

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6811232号
(P6811232)

(45) 発行日 令和3年1月13日(2021.1.13)

(24) 登録日 令和2年12月16日(2020.12.16)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 L 27/22 (2006.01)	A 6 1 L 27/22
A 6 1 L 27/58 (2006.01)	A 6 1 L 27/58
A 6 1 L 27/56 (2006.01)	A 6 1 L 27/56
A 6 1 L 27/40 (2006.01)	A 6 1 L 27/40
A 6 1 L 27/54 (2006.01)	A 6 1 L 27/54

請求項の数 17 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-503476 (P2018-503476)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月20日 (2016. 7. 20)
 (65) 公表番号 特表2018-527060 (P2018-527060A)
 (43) 公表日 平成30年9月20日 (2018. 9. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/043166
 (87) 国際公開番号 W02017/015387
 (87) 国際公開日 平成29年1月26日 (2017. 1. 26)
 審査請求日 令和1年7月19日 (2019. 7. 19)
 (31) 優先権主張番号 62/194, 423
 (32) 優先日 平成27年7月20日 (2015. 7. 20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 303067548
 タフツ・ユニバーシティ
 アメリカ合衆国02155マサチューセツ
 ツ州メドフォード、バルー・ホール
 (73) 特許権者 511140770
 マサチューセツ アイ アンド イヤー
 インファーマリー
 アメリカ合衆国 マサチューセツ 02
 114, ボストン, チャールズ スト
 リート 243

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生分解性シルク耳チューブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

再吸収可能な耳チューブを作製する方法であって、
 シルクフィブロイン溶液を提供するステップ；および
 前記のシルクフィブロイン溶液からシルク耳チューブを形成するステップ、
 を含み、
 前記のシルク耳チューブは、約0.4mm～約3.6mmの長さを有し、約0.08m
 m～約4.8mmの外径を有し、

前記のシルク耳チューブは、再吸収可能である、
 方法。

【請求項2】

請求項1の方法であって、
 前記のシルク耳チューブは、ゲル紡糸またはゲル沈着を介して形成される、
 方法。

【請求項3】

請求項1の方法であって、
 前記のシルク耳チューブは、浸漬コーティングまたは溶液沈着を介して形成される、
 方法。

【請求項4】

請求項1の方法であって、

前記のシルク耳チューブは、マイクロ造型を介して形成される、
方法。

【請求項 5】

請求項 1 の方法であって、
前記方法は、複数のポアを前記のシルク耳チューブに導入するステップをさらに含む、
方法。

【請求項 6】

請求項 5 の方法であって、
前記ポアは、前記のシルク耳チューブを形成する前に、前記シルクフィブロイン溶液と
ポロゲンを関連させることによって導入される、
方法。

10

【請求項 7】

請求項 6 の方法であって、
前記ポロゲンは、ポリエチレンオキシド、NaCl、アルカリ金属、ハロゲン化アルカ
リ土類金属、リン酸、硫酸、糖結晶、水溶性マイクロスフェア、多糖類、タンパク質マイ
クロスフェア、ワックス粒子、および、合成ポリマー粒子から選択される、
方法。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれか一項の方法であって、
前記のシルク耳チューブは、少なくとも 2 つの層を含む、
方法。

20

【請求項 9】

請求項 1 の方法であって、
前記のシルク耳チューブの形成前または形成中に、少なくとも 1 つの治療剤を、前記シ
ルクフィブロイン溶液と関連させるステップをさらに含む、
方法。

【請求項 10】

請求項 9 の方法であって、
前記の少なくとも 1 つの治療剤は、抗生物質、鎮痛剤、およびステロイドからなる群よ
り選択される、
方法。

30

【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれか一項の方法であって、
前記のシルクフィブロイン溶液は、1% ~ 30% w t のシルクフィブロインを含む、
方法。

【請求項 12】

請求項 1 から 11 のいずれか一項の方法であって、
前記のシルク耳チューブは、1日 ~ 1週を含めた再吸収速度を有する、
方法。

40

【請求項 13】

請求項 1 から 11 のいずれか一項の方法であって、
前記のシルク耳チューブは、8日 ~ 2年を含めた再吸収速度を有する、
方法。

【請求項 14】

請求項 1 から 13 のいずれか一項の方法であって、
前記のシルク耳チューブは、1 ~ 60% のベータシート含有量を含む、
方法。

【請求項 15】

請求項 14 の方法であって、
実質的なベータシート含有量は、オートクレーピング、水蒸気アニーリング、および、

50

メタノールによる処理の少なくとも1つによって導入される、
方法。

【請求項16】

請求項1から15のいずれか一項の方法であって、
前記のシルクフィブロインは、スパイダーシルク、カイコシルク、および組み換えシルクからなる群より選択される、
方法。

【請求項17】

請求項1の方法であって、
前記のシルク耳チューブは、0.5mm~3.0mmの長さを有し、0.1mm~4.0mmの外径を有する、
方法。

10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

鼓膜切開術チューブは、中耳の通気を維持するために、および、中耳内の流体の蓄積を防ぐために、鼓膜の中に挿入される小さなチューブである。鼓膜切開術チューブの配置は、子どもでは全身麻酔下で行なわれる、単一の最も一般的な外来通院の外科的手順であり、しばしば中耳炎または気圧性外傷の処置として、米国において毎年667,000の手順が行なわれる。手順あたり、およそ\$2,700であり、合計財政負担は、周術期訪問および追加試験を除き、18億ドル近くに見積もられる。3才までに子どもの7%近くが所定の位置にチューブを有する。残念なことに、以前の鼓膜切開術チューブは、慢性炎症および癒痕を引き起こすこと、および繰り返しの外科的介入を行なう必要があることを含む、様々な理由で満足なものでないことが証明されている。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0002】

鼓膜切開術チューブ(「耳チューブ」とも称される)を製造する以前の試みとは異なり、本発明は、対象において実質的な炎症性反応を引き起こさず、任意の様々な物理的および機械的特性を有して製造され得る、生体吸収性を提供する。例えば、様々な実施態様によれば、提供されるシルク耳チューブは、患者の体内に再吸収される前に、対象において何週間も、何月も、または何年もの間、存続するように製造され得る。また、一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは多層を含み、そのそれぞれが、ポア、治療剤、および異なる機械的および/または物理的特性の1つまたは複数を含み得る。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、それらの長さに沿って異なる組成および/または特性を有してもよい。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、フランジ、ベベル、および/または他の機構を含み得る。

30

【0003】

一部の実施態様では、本発明は、シルクフィブロイン溶液を提供するステップ、および、シルクフィブロイン溶液からシルク耳チューブを形成するステップを含む、再吸収可能な耳チューブを作製する方法を提供し、ここで、シルク耳チューブは、2mm未満の長さであり、1.5mm未満の外径を有し、およびここで、シルク耳チューブは、再吸収可能である。

40

【0004】

一部の実施態様では、本発明は、シルク耳チューブを対象の外耳道に導入するステップを含む、中耳炎を処置する方法も提供し、
ここで、シルク耳チューブは、2mm未満の長さであり、1.5mm未満の外径を有し、およびここで、シルク耳チューブは、対象によって再吸収される。一部の実施態様では、中耳炎は、急性中耳炎、浸出のある中耳炎、または慢性の化膿性中耳炎である。

50

【0005】

様々な実施態様によれば、提供されるシルク耳チューブは、任意の公知の方法を介して形成され得る。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、ゲル紡糸またはゲル沈着を介して形成される。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、浸漬コーティングまたは溶液沈着を介して形成される。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、注入成形、マイクロ成型、または機械加工を介して形成される。

【0006】

一部の実施態様では、提供される方法は、シルク耳チューブが多層を含むのを可能にし得る。一部の実施態様では、シルク耳チューブは、少なくとも2つの層（例えば、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10またはより多くの層）を含む。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、単一の層を含む。

10

【0007】

一部の実施態様では、提供される方法は、例えば、特定のシルク耳チューブ（単数または複数）を、特定の適用および/または対象に適合させるための、1つまたは複数のさらなるステップを含む。一部の実施態様では、提供される方法は、提供されるシルク耳チューブの少なくとも1つの層に、複数のポアを導入するステップをさらに含む。一部の実施態様では、ポアは、シルク耳チューブを形成する前に、ポロゲンをシルクフィブロイン溶液と関連させることによって導入される。一部の実施態様では、ポロゲンは、ポリエチレンオキシド、NaCl、アルカリ金属、ハロゲン化アルカリ土類金属、リン酸、硫酸、糖結晶、水溶性マイクロスフェア、多糖類、タンパク質マイクロスフェア、ワックス粒子、および、合成ポリマー粒子から選択される。一部の実施態様では、ポアは、他の公知の方法、例えば、凍結乾燥またはガス放散の方法を用いて導入される。

20

【0008】

様々な実施態様によれば、シルクフィブロイン溶液の1つまたは複数の特性は、異なるとよく、制限されないが、ほんの数個を挙げれば、シルクフィブロイン溶液中のシルクフィブロイン量、シルクフィブロイン溶液中のさらなる材料の存在または不存在、および、シルクフィブロイン溶液中の溶媒の組成を含む。例えば、一部の実施態様では、シルクフィブロイン溶液は、水中に1%~30%wtのシルクフィブロインを含む。一部の実施態様では、シルクフィブロイン溶液は、例えばグリセロールおよび/またはグリコールを含む1つまたは複数の他の添加剤を含んでもよい。一部の実施態様では、1つまたは複数の添加剤の添加は、提供されるシルク耳チューブの形成および/または形態の制御に有用であり得る。

