

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-524380
(P2022-524380A)

(43)公表日 令和4年5月2日(2022.5.2)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 26/00 (2006.01)	A 6 1 L 26/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	4 C 0 8 1
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
C 1 2 N 5/071(2010.01)	C 1 2 N 5/071	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全62頁)

(21)出願番号	特願2021-553299(P2021-553299)	(71)出願人	504279968
(86)(22)出願日	令和2年3月12日(2020.3.12)		ユニバーシティ オブ ピッツバーグ
(85)翻訳文提出日	令和3年10月20日(2021.10.20)		オブ ザ コモンウェルス システム オブ
(86)国際出願番号	PCT/US2020/022433		ハイヤー エデュケーション
(87)国際公開番号	WO2020/186082		アメリカ合衆国 1 5 2 6 0 ペンシルバ
(87)国際公開日	令和2年9月17日(2020.9.17)		ニア州, ピッツバーグ, サッカレイ ア
(31)優先権主張番号	62/817,787		ヴェニュー 1 3 0, ガードナー スティ
(32)優先日	平成31年3月13日(2019.3.13)		ール カンファレンス センター ファー
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		スト フロア
(31)優先権主張番号	62/950,565	(74)代理人	100078282
(32)優先日	令和1年12月19日(2019.12.19)		弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100181674
	最終頁に続く		弁理士 飯田 貴敏
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 音響細胞外マトリックスヒドロゲルおよびそれらの使用

(57)【要約】

本明細書において、哺乳動物の音響細胞外マトリックス（ECM）ヒドロゲルを生成するための方法が開示される。さらなる実施形態では、開示される方法を使用して生成される哺乳動物の音響ECMヒドロゲルが開示される。熱可逆的である哺乳動物の音響ECMヒドロゲルも開示される。これらの音響ECMヒドロゲルを使用する方法も開示される。ECM生体骨格は酵素的消化なしで超音波を使用して首尾よく可溶化することができ、細胞増殖を支えることが可能なゲルの形に再重合するように誘導することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞外マトリックス（ECM）ヒドロゲルを生成する方法であって、超音波周波数を使用して哺乳動物ECMを液体中に可溶化して液相の音響ECMヒドロゲルを生成することを含む方法。

【請求項 2】

前記超音波周波数が30℃～43℃の間の温度で印加される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記超音波周波数が35℃～40℃の間の温度で印加される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記超音波周波数が36℃～38℃の間の温度で印加される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記超音波周波数が約37℃の温度で印加される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記哺乳動物ECMが約25mg/mlから約600mg/mlの濃度で存在する、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記超音波周波数が20kHzまたはそれより大きい、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記超音波周波数が約20kHzから約100kHzである、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記超音波周波数が少なくとも30秒間印加される、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

細胞外マトリックス（ECM）ヒドロゲルを生成する方法であって、約20kHzから約100kHzの周波数の超音波により約37℃より高い温度で少なくとも約30秒間、哺乳動物ECMを約25mg/mlから約600mg/mlの濃度で液体中に可溶化して、液相の音響ECMヒドロゲルを生成することを含む方法。

【請求項 11】

前記哺乳動物ECMが少なくとも約60秒間超音波で処理される、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記哺乳動物ECMが凍結乾燥された哺乳動物ECMである、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記凍結乾燥された哺乳動物ECMが粉末に粉碎される、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記ECMが約10μmから約2000μmの範囲内の断片として提供される、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記ECMが約10μmから約1000μmの範囲内の断片として提供される、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記液相の前記音響ECMヒドロゲルを約37℃またはそれ未満の温度まで冷却し、それによってゲル相の前記音響ECMヒドロゲルを生成することをさらに含む、請求項1～1

10

20

30

40

50

5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記冷却が 4℃から 25℃の温度までである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記冷却が 4℃から 37℃未満の温度までである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記超音波が約 20 kHz の周波数である、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記超音波が約 20 μm から約 320 μm の振幅を有する、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 21】

前記超音波が約 36 μm から約 180 μm の振幅を有する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記液体中の可溶化された哺乳動物 ECM を約 60 秒から約 1 時間前記超音波で処理することを含む、請求項 1～21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記液体中の可溶化された哺乳動物 ECM を約 60 秒間前記超音波で処理することを含む、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記液体中の哺乳動物 ECM を 25 mg/ml から 150 mg/ml の濃度で提供することを含む、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 25】

前記液体中の可溶化された哺乳動物 ECM を約 30～45℃の温度で前記超音波で処理することを含む、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記液体中の可溶化された哺乳動物 ECM を約 35℃から 40℃の温度で前記超音波で処理することを含む、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記液体中の可溶化された哺乳動物 ECM を約 36℃から 38℃の温度で前記超音波で処理することを含む、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 28】

前記液体中の可溶化された哺乳動物 ECM を約 37℃の温度で前記超音波で処理することを含む、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記液体中の可溶化された哺乳動物 ECM を約 40℃の温度で前記超音波で処理することを含む、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記 ECM がヒト ECM である、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記液体がリン酸緩衝食塩水である、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 32】

前記 ECM が膀胱 ECM、小腸粘膜下 ECM、食道 ECM、気管 ECM、肝臓 ECM または真皮 ECM である、請求項 1～31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記 ECM がブタ ECM またはウシ ECM である、請求項 1～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記 ECM がブタ食道 ECM である、請求項 1～33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記 E C M がブタ膀胱 E C M である、請求項 1 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記液相の前記音響 E C M ヒドロゲルを冷却前に三次元型に入れることをさらに含む、請求項 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記型が少なくとも 4 ミクロン厚のシートを生成する、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記音響 E C M ヒドロゲルがガンマ線照射される、請求項 1 ～ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記音響 E C M ヒドロゲルが約 2 0 k G y でガンマ線照射される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

請求項 1 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の方法によって生成される音響 E C M ヒドロゲル。

【請求項 4 1】

熱可逆的であり、約 3 7 °C 未満の温度でゲル相であり、約 3 7 °C より高い温度で液相である音響 E C M ヒドロゲル。

【請求項 4 2】

貯蔵弾性率 (G ') が損失弾性率 (G '') より約 1 桁大きい、請求項 4 0 または 4 1 に記載の音響 E C M ヒドロゲル。

【請求項 4 3】

前記音響 E C M ヒドロゲルの粘度が約 1 5 °C から約 3 7 °C の温度で応力の増加に伴って減少する、請求項 4 0 ～ 4 2 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲル。

【請求項 4 4】

哺乳動物 E C M ヒドロゲルがヒト E C M ヒドロゲルである、請求項 4 0 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲル。

【請求項 4 5】

前記 E C M が膀胱 E C M 、小腸粘膜下 E C M 、食道 E C M 、気管 E C M 、肝臓 E C M または真皮 E C M である、請求項 4 0 ～ 4 4 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲル。

【請求項 4 6】

前記 E C M がブタ E C M である、請求項 4 0 ～ 4 5 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲル。

【請求項 4 7】

1 5 °C で約 1 4 0 0 P a * s の粘度、および 2 5 °C の温度で約 4 0 0 P a * s の粘度を有し、約 1 5 0 m g / m L の濃度の E C M を含む、請求項 4 0 ～ 4 6 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲル。

【請求項 4 8】

1 5 °C で概ね 2 7 0 0 P a * s 、 2 5 °C で概ね 8 0 0 P a * s および 3 7 °C で 6 0 0 P a * s の貯蔵弾性率を有し、約 1 5 0 m g / m L の濃度の E C M を含む、請求項 4 0 ～ 4 7 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲル。

【請求項 4 9】

ガンマ線照射されている、請求項 4 0 ～ 4 8 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲル。

【請求項 5 0】

外因性プロテアーゼも不活性化外因性プロテアーゼも含有しない、請求項 4 0 ～ 4 9 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲル。

【請求項 5 1】

外因性ペプシン、トリプシンもしくはヒアルロニダーゼ、または外因性ペプシン、トリプシンもしくはヒアルロニダーゼの不活性化形態を含有する、請求項 4 0 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲル。

10

20

30

40

50

【請求項 5 2】

対象の損傷で止血を増加させる方法であって、請求項 4 0～5 1 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲルの治療的有効量を前記損傷へ局所的に投与し、それによって止血を増加させることを含む方法。

【請求項 5 3】

前記損傷が外科創傷、火傷または外傷性損傷である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記対象がヒトである、請求項 5 2 または 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記損傷が前記対象の血管、肝臓、肺または皮膚の中にある、請求項 5 2～5 4 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 5 6】

前記対象に前記音響 E C M ヒドロゲルを投与してから約 1 0 から約 1 0 0 秒以内に止血が誘導される、請求項 5 2～5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

マクロファージで M 2 表現型を誘導する方法であって、請求項 4 0～5 1 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲルの有効量でマクロファージを処理し、それによって前記 M 2 表現型を誘導することを含む方法。

【請求項 5 8】

前記対象がヒトである、請求項 5 7 に記載の方法。 20

【請求項 5 9】

対象の臓器の領域からの固有筋層から粘膜および粘膜下層を切開する方法であって、請求項 4 0～5 1 のいずれか一項に記載の音響 E C M ヒドロゲルを含む医薬組成物を前記対象の前記臓器へ粘膜下に注射して、前記臓器の前記領域の前記粘膜下層と下にある固有筋層の間でクッションを形成し、それによって前記粘膜および前記粘膜下層を下にある前記固有筋層から切開し、前記対象の前記臓器の前記領域における炎症を阻止することを含む方法。

【請求項 6 0】

前記音響 E C M ヒドロゲルが膀胱 E C M、小腸粘膜下 E C M、食道 E C M、気管 E C M、肝臓 E C M または真皮 E C M から生成される、請求項 5 9 に記載の方法。 30

【請求項 6 1】

前記音響 E C M ヒドロゲル中の E C M 濃度が 2 5 m g / m l から約 6 0 0 m g / m l である、請求項 5 9 または請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記音響 E C M ヒドロゲル中の E C M 濃度が 2 5 m g / m l から約 1 0 0 m g / m l である、請求項 5 9 または請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記音響 E C M ヒドロゲルが内視鏡的にまたはカテーテルによって投与される、請求項 5 9～6 2 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 6 4】

前記臓器が食道、胃、結腸、直腸または小腸である、請求項 5 9～6 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記結腸が上行結腸、横行結腸、下行結腸または S 字結腸である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記小腸が空腸、盲腸または回腸である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記臓器から腺癌または癌腫を切開する方法を含む、請求項 5 9～6 6 のいずれか一項に 50

記載の方法。

【請求項 68】

前記臓器が胃、小腸または結腸である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記臓器が結腸である、請求項 64 ～ 65 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

前記臓器が結腸であり、前記方法が、前記結腸からポリープまたは癌腫を切開することを含む、請求項 64、65 または 69 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 71】

前記臓器が食道であり、前記方法が、前記食道の固有筋層から前記粘膜および前記粘膜下層を切開することを含む、請求項 59 ～ 64 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 72】

前記対象がバレット食道を有する、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 73】

切開された粘膜および粘膜下層を除去するために前記クッション上で内視鏡的切除施術を実行することをさらに含む、請求項 59 ～ 72 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 74】

前記切除施術が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、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

音響 E C M ヒドロゲルが下にある前記臓器の前記固有筋層の上で保持され、前記粘膜および前記粘膜下層が前記臓器の前記領域から除去されるように前記クッションを分割することを含む、請求項 74 に記載の方法。

20

【請求項 76】

前記対象がヒトである、請求項 59 ～ 75 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

前記臓器が胃腸管の中にある、請求項 59 ～ 76 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】

30

関連出願への相互参照

本願は、2019年3月13日に出願の米国仮出願第62／817,787号および2019年12月19日に出願の米国仮出願第62／950,565号の権益を主張し、それらは参照により完全に本明細書に組み込まれる。

【0002】

開示の分野

本願は、ヒドロゲルの分野に、特に超音波を使用して哺乳動物の細胞外マトリックス（ECM）から生成される音響 E C M ヒドロゲルおよびそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

40

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などの精製された E C M 構成要素で構成されるヒドロゲルは、組織工学操作適用で広く使われている。しかし、これらの精製された単一構成要素 E C M 生体材料は、天然の組織 E C M の複雑な生化学的特徴が欠如している。全体の組織または臓器の非細胞化は、天然の組織 E C M の生化学的特徴を保存する E C M を採取するための代替の方法を提供する。E C M の使用における主要な進歩はヒドロゲルを形成する能力であり、それによって E C M の臨床適用性が拡張される。E C M からヒドロゲルを生成するための公知の技術は、酸性溶液中の酸性プロテアーゼによる E C M 材料の消化；E C M フォームを生成する α -アミラーゼ消化の使用；または、カオトロピック抽出緩衝液および手間がかかる透析施術の使用にほ

50

とんど集中している。そのような技術によって作製されるECMヒドロゲルはタンパク質分解および変性を必然的に受け、それによってECM分子および組織特異的ECM構成要素の総体の生物活性が弱められる。そのうえ、ECMヒドロゲルを生成するための酵素ベースの方法は、ECM構成要素の十分な可溶化を達成するために24～72時間に及ぶ長いインキュベーション時間を必要とする。酸性またはアルカリ性の溶液およびプロテアーゼ消化を使用せずにECMヒドロゲルを形成する方法が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

開示の要旨

本明細書において、生体適合性である哺乳動物の音響細胞外マトリックス（ECM）ヒドロゲルを生成するための方法が開示される。これらの方法は、約20kHzから約100kHzの周波数の超音波により30から43℃の温度で十分な時間、緩衝食塩水溶液などの液体の中に25mg/mlから600mg/mlの濃度で哺乳動物ECMを液体中に可溶化して、液相の音響ECMヒドロゲルを生成することを含む。一部の実施形態では、本方法は、液相の音響ECMヒドロゲルを37℃またはそれ未満の温度まで冷却して、ゲル相の音響ECMヒドロゲルを生成することを含む。さらなる実施形態では、開示される方法を使用して生成される音響ECMヒドロゲルが開示される。

【0005】

熱可逆的である音響ECMヒドロゲルも開示される。一部の非限定的な例では、音響ECMヒドロゲルは、約37℃未満の温度で固相であり、約37℃より高い温度で液相である。これらのヒドロゲルは、哺乳動物ECMから生成される。

【0006】

これらの音響ECMヒドロゲルを使用する方法も、開示される。

【0007】

本発明の上のおよび他の特徴および利点は、付随図面を参照して進行するいくつかの実施形態の以下の詳細な説明からより明白になる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1A～1Dは、超音波処理を使用した音響ECMヒドロゲルの調製を示す。（A）15ml円錐管中の粉碎された真皮ECM。（B）PBS中のECM粉末の再懸濁の後、円錐管を氷水浴中に置き、超音波処理器プローブを管に挿入する。（C、D）超音波処理パルスによるECMの可溶化の後、前ゲル溶液を3D型にピペットで移すかまたはTeflonシートの上に薄く広げ、 $\leq 37^{\circ}\text{C}$ の温度でインキュベートしてゲル化を誘導する。

【図2】図2A～2Dは、音響ECMヒドロゲル、凍結乾燥ゲル、超薄ECMシートおよびECMパテの代表的な画像を示す。（A）音響ECMヒドロゲルは、円柱としてキャストされる。（B）凍結乾燥された音響ECMヒドロゲルは、それらの3D構成を維持する。（C）ECMゲルをTeflonシートの上でキャストすることによって調製される超薄音波ECMシート。（D）25mg/ml未満の濃度のECMの超音波処理によって調製されるECMパテ。

【図3】図3は、走査電子顕微鏡写真（SEM）を示す。超音波処理によって調製されたECMヒドロゲルは、織物状の線維性表面を示した。

【図4】図4A～4Bは、フロースイープを示す。定常状態フロースイープ試験を、音響ECMゲルの上で（A）25℃、（B）4から37℃および37から4℃で実行した。定常応力をゲルに加え、生じた変形を測定する。データは、ゲルの粘度がより多くの応力に伴って減少することを示し、剪断低粘稠化材料を暗示する。

【図5】図5A～5Bは、時間スイープ試験を示す。時間スイープ試験を、50mg/ml音響ECMゲルの上で（A）25℃、（B）4から37℃および37から4℃で実行して、最大 G' （貯蔵弾性率）および G'' （損失弾性率）値を決定した。データは、全ての温

10

20

30

40

50

度において貯蔵>損失弾性率であることを示す；すなわち、それはヒドロゲルの品質を維持する。

【図6A】図6A～6Cは、50mg/ml音響ECMヒドロゲルの貯蔵弾性率、損失弾性率および複素粘度の代表的グラフを示す。データは、小さい0.5%振動張力を加えることによって25℃(A)、4℃(B)、または37℃から4℃に速やかに下げた温度(C)で測定したlog-logスケールの角周波数の上にプロットした。データは、G'がG''より約1桁大きいことを示し、それはこの材料がヒドロゲルの判定基準を満たすことを示す。

【図6B】図6A～6Cは、50mg/ml音響ECMヒドロゲルの貯蔵弾性率、損失弾性率および複素粘度の代表的グラフを示す。データは、小さい0.5%振動張力を加えることによって25℃(A)、4℃(B)、または37℃から4℃に速やかに下げた温度(C)で測定したlog-logスケールの角周波数の上にプロットした。データは、G'がG''より約1桁大きいことを示し、それはこの材料がヒドロゲルの判定基準を満たすことを示す。

【図6C】図6A～6Cは、50mg/ml音響ECMヒドロゲルの貯蔵弾性率、損失弾性率および複素粘度の代表的グラフを示す。データは、小さい0.5%振動張力を加えることによって25℃(A)、4℃(B)、または37℃から4℃に速やかに下げた温度(C)で測定したlog-logスケールの角周波数の上にプロットした。データは、G'がG''より約1桁大きいことを示し、それはこの材料がヒドロゲルの判定基準を満たすことを示す。

【図7】図7は、フロースイープを示す。定常状態フロースイープ試験を、音響ECMゲルの上で15℃、25℃または37℃で3つの異なる濃度：25、100および150mg/mlについて実行した。データは、25～150mg/mlの間の濃度範囲および15～37℃の間の温度範囲で、ゲルの粘度が1でより多くの応力に伴って減少することを示し、剪断低粘稠化材料を暗示する。剪断低粘稠化は、フローの増加に伴って粘度が減少することを意味する（例えば、材料を針またはシリンジの末端のような開口部を通してより速く「押し出す」ほど、開口部を通して材料を通過させることが「より容易」であり、このことは臨床適用のために有利である）。

【図8】図8は、時間スイープ試験を示す。音響ヒドロゲルの最大G'（貯蔵弾性率）およびG''（損失弾性率）値を決定するために、15℃、25℃または37℃で3つの異なる濃度：25、100および150mg/mlで時間スイープ試験を実行した。データは、全ての温度において全ての濃度で貯蔵>損失弾性率であることを示す；すなわち、それはヒドロゲルの品質を維持する。

【図9A】図9A～9Bは、細胞適合性アッセイを示す。(A)3T3線維芽細胞を対照（コーティングなし）またはUBM、SISもしくは真皮から調製された音響ECMヒドロゲルでコーティングしたシャーレの上に播種し、24時間培養した。細胞の生存能力を評価するために使用したVYBRANT（登録商標）MTT細胞増殖アッセイキット（Thermo Fisher）。結果は、全てのECMが3T3線維芽細胞（n=3）に非細胞傷害性であったことを示す。(B)生/死アッセイ。ヒドロゲルでコーティングしたプレートをウマの間葉性幹細胞で播種し、組織培養プラスチックの上で生育する細胞と比較した。生存能力は、生/死アッセイキット（Invitrogen）で評価した。3つの技術的反復にわたって、5つの200×視野について画像をとった。細胞プロファイラーを使用して、パーセント生死細胞を定量化した。エラーバーは標準偏差を表す。

【図9B】図9A～9Bは、細胞適合性アッセイを示す。(A)3T3線維芽細胞を対照（コーティングなし）またはUBM、SISもしくは真皮から調製された音響ECMヒドロゲルでコーティングしたシャーレの上に播種し、24時間培養した。細胞の生存能力を評価するために使用したVYBRANT（登録商標）MTT細胞増殖アッセイキット（Thermo Fisher）。結果は、全てのECMが3T3線維芽細胞（n=3）に非細胞傷害性であったことを示す。(B)生/死アッセイ。ヒドロゲルでコーティングしたプレートをウマの間葉性幹細胞で播種し、組織培養プラスチックの上で生育する細胞と比

較した。生存能力は、生／死アッセイキット (Invitrogen) で評価した。3つの技術的反復にわたって、5つの200×視野について画像をとった。細胞プロファイラーを使用して、パーセント生死細胞を定量化した。エラーバーは標準偏差を表す。

【図10】図10は、音響方法によってヒドロゲルとして調製された止血性粉末AVITENE (商標) およびXENMATRIX (商標) ECMの凝固時間 (止血) を決定するために、リーホワイト凝固方法を使用したことを示す。XENMATRIX (商標) は、ブタ真皮から採取されたECM製品である。データは、未処置と比較して、AVITENE (商標) およびXENMATRIX (商標) ゲルが急速な止血を達成したことを示す。

【図11】図11は、ラット肝臓裂傷モデルを使用した凝固時間のin vivo評価を示す。ラットは肝臓裂傷を受けさせ、止血剤で処置した。SDラットを5つの実験群 (群につきn=5) に無作為割付けした: Aristapowder (BD/CR Bard)、AVITENE (商標) 粉末 (BD/CR Bard)、Micromatrix粉末 (Acell); 音響方法を使用してヒドロゲルとして調製された食道ECMの指示された濃度、音響方法を使用してヒドロゲルとして調製されたXenMatrix (BD/CR Bard) の指示された濃度。データは、音響方法を使用してヒドロゲルとして調製された哺乳動物ECMが、in vivoで止血を誘導することができることを示す。

【図12A】図12A~12Cは、20~100%に及ぶ振幅を使用して20kHzの周波数でECMを超音波処理することによって音響ヒドロゲルを調製することができることを示す。試料は全て50mg/mLであり、10分間超音波処理してから15℃で実験を実行した。(A) 指示された振幅で形成されたヒドロゲルの画像。(B) フロー粘度。流体力学的データは、試験した全ての振幅でゲルの粘度がより多くの応力で減少することを示し、剪断低粘稠化材料を暗示する。(C) 時間スweep。流体力学的データは、全ての振幅において全ての濃度で貯蔵>損失弾性率であることを示す; すなわち、それはヒドロゲルの品質を維持する。

【図12B】図12A~12Cは、20~100%に及ぶ振幅を使用して20kHzの周波数でECMを超音波処理することによって音響ヒドロゲルを調製することができることを示す。試料は全て50mg/mLであり、10分間超音波処理してから15℃で実験を実行した。(A) 指示された振幅で形成されたヒドロゲルの画像。(B) フロー粘度。流体力学的データは、試験した全ての振幅でゲルの粘度がより多くの応力で減少することを示し、剪断低粘稠化材料を暗示する。(C) 時間スweep。流体力学的データは、全ての振幅において全ての濃度で貯蔵>損失弾性率であることを示す; すなわち、それはヒドロゲルの品質を維持する。

【図12C】図12A~12Cは、20~100%に及ぶ振幅を使用して20kHzの周波数でECMを超音波処理することによって音響ヒドロゲルを調製することができることを示す。試料は全て50mg/mLであり、10分間超音波処理してから15℃で実験を実行した。(A) 指示された振幅で形成されたヒドロゲルの画像。(B) フロー粘度。流体力学的データは、試験した全ての振幅でゲルの粘度がより多くの応力で減少することを示し、剪断低粘稠化材料を暗示する。(C) 時間スweep。流体力学的データは、全ての振幅において全ての濃度で貯蔵>損失弾性率であることを示す; すなわち、それはヒドロゲルの品質を維持する。

【図13】図13は、UBM音響ヒドロゲルがM2様マクロファージ表現型を促進することを示す。マウス骨髄由来のマクロファージを2mg/mL UBM音響ヒドロゲルで24時間で処理し、固定し、炎症誘発性M1様マーカー (iNos、TNFα) またはリモデリング誘発M2様マーカー (izz1、アルギナーゼ) の強力な指標のために免疫標識し、DAPIで対比染色した。M1様表現型のための陽性対照としてIFNγおよびリポ多糖 (LPS) による細胞の処理を使用し、M2様表現型のための陽性対照としてIL-4を使用した。マクロファージのための陽性対照としてF4/80染色を使用した。細胞は、200×で画像化した。データは、対照と比較して、UBM音響ヒドロゲルがM2様マクロファージ表現型を促進したことを示す。

【図14】図14A~14Fは、粉碎されたECMの超音波処理および温度誘導ゲル化を

10

20

30

40

50

示す。(A) 50 ml 円錐管中の超音波処理チップ液浸深度の実証。(B、C) (B) の前および (C) 超音波処理の後の 1 X P B S 中の粉碎された真皮 E C M 粉末。(D) 25℃未満の温度でのインキュベーションの後、管の反転は、可溶化 E C M が強固なゲルに重合したことを示した。(E) 重合したゲルは、3 D 幾何構造に順応することができる。(F) 可溶化 E C M はシリンジに移し(上パネル)、次に 25℃未満の温度に冷やして、注射可能な形のゲル(下パネル)を与えることができる。

【図 15 A】図 15 A ~ 15 D は、コラーゲンおよび硫酸化グリコサミノグリカン (s G A G) の可溶化を示す。(A) 超音波処理振幅の関数としての可溶化コラーゲンの濃度。粉碎された d E C M は、指示された振幅で 300 秒間超音波処理した。S I R C O L (商標) アッセイを使用して測定した可溶化コラーゲンの濃度。データは、1 群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm$ s . d . として提示される。* は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(B) 超音波処理振幅の関数としての s G A G の濃度。粉碎された d E C M は、指示された振幅で 300 秒間超音波処理した。B L Y S C A N (商標) アッセイを使用して測定した可溶化 s G A G の濃度。データは、1 群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm$ s . d . として提示される。(C) 超音波処理時間の関数としての可溶化コラーゲンの濃度。粉碎された d E C M は、指示された時間、100% 振幅で超音波処理した。S I R C O L (商標) アッセイを使用して測定した可溶化コラーゲンの濃度。データは、1 群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm$ s . d . として提示される。* は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(D) 超音波処理時間の関数としての可溶化 s G A G の濃度。粉碎された d E C M は、指示された時間、100% 振幅で超音波処理した。B L Y S C A N (商標) アッセイを使用して、可溶化 s G A G の濃度を測定した。データは、1 群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm$ s . d . として提示される。

【図 15 B】図 15 A ~ 15 D は、コラーゲンおよび硫酸化グリコサミノグリカン (s G A G) の可溶化を示す。(A) 超音波処理振幅の関数としての可溶化コラーゲンの濃度。粉碎された d E C M は、指示された振幅で 300 秒間超音波処理した。S I R C O L (商標) アッセイを使用して測定した可溶化コラーゲンの濃度。データは、1 群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm$ s . d . として提示される。* は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(B) 超音波処理振幅の関数としての s G A G の濃度。粉碎された d E C M は、指示された振幅で 300 秒間超音波処理した。B L Y S C A N (商標) アッセイを使用して測定した可溶化 s G A G の濃度。データは、1 群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm$ s . d . として提示される。(C) 超音波処理時間の関数としての可溶化コラーゲンの濃度。粉碎された d E C M は、指示された時間、100% 振幅で超音波処理した。S I R C O L (商標) アッセイを使用して測定した可溶化コラーゲンの濃度。データは、1 群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm$ s . d . として提示される。* は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(D) 超音波処理時間の関数としての可溶化 s G A G の濃度。粉碎された d E C M は、指示された時間、100% 振幅で超音波処理した。B L Y S C A N (商標) アッセイを使用して、可溶化 s G A G の濃度を測定した。データは、1 群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm$ s . d . として提示される。

