(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-530259
(P2021-530259A)
(43)公表日　令和3年11月11日(2021.11.11)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
A61F	9/01	(2006.01)	A61F	9/01	110	4C097
A61F	2/14	(2006.01)	A61F	2/14		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 38 頁）

(21)出願番号　特願2020-568250 (P2020-568250)
(86)(22)出願日　令和1年7月2日 (2019.7.2)
(85)翻訳文提出日　令和3年1月28日 (2021.1.28)
(86)国際出願番号　PCT/IB2019/000779
(87)国際公開番号　WO2020/008258
(87)国際公開日　令和2年1月9日 (2020.1.9)
(31)優先権主張番号　62/693,192
(32)優先日　平成30年7月2日 (2018.7.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　520474657
ゲバウアー―クロポテック　パテント　フェアヴァルトゥングス―ウーゲー
GEBAUER-KLOPOTEK PATENT VERWALTUNGS-UG
ドイツ連邦共和国，　７５２４２　ノイウハウゼン，　モンバッハシュトラーセ　７／１
(74)代理人　100107456
弁理士　池田　成人
(74)代理人　100162352
弁理士　酒巻　順一郎
(74)代理人　100123995
弁理士　野田　雅一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】コラーゲン足場の安定処理

(57)【要約】
形状安定化コラーゲン足場及びかかる安定化足場を得る方法が開示されている。実質は、例えば、ヒト又はブタの角膜実質から採取することができる。実質は、摘出中に又は摘出後の別のステップで成形することができる。成形（及び好ましくは脱細胞化）に続いて、摘出された実質部分を圧力、力又は真空に供して、流体含有量を低減し、次いで照射され又はその他の方法で処理し、その結果、コラーゲン鎖又はコラーゲン原線維の架橋形成を誘導する。種々のエネルギー源を用いて、例えば、紫外（ＵＶ）放射線を含めて、コラーゲンのペプチド結合の架橋形成を誘導することができる。足場はまた、選択的に高密度化又はパターン化することができる。本発明は、相加的眼科手術における角膜内移植用の安定したレンチクルを形成する上で特に有用である。
【選択図】　図５Ａ

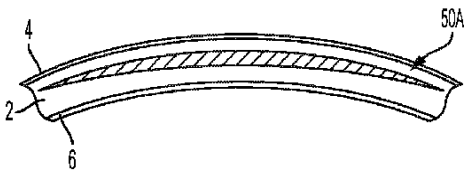


FIG. 5A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ドナー角膜源の中央領域から摘出されたドナー角膜実質から足場を形成する方法であって、
ドナー角膜実質を脱細胞化して、足場を得るステップ；
前記足場に存在する流体を除去するステップ；及び
前記足場の少なくとも一部を架橋して、その後の膨潤を防止するステップ
を含む方法。
【請求項２】
角膜切開刀、レーザー、又はウォータージェットを用いて角膜上でレンチクル抽出を実行して、ドナー角膜実質を得るステップ
をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記足場を成形するステップをさらに含み、成形する前記ステップが前記ドナー角膜実質の摘出と同時に又は連続的に実行される、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
流体を除去する前記ステップが、圧力、加速度（例えば、遠心力）又は真空を前記足場に適用することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
脱細胞化する前記ステップが、前記足場を化学的脱細胞化剤で処理することをさらに含み、任意選択で、脱細胞化する前記ステップが、水分を除去するステップの前若しくは後、又は架橋するステップの前若しくは後に行われる、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
脱細胞化する前記ステップが、洗浄剤又は界面活性剤を用いて前記足場から細胞破片を除去することをさらに含む、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記足場の少なくとも１つの免疫原性エピトープを酵素的に除去すること又はそのコンフォメーションを改変することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記足場から流体を除去する前記ステップ及び前記足場を架橋する前記ステップが、当初の摘出された実質よりも大きいコラーゲン密度を有する前記足場の少なくとも一部をもたらす、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記足場から流体を除去する前記ステップが、前記足場を圧縮することをさらに含み、それにより、圧縮及び架橋された足場の少なくとも一部は、コラーゲン少なくとも１５パーセント、又はコラーゲン少なくとも３０パーセント、又はコラーゲン少なくとも２５パーセント、又はコラーゲン少なくとも６０パーセントの組成を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
架橋する前記ステップが、圧縮された足場の少なくとも一部を架橋促進剤又は活性放射線に曝露することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
架橋する前記ステップが、前記圧縮された足場の少なくとも一部を放射線に曝露して、架橋促進剤又はその他のエネルギー媒介剤の補助の有無にかかわらず、コラーゲン原線維間のペプチド結合形成による架橋形成を誘導することをさらに含み、
任意選択で、前記足場を架橋する前記ステップが、前記足場を紫外放射線、Ｘ線、ガンマ放射線、又は電子ビームで照射することをさらに含む、
請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
架橋する前記ステップが、直接曝露によって、若しくは微小入射角度での曝露によって

、又は前記足場の表面に接続されたエバネセント導波管を介して、前記圧縮された足場の少なくとも一部を紫外放射線に曝露することをさらに含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
架橋する前記ステップが、前記圧縮された足場の表面部分が前記足場のバルク領域よりも大きな程度の架橋形成及び高いコラーゲン密度を呈するように、前記圧縮された足場の前記表面部分を放射線に選択的に曝露することをさらに含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１４】
架橋する前記ステップが、任意の微生物因子を不活性化及び／又は前記足場を滅菌するのに十分な放射線を適用することをさらに含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１５】
前記足場が、レンチクルに最終的な所望の形状を与えるレンチクル本体、前面及び後面を有する移植可能なレンチクルとしての使用向けに構成されている、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
架橋する前記ステップが、架橋剤を用いて又はパターニング放射線の選択的適用によって前記レンチクルの後面の少なくとも一部を処理して、患者の実質床に移植された場合、実質床への前記レンチクルの付着を促進することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
架橋する前記ステップが、前記足場の光学的透明度を増強することをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
前記足場が４分角未満の散乱角度シータを呈する、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記レンチクルが、３分角未満又は２分角未満の散乱角度シータを呈する、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
前記レンチクルが１分角未満の散乱角度シータを呈する、請求項１７に記載の方法。
【請求項２１】
放射線の適用を低減して、架橋したコラーゲン性の足場を形成する方法であって、
足場に存在する流体を除去するステップ；並びに
圧縮された足場を放射線に供して、前記足場の少なくとも一部を架橋し、その結果、最終的な所望の形状を画定し、前記足場が水性環境に曝露されている場合その後の膨潤を防止するステップ
を含む方法。
【請求項２２】
前記足場の少なくとも１つの表面に圧力を適用することによって前記足場を圧縮するステップをさらに含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記足場を圧縮する前記ステップが、
流体チャンバの開口部にわたって前記足場を固定し、前記足場の１つの表面に流体圧力を適用して、第１の所望の形状の足場を形成することをさらに含む、
請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
圧縮の前に、又はその逆で、前記足場を脱細胞化するステップをさらに含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
前記足場を架橋する前記ステップが、前記足場を紫外放射線、Ｘ線、ガンマ放射線、又は電子ビームで照射することをさらに含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２６】
前記足場を照射する前記ステップが、前記足場を、約１５ジュール／ｃｍ^2～約２５０

０ジュール／ｃｍ^{2}までの範囲のフルエンスを有するＵＶ放射線で、任意選択で約１５ジュール／ｃｍ^2～約６００ジュール／ｃｍ^{2}までの範囲のフルエンスを有するＵＶ－Ｃ放射線（約１００ｎｍ～約２８０ｎｍ）で、好ましくは一部の場合では約２４０ｎｍ～約２８０ｎｍのＵＶ－Ｃ放射線で、照射して、架橋形成を誘導することをさらに含む、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

架橋する前記ステップが、前記足場の光学的透明度を増強することをさらに含む、請求項２１に記載の方法。

【請求項２８】

前記足場が、４分角未満、又は３分角未満、又は２分角未満、又は１分角未満の散乱角度、シータを呈する、請求項２７に記載の方法。

【請求項２９】

前記足場がコラーゲン濃度１５％超、又は３０％超、又は４５％超、又は６０％超を呈するように前記足場を圧縮するステップをさらに含む、請求項２１に記載の方法。

【請求項３０】

前記足場が、残留ＤＮＡ又はＲＮＡの含有量によって評価して、当初のＤＮＡ又はＲＮＡの含有量の１重量パーセント未満、又は０．１重量パーセント未満、又は０．０１重量パーセント未満である細胞物質の残留量を呈する、請求項２１に記載の方法。

【請求項３１】

レンチクルに所望の形状を提供する前面及び後面を有する、角膜ドナー源に由来するレンチクル本体であり；

軸方向の膨潤を防止するように少なくとも部分的に架橋されたコラーゲンをさらに含む前記レンチクル本体

を含む、コラーゲン性のレンチクル。

【請求項３２】

コラーゲンの層が放射線の適用によって架橋されており、前記コラーゲン性のレンチクルがコラーゲン原線維間に誘導された化学結合によってさらに特徴付けられる、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。

【請求項３３】

前記コラーゲン性のレンチクルに残留する細胞物質の量が、残留ＤＮＡ又はＲＮＡの含有量によって評価されて、当初のＤＮＡ又はＲＮＡの含有量の１重量パーセント未満、又は０．１重量パーセント未満、又は０．０１重量パーセント未満であるように、脱細胞化されている、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。

【請求項３４】

角膜の屈折力を変化させるために患者の眼の実質領域に移植することができるように、所望の形状で形成されている、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。

【請求項３５】

円板状の形状及び約０．５ｍｍ～約１０ｍｍの直径を有し、任意選択で、前記コラーゲン性のレンチクルの少なくとも片側に圧力を適用することによって得られた湾曲を有する、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。

【請求項３６】

約６００マイクロメートル未満、約４００マイクロメートル未満、又は約２００マイクロメートル未満又は約１００マイクロメートル未満、又は５０マイクロメートル未満の最大の厚さを有する、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。

【請求項３７】

免疫原性エピトープの除去又は分解に起因して低い免疫反応性を呈する、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。