30

【0009】

一部の実施態様では、提供される方法において用いられるシルク耳チューブは、少なくとも1つの治療剤を含む。一部の実施態様では、提供される方法は、シルク耳チューブの形成前または（of）形成中に、少なくとも1つの治療剤をシルクフィブロイン溶液と関連させるステップをさらに含んでもよい。一部の実施態様では、提供される方法は、シルク耳チューブの導入前に、少なくとも1つの治療剤を対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施態様では、提供される方法は、シルク耳チューブの導入後に、少なくとも1つの治療剤を対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施態様では、提供される方法は、シルク耳チューブの導入と実質的に同時に、少なくとも1つの治療剤を対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施態様では、前記の少なくとも1つの治療剤は、抗生物質、鎮痛剤、および、ステロイドからなる群より選択される。

40

【0010】

様々な実施態様によれば、提供されるシルク耳チューブは、対象において再吸収可能である（すなわち、分解されて対象の体内に吸収される）。一部の実施態様では、シルク耳チューブは、1日~1週を含めた再吸収速を有する。一部の実施態様では、シルク耳チューブは、8日~2年を含めた再吸収速度を有する。

【0011】

提供されるシルク耳チューブの1つまたは複数の物理的特性は、特定の適用および/ま

50

たは対象のニーズに合うために変更され得ることが検討される。例えば、一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、実質的なベータシート含有量を含む。一部の実施態様では、実質的なベータシート含有量は、オートクレーピング、水蒸気アニーリング、および、メタノールによる処理の、少なくとも1つによって導入される。一部の実施態様では、ベータシート含有量は、1～75%（例えば、1～10%、1～20%、1～30%、1～40%、1～50%、1～60%、10～20%、10～30%、10～40%、10～50%、10～60%、20～60%、20～50%、20～40%、20～30%、または0～60%）であってよい。特定の理論に縛られることを望まずに、より高いベータシート含有量は、提供されるシルク耳チューブのインピボでの分解をより遅くさせると考えられる。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブのベータシート含有量は、任意の適用に適切な様式で異なってよい。例えば、一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、ベータシート含有量の勾配を含んでよい。一部の実施態様では、勾配は、少なくとも1つの他の層とは異なる（例えば、より高い、またはより低い）ベータシート含有量を有する少なくとも1つの層を有する、多層のシルク耳チューブを含んでよい。

10

【0012】

様々な実施態様によれば、任意のシルクフィブロインは、提供される方法およびシルク耳チューブにおいて用いられ得る。一部の実施態様では、シルクフィブロインは、スパイダーシルク（例えば、*Nephila ciavipes* 由来）、カイコシルク（例えば、*Bombyx mori* 由来）、および、スパイダーシルクまたはカイコ由来の組み換えシルクからなる群より選択される。

20

【0013】

本明細書において、刊行物、特許、または特許出願に対する任意の引用は、それらの全体で参照により援用される。約 (about) / およそ (approximately) を伴いまたは伴わずに本出願において用いられる任意の数字は、関連のある分野における通常の知識を有する者によって理解される任意の正常な変動をカバーすることを意味する。

【0014】

本発明の他の特徴、目的、および利点は、後の詳細な説明において明らかである。しかしながら、詳細な説明は、本発明の実施態様を説明しながら、説明としてのみ与えられて、限定ではないことが理解されるべきである。本発明の範囲内の様々な変更および改変は、詳細な説明から当業者に明らかになる。

30

【0015】

[定義]

本出願において、文脈からそれ以外が明らかでない限り、(i)用語「a」は、「少なくとも1つ」を意味することが理解され得て；(ii)用語「または」は、「および/または」を意味することが理解され得て；(iii)用語「含む (comprising)」および「含む (including)」は、それら自体でまたは1つまたは複数のさらなる構成要素またはステップとともに示されたかにどうかかわらず、箇条書きされた構成要素またはステップを包含することが理解され得て；および、(iv)用語「約 (about)」および「およそ (approximately)」は、等価として用いられ、当業者によって理解される標準的な変動を許容することが理解され得て；および、(v)範囲が提供される場合は、エンドポイントが含まれる。

40

【0016】

薬剤：本明細書において用いられる用語「薬剤」は、例えば、ポリペプチド、核酸、糖類、脂質、小分子、金属、またはそれらの組み合わせを含む、任意の化学的なクラスの物質または化合物を指し得る。文脈から明らかであるように、一部の実施態様では、薬剤は、細胞または生物、または、それらの画分、抽出物または構成要素であってよく、または含んでよい。一部の実施態様では、薬剤は、自然において見られる、および/または、自然から得られるという点で、天然物であり、または含む。一部の実施態様では、薬剤は、

50

人の手の働きを通してデザイン、改変および/または生産され、および/または、天然に見られないという点で、人造である1つまたは複数の物質であり、または含む。一部の実施態様では、薬剤は、単離または純粋な形態で使用され得る；一部の実施態様では、薬剤は、クルード形態で使用され得る。一部の実施態様では、潜在的な薬剤は、例えば、それらの中の活性の薬剤を同定または特性化するためにスクリーニングされ得るコレクションまたはライブラリーとして提供される。本発明に従って使用され得る薬剤の一部の特定の実施態様は、小分子、抗体、抗体フラグメント、アプタマー、核酸（例えば、*siRNA*、*shRNA*、DNA/RNAハイブリッド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム）、ペプチド、ペプチド模倣物などを含む。一部の実施態様では、薬剤は、ポリマーであり、または含む。一部の実施態様では、薬剤はポリマーではなく、および/または、任意のポリマーから実質的にフリーである。一部の実施態様では、薬剤は、少なくとも1つの高分子部分を含む。一部の実施態様では、薬剤は、任意の高分子部分を欠き、または実質的にフリーである。

10

【0017】

およそ (Approximately) : 本明細書において用いられる用語「およそ (approximately)」または「約 (about)」は、1つまたは複数の目的値に適用されるとき、述べられた参照値と似た値を指す。特定の実施態様では、用語「およそ」または「約」は、別段の記載がない限り、または、文脈からそれ以外が明白でない限り、いずれかの方向で（よりも大きい、または、よりも小さい）、述べられた参照値の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満に入る値の範囲を指す（そのような数が、可能値の100%を超える場合を除く）。

20

【0018】

関連する (Associated with) : 2つのイベントまたは物質は、その用語が本明細書において使われるとき、一方の存在、レベル、および/または形状が、他方のものと相関するならば、互いに「関連する」。例えば、特定の物質（例えば、ポリペプチド、遺伝子シグネチャ、代謝物など）は、その存在、レベル、および/または形状が、疾患、障害、または状態の、発生率および/または脆弱性と、（例えば、関連のある集団にわたって）相関するならば、特定の疾患、障害、または状態と関連すると考えられる。一部の実施態様では、2以上の物質は、それらが互いに物理的に近接して存在および/または存続するようにそれらが直接的または間接的に相互作用するならば、互いと物理的に「関連する」。一部の実施態様では、互いに物理的に関連する2以上の物質は、互いに共有結合され；一部の実施態様では、互いに物理的に関連する2以上の物質は、互いに共有結合されないが、例えば、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、磁気作用、およびそれらの組み合わせを用いて、非共有的に結合される。

30

【0019】

生体適合性 : 本明細書において用いられる用語「生体適合性」は、生組織に対して、例えばインビボでそのような組織と接触して置かれた場合に、重大な害を引き起こさない材料を指す。特定の実施態様では、材料は、それらが細胞に対して毒性でないならば、「生体適合性」である。特定の実施態様では、材料は、インビトロでの細胞へのそれらの添加が20%以下の細胞死をもたらすならば、および/または、インビボでのそれらの投与が重大な炎症または他のそのような副作用を誘導しないならば、「生体適合性」である。

40

【0020】

生分解性 : 本明細書において用いられる用語「生分解性」は、細胞中に導入された場合に、細胞に対する重大な毒性作用を伴わずに、細胞が再利用または処理のいずれかを行うことができる構成要素に、（例えば、細胞の機構によって、例えば、酵素分解によって、加水分解によって、および/または、それらの組み合わせによって）分解される材料を指す。特定の実施態様では、生分解性材料の分解によって生産される構成要素は、生体適合性であり、したがって、重大な炎症および/または他の副作用をインビボで誘導しない。一部の実施態様では、生分解性ポリマー材料は、それらの構成要素モノマーに分解する。

50

一部の実施態様では、生分解性材料（例えば、生分解性ポリマー材料を含む）の分解は、エステル結合の加水分解を含む。これに代えてまたはこれに加えて、一部の実施態様では、生分解性材料（例えば、生分解性ポリマー材料を含む）の分解は、ウレタン結合の切断を含む。例示的な生分解性ポリマーは、例えば、ヒドロキシ酸、例えば乳酸およびグリコール酸のポリマーを含み、制限されないが、ポリ（ヒドロキシル酸）、ポリ（乳酸）（PLA）、ポリ（グリコール酸）（PGA）、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）（PLGA）、および、PEG、ポリ酸無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリエステル、ポリウレタン、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（ヒドロキシアлкаノエート）、ポリ（ラクチド-コ-カプロラクトン）との共重合体、それらのブレンドおよび共重合体を含む。多くの天然起源ポリマーも生分解性であり、例えば、アルブミン、コラーゲン、ゼラチンおよびプロラミンのようなタンパク質、例えば、ゼイン、および多糖類、例えば、アルギン酸、セルロース誘導体およびポリヒドロキシアлкаノエート、例えば、ポリヒドロキシ酪酸、それらのブレンドおよび共重合体を含む。当業者は、どのような場合にそのようなポリマーが生体適合性および/またはそれらの生分解性誘導体であるかを理解し、または決定することが可能である（例えば、当技術分野で知られているように、特定の化学基の置換または付加のみが異なる実質的に同一の構造によって、親ポリマーに関する）。

10

【0021】

併用療法：本明細書において用いられる用語「併用療法」は、対象が、2以上の治療的レジメン（例えば、2以上の治療剤）に同時に曝される状況を指す。一部の実施態様では、2以上の薬剤は、または（or）、同時に投与され得て；一部の実施態様では、そのような薬剤は、連続して投与され得て；一部の実施態様では、そのような薬剤は、重なった投与レジメンで投与される。