【図 15 C】図 15 A ~ 15 D は、コラーゲンおよび硫酸化グリコサミノグリカン (s G A G) の可溶化を示す。(A) 超音波処理振幅の関数としての可溶化コラーゲンの濃度。粉碎された d E C M は、指示された振幅で 300 秒間超音波処理した。S I R C O L (商標) アッセイを使用して測定した可溶化コラーゲンの濃度。データは、1 群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm$ s . d . として提示される。* は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(B) 超音波処理振幅の関数としての s G A G の濃度。粉碎された d E C M は、指示された振幅で 300 秒間超音波処理した。B L Y S C A N (商標) アッセイを使用して測定した可溶化 s G A G の濃度。データは、1 群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm$ s . d . として提示される。(C) 超音波処理時間の関数としての可溶化コラーゲンの濃度。粉碎された d E C M は、指示された時間、100% 振幅で超音波処理した。S I R C O L (商標) アッセイを使用して測定した可溶化コラーゲンの濃度。データは、1 群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm$ s . d . として提示される。* は、 $p < 0.05$ を表す。上付き

文字は、ペアの比較を指定する。(D)超音波処理時間の関数としての可溶化 s G A G の濃度。粉碎された d E C M は、指示された時間、100%振幅で超音波処理した。B L Y S C A N (商標)アッセイを使用して、可溶化 s G A G の濃度を測定した。データは、1群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm s.d.$ として提示される。

【図15D】図15A~15Dは、コラーゲンおよび硫酸化グリコサミノグリカン (s G A G) の可溶化を示す。(A)超音波処理振幅の関数としての可溶化コラーゲンの濃度。粉碎された d E C M は、指示された振幅で300秒間超音波処理した。S I R C O L (商標)アッセイを使用して測定した可溶化コラーゲンの濃度。データは、1群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm s.d.$ として提示される。*は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(B)超音波処理振幅の関数としての s G A G の濃度。粉碎された d E C M は、指示された振幅で300秒間超音波処理した。B L Y S C A N (商標)アッセイを使用して測定した可溶化 s G A G の濃度。データは、1群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm s.d.$ として提示される。(C)超音波処理時間の関数としての可溶化コラーゲンの濃度。粉碎された d E C M は、指示された時間、100%振幅で超音波処理した。S I R C O L (商標)アッセイを使用して測定した可溶化コラーゲンの濃度。データは、1群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm s.d.$ として提示される。*は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(D)超音波処理時間の関数としての可溶化 s G A G の濃度。粉碎された d E C M は、指示された時間、100%振幅で超音波処理した。B L Y S C A N (商標)アッセイを使用して、可溶化 s G A G の濃度を測定した。データは、1群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm s.d.$ として提示される。

【図16A】図16A~16Cは、超音波キャビテーションを使用して調製された E C M ヒドロゲルのゲル化時間に及ぼす、温度および超音波処理振幅の影響を示す。(A)ゲル化時間に及ぼす温度の影響。25、50および100mg/ml d E C M を100%振幅で300秒間超音波処理し、次にゲル化を誘導するために指示された温度でインキュベートした。データは、1群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm s.d.$ として提示される。*は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(B)ゲル化時間に及ぼす超音波処理振幅の影響。25、50および100の d E C M を指示された振幅で300秒間超音波処理し、次にゲル化を誘導するために4℃でインキュベートした。データは、1群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm s.d.$ として提示される。*は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(C) U B M、S I S、e E C M、t E C M または L E C M のゲル化時間に及ぼす温度の影響を評価するゲル化アッセイ。100mg/ml濃度の指示された組織 E C M を100%振幅で300秒間超音波処理し、次にゲル化を誘導するために4℃または25℃でインキュベートした。データは、1群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm s.d.$ として提示される。*は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。

【図16B】図16A~16Cは、超音波キャビテーションを使用して調製された E C M ヒドロゲルのゲル化時間に及ぼす、温度および超音波処理振幅の影響を示す。(A)ゲル化時間に及ぼす温度の影響。25、50および100mg/ml d E C M を100%振幅で300秒間超音波処理し、次にゲル化を誘導するために指示された温度でインキュベートした。データは、1群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm s.d.$ として提示される。*は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(B)ゲル化時間に及ぼす超音波処理振幅の影響。25、50および100の d E C M を指示された振幅で300秒間超音波処理し、次にゲル化を誘導するために4℃でインキュベートした。データは、1群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm s.d.$ として提示される。*は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(C) U B M、S I S、e E C M、t E C M または L E C M のゲル化時間に及ぼす温度の影響を評価するゲル化アッセイ。100mg/ml濃度の指示された組織 E C M を100%振幅で300秒間超音波処理し、次にゲル化を誘導するために4℃または25℃でインキュベートした。データは、1群あたり $n = 3$ 試料の平均 $\pm s.d.$ として提示される。*は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。

【図16C】図16A～16Cは、超音波キャビテーションを使用して調製されたECMヒドロゲルのゲル化時間に及ぼす、温度および超音波処理振幅の影響を示す。(A)ゲル化時間に及ぼす温度の影響。25、50および100mg/ml dECMを100%振幅で300秒間超音波処理し、次にゲル化を誘導するために指示された温度でインキュベートした。データは、1群あたりn=3試料の平均±s.d.として提示される。*は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(B)ゲル化時間に及ぼす超音波処理振幅の影響。25、50および100のdECMを指示された振幅で300秒間超音波処理し、次にゲル化を誘導するために4℃でインキュベートした。データは、1群あたりn=3試料の平均±s.d.として提示される。*は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。(C)UBM、SIS、eECM、tECMまたはLECMのゲル化時間に及ぼす温度の影響を評価するゲル化アッセイ。100mg/ml濃度の指示された組織ECMを100%振幅で300秒間超音波処理し、次にゲル化を誘導するために4℃または25℃でインキュベートした。データは、1群あたりn=3試料の平均±s.d.として提示される。*は、 $p < 0.05$ を表す。上付き文字は、ペアの比較を指定する。

10

【図17A】図17A～17Cは、超音波キャビテーションを使用して調製されたECMヒドロゲルの粘弾性特徴付けを示す。(A)dECMおよびeECMのための3つの温度プロファイルにおけるECMヒドロゲルゲル化カイネティクスの代表的グラフ。温度が速やかに低下した場合(37→4℃)、貯蔵弾性率(G')はS字状に増加した。温度が速やかに増加した場合(4→37℃および25→37℃)、ヒドロゲル剛性(G'')は維持された。(B)3つの温度プロファイルにおける平均貯蔵弾性率(n=3、平均±SD)。(C)S字状の温度プロファイル37→4℃のための50%ゲル化までの平均時間(n=3、平均±SD)。* $p \leq 0.05$ 、** $p \leq 0.01$ 。

20

【図17B】図17A～17Cは、超音波キャビテーションを使用して調製されたECMヒドロゲルの粘弾性特徴付けを示す。(A)dECMおよびeECMのための3つの温度プロファイルにおけるECMヒドロゲルゲル化カイネティクスの代表的グラフ。温度が速やかに低下した場合(37→4℃)、貯蔵弾性率(G')はS字状に増加した。温度が速やかに増加した場合(4→37℃および25→37℃)、ヒドロゲル剛性(G'')は維持された。(B)3つの温度プロファイルにおける平均貯蔵弾性率(n=3、平均±SD)。(C)S字状の温度プロファイル37→4℃のための50%ゲル化までの平均時間(n=3、平均±SD)。* $p \leq 0.05$ 、** $p \leq 0.01$ 。

30

【図17C】図17A～17Cは、超音波キャビテーションを使用して調製されたECMヒドロゲルの粘弾性特徴付けを示す。(A)dECMおよびeECMのための3つの温度プロファイルにおけるECMヒドロゲルゲル化カイネティクスの代表的グラフ。温度が速やかに低下した場合(37→4℃)、貯蔵弾性率(G')はS字状に増加した。温度が速やかに増加した場合(4→37℃および25→37℃)、ヒドロゲル剛性(G'')は維持された。(B)3つの温度プロファイルにおける平均貯蔵弾性率(n=3、平均±SD)。(C)S字状の温度プロファイル37→4℃のための50%ゲル化までの平均時間(n=3、平均±SD)。* $p \leq 0.05$ 、** $p \leq 0.01$ 。

40

【図18A-C】図18A～18Eは、in vitro細胞応答を示す。(A)3T3線維芽細胞を対照(コーティングなし)またはUBM、SISもしくは真皮から調製されたECMヒドロゲルでコーティングしたシャーレの上に播種し、24時間培養した。細胞の代謝活性は、VYBRANT(登録商標)MTT細胞増殖アッセイキットを使用して評価した。データは、1群あたりn=3試料の平均±s.d.として提示される。(B、C)生/死アッセイ。一次ウマ間葉性幹細胞を、対照(コーティングなし)またはdECMもしくはUBMから調製されたECMヒドロゲルでコーティングしたシャーレの上に播種した。生存能力は、生/死アッセイキットを使用して評価した。細胞は200×で画像化し(B)、細胞プロファイラーを使用してパーセント生死細胞を定量化した(C)。データは、1群あたりn=3試料の平均±s.d.として提示される。(D)マウス骨髄由来のマクロファージは未処理(対照)であるか以下の試験品で24時間処理した：IFN γ

50

+ L P S、I L - 4、d E C M ヒドロゲルまたは e E C M ヒドロゲル。細胞は、F 4 / 8 0 (マクロファージマーカー)、i N O S (M 1 様マーカー) または F i z z 1 (M 2 様マーカー) で免疫標識した。細胞は、2 0 0 × で画像化した。(E) F 4 / 8 0、i N O S および F i z z 1 免疫標識の定量化。データは、1 群あたり n = 3 の平均 ± s . d . として提示される。

【図 1 8 D】図 1 8 A ~ 1 8 E は、i n v i t r o 細胞応答を示す。(A) 3 T 3 線維芽細胞を対照 (コーティングなし) または U B M、S I S もしくは真皮から調製された E C M ヒドロゲルでコーティングしたシャーレの上に播種し、2 4 時間培養した。細胞の代謝活性は、V Y B R A N T (登録商標) M T T 細胞増殖アッセイキットを使用して評価した。データは、1 群あたり n = 3 試料の平均 ± s . d . として提示される。(B、C) 生 / 死アッセイ。一次ウマ間葉性幹細胞を、対照 (コーティングなし) または d E C M もしくは U B M から調製された E C M ヒドロゲルでコーティングしたシャーレの上に播種した。生存能力は、生 / 死アッセイキットを使用して評価した。細胞は 2 0 0 × で画像化した (B)、細胞プロファイラーを使用してパーセント生死細胞を定量化した (C)。データは、1 群あたり n = 3 試料の平均 ± s . d . として提示される。(D) マウス骨髄由来のマクロファージは未処理 (対照) であるか以下の試験品で 2 4 時間処理した: I F N γ + L P S、I L - 4、d E C M ヒドロゲルまたは e E C M ヒドロゲル。細胞は、F 4 / 8 0 (マクロファージマーカー)、i N O S (M 1 様マーカー) または F i z z 1 (M 2 様マーカー) で免疫標識した。細胞は、2 0 0 × で画像化した。(E) F 4 / 8 0、i N O S および F i z z 1 免疫標識の定量化。データは、1 群あたり n = 3 の平均 ± s . d . として提示される。

【図 1 8 E】図 1 8 A ~ 1 8 E は、i n v i t r o 細胞応答を示す。(A) 3 T 3 線維芽細胞を対照 (コーティングなし) または U B M、S I S もしくは真皮から調製された E C M ヒドロゲルでコーティングしたシャーレの上に播種し、2 4 時間培養した。細胞の代謝活性は、V Y B R A N T (登録商標) M T T 細胞増殖アッセイキットを使用して評価した。データは、1 群あたり n = 3 試料の平均 ± s . d . として提示される。(B、C) 生 / 死アッセイ。一次ウマ間葉性幹細胞を、対照 (コーティングなし) または d E C M もしくは U B M から調製された E C M ヒドロゲルでコーティングしたシャーレの上に播種した。生存能力は、生 / 死アッセイキットを使用して評価した。細胞は 2 0 0 × で画像化した (B)、細胞プロファイラーを使用してパーセント生死細胞を定量化した (C)。データは、1 群あたり n = 3 試料の平均 ± s . d . として提示される。(D) マウス骨髄由来のマクロファージは未処理 (対照) であるか以下の試験品で 2 4 時間処理した: I F N γ + L P S、I L - 4、d E C M ヒドロゲルまたは e E C M ヒドロゲル。細胞は、F 4 / 8 0 (マクロファージマーカー)、i N O S (M 1 様マーカー) または F i z z 1 (M 2 様マーカー) で免疫標識した。細胞は、2 0 0 × で画像化した。(E) F 4 / 8 0、i N O S および F i z z 1 免疫標識の定量化。データは、1 群あたり n = 3 の平均 ± s . d . として提示される。

【図 1 9】図 1 9 A ~ 1 9 C は、粘膜下流体クッションとしての音響ヒドロゲルを示す。

(A) 音響細胞外マトリックス (E C M) ヒドロゲル (1 0 0 m g / m L) は、真皮 E C M (d E C M) および食道粘膜 E C M (e E C M) から調製し、粘膜下流体クッションとして e x v i v o で使用した。音響 E C M ヒドロゲル流体クッションの高さに及ぼす 2 0 k G y ガンマ線照射 (γ) の影響を評価した。臨床標準の E l e v i e w および P B S を、対照のために使用した。流体クッションの高さは、ブタ食道への 2 m L の試験品の注射の後に経時的に測定した。値は、平均 ± S D (n = 3) で表す。(B) 音響ヒドロゲル試料は、1 6 G シリンジによって注射可能である。(C) 7 5 分後の試験品流体クッションの高さの代表的写真。

【図 2 0 A】図 2 0 A ~ 2 0 B は、音響ヒドロゲルゲル化を示す。経時的なヒドロゲル「剛性」は、ガンマ線照射 (2 0 k G y) および非滅菌対照音響ヒドロゲル (真皮 E C M 1 0 0 m g / m L) について測定した。貯蔵弾性率 (「剛性」) (G ') および損失弾性率 (G ' ') は、小さい 0 . 5 % 振動張力を試料に加えることによって測定した。3 つの温

度プロファイルを試験した：温度は、初期の保存温度から最終温度まで速やかに上昇させた：4から37℃、25から37℃または37から4℃。（A）時間スweepの代表的グラフを示す（B）。試験の最終5分間で平均した平均貯蔵および損失弾性率を示す。

【図20B】図20A～20Bは、音響ヒドロゲルゲル化を示す。経時的なヒドロゲル「剛性」は、ガンマ線照射（20kGy）および非滅菌対照音響ヒドロゲル（真皮ECM 100mg/mL）について測定した。貯蔵弾性率（「剛性」）（ G' ）および損失弾性率（ G'' ）は、小さい0.5%振動張力を試料に加えることによって測定した。3つの温度プロファイルを試験した：温度は、初期の保存温度から最終温度まで速やかに上昇させた：4から37℃、25から37℃または37から4℃。（A）時間スweepの代表的グラフを示す（B）。試験の最終5分間で平均した平均貯蔵および損失弾性率を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0009】

いくつかの実施形態の詳細な説明

様々な組織の修復および再構築を促進するために、ECMヒドロゲルは3Dオルガノイド培養のための基質として、ならびに多数の前臨床および臨床適用で使用されている。以前には、ECMヒドロゲル材料は酸性溶液中の酸性プロテアーゼによるECMの酵素的消化に重点を置いた手間がかかる方法を使用して；または、天然のタンパク質構造および機能に影響することができるカオトロピック抽出緩衝液および透析施術の使用によって製作された。本明細書において、超音波キャビテーションを使用してECM生体骨格からヒドロゲルを調製する方法が開示される。温度を調整することによって可溶化ECMをゲルに速やかに自己集合するように誘導することができ、ゲルの材料特性はECM濃度および超音波処理パラメータを調整することによって変更することができる。ECM生体骨格は酵素的消化なしで超音波を使用して首尾よく可溶化することができ、細胞増殖を支えることが可能なゲルの形に再重合するように誘導することができる。これらのヒドロゲルは多数の適用で使うことができ、ガンマ線照射で最後に滅菌することができる。

20

【0010】

開示されるECMヒドロゲルを生成するために、超音波処理技術は、真皮、膀胱マトリックス（UBM）および小腸粘膜下組織（SIS）を限定されずに含む多くの組織特異的ECMに適用することができる。それは、市販されているECM製剤と使用することもできる。一部の実施形態では、このアプローチは液体、例えば緩衝液、例えば中性緩衝食塩水溶液での粉碎されたECMの再懸濁と、続く超音波を使用したECM可溶化とを含む。一部の実施形態では、緩衝食塩水溶液は、約290mOsm/Lのモル浸透圧濃度を有する。様々な濃度を使用することができ、ECMは少なくとも60秒間超音波処理することができる。ECM溶液の温度を下げることによってECM溶液の急速ゲル化を誘導することができる。ECM濃度、超音波処理の振幅および時間を調整することによって、ゲル化時間およびECMゲル特性を調整することができる。一部の実施形態では、音響ECMヒドロゲルは、外因性ペプシン、トリプシンもしくはヒアルロニダーゼまたは外因性ペプシン、トリプシンもしくはヒアルロニダーゼの不活性形などの、外因性プロテアーゼも不活性化外因性プロテアーゼも含有しない。

30

【0011】

重合すると、これらのECMヒドロゲルは室温で安定し、カスタマイズ可能な3D幾何構造に順応することができる。超音波処理によって生成されるECMヒドロゲル（「音響ECMヒドロゲル」）は、全体的3D幾何構造を維持して空隙率を増加させる凍結および凍結乾燥手順によって固形骨格に加工することができる。この技術は、*in vitro*および*in vivo*適用のために細胞または化合物の組込みを支えることができる。限定されずに例えば止血を増加させるために、開示される音響ECMヒドロゲルを使用する方法も開示される。

40

【0012】

ECMヒドロゲルの大規模製造において、比較的小さい進歩があった（上記、Brown et al., 2012）。開示される方法は、いくつかの態様での大規模製造のために有用であ

50

る。一部の実施形態では、ECMヒドロゲルの濃度範囲は、超音波キャビテーション方法を使用して2～20mg/ml（酵素的方法の限界）から25～100mg/mlに拡張することができ、これは特異的臨床適用のためのECMヒドロゲルの粘弾特性の微調整を可能にする。他の実施形態では、加工時間は48～72時間から分のオーダーへ激減される。さらなる実施形態では、ECMヒドロゲルはカスタマイズ可能な3D幾何構造に順応することができ、*in vitro*および*in vivo*適用のために細胞または治療薬の組み込みを支えることができる。

【0013】

用語

特に明記しない限り、専門用語は従来の用法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は、Jones & Bartlett Publishersによって出版されたKrebs et al (Eds.), Lewin's Genes XII, 2017；およびWiley-VCHによって出版された16巻のMeyers et al. (eds.), The Encyclopedia of Cell Biology and Molecular Medicine, 2008；および他の類似の参考文献に見出すことができる。

10

【0014】

この開示の様々な実施形態のレビューを容易にするために、具体的な用語の以下の説明が提供される：

【0015】

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でペプチド結合を切断する活性が増加している。例えば、限定されずに、酸性プロテアーゼはペプシンおよびトリプシンを含むことができる。

20

【0016】

抗生物質：細菌、真菌または任意の他の微生物を殺すかまたはその増殖速度をかなり遅くする化合物または物質。「抗細菌剤」は、細菌を殺すかまたはその増殖速度をかなり遅くする化合物または物質である。

【0017】

抗細菌性抗生物質は、それらの作用機構、化学構造または活性スペクトルに基づいて一般的に分類される。ほとんどは細菌の機能または増殖過程を標的にする。細菌細胞壁（例えば、ペニシリンおよびセファロsporin）もしくは細胞膜（例えば、ポリミキシン）を標的にするか、または必須の細菌酵素を妨害する（例えば、キノロンおよびスルホンアミド）ものは、殺細菌性である。タンパク質合成を標的にするもの（例えば、アミノグリコシド、マクロライドおよびテトラサイクリン）は、一般的に静菌性である。さらなる分類は、それらの標的特異性に基づく。

30

【0018】

「狭スペクトル」抗細菌性抗生物質は、特異的タイプの細菌、例えばグラム陰性またはグラム陽性細菌を標的にする。「広域スペクトル抗生物質」は、いくつかの異なるタイプの細菌に影響する。抗細菌性剤には、環状リポペプチド（例えば、ダプトマイシン）、グリシルサイクリン（例えば、チゲサイクリン）およびオキサゾリジノン（例えば、リネゾリド）も含まれる。

【0019】

局所用抗生物質は、皮膚または目などの体表面に付与される抗生物質である。局所用抗生物質は、軟膏またはクリームにしばしば製剤化され、活性薬剤、例えば、マクロライド抗生物質（エリスロマイシンなど）、サルファ抗生物質（サルファセタミドなど）、環式ペプチド（バシトラシン、ポリミキシンなど）、プソイドモニン酸（ムピロシンなど）、アミノグリコシド（ネオマイシンなど）もしくはキノロン（シプロフロキサシンまたはオフロキサシンなど）、ニトロイミダゾール（メトロニダゾール（metronidazole）など）、または薬物の組合せ（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／バシトラシンなど）を含有する。

40

【0020】

生体適合性：哺乳動物対象に植え込まれたときに対象で有害な応答を引き起こさない任意

50

の材料。個体に導入したとき、生体適合材料はその目的の機能を発揮することができ、その個体に毒性でも有害でもなく、対象において材料の免疫学的拒絶も誘導しない。

【0021】

生体骨格：生体適合性である骨格、通常固形支持体またはゲル。生体骨格は、天然に存在する材料で構成される。「生合成骨格」は、天然に存在しないおよび天然に存在する材料で構成される。

【0022】

遠心分離：遠心分離力が混合物に加えられ、それによって混合物のより高密度の構成要素が混合物中の他のより低密度の構成要素と比較して遠心分離機の軸から離れて移動するプロセス。混合物に加えられる力は、遠心分離機ローターの速度および回転半径の関数である。ほとんどの適用では、回転の力は、遠心分離機の底に集積する沈殿物（ペレット）をもたらす、ここで、残りの溶液は「上清」または「上澄み」と正確に呼ばれる。他の類似の適用では、所望の構成要素より高密度および低密度の両方の構成要素を含有する混合物から特定の種を単離するために、密度に基づく分離または「密度勾配遠心分離」技術が使用される。

【0023】

遠心分離機ローターの環状動作の間、加えられる力は回転の半径および角速度の積であり、ここで力は、地球表面の重力による標準加速度「g」と比較した加速度で伝統的に表される。加えられる遠心分離力は「相対遠心分離力」（RCF）と呼ばれ、「g」の倍数で表される。

【0024】

粉碎する（粉碎および粉碎すること）：限定されずに磨砕、ブレンディング、破碎、スライミング、微粉碎、切断、破碎によることを含む、より大きな粒子をより小さい粒子に低減するプロセス。ECMは、水和形、凍結、空気乾燥、凍結乾燥、粉末、シート形を限定されずに含む任意の形の間に粉碎することができる。

【0025】

接触させること：固体または液体形であってよい、直接的な物理的関連への配置。

【0026】

サイトカイン：用語「サイトカイン」は、ナノからピコモルの濃度で体液性の調節因子として作用し、正常または病理学的な条件の下で個々の細胞および組織の機能的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一般名として使用される。これらのタンパク質は、さらに細胞間の相互作用を直接的に媒介し、細胞外環境で起こる過程を調節する。サイトカインの例には、限定されずに腫瘍壊死因子- 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増殖因子およびインターフェロン- γ が含まれる。

【0027】

診断：その徴候、症状および様々な検査の結果によって疾患を同定するプロセス。そのプロセスを通して到達する結論は、「診断」とも呼ばれる。一般的に実行される試験の形態には、血液検査、医学的画像化および生検が含まれる。

【0028】

細胞外マトリックス（ECM）：細胞増殖のための天然の無細胞骨格。天然のECM（限定されずに哺乳動物およびヒトなどの多細胞生物体で見出されるECM）は、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、抗微生物物質、化学誘引物質、サイトカインおよび増殖因子を限定されずに含む、構造的および非構造的な生体分子の複雑な混合物である。哺乳動物では、ECMは約90%のコラーゲンをその様々な形でしばしば含む。ECMの組成および構造は、組織の供与源によって異なる。例えば、小腸粘膜下組織（SIS）、膀胱マトリックス（UBM）、食道（E）および肝臓間質ECMは、各組織に必要な特異な細胞ニッチのために、それらの全体的構造および組成が各々異なる。無傷の「細胞外マトリックス」および「無傷のECM」は、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、抗微生物物質、化学誘

10

20

30

40

50

引物質、サイトカインおよび増殖因子を限定されずに含む、そ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である。

【0029】

ECMの中の生体分子の構造および／または活性は、化学的または機械的に、例えば架橋によっておよび／またはECMを透析することによって変更することまたは取り除くことができる。無傷のECMは、本質的に酵素的に消化されず、架橋されず、および／または透析されておらず、それは、ECMが消化、透析および／もしくは架橋過程に、または可溶化の前のECMの保存および取扱いの間に天然に起こる過程以外の条件にさらされていなかったことを意味する。したがって、実質的に架橋および／または透析されている（本明細書に記載されるその使用においてECMのゲル化および機能的特徴に実質的に影響しない取るに足らない様式以外の、任意の様式で架橋および／または透析されている）ECMは、「無傷である」とみなされない。「無細胞」は、ECMが残るように細胞を除去するように処理された供与源組織から生成されるECMを指す。ECMヒドロゲルを生成するために、非細胞化組織が使用される。

10

【0030】

ゲル：液体と固体の間の物体の状態であり、液体媒体の中で膨潤した架橋ポリマーネットワークと一般的に規定される。一般的に、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液であり、固体の量は「ゾル」と呼ばれる二相コロイド分散液のそれより多い。このように、「ゲル」は、液体の特性のいくつか（すなわち、形状は弾力的で変形可能である）および固体の特性のいくつか（例えば、形状は、二次元表面上で三次元を維持するのに十分はっきりしている（discrete））を有する。「ゲル時間」とも呼ばれる「ゲル化時間」は、組成物が穏やかな応力の下で非流動性になるのにかかる時間を指す。

20

【0031】

ゲル化：ゾルからのゲルの形成。

【0032】

止血：出血の阻止または停止させること。

【0033】

ヒドロゲル：水が分散媒体であるコロイド状ゲルとして時には見出される、親水性のポリマー鎖のネットワーク。ヒドロゲルは、高度に吸収性の天然または合成のポリマーネットワークである。ヒドロゲルは、天然の組織に類似した程度の柔軟性も有する。音響ECMヒドロゲルなどの「音響」ヒドロゲルは、超音波エネルギーを使用して生成される。これらのヒドロゲルの特徴は、本明細書で開示される。ヒドロゲルの場合、 G' （貯蔵弾性率）は、 G'' （損失弾性率）より一般的に約1桁大きい。

30

【0034】

単離された：「単離された」生体構成要素（細胞外マトリックスなど）は、他の生体構成要素、構成要素が天然に存在する細胞または生物体、すなわち生細胞、他の染色体および染色体外のDNAおよびRNA、ならびにタンパク質から実質的に分離されたか、分けて生成されたかまたは精製されている。したがって、「単離された」核酸、ペプチドおよびタンパク質には、標準の精製方法によって精製される核酸およびタンパク質が含まれる。この用語は、宿主細胞での組換え発現によって調製される核酸、ペプチドおよびタンパク質、ならびに化学合成される核酸も包含する。単離されたECMは、ECMを生成する細胞から分離されている。