【請求項３８】

前記コラーゲン性のレンチクルの前記後面は、患者の実質床に移植された場合、実質床への前記コラーゲン性のレンチクルの付着を促進するように架橋剤又は可変架橋形成のパ

ターンをさらに含む、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項３９】
前記前面は、前記レンチクル本体のバルク領域よりも大きいコラーゲン密度を有する前面領域をさらに含む、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項４０】
前記足場の１つの表面に圧力を適用することによって任意選択で形成された湾曲を有する、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項４１】
角膜内インプラントとしての使用向けに十分な光学的透明度を有する、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項４２】
３分角未満、又は２分角未満、又は１分角未満の散乱角度、シータを呈する、請求項４１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項４３】
コラーゲン濃度１５％超、又は３０％超、又は４５％超、又は６０％超を呈するように、流体が低減しており、任意選択で圧縮されている、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項４４】
ＵＶ放射線又は電子ビームなどの放射線によって滅菌されている、請求項４１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項４５】
保管及び／又は運送向けに前記コラーゲン性のレンチクルを囲んでいる容器をさらに含む、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項４６】
前記容器が、前記足場を成形、圧縮するための、又は前記足場から流体を除去するためのモールドとしても機能する、請求項４５に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項４７】
前記容器が、前記足場の架橋形成又は滅菌を容易にするように、少なくとも１つの放射線透過性又は半透過性の表面をさらに含む、請求項４５に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項４８】
天然の角膜実質組織よりも大きい屈折率を呈する、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項４９】
１．３７７よりも大きい屈折率を呈する、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項５０】
１．３７８よりも大きい屈折率を呈する、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項５１】
屈折率の勾配を呈する、請求項３１に記載のコラーゲン性のレンチクル。
【請求項５２】
レンチクルに所望の形状を提供する前面及び後面を有する、角膜ドナー源に由来するレンチクル本体並びに
角膜内インプラントとしての使用向けに十分な光学的透明度
を備える、脱細胞化コラーゲン性のレンチクル。
【請求項５３】
４分角未満の散乱角度、シータを呈する、請求項５２に記載の脱細胞化コラーゲン性のレンチクル。
【請求項５４】

２分角未満の散乱角度、シータを呈する、請求項５２に記載の脱細胞化コラーゲン性のレンチクル。
【請求項５５】
１分角未満の散乱角度、シータを呈する、請求項５２に記載の脱細胞化コラーゲン性のレンチクル。
【請求項５６】
前記レンチクル本体が、
軸方向の膨潤を防止するように、少なくとも部分的に流体が低減しており、任意選択で圧縮されている、少なくとも部分的に架橋されているコラーゲン
をさらに含む、請求項５２に記載の脱細胞化コラーゲン性のレンチクル。
【請求項５７】
密封空洞を画定している上部の本体及び下部の本体を備える、レンチクル用の保管容器であって、
前記上部の本体の少なくとも一部若しくは前記下部の本体の少なくとも一部、又は両本体の少なくとも一部がレンチクルのその場での滅菌を可能にするように放射線透過性である、
保管容器。
【請求項５８】
少なくとも１つのシールが前記上部の本体と前記下部の本体との間に設けられており、任意選択で、前記シールがＯリング又はフラットガスケットシールである、請求項５７に記載のレンチクル保管容器。
【請求項５９】
前記シールが放射線透過性である、請求項５８に記載のレンチクル保管容器。
【請求項６０】
前記シールがＵＶ透過性であり、任意選択でフルオロポリマー組成物を含む、請求項５８に記載のレンチクル保管容器。
【請求項６１】
前記シールが、ポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ）、フッ素化エチレンプロピレン（ＦＥＰ）、エチレンテトラフルオロエチレン（ＥＴＦＥ）又はパーフルオロアルコキシ（ＰＥＡ）の組成物を含む、請求項５８に記載のレンチクル保管容器。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、コラーゲン足場の安定処理に関する。
（関連出願）
本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、２０１８年７月２日出願の米国特許仮出願第６２／６９３，１９２号の優先権を主張する。
【背景技術】
【０００２】
[001]異常な屈折状態、例えば屈折異常によって引き起こされる視覚障害は、あらゆる年齢の患者にとって深刻な問題となる可能性があり、常にとはかぎらないが、サブトラクティブレーザー処置で治療することができる場合が多い。近年フラップを切離し折り返して角膜の実質内領域を露出させた後に、患者の角膜へのレンチクルの移植を伴う相加的な技法が開発された。レンチクルの形状が、角膜の湾曲を変えることによって患者の角膜の屈折力を修正する。次いで、フラップをレンチクルの上部に戻して置くことができる。円錐角膜などの他の状況では、移植レンチクルは、異常な実質を機械的に安定化又は定常化し、疾患の進行を遅延させることができる。円錐角膜の症例では、フラップよりもむしろ実質ポケットがより頻繁に形成される。
【０００３】
[002]しかし、いくつかの問題が、相加的（レンチクル）技法のより広い受入れを制限

している。第一に、レンチクルを形成するためのドナーヒト角膜の利用可能性がまったく限られている。加えて、レンチクルが非ヒトの給源から得られる場合、免疫反応を最小限に抑えるためにレンチクルを脱細胞化する必要がある。さらに、レンチクル（コラーゲンの構造化した層）の性質に起因して、それらは脆弱であり、特別な取扱いを必要とする。一般に、脱細胞化は、構造をさらにもろくし及び／又は浸透性の特性を改変し、その結果、脱細胞化レンチクルは、術後の膨潤を起こしやすくなり、その結果、手術時の適切な屈折矯正がそのまま保たれない可能性がある。したがって、移植可能なレンチクル及び他のコラーゲンベースの足場を安定化するためのより良好な方法が求められている。

【０００４】

[003]コラーゲンは人体に広く存在する。例えば、コラーゲンは、腸、静脈、関節、皮膚、内膜、心室弁、並びに角膜に存在する。

【０００５】

[004]しかし、角膜の実質コラーゲンは多くの点で独特である。水分以外では、コラーゲンが角膜実質の主成分を構成する。実質の他の成分としては、グリコアミノグリカン（ＧＡＧ）及びプロテオグリカンが挙げられる。生細胞は、角膜実質のわずか約１～４パーセントを構成する。ヒト実質はおよそ１００～１５０のラメラからなり、それぞれが平行なコラーゲン原線維を含有する。透明であるために、コラーゲン原線維の層は、層又はラメラどうしの間の間隔がほぼ理想的に分布した面内整合を呈する。このように構成されたコラーゲン原線維を含有する器官は他にない。

【０００６】

[005]実質コラーゲンは、面内方向で高い引張強度を呈するが、それに比べ、面に垂直な方向ではかなりもろい。脱細胞化された実質はさらにもろさを呈する。そのような脱細胞化された実質コラーゲンを足場として使用する場合、その機械的強度を増大するより良い方法が必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

[006]コラーゲン足場を安定化する方法が開示されており、本発明の方法によって、水分抽出及び／又は圧縮、並びに架橋形成を用いて、コラーゲン足場を成形し、コラーゲン足場を機械的に強化し、水性環境で膨潤するコラーゲン足場の傾向を防止することができる。本発明の方法は、相加的屈折矯正手術の一部として、実質内又は角膜内移植用のレンチクルとしてコラーゲン足場を調製するのに特に有用であり得る。

【０００８】

[007]コラーゲン性の組織から形成された足場は、角膜に機械的利点をもたらすことができる。しかし、足場は、脱細胞化処理によって通常は機械的にもろくなっているので、実質に配置する前に強化し方向付ける必要がある。本発明の一態様では、ドナーのコラーゲン性の組織から足場を形成及び強化する方法であって、ドナーのコラーゲン性の組織源（例えば、ドナー角膜実質）の中央領域から組織の一部を摘出するステップ；組織部分を成形して、第１の所望の形状の足場を形成するステップ；足場を脱細胞化するステップ；足場を締固めて（例えば、足場のラメラ構造に一般には垂直な方向に）、足場に存在する過剰な流体を除去するステップ及びコラーゲン密度を増強するステップ；並びに足場の少なくとも一部を架橋して、機械的に強化するステップ及び足場が水性環境に曝露されている場合、その後の膨潤を防止するステップを含む方法が開示されている。したがって、本発明の方法は、足場の機械的強度及び化学的安定性を増強することができる。足場が角膜内移植可能なレンチクルとしての使用向けである場合、架橋形成を用いて、足場の光学的透明度（例えば、透明性）を回復及び／又は確保することができる。

【０００９】

[008]ある特定の実施形態では、摘出するステップ及び成形するステップは、同時に実行することができる。足場を脱細胞化するステップは、細胞を溶解すること、洗浄剤又は界面活性剤でレンチクルから細胞破片を除去することをさらに含むことができるとともに

、任意選択で、レンチクルから少なくとも１つの免疫原性エピトープを酵素的に除去することをさらに含むことができる。足場を脱細胞化する際に有用な一溶液は、水、エチルアルコール及びグリセロールを含むことができる。足場の配向も操作することができる。本明細書に記載の方法ステップは、実現可能であれば、任意の順序で実行することができる。

【００１０】

[009]特定の任意の操作理論に拘束されるものではないが、コラーゲン足場の機械的強化は、架橋形成の結果であるだけではなく、コラーゲン原線維のより硬く締まった束への締固めの結果でもある。高密度化された原線維束の架橋形成は、架橋形成単独によって達成可能な改善を超える材料強度をもたらすことができる。

【００１１】

[0010]本発明の方法では、架橋するステップは、圧縮された足場の少なくとも一部を架橋剤若しくはエネルギー媒介剤に曝露すること、又は圧縮された足場の少なくとも一部を放射線に曝露して、エネルギー媒介剤の補助の有無にかかわらず、コラーゲン原線維間のペプチド結合形成による架橋形成を誘導することをさらに含むことができる。化学的架橋形成及び光架橋形成の組み合わせも開示されており、この組み合わせによって、化学薬剤は、異なる化学結合を誘導し、コラーゲン原線維間にメカニカルブリッジを物理的に形成することができる。

【００１２】

[0011]架橋するステップは、直接曝露によって、若しくは見通し角度でのそのような放射線への曝露によって又は足場の表面に接続されたエバネセント導波管を介して、圧縮された（又は脱水された）足場の少なくとも一部を放射線に曝露することによって、行うことができる。架橋するステップは圧縮された足場の表面部分を放射線に曝露することをさらに含むことができ、その結果、表面部分が足場のバルク領域よりも大きな程度の架橋形成及びより高いコラーゲン密度を呈する。

【００１３】

[0012]好ましくは、圧縮するステップ及び架橋するステップは、最初の脱細胞化された足場セグメントよりも大きいコラーゲン密度を有する足場の少なくとも一部をもたらす。例えば、圧縮及び架橋された足場の少なくとも一部は、コラーゲン少なくとも２０パーセント、好ましくはコラーゲン３５パーセント超の組成を有することができる。