20

【0022】

組成物：本発明に係る「組成物」または「医薬組成物」は、同一レジメンの一部としての投与または同時投与のための、本明細書に記載の2以上の薬剤の組み合わせを指す。全ての実施態様において薬剤の組み合わせが物理的な混合をもたらす必要はなく、すなわち、別個の共薬剤として組成物のそれぞれの構成要素の投与が可能であり；しかしながら、多くの患者または当該分野の熟練者は、2以上の成分の混合である組成物を、薬学的に許容できる担体、希釈剤、または賦形剤において調製して、組み合わせの構成要素成分を同時に投与することを可能にすることが有利であると考え得る。

30

【0023】

改善、増大または低減：本明細書において用いられるように、またはそれらの文法上の等価物は、ベースライン測定、例えば、本明細書に記載の処置の開始前の同一個体における測定、または、本明細書に記載の処置の不存在下でのコントロール個体（または、多数のコントロール個体）における測定と比較される値を示す。一部の実施態様では、「コントロール個体」は、処置される個体と同一形態の疾患または損傷に悩んでいる個体である。

【0024】

対象：「対象」は、哺乳類（例えばヒト）を意味する。一部の実施態様では、対象は、関連のある疾患、障害または状態を患っている。一部の実施態様では、対象は、疾患、障害、または状態を引き起こしやすい。一部の実施態様では、対象は、疾患、障害または状態の1つまたは複数の症候または特徴を示す。一部の実施態様では、対象は、疾患、障害、または状態のいかなる症候または特徴も示さない。一部の実施態様では、対象は、疾患、障害、または状態に対する脆弱性またはリスクに特徴的な1つまたは複数の特徴を有する者である。一部の実施態様では、対象は患者である。一部の実施態様では、対象は、診断および/または治療が施される、および/または、施されたことのある個体である。

40

【0025】

実質的：本明細書において用いられる用語「実質的」は、目的の特徴または特性の全体的またはほぼ全体的な程度または度合いを示す定性的状態を指す。生物学的分野における

50

通常の知識を有する者は、生物学的および化学的現象は、完了するおよび/または完全に進行するまたは絶対的な結果を達成または回避することは、仮にあるとしても滅多にないということを理解している。したがって、用語「実質的」は、本明細書において、多くの生物学的および化学的現象に固有の完全性の潜在的な欠如を捕捉するために用いられる。

【0026】

治療剤：本明細書において用いられる語句「治療剤」は、一般に、生物に投与されたときに所望の薬理学的効果を誘発する任意の薬剤を指す。一部の実施態様では、薬剤は、適切な集団にわたって統計的に有意な効果を示すならば、治療剤であると考えられる。一部の実施態様では、適切な集団は、モデル生物の集団であり得る。一部の実施態様では、適切な集団は、様々な基準、例えば、特定の年齢群、性別、遺伝的背景、以前から存在する臨床状態などによって定義され得る。一部の実施態様では、治療剤は、疾患、障害、および/または状態の1つまたは複数の症候または特徴を、軽減する、寛解させる、緩和する、阻害する、予防する、発症を遅らせる、重症度を低減させる、および/または、発生率を低減させるために用いられ得る物質である。一部の実施態様では、「治療剤」は、ヒトに対する投与に関して市場に出すことができる前に、政府機関によって承認されている、またはその必要のある、薬剤である。一部の実施態様では、「治療剤」は、ヒトに対する投与に関して処方箋が必要な薬剤である。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】浸漬コーティングを用いて製造されたシルクチューブの画像を示す。(パネルa) 3回浸漬コーティング、(パネルb~d) 5回浸漬コーティング、(パネルa、b) 割られた横断面、(パネルc) 拡大された割られた横断面、(パネルd) 側面図。

【図2】例示的な製作工程の一部を示す。(パネルA) ゲルを紡いだシルクチューブの製作のデジタル写真。左の画像では、ポリプロピレンチューブ(1090 μm外径)を集めて、チューブの一方の末端を、より大きな内側ルーメンが合うように作成した。中央の画像では、非常に濃縮されたシルク溶液を、回転している金属ワイヤ上に紡いだ。右の画像では、ゲルを紡いだシルクチューブが凍結乾燥後に得られた。(パネルB) シルクカテーテルの概略。一方の末端を濃縮されたシルク溶液中に浸漬して乾燥させることによって、チューブの他方の末端をシルクでキャップした。(パネルC) 写真は、ゲルを紡いだチューブが、乾燥した場合でさえ柔軟性があることを示す。

【図3】耳チューブ製作に関する例示的な提供される方法を示す。(パネルA) 提供される注入成形工程を介して耳チューブを製造するための概略を示す。注入、凍結乾燥、メタノール処理、乾燥(パネルB) および機械加工の製作ステップに従ってチューブを製作した(側面図(パネルC)、および上面図(パネルD)で示される)。(パネルE) SEM画像は、この例示的な実施態様において、低い度合いの多孔性を示す。

【図4】パネル(A)は、Instron機械的試験が行われた結果を示し、圧縮弾性率は、図3に示される(図3、パネルC、D、およびEに示される)例示的な耳チューブに関して計算された。パネル(B)例示的な圧縮弾性率が示され、パネル(C)は、市場で売られている現行のPTFEチューブの圧縮弾性率であり、同様の方法を用いて製作されるシルク骨スクリューよりもいっそう低い(パネルC)。

【図5】(パネルA)は、例示的な耳チューブのベンチトップ凍結乾燥の結果を示し、(パネルB)および(パネルC)は、-20 ~ -30 の温度で6時間、提供される耳チューブの例示的なメタノールに基づく脱水を示し、(パネルB)は、25%シルクフィブロイン溶液で作られた耳チューブに関する結果を示し、(パネルC) 33%シルクフィブロイン溶液で作られた耳チューブに関する結果を示す。

【図6】多孔性コーティングを有する耳チューブを得るために、PEO/シルク溶液を混合するステップ(パネルA)、ペイントブラシを用いてコーティングをペイントするステップ(パネルB)、メタノール処理(パネルC)、および、乾燥するステップ(パネルD)を含む、提供されるコーティング工程の例示的な写真を示す。

【図7】とりわけ鼓膜付着および分解のために多孔質層を提供する、耳チューブ上のPE

10

20

30

40

50

コーティングを含む、図6に示される方法に従って作られる特定の提供される組成物の例示的な写真を示す。

【図8】滅菌後にImage Jソフトウェアで測定した、図7に示される特定の提供される実施態様の例示的な画像および寸法を示す(内径を1.1mmに調整した)。

【図9】 5.21×10^7 CFU/mLのグラム陰性 *Moraxella catarrhalis* 細菌株で、37°Cで24時間インキュベーション後の、浸漬コーティング方法を介した特定の薬剤溶出チューブの有効性に関する例示的な結果を示す(上列)。図9の上列に示されるように、コーティング薬物でコーティングされた例示的な提供されるシルク耳チューブ(チューブ+D)は、薬物コーティングを有さない同様のチューブ(チューブ-D)およびグラム陰性細菌を含むLB培地のポジティブコントロール(LB、G-)と比較して、抗菌活性を示す。さらに24時間の培地の培養後に、薬剤溶出チューブは、薬物を含まないチューブ(下列、中央)およびポジティブコントロール(下列、左)と比較して、増殖防止および細菌死滅の両方とも効果的であったことを示す(下列、右)。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、とりわけ、高度にカスタマイズ可能な物理的および機械的特性を有する再吸収可能なシルク耳チューブ、ならびに、提供されるシルク耳チューブを製造および使用する方法を提供する。

【0029】

様々な実施態様によれば、本発明は、シルクフィブロイン溶液を提供するステップ、および、シルクフィブロイン溶液からシルク耳チューブを形成するステップを含む、再吸収可能な耳チューブを作製する方法を提供し、ここで、シルク耳チューブは、2mm未満の長さであり、1.5mm未満の外径を有し、およびここで、シルク耳チューブは、再吸収可能である。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、実質的に完全に再吸収可能である。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、部分的にのみ再吸収可能である。

【0030】

シルクフィブロイン溶液

本明細書に記載の方法および組成物において用いられるシルクフィブロイン溶液は、例えば *Bombyx mori* 由来の溶解されたカイコシルクを含む溶液から得られ得る。あるいは、シルクフィブロイン溶液は、例えば *Nephila clavipes* 由来の溶解されたスパイダーシルクを含む溶液から得られ得る。また、シルクフィブロイン溶液は、例えば、細菌、酵母、哺乳類の細胞、トランスジェニック動物またはトランスジェニック植物由来の遺伝学的に操作されたシルクを含む溶液から得ることもできる。例えば、WO97/08315および米国特許5,245,012を参照。一部の実施態様では、遺伝学的に操作されたシルクは、例えば、治療剤、例えば、サイトカイン、酵素、または任意の数のホルモンまたはペプチド系薬物、抗菌剤および関連基質との融合タンパク質を含むことができる。

【0031】

様々な実施態様によれば、シルクフィブロイン溶液は、当業者に公知の任意の慣習の方法によって調製され得る。一部の実施態様では、溶液は水溶液である。例えば、*B. mori* 繭は、水溶液中で約30分間ボイルされる。一部の実施態様では、水溶液は、約0.02Mの Na_2CO_3 である。繭は、例えば水を用いてリンスされてセリシタンパク質が抽出され得て、抽出されたシルクは、塩類水溶液中に溶解される。この目的に有用な例示的な塩類は、臭化リチウム、チオシアン酸リチウム、硝酸カルシウム、または、シルクの可溶化が可能な他の化学物質を含む。好ましくは、一部の実施態様では、抽出されたシルクは、約9~12MのLiBr溶液中に溶解される。塩は、その結果として、例えば透析を用いて除去される。