40

【0035】

等張性緩衝溶液：pH 7.2～7.8の間に緩衝され、等張性の環境を促進するために塩の平衡濃度を有する溶液。

【0036】

マクロファージ：細胞細片、異物、微生物およびがん細胞を食菌して分解するタイプの白血球。食作用におけるそれらの役割に加えて、これらの細胞は、発達、組織維持および修復において、ならびにそれらがリンパ球などの免疫細胞を含む他の細胞を動員して影響を及ぼす点で、先天性および適応性の免疫の両方において重要な役割を演ずる。マクロファ

50

ージは、「M1様」および「M2様」とも呼ばれるM1およびM2と呼ばれている表現型を含む多くの表現型に存在することができる。主に炎症誘発機能を発揮するマクロファージは、M1マクロファージ(CD86+/CD68+)と呼ばれ、炎症を減少させて、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特定するマーカーは、種の間で異なる。マクロファージ表現型は、M1およびM2の両端の間の範囲のスペクトルによって表されることに注意すべきである。

【0037】

哺乳動物：この用語は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方を含む。同様に、用語「対象」は、ヒトおよび獣医学的対象の両方を含む。

10

【0038】

疾患を予防または処置すること：疾患を「予防すること」は、例えば、がんなどの疾患の素因を有することが知られている人で疾患の部分的または完全な発達を阻止することを指す。既知の素因をもつ人の例は、家族に乳がんの病歴をもつ者であるか、または対象を黒色腫などの状態の素因に曝露させる因子にさらされた者である。「処置」は、疾患または病的状態の、それが発達し始めた後の徴候または症状を改善する治療的介入を指す。いくつかの実施形態では、処置は腫瘍のサイズの低減、転移の数および／もしくはサイズの低下、または腫瘍の症状の軽減を指す。

【0039】

治療剤：一般的な意味で使用される場合、それは処置薬剤、予防的薬剤および置換薬剤を含む。「処置」または「処置すること」は、音響ECMヒドロゲルなどの物質を、例えば止血を増加させるために生体パラメータにはっきりと影響するのに十分な量で患者に提供することを意味する。

20

【0040】

治療的有効量：音響ECMヒドロゲルなどの組成物の「治療的有効量」は、患者に投与されるとき、治療的有益性、例えば症状の改善、疾患進行の低減を提供するのに、または疾患退行を引き起こすのに有効な量を意味する。音響ECMヒドロゲルの量は、処置される対象において所望の効果を達成するのに十分である。治療的有効量は全身に、または局所的に、例えば創傷に投与することができる。さらに、音響ECMヒドロゲルの有効量は単一の用量で、または経時的に数回の用量で投与することができる。しかし、有効量は付与される製剤、処置対象、病気の重症度およびタイプならびに化合物の投与様式に依存する。本明細書に開示される方法で有用な音響ECMヒドロゲルは、医学および獣医学の場面で等しい適用を有する。したがって、一般用語「対象」または「患者」は、ヒトまたは獣医学的対象、例えば他の霊長類、イヌ、ネコ、ウマおよびウシを限定されずに含む全ての動物を含むことが理解される。

30

【0041】

熱可逆的ヒドロゲル：ポリマー鎖の絡合いにより形成されるヒドロゲルであって、粘度はゲル化の特徴的な温度で変化する。開示された音響ECMヒドロゲルは、冷却によりゲル化（ゾルからゲルへの転移）を示す熱可逆的ヒドロゲルである。

【0042】

局所付与：局所付与の薬剤は特異的領域だけに付与され、体全体には付与されない。特定の例では、組成物は止血が所望される領域の皮膚または目に付与される。例えば、医薬組成物は、局所製剤の形で創傷に、例えば上皮の創傷または欠陥、例えば外傷性または外科創傷、例えば皮膚もしくは角膜の擦過傷または外科切開に付与することができる。

40

【0043】

超音波処理：20kHzより高い周波数の超音波を曝露させるプロセス。

【0044】

特に説明されない限り、本明細書で使用される全ての専門用語および科学用語は、この開示が属する分野の当業者が通常理解するのと同じ意味を有する。単数用語「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに別途指示しない限り、複数形を含む。同様に、単

50

語「または」は、文脈が明らかに別に指示しない限り、「および」を含むものである。核酸またはポリペプチドのために与えられる全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および全ての分子量または分子質量値は概算であり、記載のために提供されることをさらに理解するべきである。「約」は、掲載値から5%以内を示す。本明細書に記載されるものに類似するか同等である方法および材料は、本開示の実施または試験で 사용할ことができるが、適する方法および材料が以下に記載される。用語「含む (comprises)」は、「含む (includes)」を意味する。本明細書で指摘される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、参照により完全に組み込まれる。相反する場合には、用語の定義を含めた本明細書が優先される。さらに、材料、方法および例は例示されるだけであり、限定するものではない。

10

【0045】

細胞外マトリックス (ECM)

ヒドロゲルを生成するために、任意のタイプの細胞外マトリックス組織を使用することができる (ECMに関連した米国特許第4,902,508号; 4,956,178号; 5,281,422号; 5,352,463号; 5,372,821号; 5,554,389号; 5,573,784号; 5,645,860号; 5,771,969号; 5,753,267号; 5,762,966号; 5,866,414号; 6,099,567号; 6,485,723号; 6,576,265号; 6,579,538号; 6,696,270号; 6,783,776号; 6,793,939号; 6,849,273号; 6,852,339号; 6,861,074号; 6,887,495号; 6,890,562号; 6,890,563号; 6,890,564号; および6,893,666号を参照)。ある特定の実施形態では、ECMは、脊椎動物から、例えば、限定されずに、ヒト、サル、ウマ、ブタ、ウシおよびヒツジを限定されずに含む温血哺乳動物の脊椎動物から単離される。具体的な非限定的な例では、ECMはブタまたはヒトである。

20

【0046】

ECMは、膀胱、腸 (小腸または大腸など)、心臓、腎臓、子宮、脳、血管、肺、骨筋、脾臓、胃、脾臓脂肪組織、肝臓、食道および真皮を限定されずに含む任意の臓器または組織に由来することができる。ECMは、細胞培養から得ることができる。一実施形態では、ECMは膀胱から単離される。別の実施形態では、ECMは食道に由来する。別の実施形態では、ECMは真皮に由来する。ECMは、ECMの基底膜部分を含んでも含まなくてもよい。ある特定の実施形態では、ECMは基底膜の少なくとも一部を含む。ECMを生成するために、例えば、供与源組織または臓器から細胞および細胞物質を除去するために、組織を非細胞化することができる。ECMを、例えば本明細書に開示されるヒドロゲルの構成要素として対象に植え込む場合など、免疫応答を阻止するために非細胞化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などの細胞物質の除去は、そのような免疫応答を阻止する。

30

【0047】

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) は、膀胱ECMの調製を開示し、例えば、ブタ膀胱ECMは、メス取手および濡れたガーゼによる縦方向のワイピング動作を使用して漿膜層および筋層の両方を含む外部の層を除去するために、膀胱組織を擦過することによって調製される。組織セグメントの外転の後、粘膜の内腔部分を、同じワイピング動作を使用して下にある組織から離層させる。一部の実施形態では、粘膜下組織の穿孔は、阻止される。これらの組織を除去した後、生じるECMは主に粘膜下層からなる。

40

【0048】

真皮ECMからのヒドロゲルの生成は、参照により本明細書に組み込まれる、Wolf et al., Biomaterials 33: 7028-7038, 2012に開示される。食道組織からECMの生成は、例えば、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、両方は参照により本明細書に組み込まれる。参照により本明細書に組

50

み込まれる米国特許第 6, 893, 666 号は、膀胱、皮膚、食道および小腸からの ECM の生成を開示する。ECM は、これらの組織のいずれからでも生成することができる。

【0049】

市販されている ECM 製剤を使用することもできる。一実施形態では、ECM は小腸粘膜下組織または SIS に由来する。市販されている製剤には、限定されずに、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.) が含まれる。別の実施形態では、ECM は真皮に由来する。市販されている製剤には、限定されずに、PELVICOL (商標) (欧州では PERMACOL (商標) として販売される; Bard, Covington, Ga.)、REPLIFORM (商標) (Microvasive; Boston, Mass.) および ALLODERM (商標) (LifeCell; Branchburg, N. J.) が含まれる。別の実施形態では、ECM は膀胱に由来する。市販されている製剤には、限定されずに UBM (Acell Corporation; Jessup, Md.) が含まれる。

10

【0050】

ECM の調製のための組織は多様な方法で採取することができ、採取されると、採取された組織の様々な部分を使用することができる。ECM は食道および小腸からも調製されており、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。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、トリプシンを含む緩衝液で粘膜層を消化し、続いてスクロース、TRITON-X 100 (登録商標)、デオキシコール酸、過酢酸および DNアーゼ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、無傷の小腸から粘膜、漿膜層および外筋層の表在層を機械的に取り除き、無傷の粘膜下組織、粘膜筋板および基部緻密層を残すことによって調製することができる。SIS は、過酢酸で次に処理される。例示的なプロトコールは、Keane et al. で提供される。真皮ヒドロゲルは、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 に開示されているように生成することができる。

20

30

【0051】

一実施形態では、ECM は、膀胱マトリックス (UBM) を調製するために、採取されたブタの膀胱から単離される。過剰な結合組織および残留尿は、膀胱から取り除かれる。漿膜層、外筋層、粘膜下層および大部分の粘膜筋板は機械的擦過によって、または酵素処理、水和および擦過の組合せによって取り除くことができる。これらの組織の機械的除去は、粘膜 (上皮層) の外層 (特に反管腔側の平滑筋層) および内腔部分さえも除去するための、縦方向のワイピング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 Metzzenbaum 剪刀による腸間膜組織の除去、ならびに濡れたガーゼを巻いたメス取手または他の強固な物体による縦方向のワイピング動作を使用して筋層および粘膜下層を拭い取ることによって達成される。粘膜の上皮細胞は、組織を脱上皮溶液に、例えば、限定されずに、高張食塩水に浸漬することによって解離させることもできる。生じた UBM は粘膜の基底膜および隣接した固有層を含み、これは過酢酸でさらに処理され、凍結乾燥され、粉末にされる。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。

40

【0052】

ECM ヒドロゲルの調製のために真皮切片を使用することができ、参照により本明細書に組み込まれる PCT 出願番号 2015/15164728 を参照。具体的な非限定的な例では、真皮は室温の以下の溶液中で 300 RPM の攪拌振盪機により 0.25% トリプシン / 1% TRITON-X (登録商標) - 100 (すなわち SDS なし) で非細胞化することができる: 0.25% トリプシンで 6 時間、1×; 脱イオン水、15 分、3×; 70

50

%エタノール、10から12時間、1×；3% H₂O₂、15分、1×、脱イオン水、15分、2×；0.26% EDTA / 0.69% トリス中の1% TRITON-X（登録商標）-100、6時間、1×、次に一晚、1×；脱イオン水、15分、3×；0.1% 過酢酸 / 4% エタノール、2時間、1×；PBS、15分、2×；最後に脱イオン水、15分、2×。真皮シートを次に凍結乾燥させ、その後ワーリングブレンダーおよび#20メッシュスクリーンのワイリーミルを使用して粒子の形に低減する。

【0053】

一部の実施形態では、上皮細胞は、先ず、最初に高張食塩水、例えば、限定されずに1.0N食塩水などの脱上皮溶液に組織を10分間から4時間に及ぶ時間浸漬することによって離層させることができる。高張性食塩水溶液への曝露は、下にある基底膜から上皮細胞を効果的に取り除く。最初の離層手順の後に残存する組織は、上皮基底膜および上皮基底膜に反管腔側の組織層を含む。次にこの組織は、上皮基底膜でなく反管腔側組織の大半を取り除くためにさらなる処理にかけられる。外部漿膜、外膜、平滑筋組織、粘膜下層および大部分の粘膜筋板は、機械的擦過によって、または酵素処理、水和および擦過の組合せによって残りの脱上皮組織から除去される。

10

【0054】

ECMは、過酢酸への曝露、低線量ガンマ線放射、ガスプラズマ滅菌、酸化エチレン処理または電子ビーム処理を限定されずに含む、任意の数の標準技術によって滅菌することができる。より一般的には、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) 無菌水への2時間の浸漬によって得られる。過酢酸残留物は、PBS (pH=7.4) による15分間の2回の洗浄、および無菌水による15分間の2回の洗浄によって除去される。ECM材料は、酸化プロピレンもしくは酸化エチレン処理、ガンマ線照射処理 (0.05から4 mRad)、ガスプラズマ滅菌、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、グルタルアルデヒドによる処理によって滅菌することもでき、それはタンパク質材料の架橋を引き起こすが、この処理は、それが徐々に再吸収されるかまたはまったく再吸収されないように材料を実質的に改変し、建設的リモデリングよりも瘢痕組織形成または被包に緊密に類似する異なるタイプの宿主リモデリングを刺激する。タンパク質材料の架橋は、カルボジイミドまたは脱熱水もしくは光酸化方法で誘導することもできる。米国特許第8,361,503号に開示されるように、ECMは、0.1% (v/v) 過酢酸 (a)、4% (v/v) エタノールおよび96% (v/v) 無菌水への2時間の浸漬によって消毒される。次にECM材料は、PBS (pH=7.4) により15分間2回、および脱イオン水により15分間2回洗浄される。

20

30

【0055】

一般的に、目的の組織の単離の後、非細胞化が様々な方法、例えば、限定されずに、高張食塩水、過酢酸、TRITON-X（登録商標）または他の洗浄剤への曝露によって実行される。滅菌および非細胞化は、同時であってよい。例えば、限定されずに、上記の過酢酸による滅菌を非細胞化のために使用することもできる。ECMは、次に凍結乾燥（フリーズドライ）または空気乾燥で乾燥させることができる。乾燥ECMは、引き裂くこと、微粉碎、切断、磨砕および剪断を限定されずに含む方法によって粉碎することができる。粉碎されたECMは、例えば、限定されずに、凍結またはフリーズドライ状態で磨砕するか微粉碎するなどの方法によって粉末形にさらに加工することもできる。

40

【0056】

哺乳動物ECMも、市販されている。これらには、AVITENE（商標）、MICROMATRIX（登録商標）およびXENMATRIX（商標）が含まれる。

【0057】

音響ECMヒドロゲルおよびそれらの調製

一部の実施形態では、哺乳動物ECMなどの粉碎されたECMは、液体に希釈される。ECMは、粉碎する前に凍結乾燥されてもされなくてもよい。ECMは、例えば、ECMを磨砕するか、細断するか、切断することによって粉碎することができる。粉碎されたEC

50

Mは、約10 μ mから約5000 μ m、約10 μ mから約4000 μ m、約10 μ mから約3000 μ m、約10 μ mから約2000 μ m、約10 μ mから約1000 μ m、約10 μ mから約500 μ m、約30 μ mから約300 μ m、約40 μ mから約400 μ m、約25 μ mから約500 μ m、約50 μ mから約500 μ m、約100 μ mから約300 μ m、約10 μ mから約50 μ m、または約10 μ mから約100 μ mの範囲内の断片を有すべきである。一実施形態では、ECMは約10 μ mから約1000 μ mの範囲を有する断片で提供される。別の好ましい実施形態では、ECMは約10 μ mから約2000 μ mの範囲を有する断片で提供される。1つの非限定的な例では、断片は約30 μ mから約300 μ mの範囲内にある。液体は、中性pH、例えば約7.0から約7.6のpH、例えば約7.1から約7.5、例えば約7.2から約7.4、例えば約7.0から7.2、例えば約7.0から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は等張性の緩衝食塩水溶液、例えば限定されずにリン酸緩衝食塩水(PBS)またはトリス緩衝食塩水に希釈することができる。一部の実施形態では、緩衝食塩水溶液は、約290mOsm/Lのモル浸透圧濃度を有する。液体は、水であってよい。一部の実施形態では、溶液を標的pHにするために、またはゲルのpHおよびイオン強度を生理的pHおよびイオン条件などの標的レベルに維持するのに助けるために、リン酸緩衝食塩水(PBS)を限定されずに含む等張性緩衝液を使用することができる。これは、液体ECM溶液を形成する。

10

【0058】

開示される方法は、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を一般的に含まない。参照により本明細書に組み込まれるPCT出願番号WO2015/164728を参照。一般的に、本方法では、液体中の可溶化ECMは、酸性プロテアーゼと接触しない。

20

【0059】

一部の実施形態では、ECMは液体中に約25mg/mlを超える濃度で利用される。ECMは、緩衝液などの液体中に約25mg/mlから約600mg/mlの濃度で利用することができる。好適な濃度には、約25mg/mlから約300mg/ml、約25mg/mlから約200mg/ml、および約25mg/mlから約150mg/mlも含まれる。ECMは、緩衝液などの液体中に約50mg/mlから600mg/mlの濃度で利用することができる。好適な濃度には、約50mg/mlから約300mg/ml、約50mg/mlから約200mg/ml、および約50mg/mlから約150mg/mlも含まれる。好適な濃度には、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が含まれる。例示的な濃度には、約25mg/ml、100mg/mlおよび150mg/mlが含まれる。1つの非限定的な例では、ECMは約25mg/mlから約150mg/mlの濃度で液体中にある。1つの非限定的な例では、ECMは100mg/mlの濃度で液体中にある。

30

【0060】

緩衝食塩水溶液などの液体中のECMは、超音波周波数で処理される。一実施形態では、超音波は約20kHzから約100kHzの周波数である。液体中のECMは、約20kHzから約30kHz、約20kHzから約40kHz、約20kHzから約50kHz、約20kHzから約60kHz、約20kHzから約70kHz、約20kHzから約80kHz、または約20kHzから約90kHzの周波数の超音波で処理することができる。液体中のECMは、約20kHz、30kHz、40kHz、50kHz、60kHz、70kHz、80kHz、90kHzまたは100kHzの周波数の超音波で処理することができる。1つの非限定的な例では、液体中のECMは、約20kHzの周波数の超音波で処理することができる。

40

【0061】

緩衝食塩水溶液などの液体中のECMは、少なくとも20秒間、例えば少なくとも30秒

50

間、超音波で処理される。緩衝食塩水溶液などの液体中のECMは、少なくとも60秒間、超音波で処理される。一部の実施形態では、液体中のECMは、少なくとも60秒間から約1時間、超音波で処理される。さらなる実施形態では、液体中のECMは、少なくとも60秒間から約30分間、超音波で処理される。さらなる実施形態では、液体中のECMは、少なくとも30秒間から約30分間、超音波で処理される。さらなる実施形態では、液体中のECMは、少なくとも60秒間から約15分間、超音波で処理される。さらなる実施形態では、液体中のECMは、少なくとも30秒間から約15分間、超音波で処理される。一部の実施形態では、液体中のECMは、少なくとも60秒間から約10分間、超音波で処理される。一部の実施形態では、液体中のECMは、少なくとも30秒間から約10分間、超音波で処理される。一部の実施形態では、液体中のECMは、少なくとも60秒間から約5分間、超音波で処理される。一部の実施形態では、液体中のECMは、少なくとも30秒間から約5分間、超音波で処理される。液体中のECMは、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、超音波で処理することができる。一部の実施形態では、液体中のECMは、本明細書に掲載される合計時間、パルスの超音波で処理される。したがって一部の実施形態では、緩衝食塩水溶液などの液体中のECMは、例えば少なくとも約30秒の長さ、例えば約30、約40または約60秒の長さのパルスで処理される。緩衝食塩水溶液などの液体中のECMは、処理の合計時間が60秒から1時間、または掲載される合計時間のいずれかであるように、超音波で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10回処理することができる。食塩水溶液などの液体中のECMは、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。食塩水溶液などの液体中のECMは、少なくとも30秒間処理することができる。一般的に、複数の処理を使用する場合、それらは1時間未満の間に起こる。例示的な方法は超音波の30秒間のパルス、続く30～45秒間の無処理、続く別の処理である。この処理は2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10回またはそれより多く印加される。1つの例示的な非限定的な方法は、例えば約20kHzの超音波の30秒間の6つのパルス、続く45秒間の休止の6回の繰り返しであり、合計3分間の超音波による処理である。

10

20

30

40

50

【0062】

超音波は、約20μmから約320μmの振幅を有することができる。一般的に、振幅は、超音波を発生させるために使用されるプローブの中心から測定される。プローブの振動表面の振幅は、プローブの完全伸長状態と完全収縮状態の位置の間の距離であり、ミクロン(μm)で測定される。一部の実施形態では、振幅は約30μmから約200μmである。さらなる実施形態では、振幅は約36μmから約180μmである。振幅は、約30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290または300μmであってよい。一部の実施形態では、振幅は約30～40μm、40～50μm、50～60μm、60～70μm、70～80μm、80～90μm、90～100μm、100～110μm、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であってよい。1つの具体的な非限定的な例では、超音波は約20kHzの周波数であり、振幅は約36μmから約18

0 μm である。さらなる非限定的な例では、超音波は約20 kHzの周波数であり、振幅は約36 μm から約180 μm であり、処理は合計約1、2、3、4または5分間、例えば約3分間である。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分間であってよい。超音波処理は、約30秒から約5分であってよい。超音波処理は、例えば約1から約5分間の間であってよい。超音波処理は、約1から約10分間であってよい。超音波処理は、例えば1から約20分間の間であってよい。さらなる実施形態では、超音波処理は、約1時間未満、約30分未満、約20分未満または約10分未満であってよい。一部の実施形態では、超音波処理は少なくとも30秒間であってよい。他の実施形態では、超音波処理は約10分間から約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時間であってよい。一部の実施形態では、超音波処理は最高48時間であってよい。

10

【0063】

一部の実施形態では、液体中のECMは、約30℃から約43℃の範囲の温度で超音波で処理される。一実施形態では、液体中のECMは、約35℃から約40℃の範囲の温度で超音波で処理される。一実施形態では、液体中のECMは、約36℃から約38℃の範囲の温度で超音波で処理される。別の実施形態では、液体中のECMは、約37℃またはそれより高い範囲の温度、例えば約37℃から約55℃、例えば約37℃から約50℃、例えば約37℃から約45℃、例えば約37℃から約40℃の温度で超音波で処理される。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℃の温度で超音波で処理される。さらなる実施形態では、液体中のECMは、約38℃より高い温度、例えば約38℃から約50℃、例えば約38℃から約45℃、例えば約38℃から約40℃で超音波で処理される。

20

【0064】

超音波による処理は、音響ECMヒドロゲルを生成する。音響ECMヒドロゲルは、37℃前後でゾルからゲルへの相転移を一般的に経て、したがって、37℃より高い温度で液相に、および37℃未満でゲル相に転移する。37℃で、音響ECMヒドロゲルはゲルに似るのに十分に粘性であるが、温度が37℃より高くなるにつれて、ゲルはゾルに転移する。音響ECMヒドロゲルは、37℃未満の温度への低下によりゲルを形成する（ゾルからゲルへの転移）。したがって、一部の実施形態では、超音波処理の後、音響ECMヒドロゲルは37℃未満、例えば約4℃から約36℃の温度に冷却される。音響ECMヒドロゲルは、一般的に約25℃である室温に冷却することができる。一部の実施形態では、音響ECMヒドロゲルは、約15℃から約25℃に冷却される。音響ECMヒドロゲルは、約23℃から約27℃に冷却することができる。音響ECMヒドロゲルは、ゲル相を誘導するために約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℃に冷却することができる。

30

【0065】

一部の実施形態では、音響哺乳動物ECMヒドロゲルが開示され、ヒドロゲルは熱可逆的であり、ヒドロゲルは約37℃未満の温度で固体（ゲル）相であり、37℃より高い温度で液体（ゾル）相である。音響ヒドロゲルは、本明細書に開示される方法のいずれかを使用して生成することができる。一部の実施形態では、音響ECMヒドロゲルでは、貯蔵弾性率（ G' ）は損失弾性率（ G'' ）より約1桁大きい。さらなる実施形態では、音響ECMヒドロゲルの粘度は、約15から約37℃の温度、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℃で、応力の増加に伴って減少する。さらなる実施形態では、音響ECMヒドロゲルの粘度は、室温で、ならびに／または約23℃から約27℃および／もしくは約15℃から約25℃で、応力の増加に伴って減少する。一実施形態では、音響ECMヒドロゲルのゲルからゾルへの転移は約37℃であり、そのため、

40

50

それは体温で十分に粘性であるのでヒドロゲルは粘膜下クッションとして使用することができる。

【0066】

これらの音響ECMヒドロゲルは、上の開示される任意の哺乳動物ECMから作製することができる。具体的な非限定的な例では、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ECMまたは真皮ECMである。一実施形態では、ECMは膀胱ECMである。別の実施形態では、ECMは真皮ECMである。さらに別の実施形態では、ECMは食道ECMである。ECMの供与源は、例えば、ブタ、ウシまたはヒツジであってよい。

【0067】

一部の実施形態では、音響ECMヒドロゲルは、ECMを約25mg/mlから約600mg/mlの濃度で含む。さらなる実施形態では、音響ECMヒドロゲルは、ECMを約20mg/mlから約600mg/ml、約25mg/mlから約300mg/ml、約25mg/mlから約200mg/ml、および約25mg/mlから約150mg/mlの濃度で含む。さらなる実施形態では、音響ECMヒドロゲルは、ECMを緩衝液などの液体中に約50mg/mlから600mg/mlの濃度で含む。音響ECMヒドロゲルは、約50mg/mlから約300mg/ml、約50mg/mlから約200mg/ml、約50mg/mlから約150mg/ml、約50~100mg/ml、または約100~150mg/mlのECM濃度を有することもできる。一部の非限定的な例では、音響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。ECMの例示的な非限定的な濃度には、約25mg/ml、100mg/mlおよび150mg/mlも含まれる。1つの非限定的な例では、音響ECMヒドロゲルは、ECMを約25mg/mlから約150mg/mlの濃度で含む。一実施形態では、ECM濃度は約100mg/mlである。

【0068】

一部の実施形態では、音響ECMヒドロゲルは、ECMの濃度が約150mg/mLである場合、15℃で約1400Pa*sの粘度、および25℃の温度で約400Pa*sの粘度を有する。他の実施形態では、音響ECMヒドロゲルは、ECMの濃度が約150mg/mLである場合、15℃で概ね2700Pa*s、25℃で概ね800Pa*sおよび37℃で600Pa*sの貯蔵弾性率を有する。

【0069】

液相の音響ECMヒドロゲルは、冷却前に三次元型に入れることができるか、またはフィルムを形成するためにTEFLON（登録商標）シートの上に広げることができ、例えば、図1Cおよび1Dを参照。音響ECMヒドロゲル中のECMの高い濃度（50から600mg/ml）は、非常に薄いシート、例えば4ミクロンのように薄いシートの形成を可能にする。音響ECMヒドロゲルは、4ミクロンより大きい任意のサイズで、および任意の二次元または三次元の形状で構成することができる。一部の実施形態では、厚さが約4から約10ミクロン、例えば厚さが約4、5、6、7、8、9または10ミクロンであるシートが形成される。音響ECMヒドロゲルは、円柱、球体、楕円体、ディスク、シート、立方体、直方体、円錐体、三角形または長方形のプリズム、ならびに中空の球体、中空

10

20

30

40

50

の楕円体および開放末端の中空の円柱等を限定されずに含む、任意の三次元形状に成形することができる。例示的な形状は、図2A～2Cに示す。音響ECMヒドロゲルは、注射可能薬物として、例えばシリンジに入れてそれをゲルまたはゾルの相でシリンジから押し出すことによって使用することもできる。

