract, Materials and Methods, Discussion	1-40

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/065525

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

   There was a sequence listing originally filed but it was not used for the purposes of this search and opinion.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/US2023/065525

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
WO 2017/151862 A1	08 September 2017	WO 2017151862 A1	08 Sep 2017
		AU 2017227790 A1	09 Aug 2018
		AU 2017227790 B2	16 Mar 2023
		CA 3013223 A1	08 Sep 2017
		CN 109152737 A	04 Jan 2019
		EP 3423038 A1	09 Jan 2019
		JP 2019513125 A	23 May 2019
		JP 6984898 B2	22 Dec 2021
		JP 2022024085 A	08 Feb 2022
		KR 20180123054 A	14 Nov 2018
		KR 20230010778 A	19 Jan 2023
		US 2019117837 A1	25 Apr 2019
		US 2021260246 A1	26 Aug 2021
WO 2019/213482 A1	07 November 2019	WO 2019213482 A1	07 Nov 2019
		AU 2019263479 A1	07 Jan 2021
		CA 3098149 A1	07 Nov 2019
		CN 112805016 A	14 May 2021
		EP 3787642 A1	10 Mar 2021
		JP 2021523103 A	02 Sep 2021
		KR 20210005942 A	15 Jan 2021
		US 2021106526 A1	15 Apr 2021
WO 2022/055559 A1	17 March 2022	WO 2022055559 A1	17 Mar 2022
		AU 2021341543 A1	25 May 2023
		CA 3194975 A1	17 Mar 2022
		CN 116157138 A	23 May 2023
		KR 20230066414 A	15 May 2023
WO 2018/161034 A1	07 September 2018	WO 2018161034 A1	07 Sep 2018
		AU 2018226871 A1	08 Aug 2019
		CA 3049990 A1	07 Sep 2018
		CN 110352064 A	18 Oct 2019
		EP 3589294 A1	08 Jan 2020
		EP 3589294 B1	26 Oct 2022
		JP 2020509028 A	26 Mar 2020
		KR 20190121840 A	28 Oct 2019
		US 2020069738 A1	05 Mar 2020

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. PCT/US2023/065525

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
		US 11291688 B2	05 Apr 2022
WO 2020/186082 A1	17 September 2020	WO 2020186082 A1	17 Sep 2020
		AU 2020235627 A1	19 Aug 2021
		CA 3130684 A1	17 Sep 2020
		CN 113557040 A	26 Oct 2021
		CN 113557040 B	05 May 2023
		EP 3937994 A1	19 Jan 2022
		JP 2022524380 A	02 May 2022
		KR 20210142003 A	23 Nov 2021
		US 2022143265 A1	12 May 2022

End of Annex

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
A61K	*47/42*	*(2017.01)*	A61P	43/00	121	
A61K	*9/06*	*(2006.01)*	A61K	47/42		
A61K	*38/48*	*(2006.01)*	A61K	9/06		
A61K	*9/51*	*(2006.01)*	A61K	38/48		
A61K	*47/46*	*(2006.01)*	A61K	38/48	100	
			A61K	9/51		
			A61K	47/46		

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 バディラク， スティーブン フランシス
アメリカ合衆国 インディアナ ４７９０９， ウエスト ラファイエット， リリー ロード ２９５１
(72)発明者 ハッシー， ジョージ エス．
アメリカ合衆国 ペンシルベニア １６０６６， クランベリー タウンシップ， マクドナルド ドライブ １０５

Ｆターム（参考） 4C076 AA09 AA65 AA95 BB01 BB29 CC16 CC26 EE41 EE57
4C084 AA02 AA03 BA44 CA25 DA40 DC02 DC03 MA02 MA28 MA38 MA52 MA60 NA05 NA13 ZA661 ZA681 ZB211 ZC751
4C087 AA01 AA02 AA03 BB40 BB48 MA02 MA28 MA38 MA52 MA60 NA05 NA13 ZA66 ZA68 ZB21 ZC75