【0032】

必要ならば、溶液を、それから、例えば、吸湿性ポリマー、例えば、PEG、ポリエチ

レンオキシド、アミロースまたはセリシンに対する透析を用いて、濃縮することができる。好ましくは、PEGは、8,000~10,000 g/molの分子量であり、25~50%の濃度を有する。slide-alyzer dialysis cassette (Pierce, MWCO 3500)が好ましくは用いられる。しかしながら、任意の透析システムが用いられ得る。透析は10~30%の終濃度のシルク水溶液をもたらすのに十分な期間である。ほとんどの場合では、2~12時間の透析が十分である。

【0033】

様々な実施態様によれば、シルク溶液は、任意の様々な濃度のシルクフィブロインを含んでよい。一部の実施態様では、シルク溶液は、0.1~40重量%シルクフィブロインを含んでよい。一部の実施態様では、シルク溶液は、約0.5重量%~40重量%（例えば、0.5重量%~25重量%、0.5重量%~20重量%、0.5重量%~15重量%、0.5重量%~10重量%、0.5重量%~5重量%、0.5重量%~1.0重量%）を含めたシルクフィブロインを含んでよい。一部の実施態様では、シルク溶液は、15~30重量%（例えば、20~25重量%）を含めたシルクフィブロインを含んでよい。一部の実施態様では、シルク溶液は、少なくとも0.1重量%（例えば、少なくとも0.5重量%、1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、15重量%、20重量%、25重量%、30重量%、35重量%、40重量%）のシルクフィブロインを含んでよい。一部の実施態様では、シルク溶液は、最大で30重量%（例えば、最大で40重量%、35重量%、30重量%、25重量%、20重量%、15重量%、14重量%、13重量%、12重量%、11重量%、10重量%、5重量%、4重量%、3重量%、2重量%、1重量%）のシルクフィブロインを含んでよい。

【0034】

一部の実施態様では、本明細書に記載のシルク耳チューブ組成物、およびそれらを使用する方法は、任意の有機溶媒の不存在下で行なわれ得る。したがって、これらの組成物および方法は、不安定分子、例えば、生物活性剤または治療薬の取り込みに特に適していて、特定の実施態様では、制御放出生体材料を生産するために用いられ得る。好ましくは、当該方法は、水中でのみ行なわれる。

【0035】

あるいは、一部の実施態様では、シルクフィブロイン溶液は、ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) などの有機溶媒を用いて生産され得る。そのような方法は、例えば、Li, M., et al., J. Appl. Poly Sci. 2001, 79, 2192-2199; Mm, s., et al. Sen I Gakkaishi 1997, 54, 85-92; Nazarov, R. et al., Biomacromolecules 2004 May-Jun; 5(3): 718-26に記載されている。

【0036】

一部の実施態様では、非シルクの生体適合性ポリマーをシルク溶液に加えて、本明細書に記載のシルク耳チューブにおける混成マトリックスを生産することもできる。本明細書に記載の組成物において有用な生体適合性ポリマーは、例えば、ポリエチレンオキシド (PEO) (US 6, 302, 848)、ポリエチレングリコール (PEG) (US 6, 395, 734)、コラーゲン (US 6, 127, 143)、フィブロネクチン (US 5, 263, 992)、ケラチン (US 6, 379, 690)、ポリアスパラギン酸 (US 5, 015, 476)、ポリリジン (US 4, 806, 355)、アルギン酸 (US 6, 372, 244)、キトサン (US 6, 310, 188)、キチン (US 5, 093, 489)、ヒアルロン酸 (US 387, 413)、ペクチン (US 6, 325, 810)、ポリプロラクトン (US 6, 337, 198)、ポリ乳酸 (US 6, 267, 776)、ポリグリコール酸 (US 5, 576, 881)、ポリヒドロキシアルカノエート (US 6, 245, 537)、デキストラン (US 5, 902, 800)、およびポリ酸無水物 (US 5, 270, 419)を含む。一部の実施態様では、2以上の生体適合性ポリマーが用いられ得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 7 】

寸法

提供されるシルク耳チューブの外径は、特定の適用および/または対象のニーズに従って変更することができ、例えば、約 0.1 mm ~ 約 4 mm またはそれよりも大きい。本明細書に記載されるように、一部の実施態様では、シルク耳チューブまたは特定の内側ルーメン直径の構築物は、シルク耳チューブを作製する工程において、所望の直径のロッドを用いることによって準備され得る。特定のサイズは、例えば、0.1 mm、0.2 mm、0.3 mm、0.4 mm、0.5 mm、0.6 mm、0.7 mm、0.8 mm、0.9 mm、1.0 mm、1.2 mm、1.4 mm、1.6 mm、1.8 mm、2.0 mm、2.2 mm、2.4 mm、2.6 mm、2.8 mm、3.0 mm、3.2 mm、3.4 mm、3.6 mm、および 3.8 mm を含む。好ましいサイズは、範囲として表現することもでき、例えば、0.1 ~ 2.9 mm、0.1 ~ 2.5 mm、0.1 ~ 2 mm、0.1 ~ 1.5 mm、0.1 ~ 1 mm、1.0 ~ 3 mm、1.0 ~ 2 mm、1.0 ~ 1.5 mm などである。一部の実施態様では、提供される実施態様は、これらの値の 1 つまたは複数から、最大で 20 % (例えば、最大で 15 %、10 %、5 %) 変化し得る。

10

【 0 0 3 8 】

また、提供されるシルク耳チューブの長さは、適用および/または対象 - 特有の様式でも変化し得る。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、0.5 ~ 3 mm (例えば、0.5 ~ 2.5 mm、0.5 ~ 2 mm、0.5 ~ 1 mm、1 ~ 2.5 mm、1 ~ 2 mm、1 ~ 1.5 mm) の長さを有してよい。特定の長さは、例えば、0.1 mm、0.2 mm、0.3 mm、0.4 mm、0.5 mm、0.6 mm、0.7 mm、0.8 mm、0.9 mm、1.0 mm、1.2 mm、1.4 mm、1.6 mm、1.8 mm、2.0 mm、2.2 mm、2.4 mm、2.6 mm、2.8 mm、および 3.0 mm を含む。一部の実施態様では、提供される実施態様は、これらの値の 1 つまたは複数から、最大で 20 % (例えば、最大で 15 %、10 %、5 %) 変化し得る。

20

【 0 0 3 9 】

本明細書において用いられる、濃度、量、サイズ、多孔性、および他の数値データは、本明細書において範囲形式で示され得る。そのような範囲形式は、単に便利性および簡潔性のために用いられ、柔軟に解釈すべきであり、範囲の限定として明示的に挙げられた数値を含むだけでなく、その範囲内に包含される個々の数値またはサブ範囲の全ても、それぞれの数値およびサブ範囲が明示的に挙げられたかのように含むことが理解されるべきである。

30

【 0 0 4 0 】

例えば、約 1.0 ~ 約 3.0 mm の範囲は、明示的に挙げられた 1.0 ~ 約 3.0 mm のサイズ限定を含むだけでなく、1.4 mm、1.8 mm、2.0 mm、および 2.7 mm のような個々の寸法、ならびに、1.0 ~ 1.4 mm、1.0 ~ 1.8 mm、1.8 ~ 2.4 mm、1.4 ~ 3.0 mm などのようなサブ範囲も含むと解釈されるべきである。さらに、そのような解釈は、範囲の幅または説明される特徴、例えば、タンパク質濃度、管状多孔性、ルーメン直径、ポロゲン濃度、および、他の成分または薬剤の量および濃度にかかわらず当てはまるべきである。

40

【 0 0 4 1 】

様々な実施態様によれば、提供されるシルク耳チューブは、任意の様々な方法で形状が異なってよい。例えば、一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、一方または両方の末端に斜めの角を含んでよく、他方の末端よりも大きな外径を有する一方の末端を含んでよく、1 つまたは複数のフランジを含んでよく、および/または、滑らかな内側表面および多孔性の外側表面を含んでよい。

【 0 0 4 2 】

層

様々な実施態様によれば、提供されるシルク耳チューブは、2 以上の層を含んでよい。一部の実施態様では、それぞれの沈着された層の厚さは、とりわけ、層を形成するために

50

用いられるシルクフィブロイン溶液中のフィブロインの濃度を調節することによって制御することもできる。例えば、提供されるシルク耳チューブが、浸漬コーティングによって形成される実施態様では、シルクフィブロイン水溶液中のフィブロインが濃縮されればされるほど、より多くのフィブロインが、ロッド上またはシルクフィブロインの以前の層上に沈着されて、よりぎっしり詰まった構造が形成される。

【0043】

一部の実施態様では、シルク耳チューブの各層は、実質的に同様の厚さおよび/または機能付与を有する。一部の実施態様では、シルク耳チューブの少なくとも1つの層は、少なくとも1つの他方の層とは異なる厚さおよび/または機能付与を有する。様々な実施態様によれば、機能付与は、1つまたは複数の治療剤の追加を含んでよい。

10

【0044】

一部の実施態様では、シルク耳チューブは、1~10層（例えば、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、1~4、1~3、または1~2層）を有してよい。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、単一の層を含む。一部の実施態様では、シルク耳チューブの各層は、1ナノメートル（nm）~1ミリメートル（mm）であってよい。例えば、一部の実施態様では、シルク耳チューブの各層は、10nm~1mm（例えば、25nm~1mm、50nm~1mm、100nm~1mm、200nm~1mm、300nm~1mm、400nm~1mm、500nm~1mm、または600nm~1mm）であってよい。一部の実施態様では、シルク耳チューブの各層は、10nm~1mm（例えば、10nm~900nm、10nm~800nm、10nm~700nm、10nm~500nm、10nm~400nm、10nm~300nm、または10nm~200nm）であってよい。