【0070】

一部の実施形態では、音響ECMヒドロゲルは生体適合性基質に吸収させるか、その上に吸着させるか、さもなければその上またはその中に分散させる。生体適合性基質の非限定的な例には、以下のものが含まれる：メッシュ、不織布、非細胞化組織、ポリマー組成物、ポリマー構造、細胞増殖骨格、インプラント、整形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、ステントおよびトランスプラント。一部の実施形態では、基質は合成物である。他の実施形態では、基質は天然である。音響ECMヒドロゲルは、不織布の材料、例えば包帯、縫合糸、インプラント、例えばセラミック、金属もしくはポリマー製のインプラント、例えば人工器官、人工のさもなければ改変された血管、弁、眼内レンズまたは組織インプラントに任意の好適な方法によって付与することまたは組み込むことができる。本明細書で使用されるように、用語「コート」ならびに「コーティングされた」および「コーティング」などの関係する同じ語源の語は、無機構造物を本明細書に記載の組成物によって一部または全体をカバーすることを含むプロセスを指す。例えば、限定されずに、液相の音響ECMヒドロゲルによる無機構造物のコーティングは、流し込み、包埋、重層、浸漬、噴霧などの方法を含むことができる。

10

【0071】

別の実施形態では、音響ECMヒドロゲルを含む組成物は、液相で、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などの無機カルシウム化合物、またはセラミック組成物にコーティングされる。好適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、それらは、非金属および金属の構成要素の両方、例えばモリブデン、タンタル、ニオブウム、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を含むことができ、限定されずに、様々なグレードのCPTi（商業的に純粋なチタン）またはTi6Al4V（90%wt Ti、6%wt Alおよび4%wt 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したチタン合金が挙げられる。金属は、高い強度、柔軟性および生体適合性のために有益である。金属は複雑な形状に成形することもでき、多くは生物学的環境で腐食に耐えること、摩耗を低減することができ、組織に傷害を引き起こすことがない。他の組成物には、セラミック、カルシウム化合物、例えば限定されずにアラゴナイトが含まれる。金属、セラミックおよび／または他の材料の組合せが有用である可能性もある。

20

30

【0072】

任意の有益な薬剤を、本明細書に記載される任意の組成物に混入すること、同時送達すること、同時付与すること、またはさもなければ組み合わせることができる。例えば、限定されずに、有益な薬剤にはインターフェロン、インターロイキン、ケモカイン、モノカイン、ホルモン、凝固剤、化学療法薬および抗生物質が含まれる。

40

【0073】

使用方法

マクロファージは、損傷後の正常な治癒および正常な組織発達において重要な調節因子であることが示された。開示される音響ECMヒドロゲルは、マクロファージ表現型に及ぼす全体のECMの影響を再現することができ、M2様の調節性またはリモデリング促進マクロファージの増加につながる。したがって、マクロファージ表現型を改変するために、例えば調節性M2マクロファージを誘導するために、本明細書に開示される組成物のいずれかを使用することができる。

【0074】

一部の実施形態では、本明細書に開示される音響ECMヒドロゲルを含む組成物の治療的

50

有効量を投与し、それによって対象でM2マクロファージを誘導することによって対象でM2マクロファージを誘導するための方法が開示される。さらなる実施形態では、対象でM1（炎症誘発性）マクロファージを減少させるための方法が開示される。本方法は、音響ECMヒドロゲルの治療的有效量を投与し、それによって対象でM1マクロファージを阻害することを含む。対象は、ヒトおよび獣医学的対象を含む任意の目的の対象であってよい。

【0075】

開示される音響ECMヒドロゲルは、対象の損傷で止血を増加させる。したがって、創傷の凝固を加速するためのおよび／または出血時間を短縮するための方法も開示される。一部の実施形態では、止血は、対象に音響ECMヒドロゲルを投与してから約10から約100秒以内に、例えば約10、20、30、40、50、60、70、80、90または100秒以内に誘導される。

10

【0076】

一部の実施形態では、止血を誘導するために、音響ECMヒドロゲルの治療的有效量を対象の部位へ局所的に投与することができる。対象は、創傷を有することができる。創傷は外部の創傷であるか、または患者の外から見えない内部の創傷であってよい。開示される音響ECMヒドロゲルは、任意のタイプの創傷の止血剤として有用である。本方法は、任意の創傷を有する者などの目的の対象のいずれか一人を選択することを含むことができる。

【0077】

図10に示すように、音響ECMヒドロゲルは凝固時間を短縮する。凝固は、当業者に公知である任意の方法によって測定することができる。リーホワイト試験管方法では、静脈血が3本の試験管に入れられ、水浴中で37℃に保たれる。凝固時間は、第1のおよび次に第2の試験管を1分間隔で傾け、それらの各々で堅い凝塊が順番に形成する時間を記録し、次に、第3の管で血液の凝血を検出して凝血時間を与えることによって決定される。毛細管方法では、ガラス毛細管を指穿刺からの血液で満たす。毛細管の切断部分の間に血液凝塊が出現するまで、毛細管の短い断片を一定間隔で切断する。凝塊の出現を決定するための別の方法は、トロンプエラストグラム方法である。この方法では、凝血時に増加する粘度を感知するために、血液または血漿試料中で動かすフォークが使用される。凝固の発生を記録するためのさらなる方法は、血液から単離された後に血漿試料の半透明性を監視することによる。凝塊の出現で、試料は不透明になる。

20

30

【0078】

一部の実施形態では、炎症または創傷を有する対象を処置するための方法が開示される。本方法は、炎症または創傷へ音響ECMヒドロゲルの治療的有效量を局所的に付与することを含む。一部の非限定的な例では、対象は炎症性障害、例えば、限定されずに、潰瘍性大腸炎または関節リウマチを有する。本方法は、組織表面へECMヒドロゲルを付与することを含むことができる。他の非限定的な例では、対象は臓器移植レシピエント、移植片対宿主病にかかった対象、心筋梗塞の対象、または創傷を有する対象、例えば限定されずに外科創傷もしくは非外科的外傷性創傷を有する対象である。したがって、それを必要とする個体で創傷治癒を加速するためのおよび／または止血を増加させるための方法であって、本明細書に開示される音響ECMヒドロゲルを含む組成物の治療的有效量を投与することを含む方法が開示される。投与は、創傷部位または移植片など局所であってよい。

40

【0079】

ヒドロゲルは、止血を増加させるためおよび／または創傷治癒を増加させるために、任意の創傷部位へ付与することができる。創傷は、皮膚の創傷、または目を限定されずに含む任意の表面の創傷であってよい。虚血および虚血性損傷から生じる創傷、例えば静脈循環性系戻りの障害および／または不全によって引き起こされる慢性静脈脚潰瘍のための方法も提供される。したがって、本方法は、局所の真皮または目への投与を利用することができる。一般的に、これらの適用では、組成物は局所投与のために製剤化される。ヒドロゲルは、任意の臓器の組織表面へ付与することができる。

50

【0080】

真皮創傷などの創傷の治癒のための局所組成物が、本明細書に開示される。処置に適合するこれらの創傷は、表在性であってよいかまたは深在性であってもよく、皮膚の真皮および表皮の傷害を含むことができる。創傷は、外科創傷であってもよい。したがって、対象で創傷治癒を促進するおよび／または対象で凝固を促進する（止血を増加させる）方法が提供される。

【0081】

音響ヒドロゲルは、例えばシート、プラグなどの局所製剤中で、または被覆帯もしくは包帯の一部として、標的位置へ直接的に付与することができる。包帯および創傷被覆帯は、音響ECMヒドロゲルを含有することができる。これらは、ゲルまたは液相の音響ECMヒドロゲルを、所望される任意の他の添加剤と一緒に包帯または創傷被覆帯へ塗布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、包帯または被覆帯は、凝固時間を短縮するために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。音響ヒドロゲルは、創傷治癒を促進するために例えばゲル相中の固体として標的位置へ注射によって投与することができるか、または、ヒドロゲルが液相で投与されるように投与の前に温度を37℃より上に上昇させることができる。

【0082】

創傷処置で使用するために、および／または止血を増加させるために、音響ECMヒドロゲルは上記の範囲内の濃度を通常有する。音響ECMヒドロゲルは、1回で付与することができる。あるいは、音響ECMヒドロゲルは患部に周期的に、一般的に毎日約1回から10回、例えば創傷の性質によって約3～14日間にわたって付与することができる。一部の場合には、組成物を無期限に付与することが望ましいかもしれない。

【0083】

音響ECMヒドロゲルは、止血および創傷治癒の速度に影響する。一部の実施形態では、本組成物は、標準値、処置なしで達成される創傷治癒もしくは止血の速度、または酵素的な方法によって生成されるECMヒドロゲルの処置などの対照と比較して、止血および／または創傷治癒を少なくとも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%増加させる。

【0084】

音響ECMヒドロゲルは、外科創傷の処置および他の意図的な介入で使用することもでき、ここで、組成物は手術の完了の直後に付与することができる。外科創傷、摘出創傷、真皮および表皮の傷害を含む深部の創傷、目組織創傷、歯組織創傷、口腔創傷、糖尿病性潰瘍、真皮潰瘍、肘潰瘍、動脈の潰瘍、静脈うっ血潰瘍ならびに熱曝露または化学物質からもたらされる火傷を含む創傷の治癒を刺激するための、および創傷部位で止血を増加させるための方法が提供される。

【0085】

対象は、ヒトまたは獣医学的対象を含む任意の目的の哺乳動物対象であってよい。対象は児童または成人の対象、例えば若齢、中年またはより高齢の成人対象であってよい。ヒトでは、成人対象は18歳を超え、若年成人は約18から約35歳であり、中年成人は一般的に約35から約55歳であるとみなされ、高齢の（または、老齢の）ヒト対象は約55歳を超え、例えば60歳、65歳、70歳、75歳または80歳を超える。

【0086】

対象は正常な速度で創傷を治癒させることができるか、障害を治癒させることができる。いくつかの病気および状態は、障害の治癒をもたらすことができる。これらには、糖尿病（I型真性糖尿病など）、ステロイドおよび他の薬理学的薬剤の両方による処置、ならびに虚血性閉塞または損傷（末梢血管疾患または外傷性血管閉塞におけるような）が含まれる。異常な創傷治癒を誘導する状態には、限定されずに、尿毒症、栄養失調、ビタミン欠乏症、肥満、感染症、免疫抑制、ならびに、ステロイド、放射線療法および抗新生物薬による全身処置、ならびに代謝拮抗物質に関連した合併症が含まれる。創傷治癒を損なう

10

20

30

40

50

ことが示されたステロイドには、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ンが含まれる。酢酸オクトレオチドなどの非ステロイド系化合物も、創傷治癒を損なうことが示された (Waddell et al., Am. Surg. 63:446-449, 1997)。

【0087】

対象は凝固障害を有してもよい、抗凝固剤、例えば限定されずにワルファリンまたは P L A A V I X (登録商標) による処置を受けていてもよい。対象は、第ⅠⅠ因子、第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠ因子、第Ⅹ因子または第ⅩⅠⅠ因子欠乏症を有していてもよい。対象は、血友病 A、血友病 B、フォン・ウィルブランド病、フィブリノーゲンまたはプロトロンビンの欠乏症または構造異常を有していてもよい。したがって、一部の実施形態では、これらの対象が処置のために選択される。

10

【0088】

本明細書では、創傷床への皮膚移植片の粘着を増加させる、および創傷床からの再上皮形成を刺激する方法も提供される。移植片のタイプには、限定されずに以下のものが含まれる：自家皮膚移植片、人工皮膚、同種異系移植片、自家真皮移植片、自己表皮移植片、無血管移植片、ブレアーブラウン移植片、骨移植片、胚胎組織移植片、皮膚移植片、遅延型移植片、真皮移植片、表皮移植片、筋膜移植片、完全厚移植片、異種移植片 (heterologous graft)、異種移植片 (xenograft)、同種移植片、過形成移植片、層状移植片、メッシュ移植片、粘膜移植片、オリアーティールシュ移植片、大網移植片、パッチ移植片、茎状移植片、貫通移植片、スプリット皮膚移植片、厚いスプリット移植片。本方法は、移植片を有する対象に本明細書に開示される組成物の治療的有効量を投与し、それによって移植片の粘着および受容を増加させ、細菌増殖を制御または排除することを含む。一部の実施形態では、組成物で処置される細胞または組織が対象に移植される。1つの具体的な非限定的な例では、組成物は移植の前に皮膚移植片などの移植片に投与される。

20

【0089】

擦過または化学的損傷による水疱および火傷を処置する方法も提供される。これらの方法は、皮膚または内臓の処置を含む。これらの方法は、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損傷；放射線もしくは化学療法によって誘導される膀胱炎；または高線量化学療法によって誘導される腸管損傷の処置を含む。本方法は、水疱または火傷の治癒を促進するために、および細菌増殖を低減または排除するために、本明細書に開示される組成物の治療的有効量を対象に投与することを含む。

30

【0090】

個体で外科的施術によって引き起こされ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、吻合もしくは他の手術の後の、および／またはその間の本明細書に開示される組成物の有効量の投与を含む。吻合は、例えば腸の中間部が除去され、残りの部分が連結されて腸管を再構成する場合に、2つの管状構造を連結することである。皮膚治癒と異なり、吻合創傷の治癒過程は一般的に、視認するには不明瞭である。さらに、創傷治癒は、少なくとも胃腸管では、合併症の不在で速やかに起こる；しかし、合併症により追加の手術による矯正がしばしば必要とされる (Thornton and Barbul, Surg. Clin. North Am. 77:549-573 (1997))。本方法は、吻合創傷治癒を必要とする対象を選択することを含むことができる。対象は、上の状態の1つのために創傷治癒が損なわれた対象であってよい、または正常な創傷治癒を有する対象、例えば上に掲載される状態のいずれも有しない対象であってもよい。

40

【0091】

開示される音響 E C M ヒドロゲルは室温で固相であり、約 37℃ で液相に転移する。したがって、一部の実施形態では、対象への付与の後にヒドロゲルが体熱によって温まるにつれて、音響 E C M ヒドロゲルは固相から液相に経時的に転移する。一部の実施形態では、本方法は、創傷を洗浄して音響 E C M ヒドロゲルを除去することを含むことができ、それは液相で洗い流すことができる。

50

【0092】

一部の実施形態では、音響ECMヒドロゲルは滅菌を受ける。本発明の音響ECMヒドロゲルが病原体による汚染が十分に除去され、ヒトまたは動物体への植え込みなどの医療用に好適であることを保証するために、滅菌が重要である。ガンマ線照射、酸化エチレン、超臨界CO₂、過酸化水素ガスプラズマまたはオゾンなどの方法が、本発明の音響ECMヒドロゲルの滅菌のために好適である可能性があるが、当技術分野で公知である他の滅菌方法も好適であろう。本明細書に示されるように、本発明の音響ECMヒドロゲルはガンマ滅菌したときにもそれらの剛性を維持するので、ガンマ滅菌は許容される滅菌方法である。一実施形態では、音響ECMヒドロゲルはECM溶液がゲルを形成する前にガンマ滅菌を受ける、例えば、液体のECMは超音波処理の前に、またはゲルを形成する前の超音波処理の後に滅菌することができる。別の実施形態では、音響ECMヒドロゲルは、ゲルが形成された後にガンマ滅菌を受ける。一部の実施形態では、音響ECMヒドロゲルはガンマ線照射による滅菌の後にゲルの形のままであるかまたはゲルを形成することができる。

10

【0093】

対照的に、酵素生成されるヒドロゲルの場合、ガンマ線照射は組成物を不安定にする。したがって、ガンマ線照射の後にゲルは形成されないかまたは不安定にされる。

【0094】

粘膜下クッションとしての音響ECMヒドロゲル

内視鏡検査は、侵襲的手術を用いることなく、内視鏡と呼ばれる機器による中空臓器の内部または体腔の検査を可能にする施術である。内視鏡検査は外科的施術、例えば出血血管の焼灼術、ポリープ、アデノーマおよび小腫瘍の除去、生検または異物の除去のために使用することができる。内視鏡的施術は、胃腸管、呼吸器官、耳、尿路、女性生殖系において、ならびに、小さい切開を通して、通常は閉鎖的な体腔、例えば、腹部または骨盤の腔（腹腔鏡検査）、関節（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）の内部において実行することができる。内視鏡検査は、上部の胃腸管または下部の胃腸管で実行することができる。内視鏡は、診断または治療目的のために中空の臓器またはパーツ（例えば、膀胱、食道、胃または腸）の内部を可視化するための、機器（鉗子、電気外科ナイフ、内視鏡注射針または剪刀など）の通過を可能にするかまたは生体（bioptic）試料の取出しを容易にするために1つまたは複数の作業チャンネルを一般的に有する、照明付きの、通常光ファイバーの柔軟であるか強固な管状機器である。それは、その遠位部に好適なランプおよび画像化装置を含み、口、肛門、耳、鼻などの体の天然に存在する開口部を通して、または小さい外科切開を通して挿入することができる。多種多様な体の臓器または腔を内視鏡的施術によって検査することができることから、例えば喉頭鏡、胸腔鏡、毛細血管鏡、結腸鏡、腸鏡、S状結腸鏡、直腸鏡（rectoscope）、直腸鏡（proctoscope）、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、胃カメラ、羊水鏡、膀胱鏡などの、数種類の専門化された内視鏡が存在する。

20

30

【0095】

内視鏡的施術は、上部のおよび下部の胃腸管を含む胃腸管で広く適用される。例えば、内視鏡的施術は、胃腸腔を覆う粘膜を検査するために、ならびに大小の病理学的な損傷、例えば炎症組織、ポリープ、偽ポリープ、鋸歯状損傷、アデノーマ、潰瘍、形成異常、前新生物および新生物形成ならびに腫瘍を検出するために使用することができる。内視鏡的施術は、病理学的損傷（ポリープ、アデノーマ、形成異常、前新生物および新生物形成、腫瘍）の生検および除去のために使用することができる。外科的介入は、病理学的損傷を除去するために胃腸内視鏡検査で一般的に使用される以下の2つのタイプの内視鏡的切除施術を含む：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つの技術は、リンパ節転移の最小リスクを含む胃腸ポリープ、アデノーマ、形成異常および早期がんの最小限に侵襲的な処置を可能にする。

40

【0096】

50

本明細書では、対象の臓器の領域からの固有筋層から粘膜および粘膜下層を切開するための方法が開示される。臓器は、胃腸管、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-呼吸器系の臓器（肺、のど（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。具体的な組織の例は、呼吸上皮、鼻上皮、真皮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。本方法は、悪性または前癌状態の損傷などの表在性の損傷が形成することができる粘膜および粘膜下層を有する任意の臓器において有用である。

【0097】

これらの方法は、対象の臓器の中に音響ECMヒドロゲルを含む医薬組成物を粘膜下層に注射して、臓器の領域の粘膜下層と下にある固有筋層の間でクッションを形成することを含む。一実施形態では、臓器は食道でない。別の実施形態では、臓器は食道である。本方法は、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）であってよい。

10

【0098】

EMRは、胃腸（GI）管の表在層（粘膜および粘膜下層）に限られる固着性のまたは平らな新生物の除去のために開発された内視鏡技術である。EMRは、2cm未満の損傷の除去またはより大きな損傷の小刻みな除去のために一般的に使用される。EMRは、正確な病理学的病期診断のための切除された検体の調査でも重要な役割を演ずる。ポリペクトミーと対照的に、EMRは、粘膜下層に流体剤、一般的に生理食塩水（NS）溶液を注射することによって筋肉層から損傷を持ち上げることを含む。EMRは、リンパ節転移のリスクを決定するために正確な組織病理学的病期診断のための検体を得るためにも有益である。EMRは、腸壁粘膜下層の中央部またはより深い部分を通して切除することによって、侵された粘膜の完全な除去を容易にする。様々なEMR技術が記載され、スネア切除を含む4つの方法が一般的に使用される：（1）注入および切断方法；（2）注入、リフトおよび切断方法；（3）キャップ支援EMR（EMRC）；ならびに（4）ライゲーションによるEMR（EMRL）。注入および切断技術では、病的な粘膜は粘膜下流体クッションを形成することによって筋肉層から持ち上げられ、捕捉され、電気外科スネアを使用して括約され、次に切除される。しかし、薄い粘膜下層への注射は繊細なプロセスであり、注射された溶液は速やかに放散する傾向があり、平らで陥没した損傷は隆起した損傷と比較してスネアで捕捉するのが困難であり、大きいか不格好に位置する損傷は除去するのが困難である可能性がある（Uraoka et al., Drug Design, Development and Therapy 2008:2 131-138）。注射支援EMRは、大きく平らな結腸ポリープのために頻繁に使用される。

20

30

【0099】

内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）は、より大きな損傷を除去するために特に開発された。損傷は電気外科ナイフを使用して粘膜下層に直接沿って切開され、大きな損傷の一括切除さえもたす。ESDはある特定のがん病期の処置において従来の手術を置き換えると予測されているが、それは従来のEMRより高い率の穿孔および出血合併症を有するので、EMRより高い程度の内視鏡技術および経験が必要とされる。ESDは、多数の電気外科ナイフ、例えば断熱先端透熱性ナイフ、ニードルナイフ、フックナイフ、屈曲ナイフ、三角先端ナイフ、フラッシュナイフ、スプラッシュ針および小口径チップ透明フードを使用することができる。これらのナイフは、高周波数電気外科電流（HFEC）発生器と使用することができる。ESDは、3つのステップによって特徴付けられる：（1）流体を注射して粘膜下クッションを形成して損傷を筋層から持ち上げること；（2）損傷の周囲の粘膜の円周切断；および（3）損傷の下の粘膜下層の結合組織の切開（参照により本明細書に組み込まれるKakushima et al., World J. Gastroenterol. 14(9): 2962-2967, 2008を参照）。様々な粘膜下注射液が以前に開発されており、EMRの間の使用を満足させることが示されたが、より長いESD施術の導入は、粘膜下層の切開の間の切断ラインの特定を助けるために、より持続性の溶液を必要とした（Uraoka et

40

50

al., Drug Design, Development and Therapy 2008:2 131-138)。現在開示される方法は、この必要性を満たす。

【0100】

粘膜下層クッションへの流体の注射は、例えばスネアによる標的損傷の捕捉の直前に除去される組織の単離を容易にし、それによって、切除も容易にしながら熱損傷ならびに穿孔および出血のリスクを低減するので、粘膜下注射がEMRで使用される。スネアリングを容易にするために半球状の形状を形成するのに十分な期間および必要性のために溶液が所定の位置に保持されなければならないので、粘膜下注射は、EMR施術で重要な役割を演ずる。さらに、十分に高い粘膜下層の上昇を提供することは、ESD施術の間の安全な粘膜下切断をもたらす(Uraoka et al., Drug Design, Development and Th

10

【0101】

一部の実施形態では、開示される方法は、抗炎症特性を有し、安価、無毒であり、注射が容易であり、高い持続性の粘膜下クッションを提供する音響ECMヒドロゲルを利用する。音響ECMヒドロゲルは注射部位にそのゲル状態で投与され、クッションを形成する。一部のヒドロゲルが下にある固有筋層の上に残り、それによって治癒を助けるように、施術の間にクッションを切開することができる。開示される音響ECMヒドロゲルは、切除される粘膜／粘膜下層の除去によって形成される創傷の閉鎖を容易にする。一部の実施形態では、施術はESDである。他の実施形態では、施術はEMRである。

20

【0102】

生理食塩水溶液(NS)および希釈溶液(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)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きたが、これらの溶液の固有の特徴は、溶液の急速な分散のために、適切な粘膜下流体クッションを生成すること、所望の高さを維持すること、および所望の位置でクッションを保持することを困難にする。さらに、ESDでは、粘膜／粘膜下層が除去されると、これらの薬剤は下にある固有筋層の上で保持されない。さらに、これらの薬剤は、例えば炎症を低減することにより治癒過程を助けない。音響ECMヒドロゲルの使用は、これらの必要性を満たす。

30

【0103】

本明細書に開示される音響ECMヒドロゲルは、任意のESDまたはESRで使うことができる。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,364,580号に開示されるように、内視鏡注射針は、長い(最高約230)cmであってよく、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る比較的長いカテーテルを含む装置である。必要に応じて一方を他方に対して移動させるために、近位作動ハンドルがカテーテルおよび注射管に連結される。注射管への流体のアクセスは、ハンドルの上のリーア(leeer)コネクタによって一般的に提供される。内視鏡注射針装置は、内視鏡の作業チャネルを通して注射部位へ一般的に運ばれる。内視鏡作業チャネルの内腔を傷害から保護するために、装置を内視鏡に挿入する前に、遠位注射針をカテーテルの内腔の中に引き抜くように注入針装置のハンドルを操作する。装置は内視鏡の内腔を通して移動するので、これは注射針の鋭い先端の露出を阻止する。内視鏡注射針装置の遠位末端が注射部位に位置する場合、そのハンドルは、注射針がカテーテルの内腔の遠位外部に移動するように同じく操作される。最も遠位の位置へ進んだ場合、注射針の露出部分は概ね4~6mmの長さである。

40

【0104】

注射部位を刺した後、注射針のハンドルに連結されるルアーロックフィッティングを備えた5mlから10mlのシリンジに通常含有される音響ECMヒドロゲルを注射部位に、例えば粘膜下層と下にある固有筋層の間に、注射管および針を通して送ることができる。

【0105】

50

注射針ならびに内視鏡的施術の間に一般的に使用される他の付属品、例えば、ポリペクトミーのためのスネア、クリッピング器具、生検鉗子および類似品は、内視鏡の1つまたは複数の、通常作業チャンネルまたは操作チャンネルと呼ばれる特定のチャンネルを通される。G I内視鏡検査で使用されるタイプの内視鏡（例えば、胃カメラ、腸鏡、結腸鏡、十二指腸鏡、S状結腸鏡および類似品）によって、作業チャンネルの内径はかなり異なることがある。しかし、G I内視鏡検査で使用される最も一般的な内視鏡は、約2 mmから約5 mmの範囲内の内径を有する作業チャンネルを有する。一般的に、内視鏡付属品の製造業者は、それらを全ての作業チャンネルに適合させる外径を有する付属品を生産する。一部の実施形態では、内視鏡注射針は、カテーテルの外径が1.9 mmから2.3 mmに及び、例えば、約1.9、2.0、2.1、2.2または2.3 cmである。したがって、内部注射管が外部のカテーテル内に収まっていることを考慮すると、その内径は通常1 mmまたはそれより小さい。ゲルまたは液体の形の開示される音響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。

10

【0106】

音響ECMヒドロゲルは、所定の位置に配置されたらクッションになる粘膜下層にヒドロゲルを放出する（depose）ために、シリンジによってその一次容器からヒドロゲルの一定量を吸引し、表在性粘膜層の直下の内視鏡の作業チャンネルに挿入された内視鏡注射針によって前記ヒドロゲルの好適な量を注射することによって、内視鏡的切除施術で実施することができる：粘膜表面の上昇は、たとえ損傷が平らであり、したがって、腸管、食道または胃内腔などの内腔に突き出ていないとしても、内視鏡検査専門医が内視鏡的施術の執行の間に見出される粘膜損傷の容易な切除を実行することを可能にする。体温では、音響ECMヒドロゲルは、液相へ転移する粘性であるが流動可能なゲルであり、この施術のためにクッションを形成するために、表在性粘膜層の下へ容易に注射することができる。ゲル-ゾル転移は時間がかかるので、クッションは切除をするのに十分な時間、所定の位置にとどまる。

20

【0107】

クッションへの少なくとも1つの色素の存在は、内視鏡検査専門医が粘膜の下構造（例えば、粘膜下層および外部筋肉壁）を可視化するのを助けることができ、それによって、切除施術を実行する内視鏡検査専門医が前記構造へ傷害を引き起こすかもしれないリスクを低減する。色素の使用は、クッション空洞および粘膜基底の可視化を可能にすることができる。粘膜表面からの損傷の除去は、粘膜創傷を発生させる。医薬組成物の注射された量によって生成されるクッションの持続性は、再注射の必要性なしで内視鏡的切除施術を実行することを可能にする。音響ECMヒドロゲルは、対象の臓器の目的の領域、例えば損傷または腫瘍の領域に対して粘膜下に注射され、臓器の領域の粘膜下層と下にある固有筋層の間でクッションを形成する。音響ECMヒドロゲルの一部が下にある固有筋層で維持されて治癒過程を支援するように、クッションを切開することができる。