【００１４】

[0013]本発明の方法は、足場が、レンチクル本体、配向された前面及び後面を有する移植可能な角膜内レンチクルとしての使用向けに構成されるように、実践することができ、本発明の方法は、架橋剤を用いて又はパターニング放射線の選択的適用によってレンチクルの後面の少なくとも一部を処理して、実質床へのレンチクルの付着を促進することをさらに含む。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、ドナー実質からレンチクルを形成するステップ、レンチクル抽出よってドナー実質の中央領域から組織の一部を除去するステップ、除去された組織部分を第１の所望の形状のレンチクルに成形するステップであって、レンチクルが、レンチクル本体、前面及び後面を有する、成形するステップ、レンチクルから細胞物質を除去するステップ；レンチクルに存在する過剰な流体（例えば、実質に当初存在していた水分、及び脱細胞化中にレンチクルに導入された可能性のある任意のその他の流体）を除去するステップ；並びにレンチクルの少なくとも一部を架橋して、最終的な所望の形状を画定し、レンチクルが水性環境に曝露されている場合その後の膨潤を防止するステップを含むことができる。レンチクルの形成は、角膜切開刀又はフェムト秒レーザー又はエキシマレーザー又はウォータージェットを用いて実行されるレンチクルの摘出又は抽出によって行うことができる。

【００１５】

[0014]レンチクルの架橋形成は、圧縮された足場の少なくとも一部を架橋剤若しくはエネルギー媒介剤に曝露することによって、又は圧縮された足場の少なくとも一部を放射線に曝露して、エネルギー媒介剤の補助の有無にかかわらず、コラーゲン原線維間のペプチ

ド結合形成による架橋形成を誘導することによって、行うことができる。例えば、レンチクルの架橋形成は、直接曝露によって、若しくは見通し角度での曝露によって又は足場の表面に接続されたエバネセント導波管を介して、圧縮された足場の少なくとも一部を放射線に曝露することを含むことができる。ある特定の適用では、紫外放射線が好ましいエネルギー源である。

【００１６】

[0015]コラーゲンの架橋形成に関して化学的方法が報告されている。これらの化学的方法は、化学薬剤（例えば、ゲニピン）又は光化学薬剤の使用を含むことができる。例えば、米国特許出願公開第２０１７／０１１９９２８号は、心膜組織を脱細胞化することによって人工心臓弁を形成して、グルタルアルデヒド含有溶液で架橋し、移植用に所望の構造に成形することができるコラーゲン性のマトリックス材料を得る方法を開示している。

【００１７】

[0016]放射線架橋形成は化学的架橋形成よりも有利であり得、その理由は、生じるレンチクルは頻繁により透明であり、結果としてレシピエントの角膜への移植の後により良好な視力がもたらされるからである。

【００１８】

[0017]圧縮された足場の放射線架橋形成は、非圧縮の（流体を多く含んだ）足場に必要なエネルギーよりも実質的に少ないエネルギーで行うことができる。例えば、圧縮の後の典型的なレンチクルの場合、架橋形成は、約１５ジュール／ｃｍ^{2}未満、又は一部の場合では約２５００ジュール／ｃｍ^{2}未満のフルエンスでの紫外放射線によって行うことができる。より一般的には、所望のフルエンスは、約１５ジュール／ｃｍ^2～約６００ジュール／ｃｍ^{2}までの範囲となる。コラーゲン性の足場を架橋するのに有用な波長の一特定の範囲は、「ＵＶ－Ｃ」波長帯の一部、例えば、約１８５ｎｍ～約２８０ｎｍまでに一般に相応する。その他のＵＶ波長帯（約２８０ｎｍ～約３１５ｎｍ（又は３２０ｎｍ）までの範囲のＵＶ－Ｂ帯、又は約３１５ｎｍ（又は３２０ｎｍ）～約４００ｎｍまでのＵＶ－Ａ帯）も、一部の場合では、Ｘ線、ガンマ放射線又は電子ビームと同様に用いて、足場の少なくとも部分的な架橋形成及び／又は滅菌を誘導することができる。

【００１９】

[0018]脱細胞化コラーゲン足場は、ある程度の「形状記憶」又は「応力ヒステリシス」を呈するので、脱細胞化コラーゲン足場を別途圧縮し、その後に、脱細胞化コラーゲン足場を架橋することが可能であるが、脱細胞化コラーゲン足場は圧縮モールドによってもはや拘束されてはいない。このような分離していることは（連続的に）代替の製造プロセスである。しかし、好ましい方法は、ほとんどの場合、足場がモールド内で圧縮されている間に架橋形成を誘導することである。いずれの場合も、締固められたコラーゲン束の架橋形成は、分散したコラーゲン原線維構成の架橋形成よりも大きい強度をもたらす。

【００２０】

[0019]本発明の方法の別の態様では、架橋するステップは、表面部分が足場のバルク領域よりも大きな程度の架橋形成及び高いコラーゲン密度を呈するように、圧縮された足場の表面部分を放射線に曝露するステップをさらに含むことができる。さらに、架橋するステップはまた、任意の微生物因子を不活性化し、レンチクルを滅菌するのに十分な放射線を適用することも含むことができる。ある特定の実施形態では、足場を脱細胞化するステップは、洗浄剤又は界面活性剤を用いてレンチクルから細胞破片を除去することを包含することができるとともに；任意選択で、レンチクルから少なくとも１つの免疫原性エピトープを酵素的に除去することをさらに含む。

【００２１】

[0020]さらに、圧縮するステップ及び架橋するステップは、最初のコラーゲン性の組織セグメントよりも大きいコラーゲン密度を有する足場の少なくとも一部をもたらすことができる。架橋するステップは、前面領域がレンチクル本体のバルク領域よりも大きな程度の架橋形成又は大きいコラーゲン密度を呈するように、前面に放射線を選択的に適用することをさらに含むことができる。

【００２２】
[0021]本発明のさらに別の態様では、レンチクルに所望の形状及び配向を提供するように形成された前面及び後面を有する、ドナー組織に由来するレンチクル本体を有する脱細胞化コラーゲンレンチクルが開示されている。例えば、レンチクルは、常にとは限らないが、レンチクルの前面及び後面と頻繁に一致する、凸面及び凹面を有することができる。レンチクル本体は、コラーゲン１５又は２５パーセント超である組成を得るように脱細胞化及び圧縮されたコラーゲンの層を含むことができるとともに、さらに少なくとも部分的に架橋されて軸方向の膨潤を防止することができる。バルク架橋レンチクルの場合、組成はコラーゲン３０パーセント超であり得る。さらに、局所的に高密度化の層が望ましい場合（例えば、ボーマン膜などの角膜構造に近似するために）、局所的なコラーゲン濃度はさらにより高くすることができる（例えば、コラーゲン３５パーセント超又は４０パーセント超又は６０パーセントさらに超）。

【００２３】
[0022]レンチクルは、ある特定の実施形態では、放射線の適用によって架橋されているコラーゲンの層によって特徴付けることができ、レンチクルはまた、コラーゲン原線維間の誘導されたペプチド結合によってさらに特徴付けることができる。レンチクルは、細胞物質を９０パーセント～１００パーセントまで、又は好ましくは９５パーセント～９９．９９パーセントまで除去されていてもよく、脱細胞化、圧縮及び架橋形成に続いて、レンチクルを患者の眼に移植して角膜の屈折力を変化させ、実質の損傷又は病変の領域を補充又は強化することができるように所望の形状で形成することができる。

【００２４】
[0023]本発明によるレンチクルは、湾曲した円板状の形状及び約０．５ｍｍ～約１０ｍｍまでの直径を典型的には有する。レンチクルはまた、約６００～約５０マイクロメートルまで、より好ましくは約４００～約１００マイクロメートルまでの範囲とすることができる最大の厚さを典型的には有する。レンチクルは典型的には均一の厚さではなく、最小の厚さは、約５０マイクロメートル未満、より好ましくは約３０マイクロメートル未満又は約１５マイクロメートル未満とすることができる。

【００２５】
[0024]レンチクルは、免疫原性エピトープの分解に起因して低い免疫反応性を呈する必要がある。ある特定の実施形態では、レンチクルの少なくとも１つの表面は、患者の実質床に実質内移植された場合、実質床へのレンチクルの付着を促進するように可変架橋形成のパターンをさらに含む。レンチクルはまた、レンチクル本体のバルク領域よりも大きいコラーゲン密度を有する前面領域を備えた前面を有することができる。例えば、前面領域のコラーゲン密度は、コラーゲン少なくとも約３５パーセント又は４０パーセント又は６０パーセントとすることができる。

【００２６】
[0025]したがって、本発明は、コラーゲンレンチクル及び足場の形状を安定化する方法を開示する。コラーゲン性の組織は、ヒト由来又は動物由来の任意のコラーゲン性の給源から採取することができる。ある特定の好ましい実施形態では、組織は、ヒト又はブタの実質から採取することができる。給源組織は、摘出中又は摘出後に別のステップで成形することができる。組織は、種々の技法によって成形、脱細胞化、及び安定化することができ、この技法のいくつかを下でより詳細に説明する。成形及び脱細胞化に続いて、摘出されたコラーゲン性の組織セグメントを圧縮に供して流体含有量を低減し、照射されてコラーゲン鎖又はコラーゲン原線維の架橋形成を誘導する。架橋形成は、化学的仲介物、例えば、架橋剤の有無にかかわらず誘導することができる。ある特定の好ましい実施形態では、架橋形成は、十分に高いエネルギー放射線への曝露によるコラーゲン原線維間のペプチド結合の形成によって得られる。コラーゲン鎖間のペプチド結合の創製は通常吸熱反応であるので、このエネルギー放射線は望ましいものである。ペプチド結合の架橋形成を誘導するための種々のエネルギー源を用いることができる。ある特定の好ましい実施形態では、エネルギーは、紫外（ＵＶ）放射線によって送達される。