20

【0045】

ポア

一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、1つまたは複数のポロゲンの使用を通して、多孔性で作られ得る。任意の公知のポロゲンが、様々な実施態様による使用に適切であり得ると考えられる。一部の実施態様では、ポロゲンは、結晶（例えば、塩化ナトリウム結晶、糖結晶）、マイクロ-および/またはナノ-スフェア、ポリマー（例えば、ポリエチレンオキシド、またはPEO）、氷晶、硫酸、リン酸、アルカリ金属、ハロゲン化アルカリ土類金属、多糖類、ワックス粒子、合成ポリマー粒子、および/またはレーザーであってよく、または含んでよい。一部の実施態様では、ポロゲンは、ポアの機械的導入を含んでよい（例えば、シルク耳チューブに1回または複数回の穴をあけるための針または他の物品またはデバイスを用いる、または、シルク耳チューブ内に1つまたは複数の裂け目を導入するストレスを用いる）。

30

【0046】

本明細書において用いられる用語「多孔性」は、本明細書に記載のシルク耳チューブの少なくとも1つの層が、チューブの壁を通した材料の通過を可能にする特質を指す（チューブのルーメンを通るまたはそれに沿ったそれらの通過とは対照的）。本明細書に記載のシルク耳チューブは、細胞またはタンパク質の通過を実質的に可能にしないものから、タンパク質の通過を実質的に可能にするが細胞の通過を可能にしないものまで、両方の通過を可能にするものまで、様々な多孔性を包含し得る。本明細書において用いられる用語「非多孔性」は、本明細書に記載のチューブが、20分のアッセイの過程にわたって、チューブの壁を通したAlexa-Fluor-488-ラベル化BSAの通過を実質的に可能にしないことを意味する。「実質的に可能にしない」は、本明細書に記載の検出条件下で、20分のアッセイ後に、チューブの内側からのラベル化BSAがチューブの外側で検出されないことを意味する。あるいは、本明細書に記載の管状構成物の多孔性は、本明細書に記載または他の方法で当技術分野において知られているように測定/計算される、透過性係数の観点から表され得る。本明細書に記載の管状構成物は、Alexa-Fluor-488-ラベル化BSAに関する透過係数が $7.3 \times 10^{-4} \pm 1.5 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ 以下であるならば、タンパク質または細胞の通過に対して「非多孔性」と考えられ

40

50

る。本明細書において用いられる用語「タンパク質に対して通過性」は、本明細書に記載の管状構成物が、チューブ壁を通した Alexa-Fluor-488-ラベル化 BSA の通過を、本明細書において説明されるように測定された透過係数が少なくとも $8.9 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ で可能にすることを意味する。多孔性の評価の他のモードは、提供されるシルク耳チューブの横断面の走査電子顕微鏡評価の後の画像処理；または、水銀ポロシメトリー (porosimetry) 測定を含んでよい。

【0047】

様々な実施態様は、様々なサイズのポアを含むシルク耳チューブを含んでよい。一部の実施態様では、シルク耳チューブ内のポアは、約 $1 \sim 100 \mu\text{m}$ を含めた直径を有してよい。一部の実施態様では、シルク耳チューブ内のポアは、約 $1 \sim 50 \mu\text{m}$ (例えば、 $1 \sim 40$ 、 $1 \sim 35$ 、 $1 \sim 30$ 、 $1 \sim 25$ 、 $1 \sim 20$ 、 $1 \sim 15 \mu\text{m}$) を含めた直径を有してよい。一部の実施態様では、シルク耳チューブ内のポアは、約 $5 \sim 25 \mu\text{m}$ を含めた直径を有してよい。一部の実施態様では、シルク耳チューブ内のポアは、約 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ を含めた直径を有してよい。

10

【0048】

シルク耳チューブを形成する方法

様々な実施態様によれば、提供されるシルク耳チューブは、任意の適用に適切な方法を介して形成され得る。一部の実施態様では、例えば、提供されるシルク耳チューブを作製する方法は、限定されないが、注入成形、浸漬コーティング、ゲル紡糸、3Dプリント、および機械加工、多層 (layer by layer) 技術、および充填成形を含む。加えて、シルク耳チューブを形成するための特定の例示的な方法は、以下の実施例に示される。

20

【0049】

一部の実施態様では、本明細書に記載の提供されるシルク耳チューブは、放射線に基づく滅菌 (すなわちガンマ線)、化学に基づく滅菌またはオートクレービングのような、従来の滅菌工程を用いて滅菌され得る。一部の実施態様では、滅菌工程は、 $52 \sim 55$ の温度で8時間以下の時間、エチレンオキシドを用いるものであってよい。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、高い温度および圧力を用いたオートクレービングを介して滅菌され得る。滅菌後、生体材料は、輸送のために適切な滅菌された耐湿性パッケージ内にパッケージされ得る。

30

【0050】

治療剤

一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、1つまたは複数の治療剤を含む。一部の実施態様では、シルクフィブロイン溶液は、シルク耳チューブを形成する前に治療剤と接触され得て、または、シルク耳チューブ上にそれが (例えばコーティングとして) 形成された後にローディングされ得る。一部の実施態様では、少なくとも1つの治療剤は、シルク耳チューブの形成中にシルク内にトラップされて、例えば、一部の実施態様では、ガス流による水性フィブロイン層の乾燥、例えば、 N_2 ガスによるシルクフィブロイン層の脱水は、フィブロインの、ベータシート構造への構造変化を誘導し、それは薬剤をトラップする。一部の実施態様では、さらなる層は、それから、同一の薬剤、異なる薬剤が加えられ得て、または、薬剤が加えられ得ない。一部の実施態様では、この段階的な沈着アプローチは、様々な濃度の治療薬を各層内にトラップすることも可能にする。様々な実施態様によれば、シルク材料を溶かさないう任意の製剤担体が場合により用いられ得る。一部の実施態様では、治療剤は、液体、細かく分割された固体、または任意の他の適切な物理的形狀として存在し得る。

40

【0051】

本発明のシルク耳チューブとともに用いられ得る様々な異なる治療剤は広大であり、小分子、タンパク質、ペプチドおよび核酸を含む。一般に、本明細書に記載の管状構成物と関連し得る治療剤は、制限されずに：抗感染症、例えば、抗生物質 (例えば、シプロフロキサシン) および抗ウイルス剤；抗拒絶剤；鎮痛剤および鎮痛剤の組み合わせ；抗炎症剤

50

(例えば、デキサメタゾン)；ホルモン、例えば、ステロイド；増殖因子(骨形態形成タンパク質(すなわちBMP's 17)、骨形態形成様タンパク質(すなわち、GFD-5、GFD-7およびGFD-8)、上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(すなわちFGF1-9)、血小板由来増殖因子(PDGF)、インスリン様増殖因子(IGF-IおよびIGF-II)、形質転換増殖因子(すなわちTGF-β1、TGF-β2、TGF-β3)、血管内皮増殖因子(VEGF))；神経増殖因子、抗血管新生タンパク質、例えば、エンドスタチン、および、他の天然由来または遺伝学的に操作されたタンパク質、多糖類、糖タンパク質、またはリポタンパク質を含む。

【0052】

一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、1つまたは複数のプロテアーゼを含んでよい。一部の実施態様では、プロテアーゼは、セリンプロテアーゼ(例えば、プロテイナーゼK、プロテイナーゼXIV、またはキモトリプシン)、コラゲナーゼ、または、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)(例えば、MMP-1、MMP-2など)の1つまたは複数であってよい。一部の実施態様では、1つまたは複数のプロテアーゼは、シルク耳チューブ内に埋め込まれ、または、対象において移植後にシルク耳チューブと関連される。一部の実施態様では、プロテアーゼ活性化を引き起こすために1つまたは複数の活性化イベントを必要とする1つまたは複数のプロテアーゼが用いられ得る。一部の実施態様では、活性化イベントは、例えば、水和、pH変化(すなわち、上昇または低下)、補因子の添加、および/または、任意の他の適用に適切な活性化イベントであってよい。さらなる情報は、Brown et al., Impact of silk biomaterial structure on proteolysis, Acta Biomaterialia, 11:212-224, (2014)に見ることができ、その開示はその全体で本明細書中に援用される。

【0053】

使用方法

当業者は、提供されるシルク耳チューブに関するいくつかの使用を思い描くことが可能である。一部の実施態様では、本発明は、シルク耳チューブを対象の外耳道に導入するステップを含む、中耳炎を処置する方法を提供し、ここで、シルク耳チューブは、2mm未満の長さであり、1.5mm未満の外径を有し、およびここで、シルク耳チューブは、対象によって再吸収される。一部の実施態様では、中耳炎は、急性中耳炎、浸出および伝音難聴のある中耳炎、または慢性の化膿性中耳炎である。

【0054】

提供されるシルク耳チューブは、以前の鼓膜切開術チューブに勝るいくつかの利点を提供し、以前の鼓膜切開術チューブおよび挿入方法の多くの一般的な合併症の予防を含む。鼓膜切開術チューブの一般的な合併症の中でも、チューブを除去するためのその後の二次的な外科的処置に関する必要性があるチューブの遅延した押し出し、ならびに、押し出されていないチューブの周りに発症し得る鼓室硬化症および肉芽組織である。より不吉な合併症は、鼓膜切開術チューブに隣接する鼓膜の萎縮性領域の進行であり、次にはコレステリン腫の形成をもたらす。本発明の様々な実施態様は、少なくとも部分的に、以前に公知の鼓膜切開術チューブの使用に起因する、1つまたは複数のこれらの例示的な合併症を低減または除去することが可能である。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブの移植または挿入は、対象において炎症性反応をもたらさない。