30

【0108】

開示される方法は、食道で有用である。非限定的な例では、本方法は、食道から食道癌または腺癌を切開する方法を含む。別の非限定的な例では、本方法は、バレット食道を有する対象の食道から粘膜および粘膜下層を切開することを含む。これらの実施形態では、音響ECMヒドロゲルは、膀胱、小腸粘膜下（SIS）、食道、気管、肝臓または真皮の音響ECMヒドロゲルであってよい。

40

【0109】

開示された方法は、他の臓器でも有用である。臓器は目的の任意の臓器、例えば、胃腸管の臓器であってよい。臓器は、咽頭、舌または口などの上部の胃腸管内であってよい。臓器は、膀胱、膣管または子宮であってよい。一部の実施形態では、臓器は結腸、十二指腸、胃、盲腸、結腸、S字結腸、直腸、小腸または大腸である。1つの非限定的な例では、臓器は胃、小腸または大腸であり、本方法は、胃から癌腫または腺癌を切開する方法を含む。さらなる非限定的な例では、臓器は結腸であり、本方法は、結腸からポリープまたは癌腫を切開することを含む。これらの実施形態では、音響ECMヒドロゲルは、膀胱、小

50

腸粘膜下、食道、気管、肝臓または真皮の音響 E C M ヒドロゲルであってよい。

【0110】

本明細書に開示されるように、音響 E C M ヒドロゲルは、粘膜下クッションとしての適用のためにそれがゲル化する温度またはそれより低い温度に維持される。

【0111】

音響 E C M ヒドロゲルは、投与の前に例えば約 4℃または約室温に維持されてもよい。一実施形態では、音響 E C M ヒドロゲルは、例えば 4℃から 37℃未満または 4℃から 25℃の温度で投与することができる。一実施形態では、音響 E C M ヒドロゲルは、37℃未満の温度で投与される。ゲルとして音響 E C M ヒドロゲルの有効量が、次に利用される。音響 E C M ヒドロゲルは対象の組織でゲルとして残り、それは概ね 37℃の温度である。一実施形態では、音響 E C M ヒドロゲルのゲルからゾルへの転移は約 37℃であり、そのため、ヒドロゲルは体温で十分に粘性であるので粘膜下クッションとして使用することができる。

10

【0112】

一部の実施形態では、ヒドロゲル中の E C M 濃度は 25 mg / ml から約 200 mg / ml、例えば E C M ヒドロゲルは 25 mg / ml から約 100 mg / ml である。他の実施形態では、ヒドロゲル中の E C M 濃度は約 50 から約 150 mg / ml、例えば約 75 から約 125 mg / ml、例えば約 75、80、85、90、95、100、105、110、115、120 または 125 mg / ml である。具体的な非限定的な例では、ヒドロゲル中の E C M 濃度は約 100 mg / ml である。

20

【0113】

音響 E C M ヒドロゲルは室温、冷温（例えば約 4℃）または凍結温度（例えば、約 -20℃）で、凍結乾燥形で提供することができ、対象の目的の解剖学的領域への投与の直前に復元することができる。

【0114】

開示される方法は、ヒトおよび獣医学的対象を含む任意の対象で有用である。対象は、任意の年齢であってよい。対象は、成体または幼若体であってよい。一実施形態では、音響 E C M ヒドロゲルを含む組成物は、クッションを形成するために臓器の標的組織に注射され、それは次に必要に応じて切除手術などの内視鏡的外科手術を受ける。E C M は、処置される対象と同じ種に由来することができるか、異なる種に由来することができる。一部の実施形態では、対象はヒトであり、音響 E C M ヒドロゲルはヒトまたはブタの E C M に由来する。他の実施形態では、E C M ヒドロゲルは、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマまたはウシに由来する。音響 E C M は、市販の供与源に由来してもよい。音響 E C M ヒドロゲルは、一部の実施形態では、任意の哺乳動物の組織、例えば限定されずにブタまたはヒトの組織に由来することができ、一部の非限定的な例では、膀胱、小腸または食道であってよい。任意の供与源組織に由来する上で開示される音響 E C M ヒドロゲルのいずれも、粘膜下クッションとしておよび／または開示される方法のいずれでも使用することができる。音響 E C M ヒドロゲルは、食道音響 E C M ヒドロゲルまたは膀胱音響 E C M ヒドロゲルであってよい。

30

【0115】

開示される方法は対象の腸管の臓器の領域からの固有筋層から粘膜および粘膜下層を切開する注射を必要とするので、侵襲的である。一部の実施形態では、音響 E C M ヒドロゲルは、食道などの胃腸管の臓器などの臓器の表面に付与されない。開示される方法は食道で使用するができるが、他の組織で使用することもできる。

40

【0116】

本明細書に開示される方法のいずれも、対象の臓器の中に音響 E C M ヒドロゲルを含む医薬組成物を粘膜下に注射して、臓器の領域の粘膜下層と下にある固有筋層の間でクッションを形成することを含むことができる。好適な音響 E C M ヒドロゲルが上で開示される。音響 E C M ヒドロゲルはゲル化し、下にある固有筋層から粘膜および粘膜下層を切開し、対象の臓器の領域で炎症を阻害する。ゲルとしての音響 E C M ヒドロゲルは、内視鏡的に

50

、またはカテーテルによって投与することができる。一部の実施形態では、臓器は食道、結腸、胃、盲腸、結腸、S字結腸、直腸、小腸または大腸である。ゲルまたはゾルとしての音響ECMヒドロゲルも、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。さらなる実施形態では、音響ECMヒドロゲルは、膀胱、小腸粘膜下、食道、気管、肝臓または真皮の音響ECMヒドロゲルであってよい。一部の実施形態では、ECMはヒト組織に由来することができる。他の実施形態では、ECMはブタの組織に由来することができる。

【0117】

一部の実施形態では、切除手術は、内視鏡的粘膜切除術または食道の内視鏡的粘膜下層剥離術であり、本方法は、食道から食道癌または腺癌を切開する方法を含む。さらなる実施形態では、本方法は、形成異常を有する患者の食道から粘膜および粘膜下層を切開することを含む。さらなる実施形態では、本方法は、バレット食道を有する対象の食道から粘膜および粘膜下層を切開することを含む。

10

【0118】

一部の実施形態では、切除手術は、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。さらなる実施形態では、臓器は、胃、小腸または大腸であり、方法は、結腸からポリープ、癌腫または腺癌を切開する方法を含む。さらなる実施形態では、本方法は、形成異常を有する患者の臓器から粘膜および粘膜下層を切開することを含む。具体的な非限定的な例では、本方法は、結腸からポリープまたは癌腫を切開することを含む。

【0119】

本方法は、クッション上で内視鏡的切除手術を実行することを含むこともできる。一部の実施形態では、本方法は、ヒドロゲルが下にある食道の固有筋層の上で保持され、粘膜および粘膜下層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ことを含む。一部の非限定的な例では、下にある固有筋層の上で保持されるヒドロゲルクッションの一部は、食道において炎症誘発性マクロファージの活性化を下方制御する。

20

【0120】

本開示は、以下の非限定的な実施例によって例示される。

【実施例】

【0121】

現在、ECMからヒドロゲルを生成するための方法は、酸性溶液中の酸性プロテアーゼによるECM材料の消化 (Feyetes, Biomaterials 29(11) (2008) 1630-7; Voytik-Harbin, Tissue Engineering 4(2) (1998) 157-174)、ECMフォームを生成するα-アミラーゼ消化の使用 (Kommuller et al., JoVE (Journal of Visualized Experiments) (122) (2017) e55436); またはカオトロピック抽出緩衝液および手間がかかる透析手術の使用 (Uriel, Tissue Eng Part C Methods 15(3) (2009) 309-21; Uriel, Biomaterials 29(27) (2008) 3712-9) を含む。そのような方法によって作製されるECMヒドロゲルはタンパク質分解および変性を必然的に受け、それらはECM分子および組織特異的ECM構成要素の総体の生物活性を弱める可能性がある。そのうえ、ECMヒドロゲルを生成するための酵素ベースの方法は、ECM構成要素の十分な可溶化を達成するために24~72時間に及ぶ長いインキュベーション時間を必要とし、消化のために外因性酵素の添加を必要とする (Saldin et al., Acta Biomater 49 (2017) 1-15; Spang et al., Acta biomaterialia 68 (2018) 1-14)。酵素消化を使用して調製されるECMヒドロゲルは、限られた濃度依存的な流動特性によっても妨げられる (上記、Saldin et al., 2017)。ECMヒドロゲルの完全な臨床能力を実現するために、酸性またはアルカリ性の溶液も、プロテアーゼ消化も化学抽出および透析も使わずにECMヒドロゲルを速やかに形成することができる、基本的に異なるアプローチが開発された。

30

40

【0122】

超音波キャビテーションを使用して音響ECMヒドロゲルを生成するための方法、ならびにこれらの音響ECMヒドロゲルの粘弾特性、細胞適合性および生物活性の特徴付けが開

50

示される。一部の実施形態では、出発材料として粉碎されたECMを使用して、本方法は中性緩衝食塩水溶液でのECMの再懸濁と、続く20kHzの超音波周波数を使用した可溶化を含む。ECM溶液の急速ゲル化は、ECM溶液の温度を25℃未満の温度に下げることによって誘導することができる。ECM濃度ならびに超音波処理の振幅および時間を調整することによって、ゲル化時間およびECMゲル特性を容易に調整することができる。重合すると、ECMゲルは4℃から37℃に及ぶ温度で安定である。さらに、この方法を使用して調製されるECMヒドロゲルは生体適合性であり、下流の構成的組織リモデリングを助長するM2様のリモデリング促進マクロファージ表現型を促進することが可能である (Hussey et al., Nature Reviews Materials, 3:159-173 (2018))。これらの方法は、異なる特性を有するヒドロゲルを生成する伝統的な酵素的方法と比較して、音響ECMヒドロゲルの大規模製造のための利点を提供する。現在開示される方法によって生成される音響ECMヒドロゲルは、組織工学および再生医療ベースの臨床適用で使用する事ができる。

10

【0123】

(実施例1)

材料および方法

真皮ECMの調製：真皮ECMは、以前に記載された通りに調製された (Reing JE, et al. Biomaterials. 2010; 31(33):8626-33)。簡潔には、全層皮膚を市場重量 (約110kg) のブタ (Tissue Source Inc.) から採取し、皮下脂肪および表皮を機械的剥離によって除去した。この組織を次に0.25%トリプシン (Thermo Fisher Scientific) で6時間、70%エタノールで10時間、3% H_2O_2 で15分間、0.26%EDTA/0.69%トリス中の1%Triton X-100 (Sigma-Aldrich) で6時間、溶液を交換してさらに16時間、および0.1%過酢酸/4%エタノール (Rochester Midland) で2時間処理した。最終ステップの後、各化学物質交換の間に水とリン酸緩衝食塩水 (PBS) 洗浄で交互に水洗浄を実行した。全ての化学曝露は、300rpmのオービタル振盪機の上において攪拌下で実行した。真皮ECMを次に凍結乾燥し、#60メッシュスクリーンでワイリーミルを使用して微粒子に微粉碎した。

20

【0124】

膀胱マトリックス (UBM) の調製：UBMは、以前に記載された通りに調製した (Mase VJ, et al. Orthopedics. 2010; 33(7):511)。市場重量の動物からのブタ膀胱は、Tissue Source, LLCから獲得した。簡潔には、漿膜層、外筋層、粘膜下層および粘膜筋板層を機械的に除去した。脱イオン水で洗浄することによって、粘膜の内腔尿路上皮細胞を基底膜から解離させた。残りの組織は粘膜の基底膜および下位粘膜固有層からなり、4%エタノールと0.1%過酢酸中での300rpmで2時間の攪拌によって非細胞化させた。組織は、次にPBSおよび無菌水で広く水洗した。UBMを次に凍結乾燥し、#60メッシュスクリーンでワイリーミルを使用して微粒子に微粉碎した。

30

【0125】

小腸粘膜下層 (SIS) の調製：SISは、以前に記載された通りに調製した (Badylak SF, et al. J Surg Res. 1989; 47(1):74-80)。簡潔には、空腸を6カ月齢の市場重量 (約110から約120kg) のブタから採取し、縦に裂いた。粘膜の表層を機械的に除去した。同様に、漿膜層および外筋層を機械的に除去し、粘膜の粘膜下層および基底部分を残した。組織の非細胞化および消毒は、4%エタノールと0.1%過酢酸中での300rpmで2時間の攪拌によって完了した。組織は、次にPBSおよび無菌水で広く水洗した。SISを次に凍結乾燥し、#60メッシュスクリーンでワイリーミルを使用して微粒子に微粉碎した。

40

【0126】

食道ECMの調製：食道ECMは、以前に記載した通りに調製した (Keane TJ, et al. Tissue Eng Part A. 2015;21(17-18):2293-300)。簡潔には、食道EC

50

M (e ECM) は、外筋層から粘膜および粘膜下層を機械的に分離し、粘膜層をロッカープレートの上で1%トリプシン/0.05% EDTA (Invitrogen、Carlsbad、CA) に37℃で1時間、脱イオン水に15分間、1Mスクロース (Fisher Scientific、Pittsburgh、PA) に30分間、脱イオン水に30分間、3.0% Triton X-100 (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) に48時間、脱イオン水に15分間、リン酸緩衝食塩水 (PBS; Fisher Scientific) に15分間、10%デオキシコール酸 (Sigma-Aldrich) に4時間、脱イオン水に30分間、4.0%エタノール中の0.1%過酢酸 (Rochester Midland Corp.、Rochester、NY) に4時間、ロッカープレートの上で100 U/mL DNアーゼ (Invitrogen) に2時間さらし、続いてPBS、脱イオン水、PBSおよび脱イオン水で15分間洗浄することによって調製された。全ての洗浄液は、振盪機プレートの上で300 rpmで攪拌した。食道ECMを次に凍結乾燥し、#60メッシュスクリーンでワイリーミルを使用して微粒子に微粉碎した。

10

【0127】

ECMの超音波処理：100 mgのECM粉末を15 mL円錐管中のリン酸緩衝食塩水 (PBS) に再懸濁させ、1/8"プローブを備えたFISHER BRAND (商標) モデル120 Sonic Dismembratorで超音波処理した。ECM濃度は、20~200 mg (w/v) で変化させた。再懸濁させたECMは、100%振幅の設定により、オン30秒およびオフ45秒の周期のパルスで超音波処理した。可溶性ECM溶液を生成するために、周期を6回繰り返した。この周期パルス設定は、ゲル溶液が34~40℃に及ぶ温度を維持することを確実にした。

20

【0128】

超音波処理されたECM溶液のゲル化：ECM溶液を3D型に注ぎ、温度を25℃またはそれより下に下げてゲル化を誘導した。ECMゲルを4℃で保存したか、またはフリーズドライしてその3D幾何構造を維持した凍結乾燥ECM構築物を生成した。あるいは、ECM溶液をTeflonシートの上に均一に広げ、4℃でインキュベートしてゲル化を誘導した。次にECMゲルを24時間室温でインキュベートして水を蒸発させ、超薄ECMシートをもたらした。

【0129】

ECMパテの調製：ECM粉末を25 mg/mL (w/v) PBSに再懸濁させ、前記のように超音波処理した。濃度 $\leq$ 25 mg/mLおよび4~30℃の間の温度で、可溶化ECMはパテの形になる。

30

【0130】

ECMヒドロゲル流体力学：全ての流体力学的データは、以前に記載された通り (Medberry CJ, et al. Biomaterials.2013; 34(4):1033-40) 40 mm並行プレート幾何構造を付けたレオメータ (AR2000、TA instruments、New Castle、DE) を使用して収集し、American Society for Testing and Materials (ASTM) 標準F2900-11 (再生医療で使用するヒドロゲルの特徴付けのためのガイド) を使用して分析した。ペルティエプレートを使用して温度を0.1℃内に制御した。室温 (25℃) または4℃で、ゲル前駆体を並行プレートレオメータの上へロードした。試料-プレート界面の端を密封するために、鉱油を使用して試料蒸発を最小にした。

40

【0131】

走査電子顕微鏡法：ECMヒドロゲルの表面トポロジーを検査するために、走査電子顕微鏡写真をとった。試料をPBS中の冷たい2.5% (v/v) グルタルアルデヒド (Electron Microscopy Sciences、Hatfield、PA) で少なくとも24時間固定し、その後PBSでの3回の洗浄が続いた。固定された試料は、次に段階系列のアルコール (30、50、70、90、100%) を各々15分間使用し、その後ヘキサメチレンジアミン (Fisher) 中で15分間で脱水し、その後空気乾

50

燥が続いた。乾燥試料は、Sputter Coater 108 Auto (Cressington Scientific Instruments, Watford, UK) を使用して金／パラジウム合金の3.5 nm層でスパッタコーティングし、JEOL JSM 6330 f 走査電子顕微鏡 (JEOL, Peabody, MA) により100×および500×の倍率で画像化した。

【0132】

細胞適合性アッセイ：3T3 線維芽細胞をUBM、SISまたは真皮から調製されたECMヒドロゲルでコーティングした96ウェルプレートの上に播種した。コーティングしていないウェルを対照として使用した。10%ウシ胎児血清および1%ペニシリンーストレプトマイシンを加用したダルベッコの改変最小必須培地で細胞を培養した。細胞播種から24時間後に、製造業者のプロトコールによって細胞の生存能力を評価するために、VYBRANT (登録商標) MTT細胞増殖アッセイキット (Thermo Fisher) を使用した。変換された色素の吸光度は、540 nmの波長で測定した。

10

【0133】

止血アッセイ。リーホワイต์凝固アッセイを使用した。新鮮な全血を試験管に収集し、凝固が観察されるまで管を繰り返して傾ける。

【0134】

肝臓裂傷モデル：6～8週齢SDラットに、イソフルラン（1～3%）で麻酔をかけた。動物は酸素中の1.5～2.5%イソフルランにより手術水準の麻酔に維持し、腹部横臥位の位置にした。滅菌機器を使用して小さい切開を設け、その下の2 cm正中開腹を実行して肝臓を露出させた。刃の2 mmが露出するようにケリー鉗子に#11メスの刃を置くことによって、肝臓の腹側表面に深さ2 mmおよび長さ5 mmの切開を設けた。創傷は3秒間出血させ、次に無菌のガーゼできれいに拭き取った。試験品を次に欠損部位に置き、凝固時間を記録した。

20

【0135】

マクロファージ活性化：マウスの骨髄を、6から8週齢B6マウスから採取した。骨髄から採取された細胞を洗浄して 2×10^6 細胞/mLで平板培養し、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) の存在下で7日間マクロファージに分化させ、48時間おきに培地を完全に交換した。次にマクロファージを以下の1つで24時間活性化した：1) MIFN γ + LPS表現型 (M1様) を促進する20 ng/mLインターフェロン- γ (IFN γ) および100 ng/mLリポ多糖 (LPS) (Affymetrix eBioscience, Santa Clara, CA; Sigma Aldrich); 2) M IL-4表現型 (M2様) を促進する20 ng/mLインターロイキン (IL) -4 (Invitrogen); または3) 2 mg/mL UBM音響ゲル。37℃のインキュベーション期間の後、細胞を無菌のPBSで洗浄し、免疫標識のために2%パラホルムアルデヒド (PFA) で細胞を固定した。非特異的結合を阻止するために、PBS、0.1% Triton-X、0.1% Tween (登録商標) -20、4%ヤギ血清および2%ウシ血清アルブミンで構成されるブロッキング溶液の中で、細胞を室温で1時間インキュベートした。ブロッキング緩衝液を次に除去し、細胞を一次抗体とインキュベートした。細胞を4℃で16時間インキュベートし、一次抗体を除去し、細胞をPBSで洗浄した。蛍光体コンジュゲート二次抗体の溶液を室温で1時間ウェルに加えた。抗体を次に除去し、細胞をPBSで洗浄し、核はDAPIを使用して対比染色した。標準化された曝露時間 (陽性対照) を確立するためにサイトカイン活性化マクロファージを使用し、それはその後群全体で一定に保持された。

30

40

【0136】

(実施例2)

結果

細胞外マトリックス (ECM) からヒドロゲルを調製するための方法が開発された。出発材料として非細胞化組織を使用して、超音波処理技術は、真皮、膀胱マトリックス (UBM) および小腸粘膜下層 (SIS) を含む多くの組織特異的ECMに適用することができ

50

る。このアプローチは、中性緩衝食塩水溶液中の粉碎されたECMの再懸濁と、その後の例えば20～100%に及ぶ振幅を使用する20kHzの超音波周波数を使用したECM可溶化を含む（図1）。60秒間の超音波処理の後、ECM溶液の温度を37℃未満に下げることによってECM溶液の急速ゲル化が誘導される（図4、図5、図6）。流体力学的評価からの結果は、この方法を使用して、25mg/mlから150mg/mlに及ぶECM濃度を使用してECMヒドロゲルを調製することができることを示す（図7、図8）。重合すると、ECMゲルは室温で安定し、カスタマイズ可能な3D幾何構造に順応することができる（図2）。超音波処理によって調製されるECMヒドロゲルは、*in vitro*培養細胞のための基質として使用したとき、細胞適合性であることが示された（図9、図13）。ゲルの走査電子顕微鏡写真は、高密度線維ネットワークを示す（図3）。さらに、ECMヒドロゲルは、止血を助けるために患者の解剖学的部位に付与することができる止血剤として使用することができる（図10、図11）。結果は、添付の図で提供される。

10

【0137】

（実施例3）

実施例4～7のための材料および方法

ECM生体骨格の調製：ブタの真皮ECM（dECM）を、以前に記載された通りに調製した（Reing et al., *Biomaterials* 31(33) (2010) 8626-33）。簡潔には、全層皮膚を市場重量（約110kg）のブタから採取し、皮下脂肪および表皮を機械的剥離によって除去した。この組織を次に0.25%トリプシン（Thermo Fisher Scientific）で6時間、70%エタノールで10時間、3% H_2O_2 で15分間、0.26%EDTA／0.69%トリス中の1%Triton X-100（Sigma-Aldrich）で6時間、溶液を交換してさらに16時間、および0.1%過酢酸／4%エタノール（Rochester Midland）で2時間処理した。最終ステップの後、各化学物質交換の間に水とリン酸緩衝食塩水（PBS）洗浄で交互に水洗浄を実行した。全ての化学曝露は、300rpmのオービタル振盪機の上において攪拌下で実行した。真皮ECMを次に凍結乾燥し、#40メッシュスクリーンでワイリーミルを使用して微粒子に微粉碎した。

20

【0138】

ブタの膀胱マトリックス（UBM）を、以前に記載された通りに調製した（Mase et al., *Orthopedics* 33(7):511 (2010)）。簡潔には、漿膜層、外筋層、粘膜下層および粘膜筋板層を機械的に除去した。脱イオン水で洗浄することによって、粘膜の内腔尿路上皮細胞を基底膜から解離させた。残りの組織は粘膜の基底膜および下位粘膜固有層からなり、4%エタノールと0.1%過酢酸中での300rpmで2時間の攪拌によって非細胞化させた。組織は、次にPBSおよび無菌水で広く水洗した。UBMを次に凍結乾燥し、#40メッシュスクリーンでワイリーミルを使用して微粒子に微粉碎した。

30

【0139】

ブタの小腸粘膜下層（SIS）を、以前に記載された通りに調製した（Badylak et al., *J Surg Res* 47(1) (1989) 74-80）。簡潔には、空腸を6カ月齢の市場重量（約110から約120kg）のブタから採取し、縦に裂いた。粘膜の表在層を機械的に除去した。同様に、漿膜層および外筋層を機械的に除去し、粘膜の粘膜下層および基底部分を残した。組織の非細胞化および消毒は、4%エタノールと0.1%過酢酸中での300rpmで2時間の攪拌によって完了した。組織は、次にPBSおよび無菌水で広く水洗した。SISを次に凍結乾燥し、#40メッシュスクリーンでワイリーミルを使用して微粒子に微粉碎した。

40

【0140】

ブタの食道ECMを、以前に記載された通りに調製した（Keane et al., *Tissue Eng Part A* 21(17-18) (2015) 2293-300）。簡潔には、食道ECM（eECM）は、外筋層から粘膜および粘膜下層を機械的に分離し、粘膜層をロッカープレートの上で1%トリプシン／0.05%EDTA（Invitrogen、Carlsbad、

50

CA) に 37℃ で 1 時間、脱イオン水に 15 分間、1 M スクロース (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) に 30 分間、脱イオン水に 30 分間、3.0% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) に 48 時間、脱イオン水に 15 分間、リン酸緩衝食塩水 (PBS; Fisher Scientific) に 15 分間、10% デオキシコール酸 (Sigma-Aldrich) に 4 時間、脱イオン水に 30 分間、4.0% エタノール中の 0.1% 過酢酸 (Rochester Midland Corp., Rochester, NY) に 4 時間、ロッカープレートの上で 100 U/mL DNアーゼ (Invitrogen) に 2 時間さらし、続いて PBS、脱イオン水、PBS および脱イオン水で 15 分間洗浄することによって調製した。全ての洗浄液は、振盪機プレートの上で 300 rpm で攪拌した。eECM を次に凍結乾燥し、#40 メッシュスクリーンでワイリーミルを使用して微粒子に微粉砕した。

10

【0141】

ブタの気管 ECM (tECM) は、軽微な変更を加えて以前に記載された通りに調製した (Lange et al., Journal of tissue engineering and regenerative medicine 11(3) (2017) 800-811)。簡潔には、陰圧真空周期 (15 周期、-0.95 kPa 最大真空) により 0.25% Triton X-100 + 0.25% デオキシコール酸ナトリウムを含有する洗浄剤溶液中で気管を 30 分間インキュベートし、次に新鮮な洗浄剤溶液に一晩浸漬した。洗浄剤溶液を 2 日目および 3 日目に無菌の DI 水と、4 日目に水の中の 2000 KU/mL DNアーゼの溶液と、5 日目に無菌の DI 水と交換して、このプロセスを毎日繰り返した。この周期は合計 10 日間の真空周期の間に 1 回繰り返す、その後 15% 過酢酸 + 4% エタノール中で一晩の滅菌、ならびに無菌の PBS 中の洗浄および保存が続いた。気管 ECM を次に凍結乾燥し、#40 メッシュスクリーンでワイリーミルを使用して微粒子に微粉砕した。

20

【0142】

ブタの肝臓 ECM (LECM) を、以前に記載された通りに調製した (Loneker et al., Journal of Biomedical Materials Research Part A 104(4) (2016) 957-965)。肝臓は、市場重量ブタ (110~130 kg) から採取した。組織をメスで 0.5 cm³ の断片に切断し、オービタル振盪機の上で機械的攪拌により脱イオン水中で 15 分間の洗浄を 3 回行った。次に細胞溶解を助けるために切片を静かに揉み、0.02% トリプシン / 0.05% EGTA に 37℃ で 2 時間浸漬した。組織をタイプ 1 の水で水洗し、揉みを繰り返し、その後 3% Triton X-100 中で 18~24 時間の肝臓切片の機械的攪拌が続いた。細胞物質の全ての可視的残存物が除去されるまで、水洗を繰り返した。処理の後、肝臓 ECM を 0.1% 過酢酸の溶液に浸漬し、その後 pH 7.4 でタイプ 1 の水または PBS で水洗を繰り返した。肝臓 ECM を次に凍結乾燥し、#40 メッシュスクリーンでワイリーミルを使用して微粒子に微粉砕した。