【００２７】
[0026]本発明は、一般に、層状コラーゲン性の組織、特に、角膜実質から採取されたコラーゲン足場の空間的安定処理に特に適用可能である。給源組織の層状コラーゲン構成は、光学的透明性のために自然界で進化してきた可能性があるが、水性環境に曝露されると、機械的もろさ及び／又は膨潤しやすい浸透性の傾向をもたらすおそれがある。したがって、本発明の一目的は、そのような膨潤を防止すること、及び／又は最終的な足場により大きい軸方向の機械的強度を提供することである。本発明はまた、非層状の（又は無秩序な）摘出されたコラーゲン性の組織セグメントに適用することができる。
【００２８】
[0027]本発明の別の態様では、足場が角膜移植用のレンチクルである場合、足場の少なくとも１つの表面の、例えば前面のコラーゲン密度又は平滑さを改変する方法が開示されている。そのような表面の改変は、例えば、上にあるフラップを再切開してインプラントにアクセスする必要がある場合、移植後に足場を操作しやすくすることができる。表面の改変は、照射及び／又は化学薬剤の適用によって行うことができる。
【００２９】
[0028]同種移植片及び／又は異種移植片の給源からの脱細胞化及び形状化された角膜組織レンチクル、並びにそのようなレンチクルを得る方法が開示されている。レンチクルは、角膜移植術における実質内又は角膜内のレンチクルインプラントとして特に有用であり、この場合、ヒンジ状フラップを患者の角膜内に形成し、このヒンジに沿って折り返して、角膜の実質床を露出させる。次いで、形状化レンチクルが実質床に適用され、フラップがその当初の位置に戻され、その結果、角膜に新しい湾曲を付与し、所望の屈折矯正がもたらされる。新しい屈折力の微調整は、移植と同時に、又は退行若しくは緊張変化が発生する場合では後の時点にいずれかで、レーザーアブレーションによって行うことができる。
【００３０】
[0029]本発明の一態様では、脱細胞化された角膜レンチクル及び角膜組織を脱細胞化する方法が、移植レンチキクルに対する患者の側の潜在的な免疫原性反応を低減するために開示されている。通常の角膜のうちのわずか約１～４パーセントが細胞から構成されている。その他の９６～９９パーセントは、ほぼ細胞外マトリックス（ＥＣＭ）、つまり、主としてコラーゲン、グリコアミノグリカン（ＧＡＧ）及びプロテオグリカン並びに水分である。好ましい一実施形態では、レンチクルの細胞成分は、例えば、テトラデシル硫酸ナトリウム（ＳＴＳ）などの界面活性剤での処理によって、又は酵素的可溶化によって、除去される。所望の場合、特に給源が非ヒト（異種）のドナーである場合、さらなるステップを行って、レンチクルの免疫原性をさらに低下させることができる。例えば、異種組織に存在することができる２つの非ヒトエピトープは、ｎｅｕ５ＧＣ及びアルファ－Ｇａｌである。これらの望ましくないエピトープは、実質細胞の内部だけでなはなく又は表面に存在することができる；一部分のエピトープは、ＥＣＭコラーゲン原線維を取り囲む、ムコ多糖類としても知られるＧＡＧの内部に埋まっている場合がある。そのような場合、そのようなエピトープは、キナーゼ処理とさらなる洗浄によって、少なくとも部分的に、選択的に除去することができる。
【００３１】
[0030]本発明の脱細胞化レンチクルは、細胞物質のうちの９５％～１００％が典型的には除去されている。好ましくは、レンチクルは、９５％～９９．９９％、細胞が除去されている。９５％～１００％の間のあらゆる可能な部分範囲を詳述せずとも、そのような全ての部分範囲が本発明の一部として企図及び考慮されることは明白である。例えば、レンチクルは、細胞物質が９５％～９７％、９７％～９９％、又は９８％～９９．９％除去されていてもよい。
【００３２】
[0031]本発明の別の態様では、本発明による円板状のレンチクルは、ドナー角膜から円板状の組織セグメントを切離することによって得られる。組織セグメントは、スライシン

グ処置中に所望の形状が得られるように、スライス及び／又はさらに成形又は切離することができる。切離は、例えば、マイクロ角膜切開刀等を用いて、レーザー加工によって、例えば、又はフェムト秒レーザーを用いた光切断によって若しくはエキシマレーザーによって、又はウォータージェットによって、機械的に実行することができる。非対称性の可能性を低減するために、組織セグメントは、例えば、ドナー角膜の光学軸又は幾何学的軸がレンチクルの中心に確保されている状態で、ドナー角膜の中央部分から取られるのが好ましい。組織セグメントの形状は、患者の屈折異常を矯正するのに必要なジオプトリー度数（ｄｉｏｐｔｒｉｃ　ｐｏｗｅｒ）の変化によって決定されることになる。例えば、遠視（ｈｙｐｅｒｏｐｉａ）（遠視眼（ｈｙｐｅｒｍｅｔｒｏｐｉａ））及び／又は老眼の矯正の場合、目標は通常、角膜の湾曲を高めることであり、所望のレンチクル形状は、少なくとも片側でやや凸状になる。通常、レンチクルの最大の厚さは４００マイクロメートル未満、又は多くの場合２００マイクロメートル未満、又は１００マイクロメートル未満、又は５０マイクロメートル未満となる。ほとんど全ての適用に対して最大の厚さは６００マイクロメートル未満である。一部の状況では、黄斑変性症に罹患している患者の視覚改善は、前記円板状レンチクルが、網膜の異なる部分に光を向け直すプリズムとして形成される場合に行うことができる。

【００３３】

[0032]円錐角膜の治療は、視覚収差の低減のみではなくて、病的実質の機械的強化のみを含むことができる。この目的には、円板の周縁に移行傾斜（くさび様）帯を有する、厚さが５０～３００マイクロメートルの間の、限定された屈折の影響を持った、共平面の円板（ｃｏ－ｐｌａｎａｒ　ｄｉｓｋ）が好ましいことがある。或いは、円錐角膜の治療用のレンチクルは、ドナー角膜から引き継いだ自然の湾曲の利点を利用することができ、又は、湾曲したモールドの使用によって、圧縮及び／又は架橋形成中にさらなる湾曲の度合いを導入することができる。一部の場合では、円錐角膜を治療する上で、例えば、レンチクルの湾曲がレシピエントの角膜の反対であるように、レンチクルを「逆さま」に移植することが有利な場合がある。

【００３４】

[0033]一部の場合では、湾曲したモールドが望ましいが、圧縮のステップ及び架橋するステップはまた、平坦なモールドでも実行することができる。（平坦な成形は、保管及び輸送、又は製造の効率にとって有利であり得る。）本発明の別の態様では、密封されているモールドを圧縮と保管の両方に用いることができる。

【００３５】

[0034]足場の１つの表面に適用する圧力を使用して、表面の湾曲を変更すること、及び／又はコラーゲン原線維を新たに整合させる（又はコラーゲン原線維の整合を維持する）こともできる。例えば、足場をチャンバの開口部に固定することができ、次いで、チャンバを加圧流体で満たして、足場の片側で圧力を加え、その結果、足場に水平力／接線力を付与する。流体の圧力は、足場を拡張させることになる（風船のように）。圧縮性プレートを反対側の面に任意選択で適用することができる。例えば、湾曲した（準凹面の）圧縮プレートを使用して、足場を伸展させること又は再形成することができる程度を制限することができる。所望の湾曲が得られると、架橋形成を用いて、所望の形状を維持すること、及び／又は実質内又は角膜内の移植の際のそのように操作された足場の膨潤する傾向を防止することができる。

【００３６】

[0035]一部の実施形態では、レンチクルの前面がその他の（後）面とは異なるテクスチャーを呈することになるように、上部実質面、すなわち、いわゆる「ボーマン膜」を確保することが有利であり得るが、その理由は、実質組織の最外層の自然な圧縮に起因して角膜の上部実質面の自然な前部セグメントがより密及びより平滑であるからである。或いは、摘出されたセグメントを実質の中央領域から取ることができ、下により詳細に記載するように選択的架橋形成によって、成形及び摘出に続いて、前面を高密度化することができる。後面（前面又はボーマン膜の反対側）は、実質組織のより低い密度と組織の機械的カ

ット又はレーザーカットによって形成されているという事実とに起因して、より粗くなる。レンチクルが実質内又は角膜内移植用に使用される場合、粗さのこの違いは特に有利であり得るが、その理由は、レンチクルが実質床に丈夫に付着することが高度に望ましいことがあるからである。処置後に最善ではない屈折の結果が観察される場合、フラップを再び折り返して、レーザーアブレーション等によるさらなる角膜移植（レンチクルの再切削（ｒｅ－ｓｃｕｌｐｔｉｎｇ））を可能とする必要があるかもしれない。実質床においてのレンチクルの当初の位置からのレンチクルのどんな移動でも、このような角膜移植の効果を損なうおそれがある。さらに、レンチクルの前面の平滑さはまた、フラップを再切開することがレンチクルを脱落させてしまうことになる、可能性を小さくする。

【００３７】

[0036]本発明のさらに別の態様では、摘出、成形、及び脱細胞化の後に後面を処理して、後面を実質床により付着させることができる。例えば、滅菌及び包装の前に、架橋剤を適用することができる。或いは、付着増強剤を、移植前の処置中に臨床医によって適用することができる。前面を処理して、フラップへ付着しにくくすることができる。

【図面の簡単な説明】

【００３８】

【図１Ａ】摘出された実質組織セグメントの概略断面図である。

【図１Ｂ】脱細胞化の後の摘出された実質組織セグメントの概略断面図であり、組織の膨潤及びコラーゲン原線維の結果として生じる間隔を示す、図である。

【図１Ｃ】本発明による脱細胞化、圧縮及び架橋形成の後の摘出された実質組織セグメントの概略断面図である。

【図２】前面領域の脱細胞化、圧縮及び選択的架橋形成の後の摘出された実質組織セグメントの概略断面図である。

【図３】後面領域の脱細胞化、圧縮及び選択的パターニングの後の摘出された実質組織セグメントの概略断面図である。

【図４Ａ】製造及び／又は輸送中の典型的な形状である、平坦な形状にある、本開示によるレンチクルを例示する図である。

【図４Ｂ】角膜内移植用に調製された最終的な湾曲状態のレンチクルを例示する図である。

【図５Ａ】遠視状態を矯正するために角膜内移植用に設計されたレンチクルを例示する図である。

【図５Ｂ】近視状態を矯正するために角膜内移植用に設計されたレンチクルを例示する図である。

【図５Ｃ】老眼状態を矯正するために角膜内移植用に設計されたレンチクルを例示する図である。

【図５Ｄ】円錐角膜として知られる状態を矯正するために角膜内移植用に設計されたレンチクルを例示する図である。

【図６Ａ】強い架橋形成の局所的なスポットとともに製造されているレンチクルの別の実施形態を例示する図である。

【図６Ｂ】中度の架橋形成を有する中央の光学活性ゾーンと、強い架橋形成を有する外側ゾーン又は周辺ゾーンとを含むレンチクルのさらに別の実施形態を例示する図である。

【図７Ａ】深層層状角膜移植（ＤＡＬＫ）用のレンチクルの使用を例示する図である。

【図７Ｂ】患者のインタクトのボーマン膜の上に配置するように構成されたレンチクルの使用を例示する図である。

【図７Ｃ】全層角膜移植（ＰＫ）術用のレンチクルのさらに別の実施形態を例示する図である。

【図８Ａ】図８Ａ及び図８Ｂは厚いレンチクルの周辺部用の２つの代替設計を例示する図である。図８Ａは単純な、例えば、円筒形又は円錐形の周縁を有するレンチクルを示す図である。