【0055】

様々な実施態様によれば、提供されるシルク耳チューブは、インビボまたは棚上で長期間持続するように設計され得る。例えば、一部の実施態様では、インビボで実質的な完全性を6か月から5年の期間維持する、提供されるシルク耳チューブが製造され得て、換言すれば、これらの例示的なシルク耳チューブは、6月~5年の再吸収速度を有する。一部の実施態様では、提供されるシルク耳チューブは、1日~1週、8日~2年、1年~4年、1年および3年、または、1年~2年の再吸収速度を有してよい。一部の実施態様では、1年、2年、3年、4年、5年、またはそれよりも長いあいだ貯蔵安定性の、提供され

るシルク耳チューブが製造され得る。

【0056】

別段の定義がされない限り、本明細書において用いられる全ての技術的および科学的用語は、当業者の一人によって一般に理解されるのと同様の意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または同等の方法および材料が本発明の実施または試験において用いられ得るが、好ましい方法および材料を以下に記載する。本明細書において言及される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、参照により援用される。加えて、材料、方法および実施例は、単なる例示であり、限定されることを意図しない。矛盾する場合は、定義を含む本明細書が支配する。

【実施例】

【0057】

実施例1 - 例示的な浸漬コーティングおよびゲル紡糸方法

シルク溶液の調製 - シルク溶液は、以前の研究において説明される手順に従って、Bombayx moriカイコ繭から生産され得る。B. moriカイコシルクの繭は、Tajima Shoji Co (日本、横浜)によって供給され得る。手短には、繭は、沸騰した0.02Mの Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 溶液中で20分間練られる。それから、フィブロイン抽出物をMilli-Q水中で3回リンスして、9.3-M LiBr溶液中に溶解させて、20% (w/v) 溶液を産出して、続いて、蒸留水に対して2日間透析して(MWCO 3,500)、シルクフィブロイン水溶液を得る (ca. 8 wt/vol%)。

【0058】

シルクチューブの調製 - この実施例では、シルクチューブは、例示的な多数の浸漬コーティングまたはゲル紡糸方法を用いて形成される。多数の浸漬コーティング工程のために、シルクフィブロイン (10mlの8 wt/vol%) およびPEO (MW = 900,000; Sigma-Aldrich) (4mlの5 wt/vol%) 溶液 (シルク: PEO 4:1 w/w) の混合物を調製する (シルク管状マトリックス内のポア形成が所望であれば、ポアが必要でなければ、その結果、PEOは工程中に含まれる必要はない)。シルクチューブは、ニチノール、テフロンまたは他のワイヤまたはドエル (0.76mm直径) を、溶液中に浸漬コーティングするステップ、ワイヤまたはドエル上にコーティングされた混合溶液を、MeOH中で30秒間処理して、シルクをワイヤ表面上に安定化するステップ、およびそれから、コーティングされた層を空中で1時間乾燥させるステップによって製造される。この浸漬工程を繰り返して、約1.36mmの外径の管状マトリックスがワイヤ上に生じさせる。浸漬コーティング後、チューブを、MeOH中で2時間処理して、それから、水浴中に2日間置いてPEOを抽出する (使用するならば)。チューブをワイヤから除去して空中で乾燥させる。図1は、この浸漬コーティング方法に従って製造されたシルク耳チューブの例示的な画像を示す。ゲル紡糸工程のために、シルク溶液は、CentriVap減圧濃縮器 (Labconco, Kansas City, MO) を用いてさらに濃縮される (25~30 wt/vol%)。管状足場は、濃縮されたシルク溶液 [25-30% (w/v)、0.1ml/5cmの足場] を、以前に説明される [10] 慣習のゲル紡糸プラットフォームおよびプログラムを用いて、2mm/secの軸上スルーレート (ASR) で軸方向に往復運動および回転 (200rpm) するワイヤ上に紡ぐことによって製造される。チューブは、凍結乾燥されて、メタノールで2時間処理されて、そして、ワイヤから除去される。図2は、このゲル紡糸方法に従って製造されるシルク耳チューブの例示的な画像および概略、ならびに、そのようなシルク耳チューブの機械的特徴のいくつかを示す (図2のパネルCを参照)。

【0059】

この実施例に示されるのは、シルクフィブロイン溶液を生産して、本発明に係るシルク耳チューブを形成するための、例示的な、非限定の方法である。

【0060】

実施例2 - 注入成形を介したシルク耳チューブの例示的な製造

この実施例では、注入成形工程を用いてシルク耳チューブを製造した。

以前に説明された方法に従ってM a c h i n a b l e W a x . c o m (U S A) から調製されたワックスで鋳型を作成した。鋳型は、高さが3.30cmであり、0.76cmの直径であった。鋳型は、2つのピースを有し、1mm底部ウェハの上部に置かれた2mmの厚さの上側ピースは、上側部分におけるP T F Eの望ましい配置に対応する直径が0.76mmの支持となるホールを与えた。また、鋳型は、0.25cmの高さを有する、6ウェル上側ピースに取り付けられた薄いウェハを有した。シルク注入の前に、2つのピースを互いの上部に置いて、パラフィンを用いて一緒に密封して、P T F Eを、ボトム・ウェルソケット中に配置することによってウェルの中央に固定した。次に、C e n t r i V a pベンチトップバキュームを用いて25~33w/v%に濃縮された30分煮沸シルクを、鋳型の各ウェルにローディングした。ウェルにシルクを添加した後に、鋳型を-20℃中に4時間置いて、それから、完全に乾燥するまで、-30℃で、真空中で凍結乾燥器内に置いた。

【0061】

それから、鋳型をメタノール浴に12時間置いて(図3、パネルA)、脱イオン(DI)水中で洗浄して、機械加工前に空気乾燥させた。一部の実施態様では、注入されたサンプルは、間の凍結乾燥ステップを伴わずにメタノール中に直接移行してよいことに注意することが重要である。機械加工されたチューブは、0.8mmの内径、2mmの外径、および1.7mmの長さを有し、それは、走査電子顕微鏡画像(SEM)のImageJソフトウェアを用いて測定された(図3、パネルE)。一部の実施態様では、寸法は、例えば0.79mmの内径および1.36mmの外径に調整され得る。しかしながら、一部の実施態様では、オートクレーピングのような滅菌技術は、チューブを縮ませ得て、したがって、サイズのこの縮小は、異なる寸法への機械加工前に考慮されるべきである。一部の実施態様では、縮みを減らすために60℃オープン内での乾燥が使用され得て、および/または、シルク耳チューブは、縮みを考慮するように設計され得る。この実施例では、カラー・ボタンフランジを用いたが、他の実施態様では、ポップ・ベベル付きグロメットのような他のデザインが有用であり得る。シルク耳チューブの2つを、Instron機械的試験に供して、この方法によって製造されたチューブの機械学を正確に測定した。図4、パネルAおよびBに示されるように、チューブの圧縮係数は624~717MPaであった。市販のP T F Eチューブの機械学と並び、同様のアプローチを用いて製造されるスクリューよりもさらに低い(図4、パネルC)。

【0062】

加えて、上述のとおり製造されたサンプルシルク耳チューブを、a)真空中の間にサンプルを同時に凍結させないベンチトップ凍結乾燥器、b)時間を測定しながらメタノール処理、およびc)大きなバッチのシルク濃度方法、を用いて乾燥させた。

【0063】

特定の理論に縛られることを望まずに、この実施例で用いた鋳型は、乾燥工程中にサンプルが凍ったままであることを確実にするために-20~-30℃の温度で維持しながら真空中でサンプルを乾燥させることができる凍結乾燥器を必要とすると考えられる。サンプルをベンチトップ凍結乾燥器内に置くことは、乾燥工程中にチューブを部分的に解凍させた(図5、パネルA)。さらに、メタノール処理を6時間行なって、このメタノール処理時間は、図3に示されるチューブを達成するステップによって明らかにされた機械的に優れた材料ではなく、よりスタイロフォーム材料に似ているチューブをもたらした(図5、パネルBおよびCを参照)。機械学は、より短いメタノール時間によるチューブについては、それらは機械加工される能力がないので試験しなかった。したがって、一部の実施態様では、さらなるシート形成を促進するために、少なくとも12時間メタノール処理を施すことが有利であり得る。加えて、大きなバッチのシルク濃度方法は、CentriVap機内の2mLチューブ内に配置して濃縮する前に、5~7w/v%を含むシルクが透析チューブに加えられてシルクを事前濃縮するために1日間フード内に置かれる場合に、行なわれた。一部の実施態様によれば、より大きなバッチの濃度方法への移行は、

10

20

30

40

50

CentriVap紡糸後に、より大量のシルクが回収されるのを可能にし得て、十分なシルクが2 mLチューブから押し出されて、その後の注入ステップにおける気泡蓄積を低減させるのを確実にするのを助ける。

【0064】

この実施例において製造された例示的な耳チューブの走査型電子顕微鏡 (SEM) イメージングは、非常に低度の多孔性を明らかにした。特定の理論に縛られることを望まずに、より高度の多孔性は、生分解性薬物溶出シルク耳チューブのような一部の実施態様に望ましくあり得る。多孔性は最小限であったが、この実施例の例示的な技術は、以前に見られるものよりも、再生可能で、測定可能で、機械加工可能で、より信頼できる薬物ローディング方法を提供する。

10

【0065】

この実施例は、とりわけ、現在市場で売られているPTFE耳チューブと似た機械的特徴を有するシルク耳チューブが、迅速かつ経済的な様式で製造され得ることを示す。また、これらのチューブは、特定の適用または特定の対象にさえも合うようにさらにカスタマイズされ得ることも示す。

【0066】

実施例3 - 水性工程を介した多孔性シルク耳チューブの例示的な製造

シルク溶液の調製 - シルク溶液は、以前の研究において説明された手順に従って、Bombay moriカイコ繭から生産され得る。B. moriカイコシルクの繭は、Tajima Shoji Co (日本、横浜) によって供給され得る。手短には、繭は、沸騰した0.02 MのNa₂CO₃ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 溶液中で30分間練られて、5~7% w/vのシルク溶液が提供される。それから、溶液を、1日間、およそ8~9% w/vのシルクの溶液に濃縮させた。続いて、CentriVAP減圧濃縮器を用いてシルク溶液をさらに濃縮して、20~25% w/vの濃度のシルクを含むシルク溶液を得た。