30

【0143】

超音波キャビテーションによる ECM の可溶化：粉砕された ECM を 50 mL 円錐管中の 1×リン酸緩衝食塩水 (PBS) の 10 mL に再懸濁させ、1/8" プロブを備えた FISHER BRAND (商標) モデル 120 Sonic Dismembrator で超音波処理した。ECM 濃度は 25 から 100 mg/mL (w/v) で変化させ、超音波処理時間は 20%~100% に及ぶ振幅において 30~500 秒で変化させた。実験セットアップの例示を、図 14 に示す。

40

【0144】

コラーゲンおよび sGAG 定量化：粉砕された dECM (100 mg/mL) を超音波処理し、試料を 10,000×g で 30 分間遠心分離して不溶性 ECM 構成要素を圧縮した。可溶化 ECM 構成要素を含有する透明な上澄みを、新規の管へ移した。上澄み溶液のコラーゲン濃度は、製造業者の推奨プロトコールに従って Sircol アッセイキット (Biocolor Ltd., UK) で決定した。硫酸グリコサミノグリカン (sGAG) 濃度は、製造業者の推奨プロトコールに従って Blyscan 硫酸グリコサミノグリカン

50

アッセイキット (Biocolor Ltd.、UK) を使用して決定した。

【0145】

ゲル化アッセイ：ゲル化時間を測定するために、試験管反転方法 (Quin et al., Frontiers in chemistry 6 (2018); El-Fiqi et al., Acta biomaterialia 9 (12) (2013) 9508-9521) を使用した。試料材料 (25、50または100mg/ml) の超音波処理の直後に、0.5mlの試料を試験管に移し、4℃または25℃の定温でインキュベートした。管を逆にするによって、試料の流動性を毎分観察した。試料の流動が停止した時間をゲル化時間としてとり、その値を記録した。

【0146】

走査電子顕微鏡法：dECMヒドロゲルの表面トポロジーを検査するために、50および100mg/mlで走査電子顕微鏡写真をとった。試料をPBS中の冷たい2.5% (v/v) グルタルアルデヒド (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA) で少なくとも24時間固定し、その後PBSでの3回の洗浄が続いた。固定された試料は、次に段階系列のアルコール (30、50、70、90、100%) を各々15分間使用し、その後ヘキサメチレンジアミン中で15分間脱水し、その後空気乾燥が続いた。乾燥試料は、Sputter Coater 108 Auto (Cressington Scientific Instruments, Watford, UK) を使用して金/パラジウム合金の3.5nm層でスパッタコーティングし、JEOL JSM6330f走査電子顕微鏡 (JEOL, Peabody, MA) により画像化した。

【0147】

粘弾性測定：全ての流体力学的データは、以前に記載された通り (Medberry, et al., Biomaterials 34(4) (2013) 1033-40) 40mm並行プレート幾何構造を付けたレオメータ (AR2000ex、TA Instruments, New Castle, DE) を使用して収集し、American Society for Testing and Materials (ASTM) 標準F2900-11 (再生医療で 사용되는ヒドロゲルの特徴付けのためのガイド) を使用して分析した。試験した温度プロファイルの各々について試験前の1時間、各組織タイプ (dECMおよびeECM、100mg/ml) の試料を開始温度 (4、25または37℃) にした。開始温度に設定した40mm並行プレート幾何構造を付けたAR-2000exレオメータに試料をロードした。試料-プレート界面の端を密封するために鉱油を使用して、試験中の蒸発を最小にした。超音波処理されたヒドロゲルのゲル化カインेटクスを測定するために、1rad/秒の周波数の小さな0.5%振動張力を加え、試験した温度プロファイルによって温度を速やかに変更する (37または4℃) ことによって、振動時間スイープを1時間実行した。データはTriosソフトウェア (TA Instruments) を使用してエクスポートし、Prism v8ソフトウェア (GraphPad, San Diego, CA) を使用して分析した。「平均貯蔵弾性率」は、G'プラトーンを表している、60分間の試験の最後の10分間で平均した貯蔵弾性率G'であった。50%ゲル化までの時間は、平均貯蔵弾性率の50%までの時間として決定した。

【0148】

in vitro代謝アッセイ：3T3線維芽細胞をUBM、SISまたはdECMから調製された100mg/ml ECMヒドロゲルでコーティングした96ウェルプレートの上に播種した。コーティングしてないウェルを対照として使用した。10%ウシ胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシンを加用したダルベッコの改変最小必須培地で細胞を培養した。細胞播種から24時間後に、製造業者のプロトコールによって細胞の生存能力を評価するために、Vybrant (登録商標) MTT細胞増殖アッセイキット (Thermo Fisher) を使用した。変換された色素の吸光度は、540nmの波長で測定した。

【0149】

in vitro細胞適合性：一次ウマ間葉性幹細胞を以前に記載された通りに単離した

(Adams et al., Equine veterinary journal 45(3) (2013) 372-375)。細胞をUBMまたはdECMから調製された100mg/mL ECMヒドロゲルでコーティングした6ウェルプレートの上に播種した。コーティングしてないウェルを対照として使用した。播種の24時間後に、in vitro細胞適合性を、製造業者の指示に従ってLIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen)を使用して決定した。3つの技術的反復にわたって、5つの200×視野について画像をとった。CellProfilerを使用して、パーセント生死細胞を定量化した。200×倍率で5つのランダムな視野を捕捉するZeiss Axiovert顕微鏡で画像をとった。生死細胞の百分率の定量化は、カスタム仕様のCellProfilerパイプラインを使用して完了した。

10

【0150】

in vitroマクロファージ応答：マウスの骨髄細胞を、6から8週齢B6マウスから採取した。骨髄から採取された細胞を洗浄して 2×10^6 細胞/mLで平板培養し、マクロファージコロニー刺激因子(MCSF)の存在下で7日間マクロファージに分化させ、48時間おきに培地を完全に交換した。次にマクロファージを以下の1つで24時間活性化した：1) MIFN γ +LPS表現型(M1様)を促進する20ng/mLインターフェロン- γ (IFN γ)および100ng/mLリポ多糖(LPS)(Affymetrix eBioscience, Santa Clara, CA; Sigma Aldrich); 2) MIL-4表現型(M2様)を促進する20ng/mLインターロイキン(IL)-4(Invitrogen); 3) 2mg/mL dECMヒドロゲル、または4) 2mg/mL eECMヒドロゲル。37℃で24時間のインキュベーション期間の後、細胞を無菌のPBSで洗浄し、免疫標識のために2%パラホルムアルデヒド(PFA)で細胞を固定した。非特異的結合を阻止するために、PBS、0.1% Triton-X、0.1% Tween-20、4%ヤギ血清および2%ウシ血清アルブミンで構成されるブロッキング溶液の中で、細胞を室温で1時間インキュベートした。ブロッキング緩衝液を次に除去し、細胞を一次抗体とインキュベートした。細胞を4℃で16時間インキュベートし、一次抗体を除去し、細胞をPBSで洗浄した。蛍光体コンジュゲート二次抗体の溶液を室温で1時間ウェルに加えた。抗体を次に除去し、細胞をPBSで洗浄し、核はDAPIを使用して対比染色した。残りの処理群を画像化するために標準化された曝露時間(陽性対照)を確立するために、サイトカイン活性化マクロファージ(陽性対照)を使用した。

20

30

【0151】

統計的方法：全ての分析は、 $p < 0.05$ と規定された有意性でPrismソフトウェア(GraphPad Software Inc)を使用して実行した。可溶化コラーゲンおよびsGAGの結果は、ANOVAおよびペアワイズ比較を事後のチューキーの多重比較検定と使用して分析した。ゲル化時間の結果は、ANOVAを事後のチューキーの多重比較検定と使用して分析した。単一の比較のために、スチューデントの対応のないt検定を実行した。流体力学的データは、独立変数温度およびECMタイプならびに従属変数貯蔵弾性率のために二元配置ANOVAによって分析し、温度の主効果のためには事後のチューキーの多重比較検定で分析した。dECMおよびeECMのゲル化時間を比較するために、スチューデントの対応のないt検定を実行した。

40

【0152】

(実施例4)

コラーゲンおよびsGAGの可溶化

コラーゲンおよび硫酸化グリコサミノグリカン(sGAG)の可溶化に及ぼす超音波処理振幅の影響を評価するために、粉碎されたdECMを20%、40%、60%、80%および100%振幅で300秒間超音波処理した。結果は、超音波処理振幅の増加に伴う可溶化コラーゲンの有意な増加を示した(図15A)。対照的に、超音波処理振幅は、sGAGの可溶化に有意な影響を及ぼさなかった(図15B)。コラーゲンsGAGの可溶化に及ぼす超音波処理時間の影響を評価するために、粉碎されたdECMを30から500

50

秒に及ぶ時間 100% 振幅で超音波処理した。結果は、超音波処理時間の増加に伴う可溶化コラーゲンの有意な増加を示した (図 15 C)。対照的に、超音波処理時間は、s G A G の可溶化に有意な影響を及ぼさなかった (図 15 D)。

【0153】

(実施例 5)

ゲル化カイネティクスおよび定性的調査

25、50 または 100 mg/ml 濃度で調製された d E C M ヒドロゲルのゲル化カイネティクスに及ぼす超音波処理の時間および振幅の影響を計算した。結果は、試験した全ての濃度について、25℃と比較して 4℃での前ゲル溶液のインキュベーションが、ゲルを形成するために必要な時間を有意に低減したことを示した (図 16 A)。さらに、4℃でインキュベートしたとき、100 mg/ml 濃度は 25 mg/ml 濃度と比較してゲル化時間の有意な短縮を示した (図 16 A)。試験した全ての濃度で、20 または 40% から 80 または 100% 振幅へ超音波処理振幅を増加させることは、ゲル化時間の有意な短縮をもたらした (図 16 B)。40 または 100% 振幅で超音波処理された 25 および 100 mg/ml 濃度の間で、ゲル化時間における有意差が観察された (図 16 B)。100 mg/ml 濃度で調製された U B M、S I S、e E C M、t E C M および L E C M のために、ゲル化カイネティクスが決定された (図 16 C)。結果は、試験した全ての E C M 組織タイプについて、25℃でのインキュベーションと比較して 4℃での前ゲル溶液のインキュベーションが、ゲルを形成するために必要な時間を有意に低減したことを示した。さらに、e E C M ヒドロゲルは、全ての他の E C M 組織タイプと比較して、4℃で有意に低減されたゲル化時間を示した。25℃でインキュベートしたとき、e E C M は t E C M および L E C M と比較して有意に低減されたゲル化時間を示した。50 mg/ml および 100 mg/ml d E C M ヒドロゲルの走査電子顕微鏡写真は、組織化されたコラーゲンフィブリルによる高密度フィブリルネットワークを示した (図 3)。

【0154】

(実施例 6)

流体力学的測定

E C M ヒドロゲル (d E C M および e E C M、100 mg/ml) の 2 つの組織タイプを、以下の 3 つの温度プロファイルで試験した: 1) 4 → 37℃、2) 25 → 37℃、および 3) 37 → 4℃ (図 17 A)。E C M ヒドロゲルは、温度を低下させた場合 (37 → 4℃)、ゲル化の S 字状増加 (貯蔵弾性率、 G') を示した。ヒドロゲルは、S 字状のゲル化曲線のプラトーで貯蔵弾性率 $G' >$ 損失弾性率 G'' を示した。温度を増加させた場合 (4 → 37℃ または 25 → 37℃)、ヒドロゲルの剛性は経時的に維持された ($G' > G''$) (図 17 A)。最終温度を増加させた場合 4 → 37℃ (234.4 ± 215.7 Pa) ($p = 0.04$) または 25 → 37℃ (245.8 ± 94.5 Pa) ($p = 0.04$) と比較して、最終温度を速やかに低下させた場合 37 → 4℃ (3447.3 ± 3340.1 Pa)、d E C M ヒドロゲルで貯蔵弾性率 G' は増加した (図 17 B)。最終温度を速やかに低下させた場合 37 → 4℃ (2237.4 ± 227.1 Pa)、4 → 37℃ (733.0 ± 363.7 Pa) または 25 → 37℃ (624.1 ± 133.5 Pa) と比較して e E C M の剛性も増加傾向を示したが、有意でなかった ($p = 0.4$) (図 17 B)。d E C M および e E C M について 37 → 4℃の S 字状のゲル化プロファイルのためにゲル化時間 (50% ゲル化までの時間) を決定した (図 18 C)。スチューデントの対応のない t 検定により、ゲル化時間は d E C M (2.5 ± 0.5 分) と比較して e E C M (0.5 ± 0.4 分) でより短かった ($p = 0.006$)。ゲル化が維持されたので、37℃へ上げた温度プロファイルについてはゲル化時間を決定しなかった。

【0155】

(実施例 7)

i n v i t r o 細胞応答

M T T 細胞増殖アッセイは、d E C M、U B M または S I S から調製された E C M ヒドロゲルが N I H 3 T 3 線維芽細胞に細胞傷害性でないことを示した (図 18 A)。同様に

、生／死アッセイからの結果は、d E C MまたはU B Mから調製されたE C Mヒドロゲルに播種されたとき、一次ウマ間葉性幹細胞がほぼ100%の生存能力を保持したことを示した(図18B、C)。これらの処理の間で、および組織培養プラスチック(対照)の上で24時間培養された細胞と比較したとき、増殖および生存能力において差がなかった(図18B、C)。ペプシン消化方法を使用して調製されたE C Mヒドロゲルは、M2様マクロファージ表現型を促進することが以前に示された(Huleihel et al., "Macrophage phenotype in response to ECM bioscaffolds," *Seminars in immunology*, Elsevier, 2017, pp. 2-13; Sicari et al., *Biomaterials* 35(30) (2014) 8605-8612; Dziki et al., *Journal of biomedical materials research Part A* 105(1) (2017) 138-147)。超音波キャビテーション方法を使用して調製されたE C Mヒドロゲルがマクロファージに対して類似の効果を示すかどうか評価するために、一次マウス骨髄由来マクロファージを、M1様マクロファージ表現型を誘導するためにインターフェロン- γ (I F N - γ) およびリポ多糖(L P S)で、M2様表現型、d E C Mヒドロゲルまたはe E C Mヒドロゲルを誘導するためにインターロイキン-4 (I L - 4)で刺激した。全ての実験群は、均一なF4/80染色を示した。対照は、マクロファージをI F N γ / L P Sで処理したときはi N O Sの予想された増加を、およびI L - 4で処理したときはF i z z 1の増加を示した(図18B、D、E)。わずかなi N O S発現が付随するF i z z 1発現によって示されるように、d E C Mおよびe E C Mヒドロゲル処理は、I L - 4処理マクロファージに類似したM2様マクロファージ活性化を促進することが見出された(図18B、D、E)。

10

20

【0156】

したがって、超音波キャビテーションを使用して調製されたE C Mヒドロゲルのゲル化力、イネティクス、流体力学的特性ならびに細胞適合性および生物活性を評価した。本研究は超音波キャビテーション方法を開発して評価するために、主にd E C Mの使用に焦点を合わせたが、表1に要約される広範囲の非細胞化組織に由来するE C Mに超音波キャビテーション方法を適用することができることを示すために、5つの追加の供与源組織からのE C Mを選択的アッセイで使用した。

30

40

50

【表 1】

表 1: ECM 供与源組織および ECM ヒドロゲルを生成するための超音波キャビテーション方法を評価するために使用される選択アッセイの要約。評価された ECM 組織供与源は、真皮 ECM(dECM)、食道 ECM(eECM)、膀胱マトリックス(UBM)、小腸粘膜下層(SIS)、気管 ECM(tECM)および肝臓 ECM(LECM)であった。

ECM 組織タイプ	利用したアッセイ
dECM	- 可溶化アッセイ - ゲル化アッセイ - 走査電子顕微鏡法 - 流体力学的調査 - in vitro 代謝 - in vitro 細胞適合性 - in vitro マクロファージ応答
eECM	- ゲル化アッセイ - 流体力学的調査 - in vitro マクロファージ応答
UBM	- ゲル化アッセイ - in vitro 代謝アッセイ - in vitro 細胞適合性
SIS	- ゲル化アッセイ - in vitro 代謝アッセイ
tECM	ゲル化アッセイ
LECM	ゲル化アッセイ

10

20

【0157】

30

本研究では、ECM 骨格は、酸性溶液中の酸性プロテアーゼによる消化；または、ECM の分子組成に悪影響を及ぼすことができるカオトロピック抽出緩衝液および透析施術の使用の必要性なしで可溶化された。25℃またはそれ未満の温度でインキュベートしたとき、超音波処理された ECM はゲルに自己集合した。理論によって束縛されるものではないが、ゲル化はコラーゲンなどの自己集合分子の存在によるかもしれない。実際、ECM 骨格材料の超音波処理は、超音波処理の時間および振幅の増加に伴う可溶化コラーゲンのかなりの増加をもたらした。ペプシン消化を使用して調製され、25℃で液体状態を、および 37℃でゲルを維持する ECM ヒドロゲルと違って、超音波キャビテーション方法を使用して調製されたヒドロゲルは、温度を 25℃またはそれ未満に下げたときに安定したゲルを形成した。超音波処理された ECM のこの熱機械特性は、30℃未満の温度に冷却した後、ゲルを形成することが可能である加水分解されたコラーゲンで報告されたものに類似している (Tosh et al., Applied Physics Letters 84(21) (2004) 4242-4244)。しかし、ウシの腱から抽出されたコラーゲンの上で円二色性分析、原子間力顕微鏡検査および FTIR を利用した近年の研究は、コラーゲンの三重ヘリックス構造が超音波処理の影響を受けず、無傷のままであることを示した (Li et al., Sonochemistry 16(5)(2009) 605-609)。同様に、ハタ Lateo labrax japonicus の皮膚からのコラーゲンの抽出は、80% 振幅での 3 時間の超音波処理は、コラーゲン分子の構造完全性における検出可能な変化を誘導しなかったことを示した (Kim et al., Fisheries science 79(5) (2013) 849-856)。本研究では、超音波処理された ECM の走査電子顕微鏡写真は、組織化されたコラーゲンフィブリルによる高

40

50

密度線維ネットワークを示した。さらに、超音波キャビテーションを使用して生成されたECMヒドロゲルのゲル化と温度の間の逆の関係にもかかわらず、温度を増加させた場合（4→37℃または25→37℃）、ヒドロゲルの剛性は経時的に維持された（ $G' \gg G''$ ）。これらの知見は、超音波処理されたECMのゲル化過程が単にコラーゲン化学反応の生成物でなく、むしろ可溶化ECMの中の、ラミニンおよびプロテオグリカンなどの他の自己集合分子を含む様々な構成要素の間の相互作用の結果であることを示唆する。

【0158】

NIH 3T3線維芽細胞および一次ウマ間葉性幹細胞は、超音波キャビテーションを使用して生成されたECMヒドロゲルに付着して、増殖することができた。さらに、ECM媒介組織リモデリングの作用機構（複数可）は部分的に理解されているだけであるが、リモデリング部位における炎症誘発性のM1様表現型から建設的およびリモデリング誘発性M2様マクロファージ表現型への浸潤性マクロファージの活性化状態は、良好な下流側リモデリング転帰の予測因子であることが示された（Brown et al., Acta Biomater 8(3) (2012) 978-87）。本明細書に提示される結果は、超音波キャビテーションを使用して生成されるECMヒドロゲルが、M2様マクロファージ表現型を促進する能力を維持することを実証する。

10

【0159】

（実施例8）

音響ヒドロゲルのガンマ線照射

音響ヒドロゲル（100mg/mL）を、室温で20kGyガンマ線照射によって滅菌した。経時的なヒドロゲル「剛性」は、ガンマ線照射（20kGy）および非滅菌対照音響ヒドロゲル（真皮ECM 100mg/mL）について測定した。貯蔵弾性率（「剛性」）（ G' ）および損失弾性率（ G'' ）は、小さい0.5%振動張力を試料に加えることによって測定した。3つの温度プロファイルを試験した：温度は、初期の保存温度から最終温度まで速やかに上昇させた：4から37℃、25から37℃または37から4℃。（図20A）時間スイープの代表的グラフを示す。（図20B）試験の最終5分間で平均した平均貯蔵および損失弾性率を示す。

20

【0160】

音響ヒドロゲルの形成の後、ゲルをセシウム-137照射器の中に置き、室温で2065ラド/分の電離放射線に16時間さらし、20kGyの最終放射線量をもたらした。

30

【0161】

驚くべきことに、および予想外に、ガンマ線照射はゲルの形を保つ音響ヒドロゲルの能力に影響しなかった。対照的に、酵素的に生成されたECMヒドロゲルはガンマ線照射したときゲルとして留まることができず、ECMヒドロゲルのガンマ線照射プレゲルはゲル化の前にガンマ線照射したときゲルを形成することができない。

【0162】

（実施例9）

粘膜下流体クッションとしての音響ヒドロゲル

粘膜下クッションとしての使用のために評価した音響ヒドロゲルは、1グラムの真皮ECM（dECM）粉末または食道ECM（eECM）粉末（実施例3に記載される通りに調製した）を50mL円錐管の中で10mLのリン酸緩衝食塩水（PBS）で再懸濁することによって調製した。1/8"プローブを備えたFISHERBRAND（商標）モデル120 Sonic Dismembratorを使用して、試料を100%振幅で3分間超音波処理した。超音波処理の後、試料を5mLシリンジに移し、4℃でインキュベートしてゲル形成を誘導した。

40

【0163】

アセプロマジン（0.01mg/kg、SC）およびケタミン（5~11mg/kg）で麻酔を誘導し、気管内チューブを通した1~5%イソフルオランで外科水準の麻酔を維持した。手術および手術直後の期間全体で、ブタに2mL/kg/hの乳酸加リンガー液I.V.を投与した。動物の下に置いた温水再循環加熱パッドを通して、温度を制御した。

50

施術の間、心臓、呼吸数、体温および応答性などの生理的パラメータを監視する。施術を開始する前に、 25 mg/kg のセファゾリンによる抗生物質予防処置を投与する。

【0164】

管状臓器の粘膜を評価するために、ブタを背臥位に置き、Pentax EG3430K内視鏡を使用した。臓器中の参照ポイントを特定した後に、視覚コントラストを提供するために青色に染色したゲル形の音響ECMヒドロゲルのOlympus Injector force 4mm 23G針を使用した粘膜下空間への 8 mg/ml の注射によって、切除部位で粘膜および粘膜下層を下にある層から分離する。1部位につき概ね2~5mlの青色ゲルを注射する。バンドーライゲーションEMR技術を使用して、5cmの長さのために粘膜の完全な円周(100%)を除去した。EMRのために、ライゲーションバンドの付いたCook Duetteキットを使用した。次にスネアを使用して粘膜を切除した。結果は、図19A~19Cに示す。

10

【0165】

我々の発明の原理を適用することができる多くの可能な実施形態を考慮すると、例示される実施形態は本発明の例に過ぎず、本発明の範囲を限定するものと考えべきでないと認識すべきである。むしろ、本発明の範囲は以下の請求項によって規定される。したがって、これらの請求項の範囲および精神の範囲内の全てを我々は発明として請求する。

【図面】

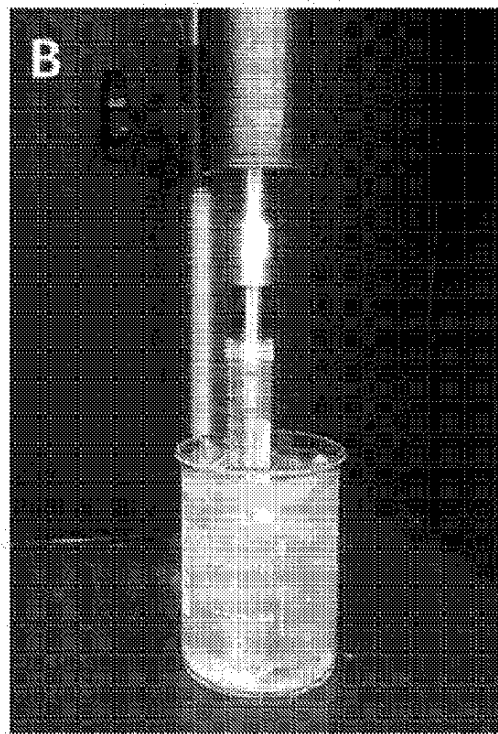
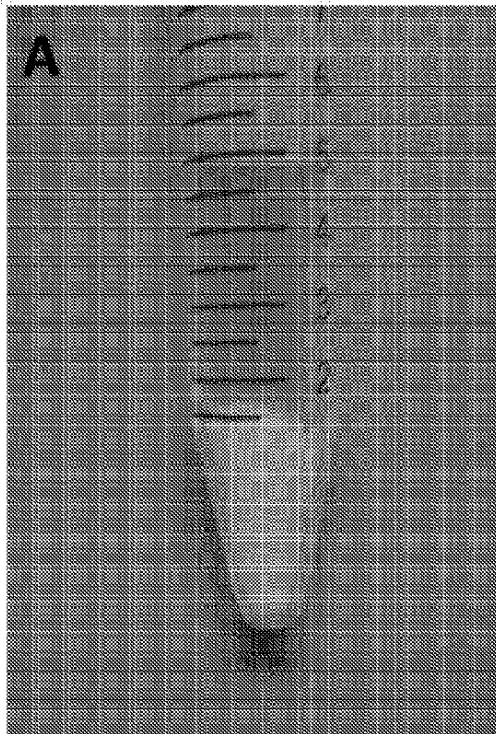
【図1A】