【図８Ｂ】図８Ａ及び図８Ｂは厚いレンチクルの周辺部用の２つの代替設計を例示する図

である。図８Ｂはレンチクルの周辺部にジグザグ又は階段状の縁を有するレンチクルを示す図である。
【図８Ｃ】レンチクル周辺部に「関鍵」の縁を有するレンチクルを示す図である。
【図９】本発明によるコラーゲン足場を圧縮するステップ及び架橋するステップにおいて使用するためのプレス装置の概略斜視図である。
【図１０Ａ】図１０Ａ及び図１０Ｂは本発明による２パーツの密封圧縮及び保管モールドを例示する図である。図１０Ａは足場の圧縮前のモールドが示されていることを示す図である。
【図１０Ｂ】図１０Ａ及び図１０Ｂは本発明による２パーツの密封圧縮及び保管モールドを例示する図である。図１０Ｂは圧縮後のモールドを例示する図である。
【図１１】足場を伸展させるための本発明によるさらなる装置を例示する図である。
【図１２】図１１の装置と同様であるが、同時である足場の伸展及び足場圧縮のための、並びに架橋放射線への曝露を容易にするための、圧縮を加えるプレート要素の付加を伴う、さらに別の代替装置を示す図である。
【図１３】本開示に従って作製されたレンチクルの透明度を測定するための装置１３０を例示する図である。
【図１４】光学的透明度を定量化するための、図１３の装置等で得られる輝度分布曲線のグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００３９】
[0065]プロセス、組成物、又は方法論は変動し得るので、本発明は記載された特定のプロセス、組成物、又は方法論に限定されるものではない。本明細書で使用される用語は、本発明の特定のバージョン又は実施形態を説明する目的のためだけのものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではいない。特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって通常に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記述のあらゆる刊行物は、参照によりその全体が組み込まれる。本発明が、先行発明を理由としてかかる開示に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるものは本明細書にはない。
【００４０】
[0066]「切離（する）」という用語は、例えば、機械的ブレード、紫外（ＵＶ）レーザー、フェムト秒レーザー、又はウォータージェットの作用による、生物学的材料の切開、アブレーション又は除去に関する既知の方法のいずれも包含する。
【００４１】
[0067]「圧縮」という用語は、圧力の適用による若しくは真空などの他の技法による締め固め又は遠心力駆動の水分抽出を包含する。
【００４２】
[0068]「放射線」という用語は、赤外放射線、可視光放射線、及び紫外放射線（例えば、約４００ｎｍから下っておよそ１９３ｎｍまで又はそれより下）、Ｘ線、ガンマ線、及び電子ビームを包含する。
【００４３】
[0069]「生物学的試料」という用語は、組織、細胞、細胞抽出物、均質化された組織抽出物、又は１つ又は複数の細胞産物の混合物を指す。生物学的試料は、適切な生理学的に許容される担体で使用又は存在することができる。
【００４４】
[0070]本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、他に文脈で明示しない限り、単数の形態「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」及び「その（ｔｈｅ）」は、複数形の言及を含む。したがって、例えば、「細胞」への言及は、１つ又は複数の細胞及び当業者に知られているその均等物等への言及である。
【００４５】
[0071]本明細書で使用される場合、「約」という用語は「約」とともに使用されている

数の数値のプラス又はマイナス１０％を意味する。したがって、約１００μｍとは９０μｍ～１１０μｍの範囲を意味する。

【００４６】

[0072]本明細書で使用される「動物」、「患者」、又は「対象」という用語は、それらに限定されないが、ヒト並びに野生動物、家畜動物及び飼育動物などの非ヒト脊椎動物を含む。「動物」、「患者」、又は「対象」という用語はまた、角膜レンチクル移植のレシピエントを指す。「異種移植片」という用語は、ブタ（ｐｉｇ）（ブタ（ｐｏｒｃｉｎｅ））、ウシ、類人猿、サル、ヒヒ、その他の霊長類、及び他の任意の非ヒト動物を含めて、提供用の動物から収集された組織を指す。「同種移植片」とは、レシピエントと同じ種であるドナーから取られた組織を指す。

【００４７】

[0073]一般に、「組織」という用語は、特定の機能の実行において統合されている、類似的に特殊化されている細胞の任意の集合体を指す。角膜実質は、ほぼ非細胞性（約１～５％が細胞性である）であるが、「組織」の一例である。

【００４８】

[0074]「レンチクル」という用語は、レシピエントの角膜内に又は角膜上に移植の用意ができた脱細胞化され、加工されたドナー角膜組織を指す。特に明記しない限り、「レンチクル」及び「足場」という用語は、本明細書では同義に使用される。「コラーゲン濃度」及び「コラーゲンパーセンテージ」という用語は、本明細書では同義に使用され、レンチクル又は足場に存在するコラーゲンの量を指す。この濃度又はパーセンテージは、乾燥前のレンチクルの重量（水分と完全な平衡状態にある）に対して、完全に乾燥したレンチクル、例えば、真空乾燥レンチクルの分率の重量として測定することができる。一部の場合では、エタノールを使用して乾燥を改善することができる。

【００４９】

[0075]レンチクル移植に関連して「角膜内」という用語は、レンチクルが角膜の中に又は上に配置される任意の処置を指す。角膜内移植の一タイプは、「実質内」移植であり、前部ボーマン膜又は上皮を摘出することなく、例えば、前部組織のフラップの折り返しによって又は側方アプローチを介する直接挿入によって、レンチクルを眼の実質内に配置する処置である。レンチクルのその他のタイプの角膜内使用としては、深層層状角膜移植（ＤＡＬＫ）及び全層角膜移植（ＰＫ）が挙げられ、この場合、下でより詳細に論議するように、レンチクルが眼の前部セグメントに完全に取って代わる。さらに別の適用可能な「角膜内」処置は、いわゆる「表層角膜移植術」であり、下でより詳細にまた論議する。

【００５０】

[0076]「軸方向」という用語は、レンチクル又は足場の配向に対する方向を指す。通常、形状化レンチクルは回転楕円体又は楕円体の円板状の形状で湾曲し、軸方向又は「軸」は円板の中心に一般には垂直となる。特に明記しない限り、「軸方向」はまた、組織セグメントが摘出される眼又はレンチクルが移植されるように設計されているレシピエントの眼、の視覚軸又は光軸と一般にほとんど平行又は同軸である。（自然の目では、光軸は通常、正確にではないが、ほとんど角膜の中心を通過する。）

【００５１】

[0077]惑星物理学（球面幾何学）は、実質におけるコラーゲン原線維の空間的構成を説明するのに便宜的な専門語を提供することができる。コラーゲン原線維の大部分は高緯度～中緯度の軌道上にあり、ごく一部のみが極軌道に存在する。このため、実質は通常、中央（真ん中）の領域／場所で最も薄い。圧縮の軸方向は、極冠圧縮又はラジアル圧縮と呼ぶことができる。ドナー実質の中央領域は、原線維整合において強い回転対称性を呈する。インプラントが圧縮においてだけではなく引張応力下でも機能するように指定されている場合、中央の実質の位置から抽出されたレンチクルは、回転対称の引張特性をインプラントに付与するのが好ましい。

【００５２】

[0078]本開示はまた、同種移植片及び／又は異種移植片の給源からの脱細胞化角膜レン

チクル並びにドナー実質からのレンチクルを形成する方法、に関する。本開示の脱細胞化角膜レンチクルは、近視、遠視、老眼、及び乱視などの異常な屈折状態、並びにその他の眼科の病状を矯正するのに使用することができる。

【００５３】

[0079]角膜は、前部から後部までの５つの層で構成されると一般に考慮することができる：角膜上皮、薄いが密である上部実質層（通常、ヒトの眼ではボーマン膜と呼ばれる）、角膜実質、デスメ膜、及び角膜内皮である。角膜上皮は、非角化重層扁平上皮細胞の約６つの層から構成されており、この細胞は、急成長であり、容易に再生する。前実質層（例えば、ボーマン膜）は、大部分がランダムに組織化され、しっかりと交織したコラーゲンタイプＩ原線維から構成される頑丈な層である。角膜実質は、平行な層で構成されたコラーゲンタイプＩ繊維からなる厚くて透明な層である。デスメ膜は、角膜内皮の基底膜として機能する薄い非細胞性の層であり、低剛性のコラーゲンタイプＩＶ原線維から構成される。最後に、角膜内皮細胞は、ミトコンドリアリッチ細胞の単一の扁平な又は低立方の単層から構成されている。

【００５４】

[0080]本明細書で使用される場合、「ボーマン膜」という用語は、ヒト又はドナー動物の角膜のいずれかからの任意の角膜の前実質領域を説明するのに使用される。ヒトの角膜の高密度化の層はより著しいことがあるが（したがって、ヒトの角膜ではボーマン膜として知られている）、全ての角膜は、動物の種及び年齢に応じてある程度までいくらかより高い前方の高密度化と平滑さ（実質床組織に対して）を呈する。したがって、「ボーマン膜」とは、こういった前部セグメントを説明するのに本出願全体で使用される用語である。

【００５５】

[0081]したがって、ドナー角膜の採取及び加工、並びにレンチクルの作製は、視力の屈折異常の矯正にとって非常に重要な要素である。レンチクルは、角膜移植術におけるレンチクルインプラントとして特に有用であり、この場合、ヒンジ状フラップを患者の角膜内に形成し、このヒンジに沿って折り返して、角膜の実質床を露出させる。次いで、形状化レンチクルが実質床に適用され、フラップがその当初の位置に戻され、その結果、角膜に新しい湾曲が生じ、所望の屈折矯正がもたらされる。新しい屈折力の微調整は、移植と同時に、又は退行若しくは緊張変化が発生する場合では後の時点のいずれかで、レーザーアブレーションによって行うことができる。

【００５６】

[0082]本発明のある特定の実施形態では、脱細胞化角膜レンチクルは、ドナー実質からの最上層の少なくとも一部を含む前面と、所望の形状を有するレンチクルを提供するために形成されている後面とを有する、ドナー実質に由来するレンチクル本体を含むことができ；ここで、ドナー実質は脱細胞化されている。他の実施形態では、レンチクルは、ボーマン膜及びドナー実質の任意の上部の確保を顧慮せずに成形されている。例えば、レンチクルは、実質組織セグメントの実質内摘出によって、例えば、フェムト秒レーザーパルスによる摘出によって形成することができる。

【００５７】

[0083]ある特定の実施形態では、ドナー実質を、採取し、脱細胞化し、その結果、患者の側で潜在的な任意の免疫原性反応の低減を有するレンチクルを作製する。通常の角膜のうちわずか約１～約４パーセントが細胞から構成されている。その他の９６～９９パーセントは、ほぼ細胞外マトリックス（ＥＣＭ）、主としてコラーゲン、並びに水分、グリコアミノグリカン及びプロテオグリカンである。上記のように、本発明の脱細胞化レンチクルは、細胞物質のうちの９５％～１００％を典型的には除去されている。好ましくは、レンチクルは、９５％～９９．９９％、細胞が除去されている。９５％～１００％の間のあらゆる可能な部分範囲を詳述せずとも、そのような全ての部分範囲が本発明の一部として企図及び考慮されることは明白である。例えば、レンチクルは、細胞物質が９５％～９７％、９７％～９９％、又は９８％～９９．９％除去されていてもよい。レンチクルに残留