20

【0067】

シルクチューブの調製 - 上述の濃縮されたシルク溶液を、それから、1 mLワックス鋳型に注入して、それから、メタノール浴中に鋳型を48時間置いた。48時間後、シルクシリンダーを鋳型から取り出して、脱イオン水 (DI) のビーカー内において、24時間攪拌した。それから、洗浄されたシルクシリンダーを鋳型から取り出して、1 mLワックス鋳型に置いて、フード内で乾燥させた。特定の理論に縛られることを望まずに、シルクシリンダーを鋳型内で乾燥させることは、乾燥工程中に材料が歪むのを避けるのを助け得ると考えられる。乾燥後、シルクシリンダーを所望の耳チューブ寸法に機械加工した。

30

【0068】

シルクおよびポリエチレンオキシド (PEO) によるチューブのコーティング

PEO溶液の調製 - 60 mg/mLのポリ (エチレン) オキシド (PEO) を50 mLの脱イオン (DI) 水に加えることによって、PEOの6% w/t溶液を調製した (合計300 mgのPEO)。PEOを加える前に、攪拌バーを用いてホットプレート上で、約80 °Cで10分間、DI水を加熱した。PEOがDI水に加えられた時点で、混合物を1時間攪拌して、粘性の均質な溶液になった。同時に、20% w/vシルク溶液を調製した。

40

【0069】

コーティング溶液の調製およびシルクチューブ上のコーティングのポア形成の誘導/コーティング - 次に、シルク/PEOの80/20 w/w混合物を、混合するシルクおよびPEOの容量を以下のように計算することによって作成した：

1 mLの20%シルクを使用：

a. (x合計mg) * 0.8 = 200 mgのシルク

b. x合計 = 250 mg、したがって、PEOのmg = 250 mg合計 - 200 mgシルク = 50 mg PEO

c. 50 mg PEO / (60 mg/mL PEO) = 0.83 mLのPEO

【0070】

50

シルクおよびPEO容量を2 mLエッペンドルフチューブに加えた後に、混合物を針で攪拌して、それから、溶液が完全に混合するまでボルテックスした。次に、シルクチューブをコーティングする前に：0.79 mmの直径を有するポリテトラフルオロエチレン（PTFE）がコーティングされたロッド上にチューブを置いて、シルクチューブを、均等に間隔をあけた。PEO/シルク溶液がペイントされる間、チューブの最小限の動きを確実にするために、テープを各チューブのいずれか側に置き、それは、コーティングされたチューブが互いに滑り込むのも防いだ（図6を参照）。次に、ロッドを計量ポート上に置いて、タッチアップペイントブラシを用いて、各チューブ上にシルク/PEO溶液の平らな層を適用した（図1、パネルBを参照）。それから、コーティングの直後に、100%メタノールを皿中に注いで、チューブをその中で1時間、水平に置いたままにし、そこで

10

【0071】

乾燥後、シルクチューブをオートクレーブして、走査電子顕微鏡（SEM）を用いて試験した。図7~8に示されるように、提供される方法は、多孔性シルク耳チューブを提供することが可能である。具体的には、図7は、この実施例において製造されたチューブ内に存在する複数のポアを示す。特定の理論に縛られることを望まずに、これらのポアの存在および特質は、一定期間後、インピボでのチューブの分解および/または鼓膜付着を促進し得ると考えられる。図8は、この実施例において提供されるチューブの例示的なSEM写真を示し、提供される方法を介して達成可能な重大な度合の多孔性の見た目を含む。

20

【0072】

実施例4 - シルクおよびシプロフロキサシンによるチューブのコーティング

Ciprodex（例示的な活性剤）による多孔性チューブのコーティング - 9 mg/mLのシプロフロキサシンHCLおよび3 mg/mLのデキサメタゾンを、20~25%シルクw/vに濃縮されたシルク溶液に加えた。次に、実施例3に上述のとおり調製された、PEOコーティングを有さないシルクチューブを、テフロンロッド上に置いた。それから、シルクチューブおよびテフロンロッドを、シルク-シプロフロキサシン-デキサメタゾン溶液中に浸漬して、それから、100%メタノールで満たされた計量ポート内に

30

【0073】

少なくとも1つの活性剤（ここではシプロフロキサシンおよびデキサメタゾン）でコーティングされた、提供されるシルク耳チューブの有効性を試験するために、これらの薬物がコーティングされたシルクチューブを、細菌の増殖を防止および/または遅らせる能力について、そのようなコーティングがされていないシルク耳チューブに対して比較し、およびまた、LB培地を含むポジティブコントロールに対しても比較した。これを試験するために、薬物がコーティングされたシルク耳チューブ、薬物がコーティングされていないシルク耳チューブ、およびポジティブコントロール耳チューブのそれぞれを、およそ5.21 * 10⁷ CFU/mLのグラム陰性細菌 *Moraxella catarrhalis* とともにマルチウェルプレート中で24時間インキュベートした（図9上列を参照）。およそ24時間後、培地をマルチウェルプレートから除去して、培養プレート上でさらに24時間37°Cでインキュベートした。図9は、薬物コーティングは、細菌の増殖を少なくとも24時間、防止および/または低減するのに効果的であったことを示す。

40

【0074】

これらの実施例に示されるように、提供される方法は、任意の様々なシルク耳チューブを作製するために用いられ得て（may be sued to）、一部の実施態様では

50

、提供されるシルク耳チューブは、生分解性でありかつ、提供される実施態様のポア中またはコーティング中などに1つまたは複数の活性剤を含むことに適していながら、以前に公知の非シルク耳チューブのものと似た物理的および/または機械的特徴を含み得る。

【0075】

[等価物および範囲]

当業者は、日常的にすぎない実験を用いて、本明細書に記載の本発明の特定の実施態様に対する多くの等価物を認識し、または確認することが可能である。本発明の範囲は、上記の説明に制限されることは意図されないが、むしろ、以下の特許請求の範囲に記載される。