【図1B】

20

FIG. 1A

FIG. 1B



30

40

50

【図 1 C】

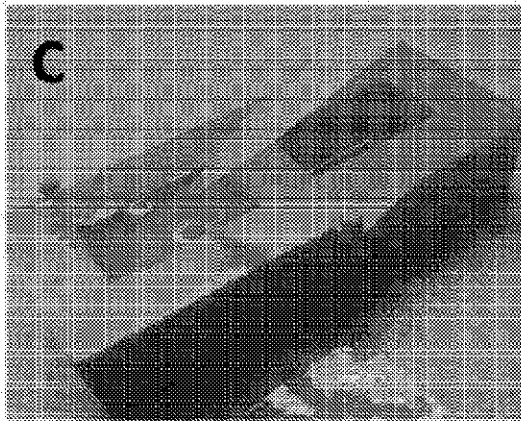


FIG. 1C

【図 1 D】

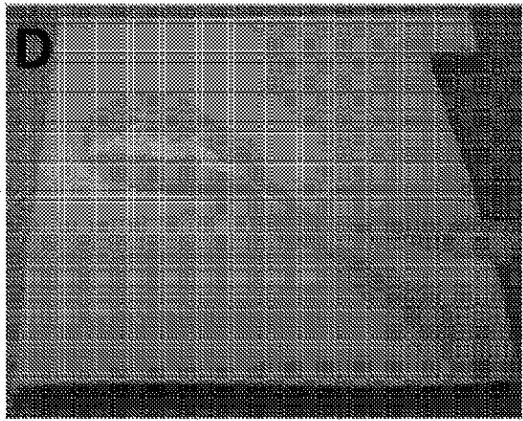


FIG. 1D

10

【図 2 A】

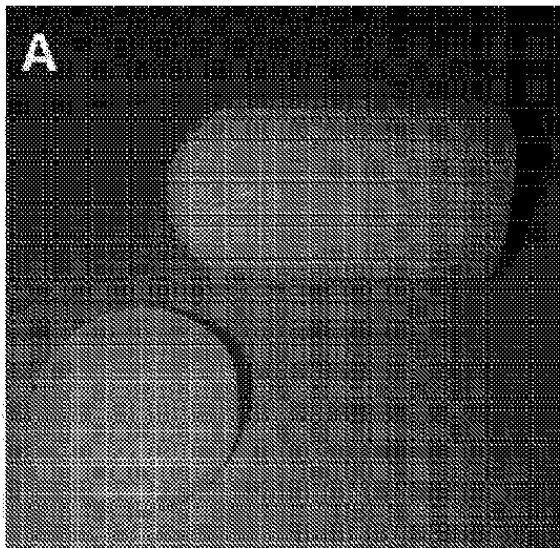


FIG. 2A

【図 2 B】

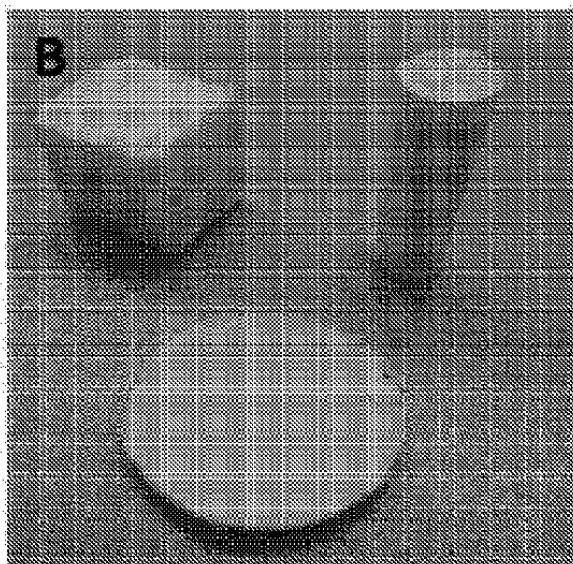


FIG. 2B

20

30

40

50

【図 2 C】

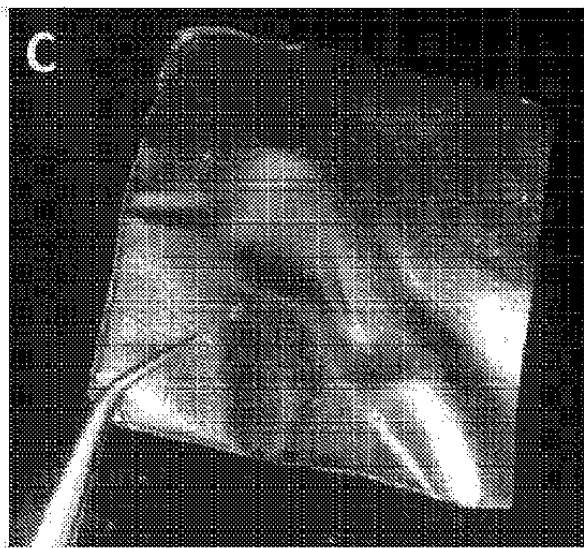


FIG. 2C

【図 2 D】

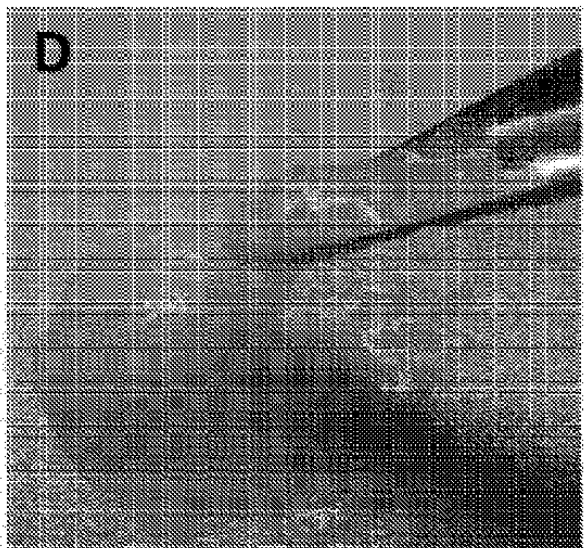
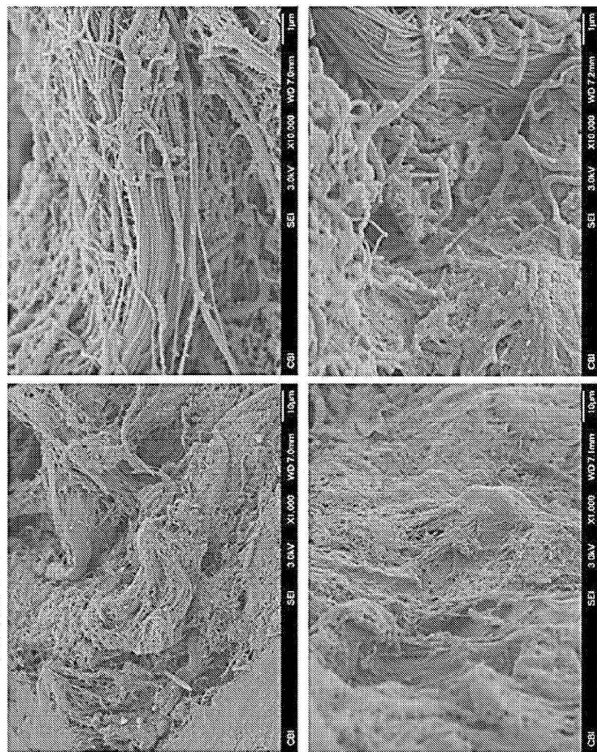


FIG. 2D

【図 3】

FIG. 3 10000X 倍率



50mg/ml ECM

100mg/ml ECM

【図 4】

FIG. 4A

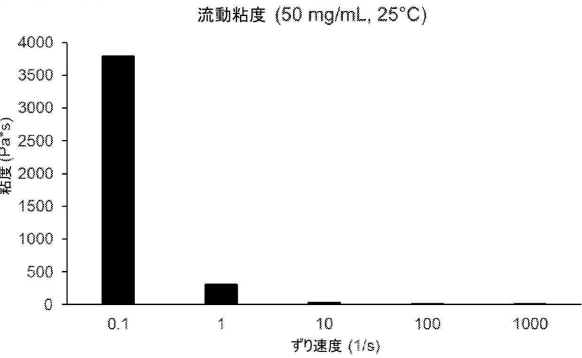
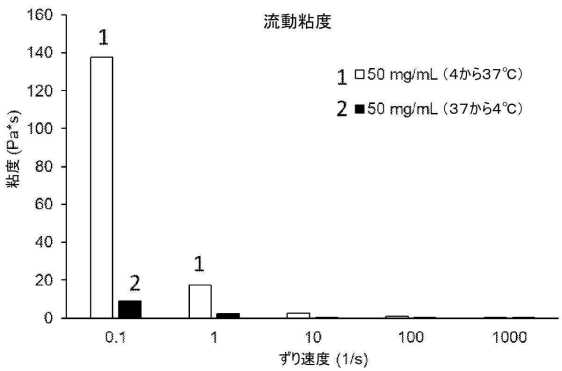


FIG. 4B



10

20

30

40

50

【図 5】

FIG. 5A

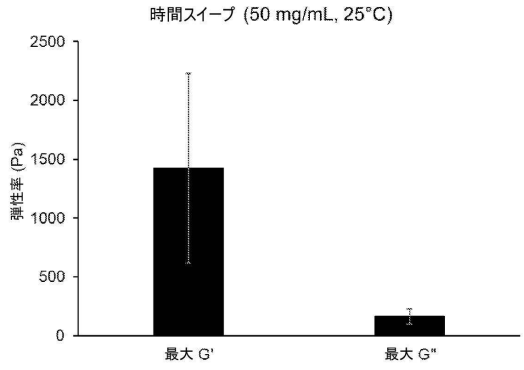
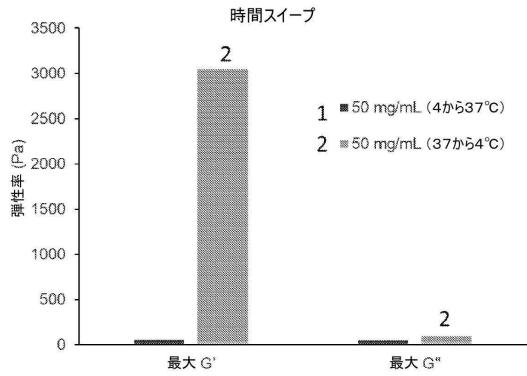


FIG. 5B



【図 6 A】

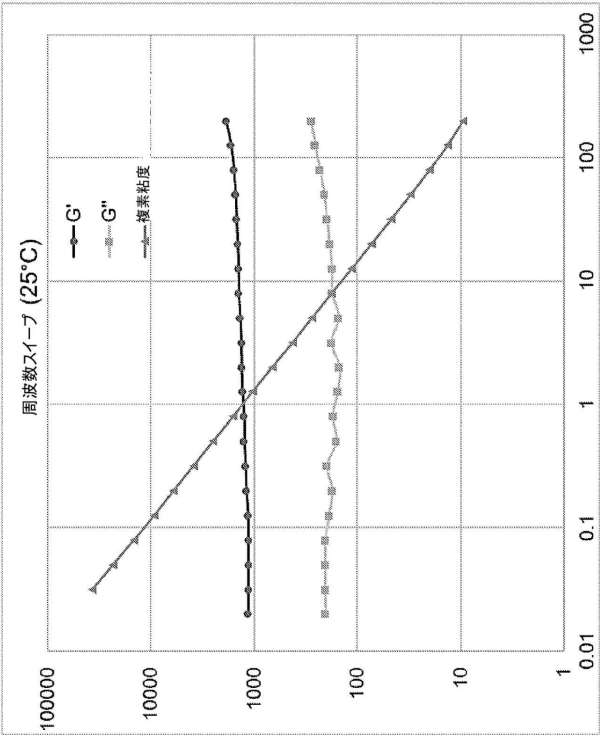


FIG. 6A

【図 6 B】

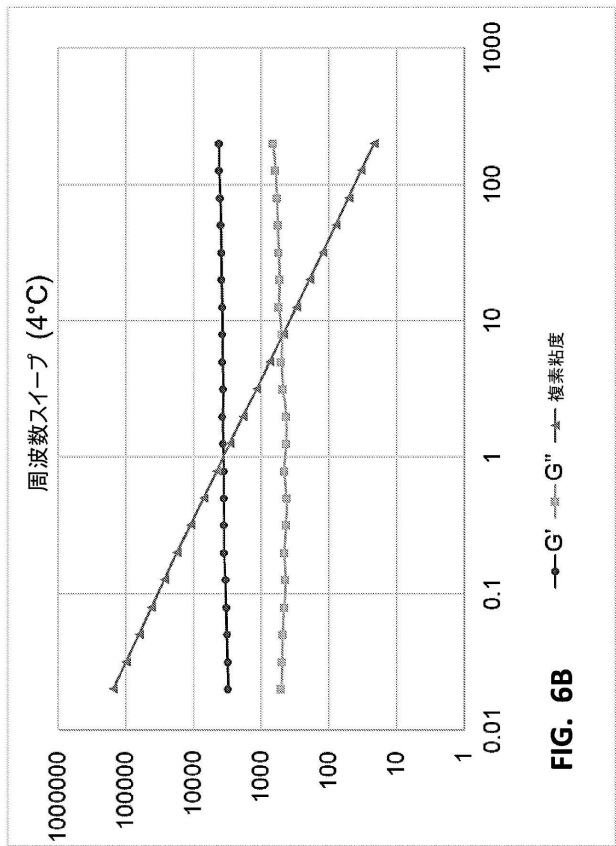


FIG. 6B

【図 6 C】

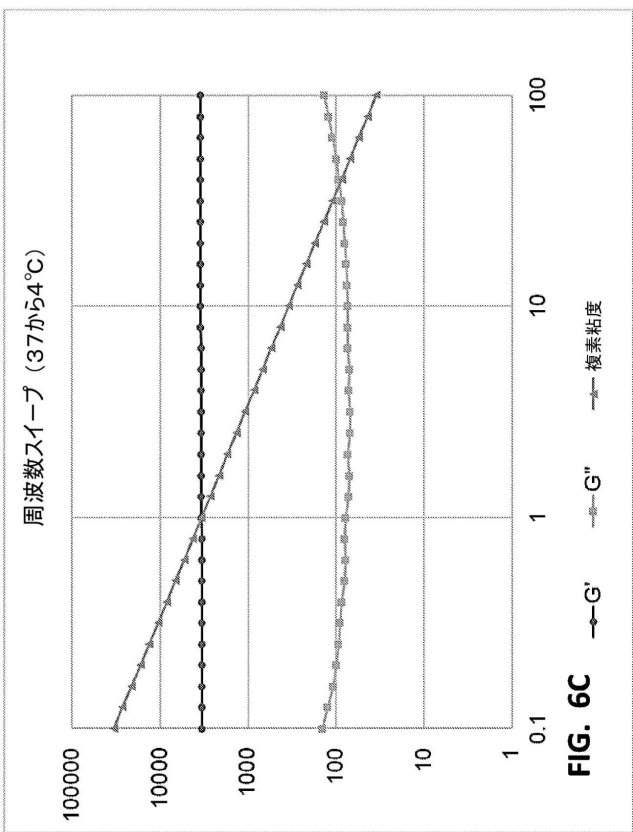


FIG. 6C

10

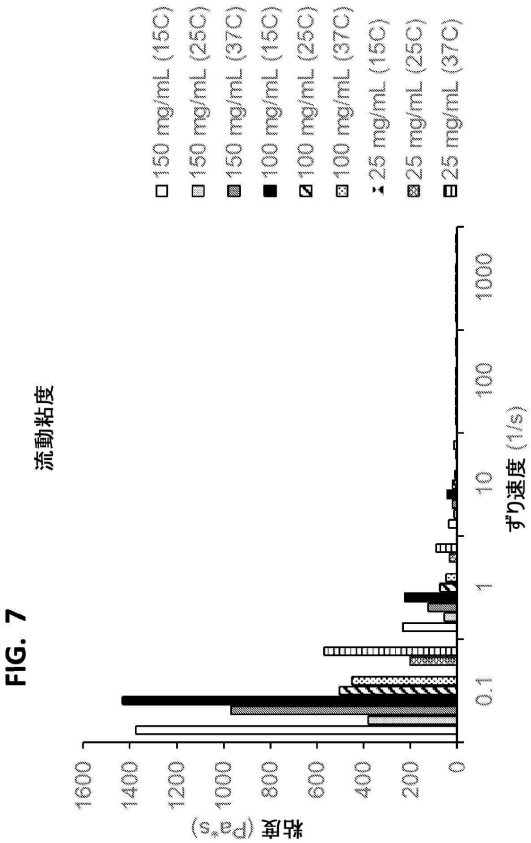
20

30

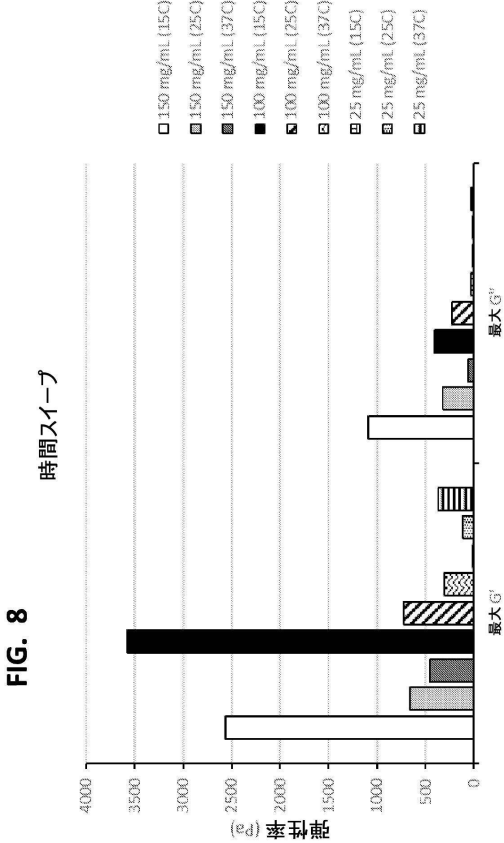
40

50

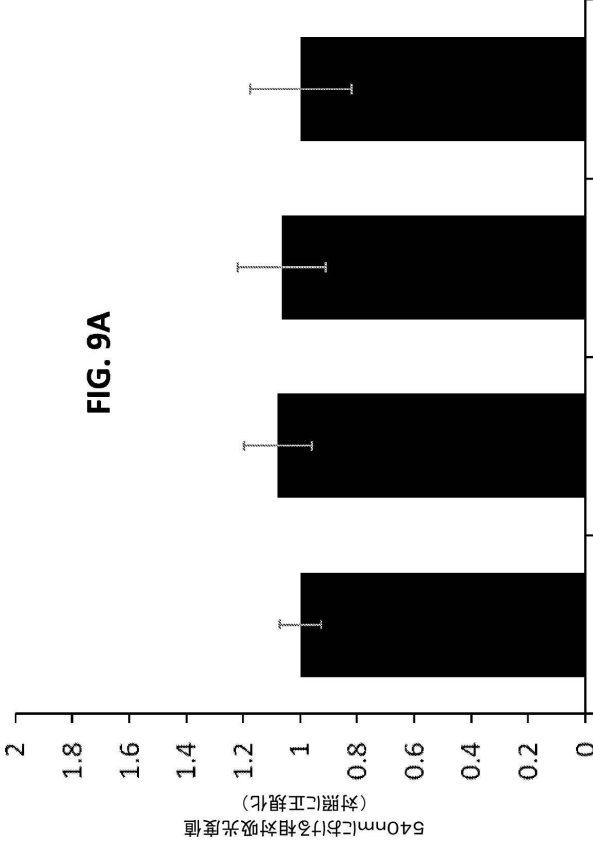
【図 7】



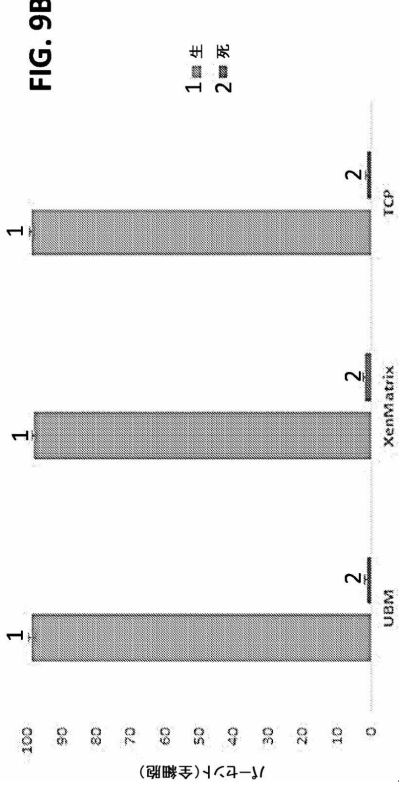
【図 8】



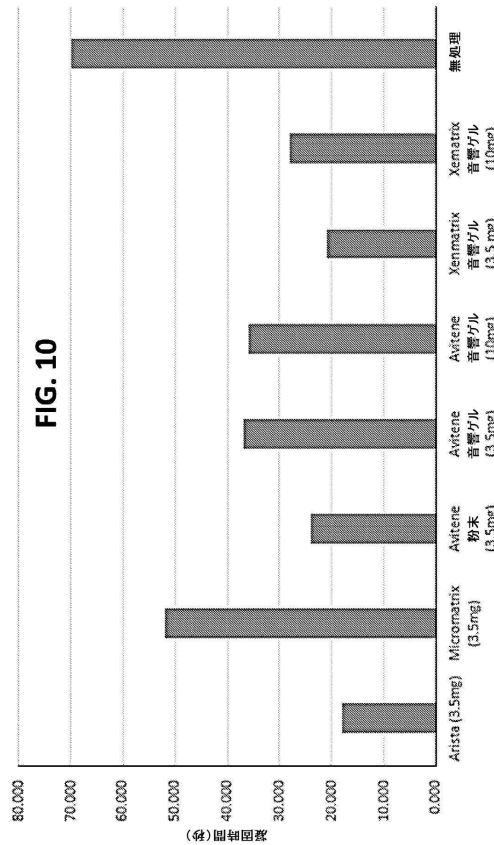
【図 9 A】



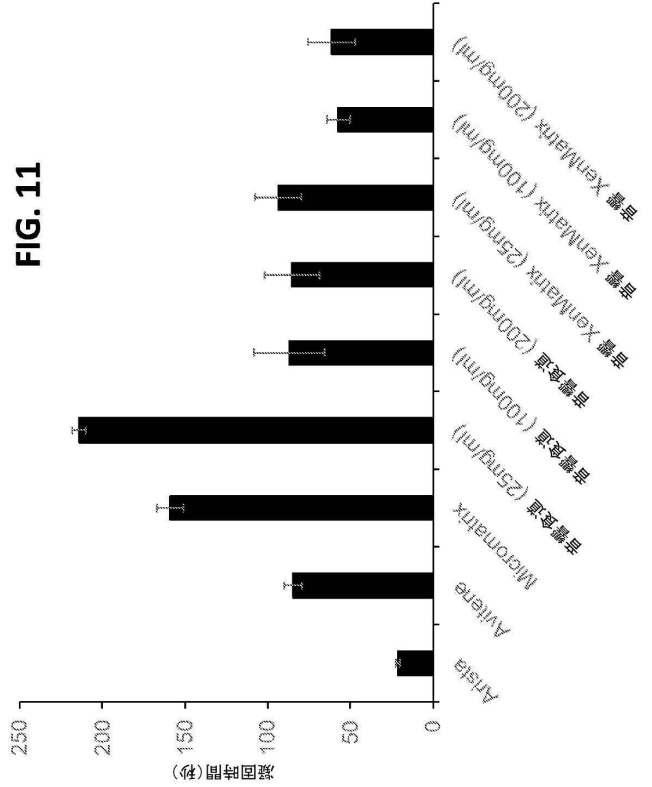
【図 9 B】



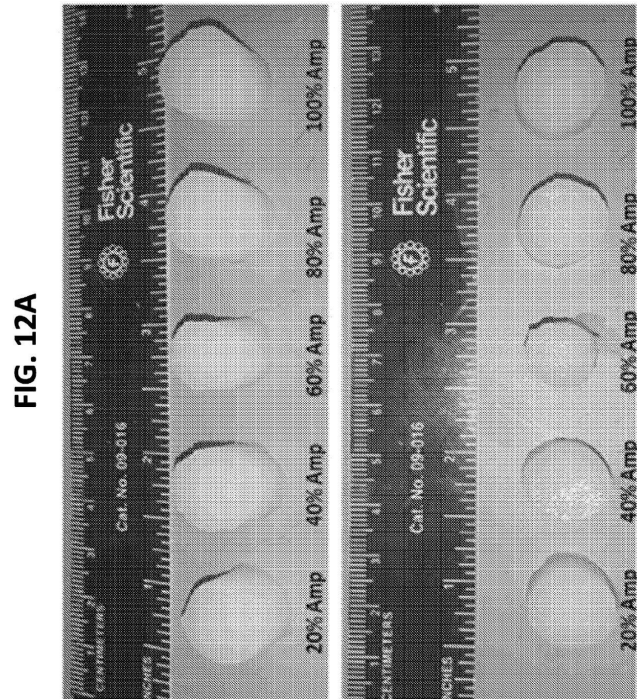
【図 1 0】



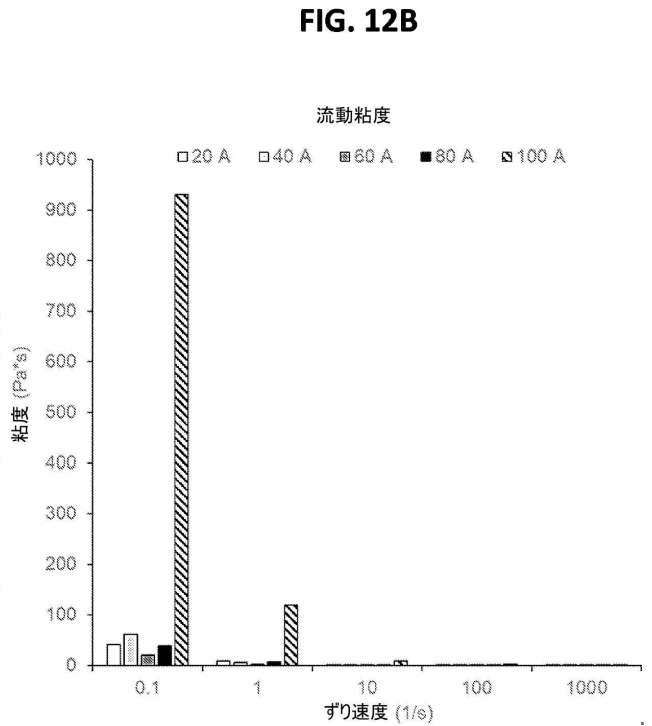
【図 1 1】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