する細胞物質の量は、例えば、残留ＤＮＡ又はＲＮＡの含有量によって評価することができる。好ましくは、ＤＮＡ又はＲＮＡの含有量は、当初のＤＮＡ又はＲＮＡの含有量の１重量パーセント未満、又は０．１重量パーセント未満、又は０．０１重量パーセント未満である。

【００５８】

[0084]脱細胞化、すなわちドナー実質からの細胞物質の除去は、様々な技法を使用して行うことができる。好ましい一実施形態では、角膜の細胞物質は、化学処理によって除去される。角膜から細胞を溶解及び除去するのに使用される化学物質としては、テトラデシル硫酸ナトリウム（ＳＴＳ）などの界面活性剤、酸、アルカリ処理剤、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）などのイオン性洗浄剤、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００などの非イオン性洗浄剤及び両性イオン洗浄剤が挙げられる。一部の実施形態では、角膜の細胞物質は、酵素処理を使用して除去される。リパーゼ、サーモリシン、ガラクトシダーゼ、ヌクレアーゼ、トリプシン、エンドヌクレアーゼ、及びエキソヌクレアーゼを使用して、角膜から細胞物質を除去する。一部の実施形態では、角膜の細胞物質は、物理的技法を使用して除去される。これらの物理的技法は、温度、力、及び圧力、並びに電気的破壊の使用を通して、組織のマトリックスから細胞を溶解、殺滅、及び除去するのに使用される方法を含む。温度法は、急速凍結解凍メカニズムで使用されることが多い。温度法は、ＥＣＭ足場の物理的構造を保存する。圧力脱細胞化は、足場を損傷するおそれのある非監視の氷晶形成を回避するのに、高温での静水圧の制御使用を含む。原形質膜の電気的破壊は、角膜の細胞物質を溶解するための別のオプションである。

【００５９】

[0085]本明細書に記載の実施形態では、レンチクルは、免疫原性エピトープの分解に起因して、さらにより低い免疫反応性を呈することができる。このことは、異種の提供を使用する場合の重要なステップであり得る。例えば、異種組織で存在することができる２つの非ヒトエピトープは、Ｎ－グリコリルノイラミン酸（Ｎｅｕ５ＧＣ）及びガラクトース－アルファ－１，３－ガラクトース（アルファ－Ｇａｌ）である。これらの望ましくないエピトープは、実質細胞の内部だけでなはなく又は表面に存在することができる；少部分のエピトープは、ＥＣＭコラーゲン原線維を取り囲む、ムコ多糖類としても知られるグリコアミノグリカン（ＧＡＧ）に埋まっている場合がある。ある特定の実施形態では、エピトープは、ガラクトシダーゼ処理によるなどの酵素処理、及びさらなる洗浄によって選択的に除去することができる。或いは、角膜組織は、いかなる免疫原性エピトープも欠いているノックアウトトランスジェニック動物（例えば、トランスジェニックブタ）から採取することができ、したがって、エピトープ分解ステップを必要とせずに非免疫原性レンチクルを作製することができる。

【００６０】

[0086]本明細書に記載の実施形態では、脱細胞化レンチクルは、包装及び密閉と併せてさらに滅菌することができる。滅菌は、ウエットな薬剤（ｗｅｔ　ａｇｅｎｔ）、放射線、又は電子ビームを使用して行うことができる。好ましい一実施形態では、コラーゲン足場への損傷が生じる可能性が低いので、脱細胞化レンチクルの滅菌はＵＶ放射線を使用して実行される。ＵＶ放射線の用法は、レンチクルの光学的透明性を改善するのに有利であり得る。

【００６１】

[0087]本発明の別の態様では、レンチクルの形状及び配向は、最善の結果に向けて設計されている。一部の実施形態では、レンチクルの直径は、約０．５ミリメートル（ｍｍ）～約１０ｍｍまで、又は約３ｍｍ～約９ｍｍまで、又は約４ｍｍ～約８ｍｍまで、又は約５ｍｍ～約７ｍｍまで、である。ここでも、０．５ｍｍ～１０ｍｍの間のあらゆる可能な部分範囲を詳述せずとも、そのような全ての部分範囲が本発明の一部として企図及び考慮されることは明白である。

【００６２】

[0088]ドナー角膜実質はスライス及び／又はさらに成形して、所望の形状を得ることが

できる。切離は、例えば、マイクロ角膜切開刀等を用いて、又はレーザー加工によって、例えば、エキシマレーザーを用いたフォトアブレーション又はフェムト秒レーザーを用いた光切断によって、機械的に実行することができる。非対称性の可能性を低減するために、角膜組織セグメントは、例えば、ドナー角膜の光学軸又は幾何学的軸がレンチクルの中心に確保されている状態で、ドナー角膜の中央部分から取られるのが好ましい。角膜組織セグメントの形状は、患者の屈折異常を矯正するのに必要なジオプトリー度数の変化によって決定されることになる。例えば、遠視（遠視眼）及び／又は老眼の矯正の場合、目標は通常、角膜の湾曲を高めることであり、所望のレンチクル形状は、少なくとも片側でやや凸状になる。一部の実施形態では、レンチクルの最大の厚さは、６００マイクロメートル未満、４００マイクロメートル未満、２００マイクロメートル未満、１００マイクロメートル未満、又は５０マイクロメートル未満となる。直径が小さいほど、レンチクルが薄いほど、より速くレンチクルは患者の実質床へ一体化することになる。

【００６３】

[0089]実質コラーゲン原線維は、長いポリマー（ポリペプチド）ストリングである。実質コラーゲン原線維は三重にねじれたタンパク質である。単一のコラーゲン原線維の長さはほぼ巨視的であり、したがって、原線維それぞれが個々に光の強力な散乱体であり得る。実質が軸方向で透明であるという事実は、こういった強力に散乱するという寄与全ての負の合計の結果である。すなわち、コラーゲン原線維は、その個々の散乱にもかかわらず、全体において集合的でほぼゼロの散乱に、集合的に寄与している。この集合的な透明性は、原線維が１つの平面に平行に構成されている場合に得られる。角膜実質では、構成面は光軸に垂直である。この独特の構成は角膜に存在するが、その他の器官では観察されない。腸や心筋膜、心室弁などの他の器官では、原線維は精密に整合されておらず、したがって、光が散乱する。目の角膜輪部コラーゲンについても同じことが言える。

【００６４】

[0090]透明性に加えて、自然淘汰は、強度についても同様に角膜の構造を最適化してきた。コラーゲン原線維の長さと整合が、実質の面内（接線）引張（引っ張り）強度に実質的に寄与している。自然な目の形状は、実質上で接線方向の引張（引っ張り）応力を加える静水眼内圧によって維持されている。コラーゲン原線維の面内配向は、角膜の透明性に役立ち、著しい機械的引張（引っ張り）強度をもたらす。しかし、この強度は面内で加えられる力にほぼ限定されている。それに比べ、光軸方向の角膜実質の強度は実質的にもろい。この軸方向の強度不足の一顕現は、水、例えば、緩衝生理食塩溶液（ＢＳＳ）に浸漬した場合の足場の膨潤である。膨潤は、光軸の方向で、ほぼ例外なく一方向性である。面内方向の膨潤は無視できる。

【００６５】

[0091]光学活性レンチクルの形状適合度は、好結果の相加的屈折矯正手術にとって極めて重要であるので、足場に関するこのもろさは懸念の源である。軸方向での足場の膨潤は、屈折異常を誘導するおそれがある。

【００６６】

[0092]膨潤の量は浸液と相関している場合が多い。界面活性剤及び／又は洗浄剤をその水に加えると、すなわち足場の公称厚さのおよそ２５０～４００％の最も高い度合いの膨潤が観察される。ＢＳＳは公称厚さのおよそ１５０～２５０％の膨潤を通常は誘導する。アルコール（軽質と重質の両方）の膨潤は、通常は少ない。（公称厚さとは、例えば、組織標本が非常に新鮮な場合、脱細胞化ステップ前の、例えば、約６０秒未満又はしたがって摘出後の、当初の摘出された実質セグメント（ラメラ）の軸方向の厚さとして定義することでき、或いは標本が上皮細胞及び／又は内皮細胞を保持している場合、より長いことがある）。

【００６７】

[0093]厚いレンチクルの場合、実質床にフラップを置き戻すことが困難となるほどに、膨潤はレンチクルを非常に厚くしてしまうおそれがある。フラップはまた、付加された材料を覆うには短すぎる可能性があるとともに（上皮の劣成長の危険を高める）、実質床へ

のフラップの機械的伸展及び／又は縫合のさらなる処置を必要とする場合がある。

【００６８】

[0094]浸透性の特性及び／又は足場の水親和性の変化（脱細胞化前の実質と比較して）と一緒に、コラーゲン足場の一方向性の機械的もろさは、足場の厚さの方向（すなわち、軸方向）で著明な一方向性の膨潤を引き起こすおそれがある。

【００６９】

[0095]遊離水が、コラーゲン性の組織の内部に存在する。インタクトの天然角膜では、実質の含水量は、角膜の全体的な構造、例えば、角膜の境界を形成する上皮膜及び内皮膜によって制御されている。しかし、相加的屈折矯正手術中に外因性実質組織が移植される場合、このバランスがかき乱されることがしばしばであり、移植されたレンチクルの含水量は、増加し、公称厚さを超えて術後膨潤を引き起こす傾向を有する。

【００７０】

[0096]本発明によれば、平坦な（円筒形の）コラーゲン性の組織標本を、定常圧力を加える２つのプレートの間に配置すると、流体含有量を低減することができる（或いは同じことであるが、コラーゲン濃度を増加させることができる）。同じことが、脱細胞化を受けた形状化レンチクルにも当てはまる。プレスは、過剰な遊離流体が組織から横に抜かれることになるように、ドレナージを用意する必要がある。形状化レンチクルの場合、プレスのプレートのうちの少なくとも１つは湾曲して、レンチクルの厚さの半径方向の変化に順応する必要がある。好ましくは、圧力は、所望の時間、穏やかに適用される。圧縮の所望の程度に応じて、圧力を、数秒から数時間まで、例えば、３０秒～１時間まで、又は一部の場合では５分～３０分までの範囲の所定の期間、コラーゲン足場に加えることができる。