【図1】

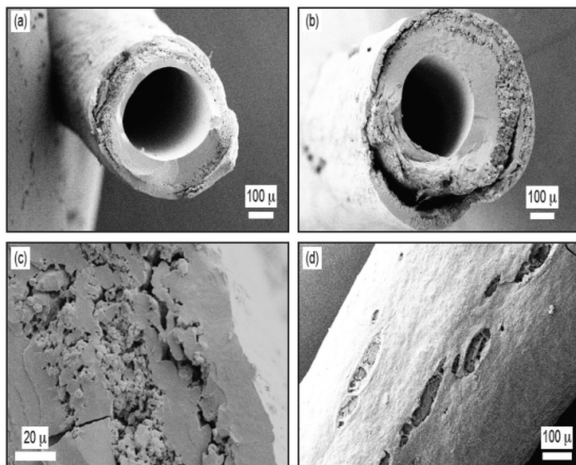


FIG. 1

【図2】

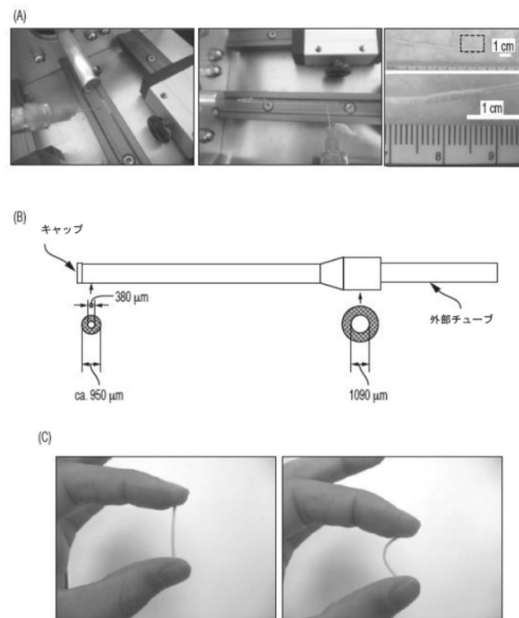


FIG. 2

【 図 3 】

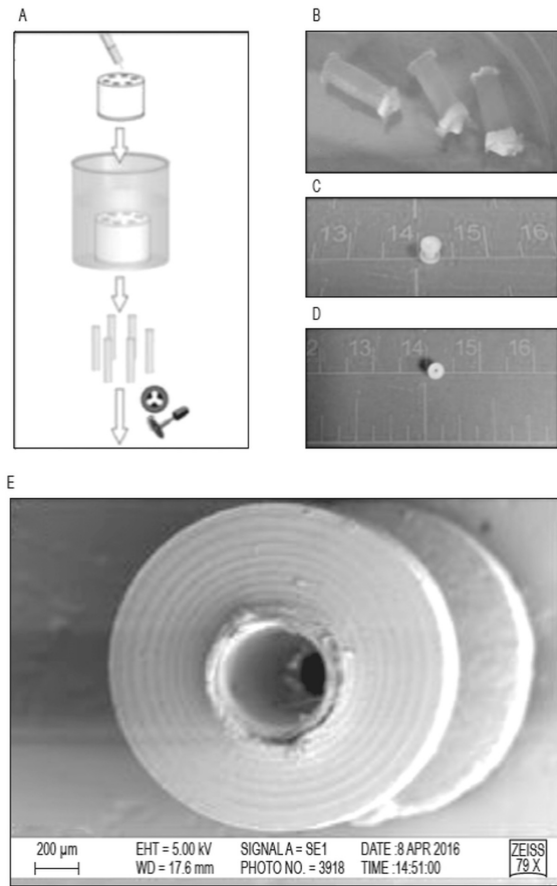


FIG. 3

【 図 5 】

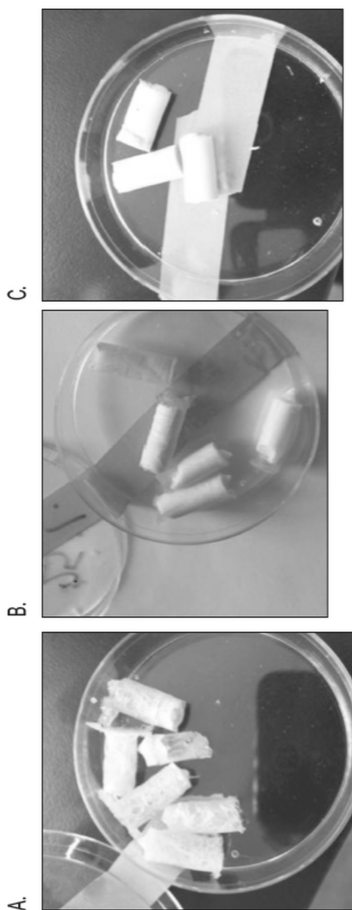


FIG. 5

【 図 4 】

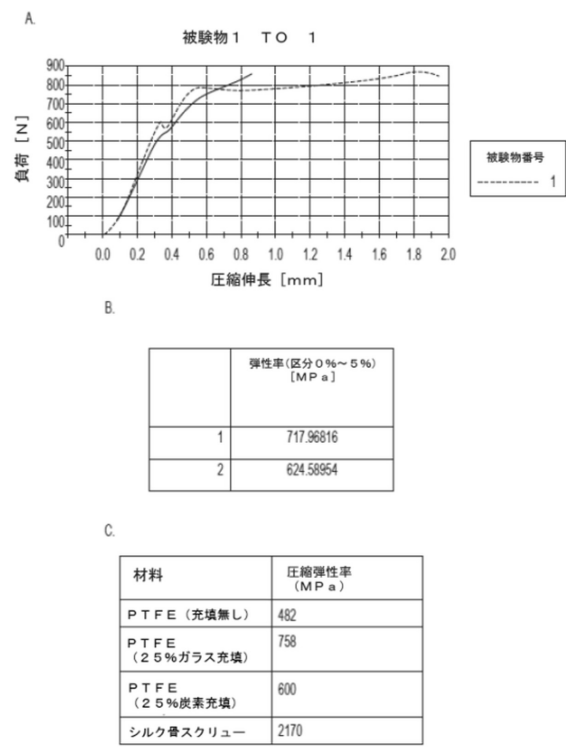


FIG. 4

【 図 6 】

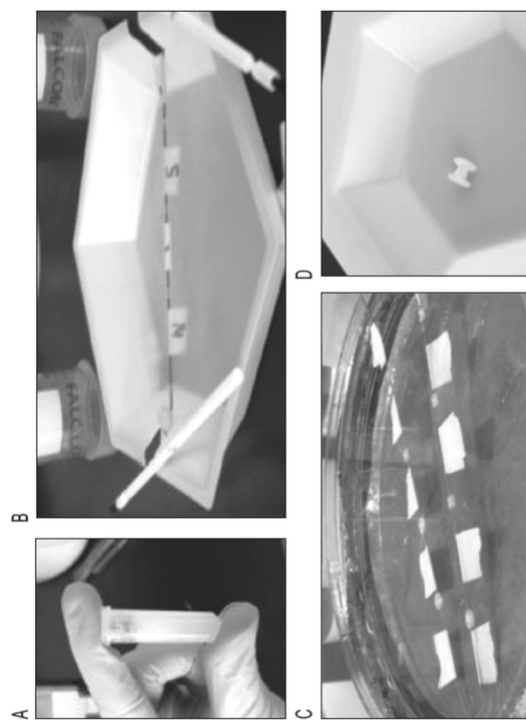


FIG. 6

【 図 7 - 1 】

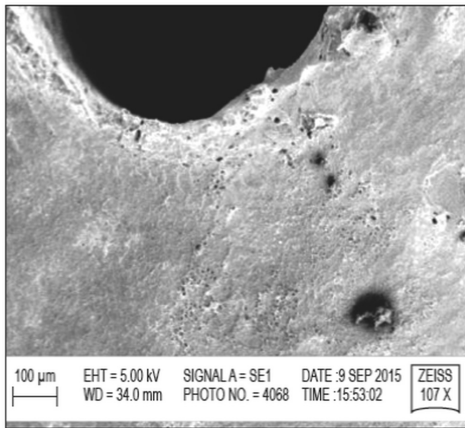
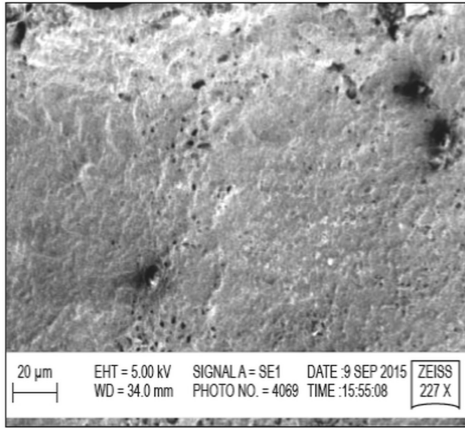


FIG. 7

【 図 7 - 2 】

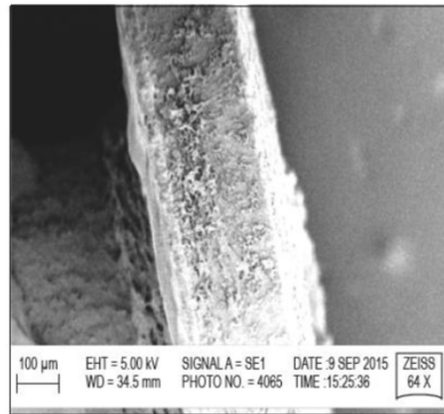
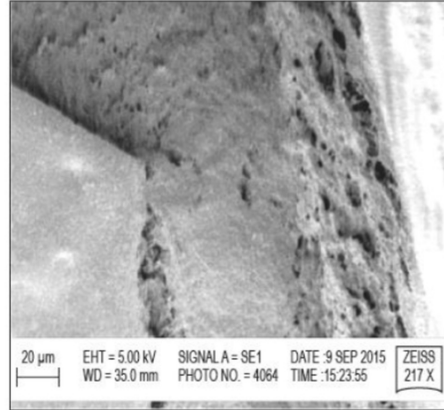
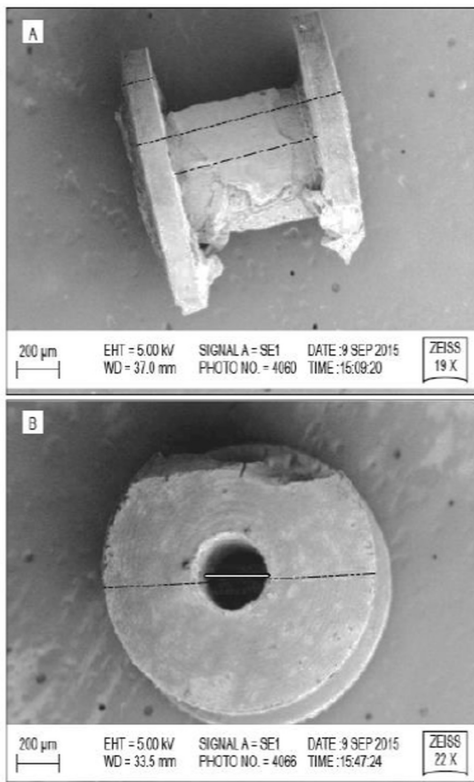


FIG. 7 (続き)

【 図 8 】



- カラーの長さ (A, 黄色い破線) : 0. 41mm
- カラー間の長さ (A, 青い破線) : 1. 74mm
- 合計の長さ (A, 赤い破線) : 2. 6mm
- ===== 内径 (B, 赤い実線) : 0. 82mm
- 外径 (B, 紫の破線) : 3. 13mm

FIG. 8

【 図 9 】

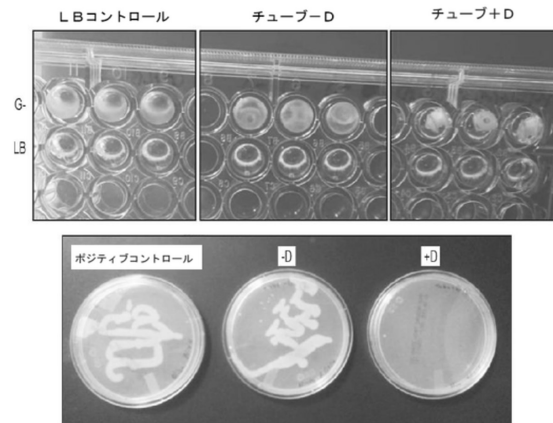


FIG. 9

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 27/16 (2006.01) A 6 1 P 27/16

(73)特許権者 310022017

ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション ドウーイング ビジネス アズ マサチューセ
ッツ ジェネラル ホスピタル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン フルーツ ストリート 5 5

(74)代理人 100113376

弁理士 南条 雅裕

(74)代理人 100179394

弁理士 瀬田 あや子

(74)代理人 100185384

弁理士 伊波 興一朗

(74)代理人 100137811

弁理士 原 秀真人

(72)発明者 カプラン デイヴィッド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 4 2 コンコード ボンド ストリート 4 6

(72)発明者 ワレン マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 9 2 ニーダム アレサ ロード 7 1

(72)発明者 ハートニック クリストファー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 6 1 ニュートン ダンクリー ストリート 3 1

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 特表2008-513051(JP,A)

国際公開第2014/051524(WO,A1)

NATURE PROTOCOLS, 2011年, Vol.6, No.10, p.1612-1631

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 L 2 7 / 0 0 - 2 7 / 6 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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