10

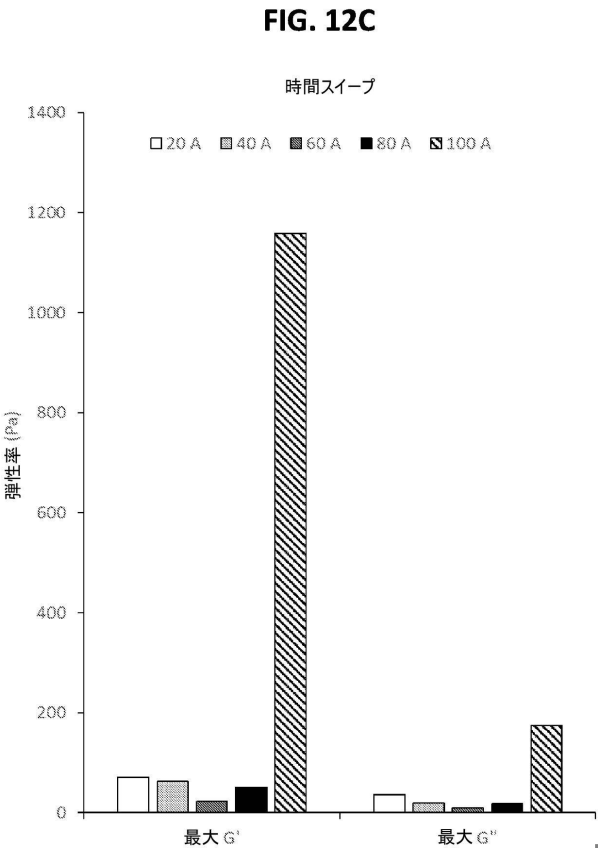
20

30

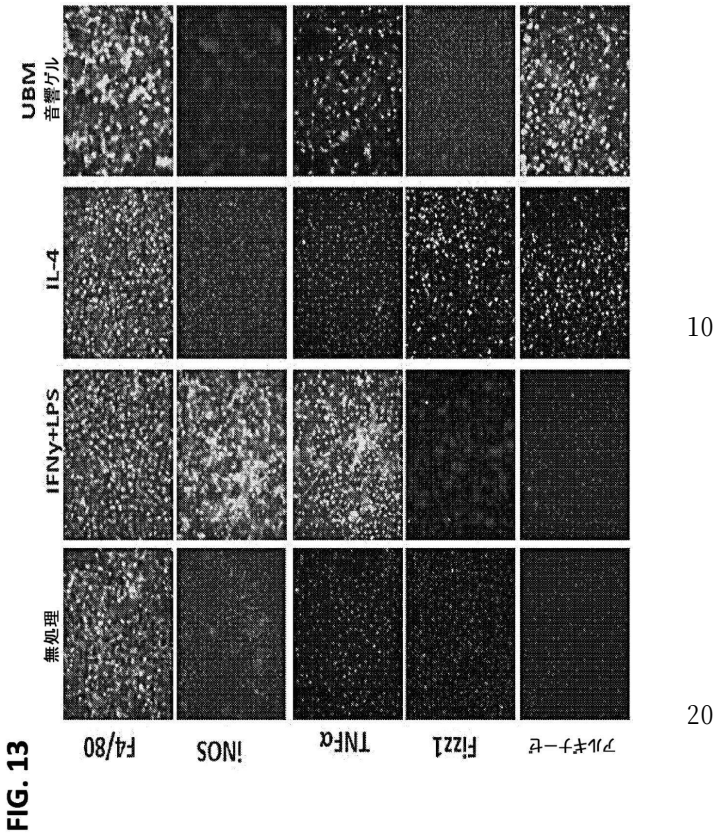
40

50

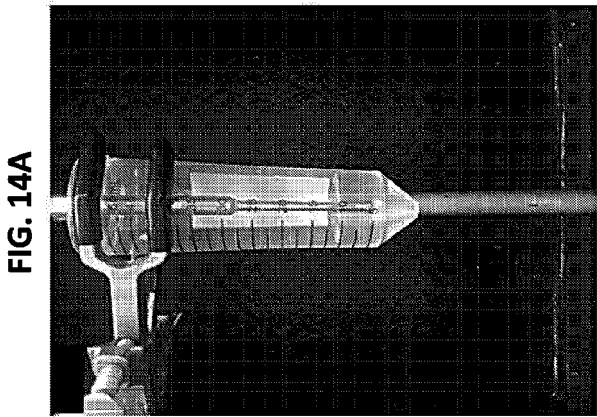
【 図 1 2 C 】



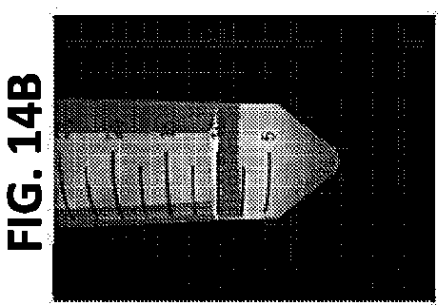
【 図 1 3 】



【 図 1 4 A 】



【 図 1 4 B 】



10

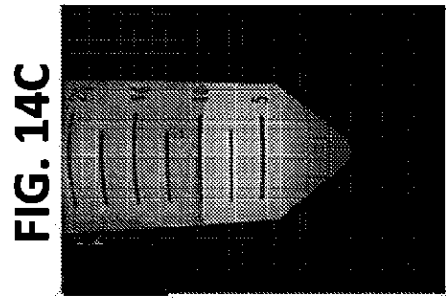
20

30

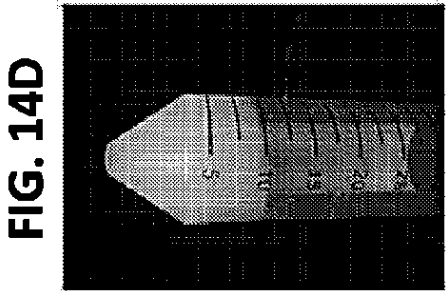
40

50

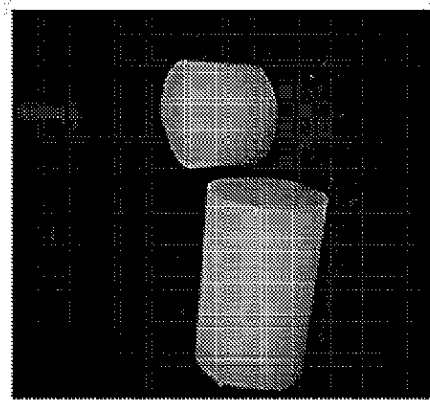
【 図 1 4 C 】



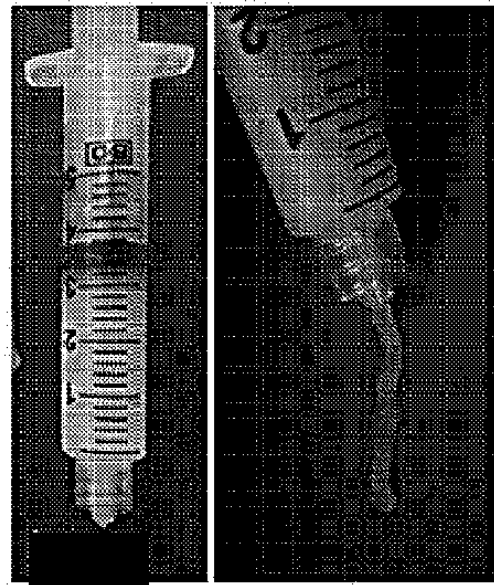
【 図 1 4 D 】



【 図 1 4 E 】



【 図 1 4 F 】



10

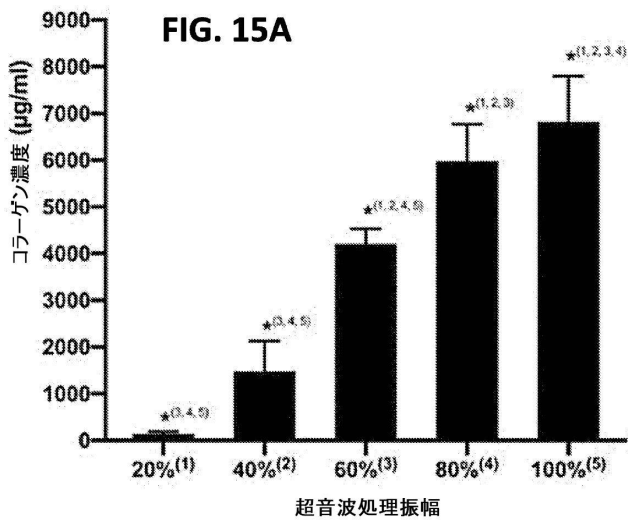
20

30

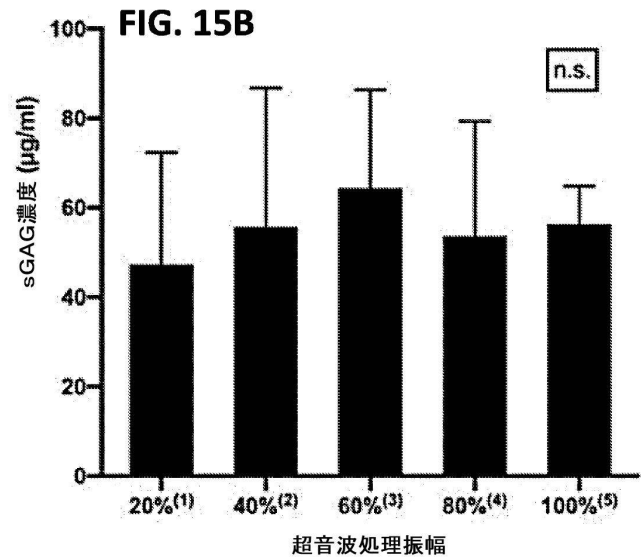
40

50

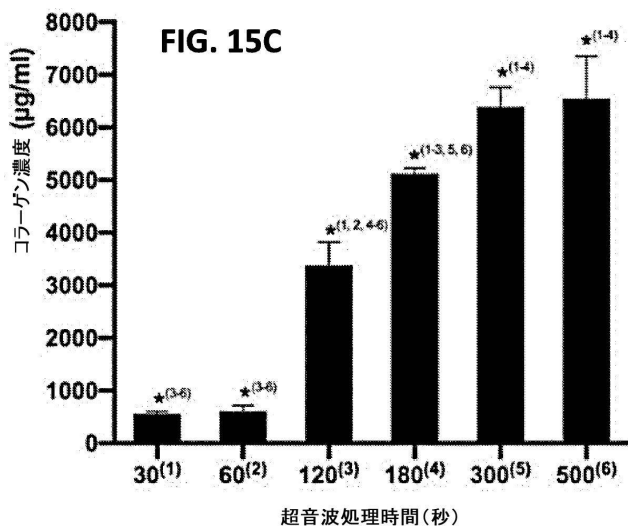
【図 15 A】



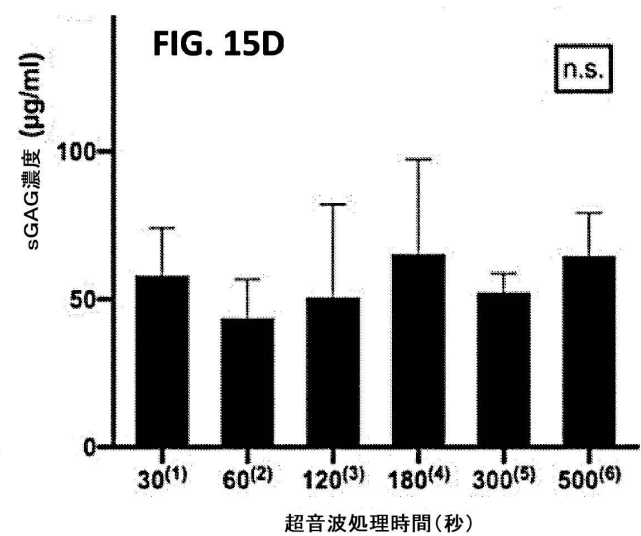
【図 15 B】



【図 15 C】



【図 15 D】



10

20

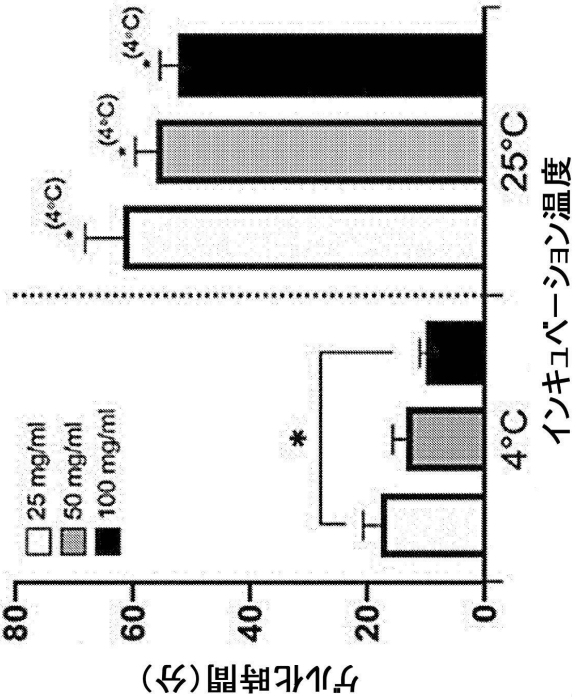
30

40

50

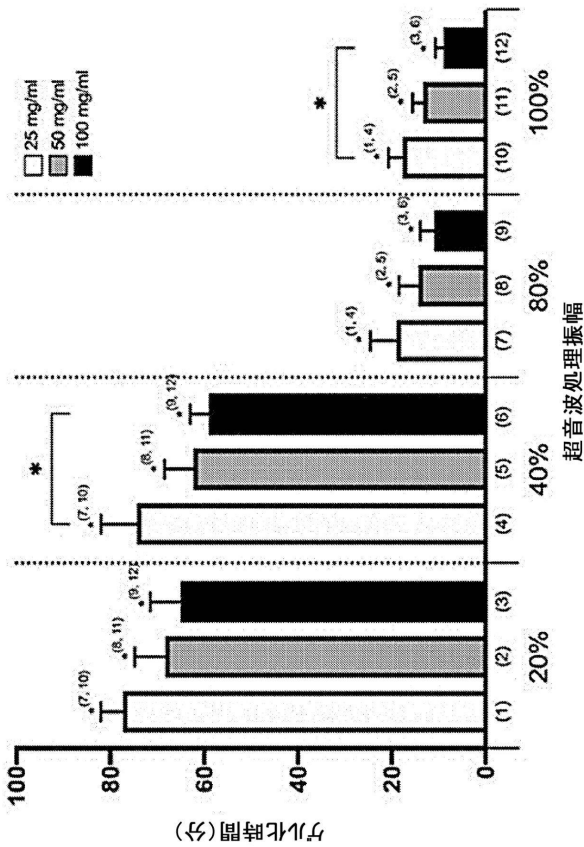
【図 16 A】

FIG. 16A



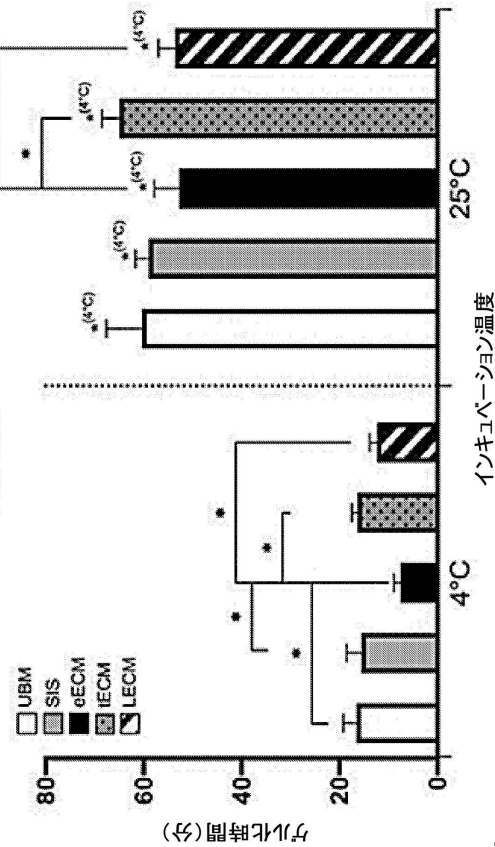
【図 16 B】

FIG. 16B



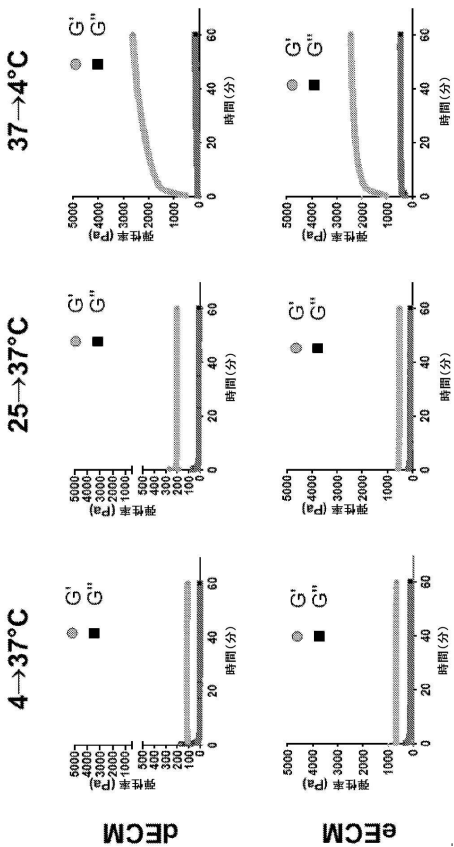
【図 16 C】

FIG. 16C



【図 17 A】

FIG. 17A



10

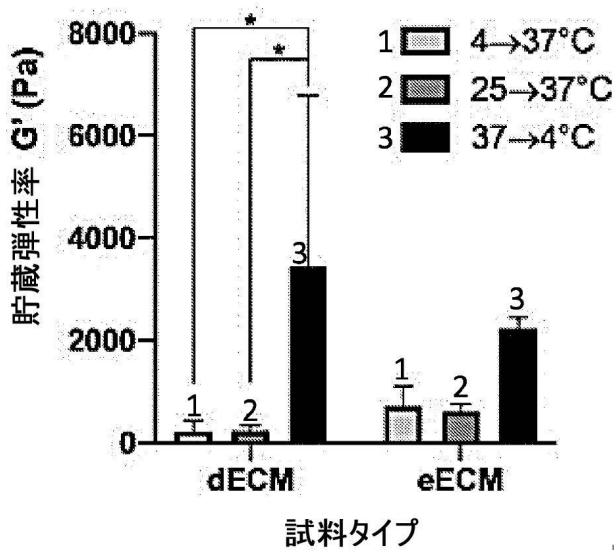
20

30

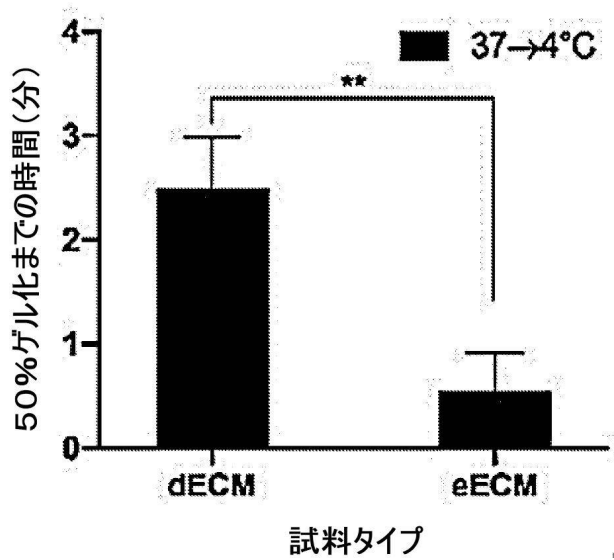
40

50

【図 17 B】
FIG. 17B

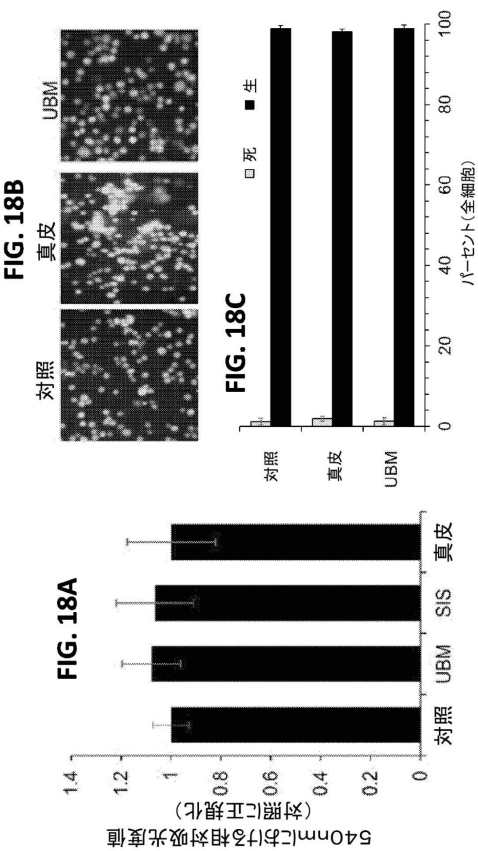


【図 17 C】
FIG. 17C

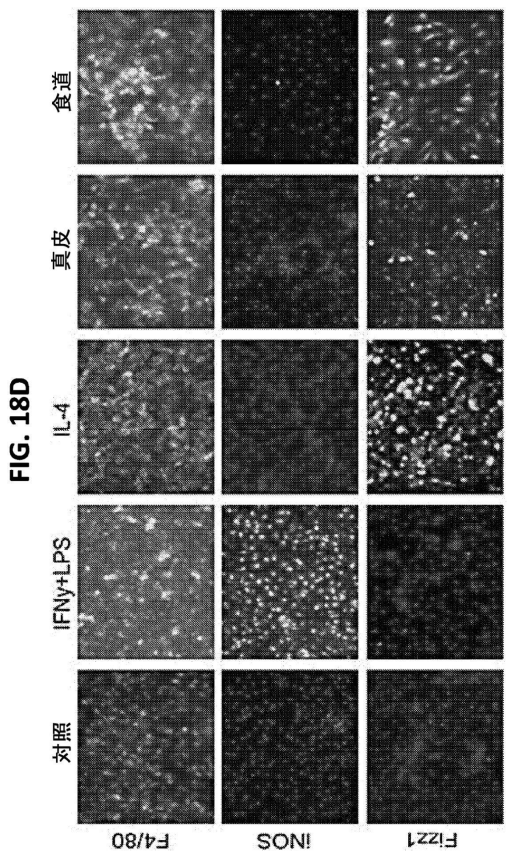


10

【図 18 A - C】



【図 18 D】



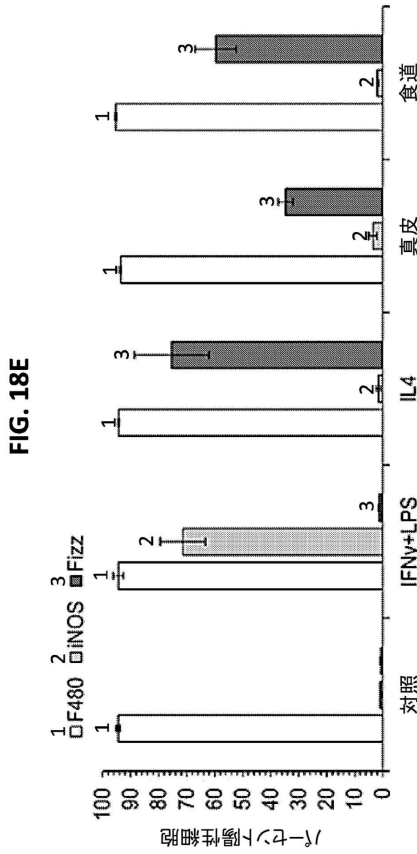
20

30

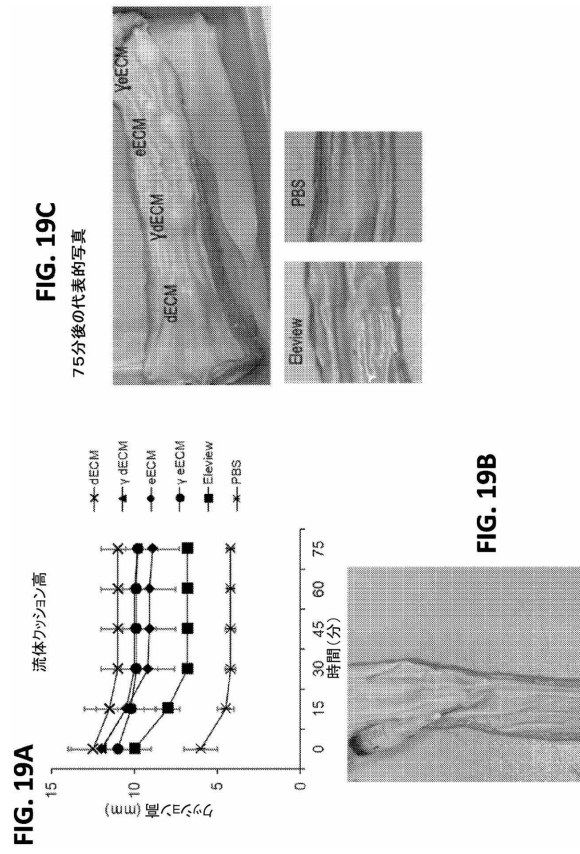
40

50

【図 18 E】

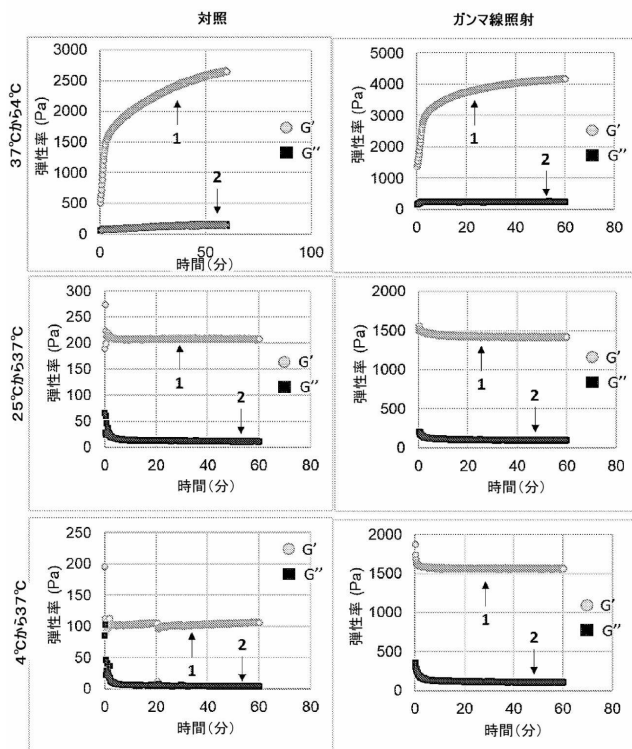


【図 19】



【図 20 A】

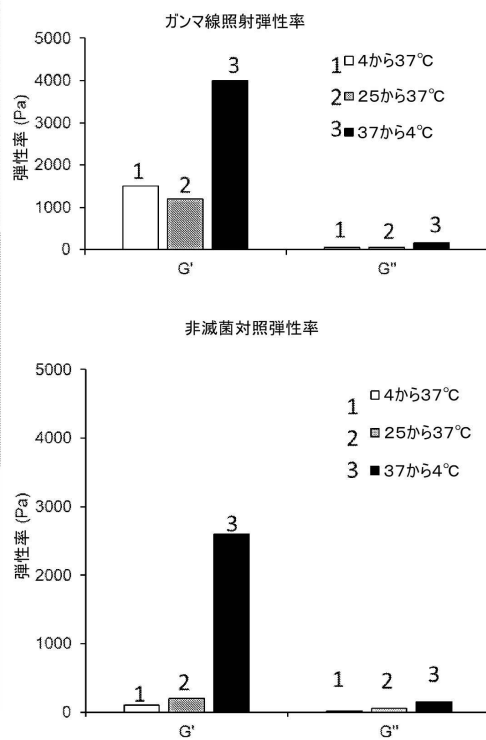
FIG. 20A



【図 20 B】

FIG. 20B

平均弾性率



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/022433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61L26/00
ADD.

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)

A61L

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)

EPO-Internal, COMPENDEX, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/166735 A1 (CHANG JAMES [US] ET AL) 16 June 2016 (2016-06-16) example 5 paragraph [0002] paragraph [0006] - paragraph [0008]	1-35, 38-49,51
X	"Friday, 13 April 2018 ED - Zoulim Fabien", JOURNAL OF HEPATOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 68, 28 March 2018 (2018-03-28), XP085370984, ISSN: 0168-8278, DOI: 10.1016/S0168-8278(18)30290-3 PS104; page S56	1,12,30, 32,36, 37,40, 44,45,50
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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

"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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 2020

Date of mailing of the international search report

29/05/2020

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zalfen, Alina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/022433

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 2018/035491 A1 (ASANA MEDICAL INC [US]) 22 February 2018 (2018-02-22) paragraph [0001] paragraph [0008] - paragraph [00010] paragraph [00023] paragraph [00032] paragraph [00042] paragraph [0003] -----	1,12,13, 30,32, 33,40, 44-46, 51,57,58
X	VENTURA REIZA D ET AL: "In-vitroandin-vivoevaluation of hemostatic potential of decellularized ECM hydrogels", MATERIALS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 232, 6 August 2018 (2018-08-06), pages 130-133, XP085459290, ISSN: 0167-577X, DOI: 10.1016/J.MATLET.2018.08.013 abstract 2.3 Fabrication of ECM hydrogel 3.1 Hemostatic properties 4 Conclusion -----	52-56
X	US 2006/070631 A1 (SCOPTON PUAL [US] ET AL) 6 April 2006 (2006-04-06) paragraph [0030] paragraph [0005] paragraph [0047] paragraph [0009] -----	59-77

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/022433

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2016166735 A1	16-06-2016	EP 2968417 A1	20-01-2016
		US 2016166735 A1	16-06-2016
		US 2018133369 A1	17-05-2018
		WO 2014144215 A1	18-09-2014

WO 2018035491 A1	22-02-2018	AU 2017313207 A1	11-04-2019
		CA 3034251 A1	22-02-2018
		CN 109715091 A	03-05-2019
		EP 3500193 A1	26-06-2019
		JP 2019528314 A	10-10-2019
		KR 20190055088 A	22-05-2019
		US 2019184060 A1	20-06-2019
		WO 2018035491 A1	22-02-2018

US 2006070631 A1	06-04-2006	EP 1804691 A1	11-07-2007
		US 2006070631 A1	06-04-2006
		US 2011196335 A1	11-08-2011
		US 2013060136 A1	07-03-2013
		US 2015005394 A1	01-01-2015
		US 2018214555 A1	02-08-2018
		WO 2006036794 A1	06-04-2006

フロントページの続き

,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,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(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,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,
MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,
RW,SA,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 47906, ウェスト ラファイエット, キングスウッド ロード
サウス 1150

(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) 4B065 AA90X AC14 AC15 BD01 BD04 CA10 CA22 CA24 CA44

4C081 AC01 BA11 CD34 DA12 EA11