【００７１】

[0097]プレスのプレートによって移動した距離は、おおよそのコラーゲン濃度の計算を可能にする。例えば、平坦な摘出組織セグメントの公称厚さが１００マイクロメートルであり、脱細胞化プロセス後にそのセグメントが膨潤して２００マイクロメートルになる場合、組成物のコラーゲン含有量は約１５％とすることができる。次いで、そのセグメントを１００マイクロメートルの厚さに再圧縮するとした場合、公称コラーゲン濃度はおよそ３０％のレベルに回復するであろう。足場を５０マイクロメートルの厚さにさらに圧縮すると、コラーゲン濃度はおよそ６０％となる。足場を４０マイクロメートルの厚さにさらに圧縮すると、コラーゲン濃度はおよそ７５％となる。（コラーゲン含有パーセンテージは、レンチクルが水分と完全な平衡状態にある場合の乾燥前のレンチクルの重量に対する真空乾燥レンチクルの重量分率として測定できる。）この値は、長時間の圧力の後にはじめて得られ、合理的に達成可能なコラーゲン濃度の上限に近い。この時点での残留水は、例えばファンデルワールス力によってタンパク質にしっかりと結合しており、さらなる圧力はコラーゲン原線維の完全性が損なう可能性がある。

【００７２】

[0098]コラーゲン性の組織を圧縮するプロセスは、足場をプレスから除去し、流体に再び浸漬する場合、ほぼ可逆的である。足場は再膨潤して、足場の圧縮前の厚さに近似する。しかし、本発明の別の態様では、最も注目すべきは、プレス加工中のコラーゲン足場の架橋形成を介した、軸方向のひずみ方向でのコラーゲン足場の強化によって、再膨潤を妨げる方法が開示されている。足場の圧縮、及び／又は過剰な流体の除去はまた、足場を加速度に曝露することによって、例えば遠心分離で、行うことができる。例えば、１０Ｇ～１００Ｇ（９８１ｍ／ｓ^2）まで又はそれ超の範囲の加速度を用いることができる。過剰な流体の除去はまた、足場を真空又は減圧に曝露することによって行うこと又は補助することができる。

【００７３】

[0099]ある特定の実施形態では、架橋形成は、化学薬剤によって行うことができる。外部化学分子を、十分な濃度、期間、及び温度で（主に水溶液又はその他の流体で）加えることができる。分子を、一方の端で１つのコラーゲン原線維と、他方の端で別のコラーゲ

ン原線維と、結合するように構築することができる。結合のタイプは、薬剤に特異的とすることができ、又はペプチドタイプの結合である必要はない。化学分子は、強力な付着として化学結合（共有結合）で物理的な橋を創り出す。そのような橋の十分に密度が高い集団は、軸方向のコラーゲン足場に新しい強度及び／又は剛直性を付与する。コラーゲン分子は互いに接触する必要はないが、ほぼ当該薬剤の分子サイズの距離に位置する必要がある。この穏やかな作動要件は、架橋形成プロセスを容易とする。化学架橋剤の例は、グルタルアルデヒド、ゲニピン、及び単糖である。

【００７４】

[00100]コラーゲン原線維は、それ自体が強力な光散乱体であるが、コラーゲン原線維の配向及び統計的構成は、集合的に散乱を解消する。架橋剤及びエネルギー媒介分子の潜在的な欠点は、屈折矯正手術で移植可能なレンチクルとしてコラーゲン足場を使用する場合に、光散乱体として作用するとともにコラーゲン足場の光学的透明性に悪影響を与えるおそれのある外因性物質を、架橋剤及びエネルギー媒介分子がコラーゲン足場に導入すること、である。

【００７５】

[00101]他の実施形態では、コラーゲン原線維はまた、原線維間に直接確立された安定な化学結合によって強化することができる。このことは、原線維が互いに接触している場合に起こるが、自然には起こらない。いわゆるペプチド結合は吸熱性であり、原線維が接触する場所に外部エネルギーを局所的かつタイムリーに送達することを必要とする。一部の実施形態では、光量子からエネルギーを受け取る特殊化した媒介分子を用いることができる。次いで、媒介分子は、これ自身リンクの構造に関与することなく、結合エネルギーを提供すること、又は架橋形成プロセスの触媒となることができる。したがって、光は安定した結合を構築するための間接的なエネルギー源である。媒介分子の一例は、例えば、発光ダイオード（ＬＥＤ）等からの光に曝露された場合のリボフラビンである。

【００７６】

[00102]さらに別の変形方法では、足場のコラーゲン原線維は、原線維が互いに接触している場所で局所的に吸収される放射線によって互いに直接結合することができる。外因性の媒介分子がエネルギーの量子を捕捉する必要はない（コラーゲン性の組織に存在するグリコアミノグリカン（ＧＡＧ）などの内因性分子が同様の機能を提供する可能性はあるが）。量子は、接触事象の接合点で直接かつタイムリーに吸収される。この方法は、種々の形態の直接照射、例えば、可視光、青色、又はＵＶの放射線、ガンマ線、さらには電子ビームを利用することができる。好ましい一エネルギー源は、少なくとも１００ジュール毎１平方センチメートル、又は少なくとも２００ジュール毎１平方センチメートル、又は少なくとも３００ジュール毎１平方センチメートルのエネルギー密度を有するＵＶ光である。例えば、活性放射線の望ましいエネルギー密度は、約１００～約５０００ジュール毎１平方センチメートルまで、又は約２００～約１０００ジュール毎１平方センチメートルの間、又は約３００～約６００ジュール毎１平方センチメートルの間の範囲とすることができる。

【００７７】

[00103]コラーゲン足場の密度（圧縮）は、架橋形成の速度においてある役割を果たすことができる。コラーゲン濃度がより高い場合（すなわち、コラーゲン足場がより圧縮されている場合）、架橋形成のプロセスはより速く進行することができる。

【００７８】

[00104]純粋な放射線誘導架橋形成に必要な臨界（閾値）線量が単独で（リボフラビンのような任意の媒介剤なしで）、脱細胞化プロセスと相関している可能性がある。非脱細胞化実質の閾値線量は、脱細胞化コラーゲン足場の閾値線量よりも３～３００倍も大きいことがある。（この比率はまた、適用される放射線の波長と相関していることがある。）本発明の別の態様では、脱細胞化が実質に存在する細胞外物質（ＧＡＧのような）のうちのより多くを除去する場合、コラーゲン架橋形成の閾値が低下することが発見された。閾値の差は、適用される脱細胞化プロトコル及び放射線の波長に応じて、１桁も異なる場合

がある。こういった架橋形成閾値が低下することは、脱細胞化プロトコルの強度と相関していると思われる。

【００７９】

[00105]架橋形成は、専用のＵＶ放射線源を介して（或いは、環境ＵＶ放射線、例えば、太陽光によって）、圧縮と同時に又は後続のステップで、実行することができる。

【００８０】

[00106]光エネルギーを使用して架橋形成を誘導する場合、光の吸収は、ビールの法則によって決定される可能性がある。すなわち、より多い光が、光が衝突する材料の表面層で吸収されることになり、材料のより深い層でより少ない量が吸収されることになる。架橋形成を誘導するのに利用可能な光の量は指数関数的に、本質的に減衰する。足場内の光散乱分子の量に差がある場合、このことはまた、エネルギーの分布に影響を与える可能性があり、その理由は、照射された材料の下にある領域へと通過することができる光の量を散乱剤が低減することになるからである。本発明では、このような効果を、段階的度合いの架橋形成を生み出すのに及び／又は活性放射線に曝露される足場の表面領域に様々な特性を付与するのに、効果的に使用することができる。

【００８１】

[00107]したがって、光エネルギー単独の、又は光散乱剤の導入（例えば、表面コーティングとして）と一体の、自然吸収プロファイルは、選択的な表面架橋形成のオプション及び／又はコラーゲン足場の表面下のより少ない架橋形成度を提供する。レンチクルの表面の選択的架橋形成は、表面に異なる接着性、透過性、又は平滑さを付与するのに、又は移植後のレシピエントの細胞によるより大きな又は小さい浸透を容易にするのに、利点を有し得る。例えば、足場が、コラーゲン密度約６０％に圧縮され、深さ約５～１０マイクロメートルのまでの表面で選択的に架橋される場合、表面は高密度を保持することになるが、一方、足場の残りの部分は、脱細胞化プロセスの後のその足場の拡張状態から依然として変わらないことになる。このような高密度化表面が擬ボーマン膜を形成することができる。

【００８２】

[00108]さらに、表面架橋形成を用いて、光散乱体で表面の一部を選択的に処理すること、又はパターン化されたマスクを介して足場を曝露させることによって、前面、後面、又は両面にパターン化された効果を付与することができる。表面のパターニングは、表面の一部の摩擦又は接着性を選択的に改変することができる。

【００８３】

[00109]足場の表面を選択的に架橋する３つの方法が存在する。第１に、足場において強い吸収を有する短波長ＵＶ放射線を使用することによって、浸透の深さを制限することができる。このアプローチでは、好ましい波長は、約２３０～約１５０ナノメートルまでの範囲となり、より好ましくは、約２１５～約１９３ナノメートル（例えば、１９３ｎｍ）までの範囲となる。放射線の衝突角度は通常、表面の法線であるが、面法線に対して０～６０度の間で変化してもよい。

【００８４】

[00110]或いは、より長い波長のＵＶ放射線を使用することができるが、例えば、その結果、約４００ナノメートルまで及び、６０度より大きい、好ましくは７５度より大きい又はより高い、例えば、約８０度～約８９．９度までの範囲で、微小入射角度で足場に侵入する。この方法の一利点は、そういった放射線源が工業的用途であるので、約２８０ナノメートル以上の波長で信頼できる強力なＵＶ放射線源が容易に利用可能なことである。レーザー光の空間干渉性が良好な微小入射角度の画定を可能にするので、光源としてのレーザー放射線の用法もまた好ましいことがある。

【００８５】

[00111]さらに別の代替法では、エバネッセント波スラブ導波管を使用することができる。この導波管は、非常に浅い架橋形成深度（入射光の波長程度）を可能にする。例えば、３８０ナノメートルのＵＶ放射線を使用する場合、架橋形成はマイクロメートル以下の

表面層に留めることができる。

【００８６】

[00112]重要なことに、レンチクルの前面を高密度化する（又はより力強く選択的に架橋形成する）ことによって、レンチクルの前面は後面とは異なるテクスチャーを呈することになるが、その理由は、ボーマン膜は、しっかりと交織したコラーゲンタイプＩ原線維に起因してより密及びより平滑であるからである。後面（前面の反対側）は、レンチクルのこの部分の組成のより低い密度（及び組織の機械的カット又はレーザーカットによって形成されるという事実）に起因して、より粗くなる。レンチクルが実質内又は角膜内移植用に使用される場合、粗さのこの違いは特に有利であり得、その理由は、レンチクルが実質床に丈夫に付着することが高度に望ましいことがあるからである。処置後に最善ではない屈折の結果が観察される場合、フラップを再び折り返して、レーザーアブレーション等によるさらなる角膜移植（レンチクルの再切削）を可能とする必要があるかもしれない。実質床においてのレンチクルの当初の位置からのレンチクルのどんな移動でも、このような角膜移植の効果を損なうおそれがある。さらに、レンチクルの前面の平滑さはまた、フラップを再切開することがレンチクルを脱落させてしまうことになる可能性を小さくする。

【００８７】

[00113]本発明のさらに別の態様では、摘出、成形、及び脱細胞化の後に後面を処理して、後面を実質床により付着させることができる。例えば、滅菌及び包装の前に、架橋剤又は付着増強剤を適用することができる。或いは、架橋剤又は付着増強剤を、移植前の処置中に臨床医によって適用することができる。

【００８８】

[00114]一部の実施形態では、採取、形状化及び脱細胞化されたレンチクルは、臨床医がフラップの再切開及びレーザーによる再切削調整中にレンチクルの適切な配向を維持できるような形でマーキングされる。マーキングは、さまざまな方法で行うことができるが、実質床にレンチクルが設置されると、全ての場合において患者にとって不可視となる。一部の実施形態では、マーキングは、レンチクルの上部前方部分又は底部前方部分の顕微鏡下の切痕とすることができる。一部の実施形態では、マーキングは、レンチクルの上部前方又は底部前方に配置された染料でなされた線又は点とすることができる。

【００８９】

[00115]ドナー実質からレンチクルを形成する方法も本明細書で開示されている。一部の実施形態では、ドナー実質からレンチクルを形成する方法は、ドナー角膜の中央領域から実質の一部を除去するステップ、及び前記ドナー実質の後面を成形して、所望の形状のレンチクル本体を形成するステップを含む。非対称性の可能性を低減するために、組織セグメントは、例えば、ドナー角膜の光学軸又は幾何学的軸がレンチクルの中心に確保されている状態で、ドナー角膜の中央部分から取られるのが好ましい。組織セグメントの形状は、患者の屈折異常を矯正するのに必要なジオプトリー度数の変化によって決定されることになる。例えば、遠視（遠視眼）及び／又は老眼の矯正の場合、目標は通常、角膜の湾曲を高めることであり、所望のレンチクル形状は、少なくとも片側でやや凸状になる。レンチクルはまた、レンチクルの前面及び後面を確認するのに、レンチクルの周縁上に１つ又は複数の非対称マーカー（文字「Ｌ」のような）を含むことができる。

【００９０】

[00116]本発明の足場は、足場を天然の実質組織よりも高い屈折率を有するように設計することができるという点において、屈折（例えば、相加的）レンチクルとしての利点をさらに提供することができる。現在、角膜の湾曲を改変する移植レンチクルの使用は、上皮の不安定性又は許容できない上皮糜爛が発生する前に、約５０Ｄ未満（頂点の近傍で測定して）の総ジオプトリー度数（例えば、自然の角膜と相加的レンチクルのジオプトリー値の合計）に通常は制限されている。より高い屈折率を有する移植可能な足場は、より高い遠視矯正の可能性を与える。実質組織の標準的な屈折率は、通常は約１．３７６である。本発明の圧縮技法は、１．３７７より大きい、１．３７８より大きい、１．３７９より

大きい、１．３８より大きい又はより高い、屈折率を有する足場を提供することができる。レンチクルの屈折率の勾配は、制御された架橋形成によっても得ることができる。（このような勾配は、高次の屈折異常の矯正にも利用でき、この用語は、ヒトの目に関する高次ゼルニケ多項式によって説明することができる）。

【００９１】

[00117]本明細書に記載の実施形態では、本発明の方法は、最善の結果に向けて設計されている形状及び密度を有するレンチクルを作製する。レンチクルは、ボーマン膜を前面として確保するように、ドナー実質から円板状の組織セグメントを最初に切離することによって得られる。一部の実施形態では、レンチクルの直径は、約０．５ｍｍ～約１０ｍｍまで、又は約３ｍｍ～約９ｍｍまで、又は約４ｍｍ～約８ｍｍまで及び約５ｍｍ～約７ｍｍまで、である。組織セグメントは、スライスする処置中に所望の形状が得られるように、スライス及び／又はさらに成形又は切離することができる。切離は、例えば、マイクロ角膜切開刀等を用いて、レーザー加工によって、例えば、又はフェムト秒レーザーを用いた光切断によって、機械的に実行することができる。切離は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、「Ｓｕｒｇｉｃａｌ Ａｐｐａｒａｔｕｓ ａｎｄ Ｂｌａｄｅ Ｅｌｅｍｅｎｔｓ ｆｏｒ ｓｌｉｃｉｎｇ Ｌａｍｅｌｌａｒ Ｓｅｇｍｅｎｔｓ Ｆｒｏｍ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｔｉｓｓｕｅ」と題する国際特許出願第ＰＣＴ／ＩＢ２０１６／０５４７９３号に開示のものなどの機器を用いて実施することができる。

【００９２】

[00118]レンチクルはまた、フェムト秒レーザーアブレーション、エキシマレーザーアブレーションによって、又はウォータージェットで切離することによって得ることができる。前部セグメントの確保が必要でない場合、レンチクルは、例えば、また参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、「Ｍｅｔｈｏｄ Ｆｏｒ Ｃｏｒｎｅａｌ Ｌａｓｅｒ Ｓｕｒｇｅｒｙ」と題する、米国特許第６，１１０，１６６号に開示の小切開レンチクル抽出（Ｓｍａｌｌ ｉｎｃｉｓｉｏｎ Ｌｅｎｔｉｃｕｌｅ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ）（ＳＭＩＬＥ）技法によっても得ることができる。

【００９３】

[00119]本明細書に記載の一部の実施形態では、レンチクルの最大の厚さは、６００マイクロメートル未満、４００マイクロメートル未満、２００マイクロメートル未満、又は１００マイクロメートル未満、又は５０マイクロメートル未満となる。直径が小さいほど、レンチクルが薄いほど、より速くレンチクルは患者の実質床へ一体化することができる。

【００９４】

[00120]ある特定の実施形態では、ドナー実質を脱細胞化して、細胞由来の免疫原に対する患者の側の有害反応の可能性が低減した状態のレンチクルを作製する。本発明の方法を使用して作製された脱細胞化レンチクルは、９０パーセント～１００パーセント、又は好ましくは９５パーセント～９９．９９パーセント、又は９８～９９．９パーセント、細胞及び／又は細胞残遺が除去されている。典型的な角膜のうちのわずか約２パーセントが細胞から構成されている。残りの９８パーセントは、ほぼ細胞外マトリックス（ＥＣＭ）、主としてコラーゲン、水分、ＧＡＧ及びプロテオグリカンである。脱細胞化プロセス後の細胞残遺の量を特徴付ける好ましい、主に実践されている方法は、ＤＮＡ残留物又は代替的にＲＮＡ残留物の検出に基づいている。これらの方法は非常に感度が高く、高特異性である。これらの測定値は、脱細胞化ステップの前にレンチクルに存在するＤＮＡ／ＲＮＡの量に典型的には標準化されている。９０％～９９．９９％の間のあらゆる可能な部分範囲を詳述せずとも、そのような全ての部分範囲が本発明の一部として企図及び考慮されることは明白である。例えば、作製されたレンチクルは、９０％、９５％、９９％～９９．７％、９９．７％～９９．９％又はより良好に、天然の細胞物質が除去されている（ＤＮＡ／ＲＮＡ残留含有量で評価して）。言い換えると、レンチクルに残留する細胞物質の量は、残留ＤＮＡ又はＲＮＡの含有量によって評価して、当初のＤＮＡ又はＲＮＡの含有

量の１重量パーセント未満、又は０．１重量パーセント未満、又は０．０１重量パーセント未満とすることができる。（レンチクル抽出自体のおかげで、かなりの量の脱細胞化を行うことができる。角膜細胞の総含有量のうちの９５％もが上皮と内皮に存在し、上皮と内皮は機械的に処分することができ、その結果、さらなる脱細胞化に向けて角膜実質のみを残留する。）

【００９５】

[00121]ドナー実質からの細胞物質の除去（脱細胞化）は、様々な技法を使用して行うことができる。好ましい一実施形態では、角膜の細胞物質は、化学処理によって除去される。角膜から細胞を溶解及び除去するのに使用される化学物質としては、酸、塩基、界面活性剤（例えば、テトラデシル硫酸ナトリウム（ＳＴＳ））、イオン性洗浄剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ））、非イオン性洗浄剤（例えば、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００）及び両性イオン洗浄剤を挙げることができる。

【００９６】

[00122]或いは又は加えて、角膜の細胞物質は、酵素処理を使用して除去される。リパーゼ、サーモリシン、ガラクトシダーゼ、ヌクレアーゼ、トリプシン、エンドヌクレアーゼ、及びエキソヌクレアーゼを使用して、角膜から細胞物質を除去することができる。一部の実施形態では、角膜の細胞物質は、物理的技法を使用して除去される。これらの物理的技法は、温度、圧力、及び／又は電気的破壊の使用を通して、組織のマトリックスから細胞を溶解、殺滅、及び除去するのに使用される方法を含む。温度ベースの脱細胞化法は、急速凍結プロトコルを含むことができる。このような温度ベースの方法は、ＥＣＭ足場の物理的構造を保存する。圧力脱細胞化は、足場を損傷するおそれのある非監視の氷晶形成を回避するのに、高温での静水圧の制御使用を含む。原形質膜の電気的破壊は、角膜の細胞物質を溶解するための別のオプションである。

【００９７】

[00123]一部の実施形態では、レンチクルはさらに処理されて、免疫原性エピトープの分解に起因してさらにより低い免疫反応性を呈することができる。これは、異種の提供を使用する場合、重要なステップである。例えば、異種組織で存在することができる２つの非ヒトエピトープは、Ｎ－グリコリルノイラミン酸（Ｎｅｕ５ＧＣ）及びガラクトース－アルファ－１，３－ガラクトース（アルファ－Ｇａｌ）である。これらの望ましくないエピトープは、実質細胞の内部だけでなはなく又は表面に存在する；少部分のエピトープは、ＥＣＭコラーゲン原線維を取り囲む、ムコ多糖類としても知られるグリコアミノグリカン（ＧＡＧ）に埋まっている場合がある。ある特定の実施形態では、そのようなエピトープは、キナーゼ又はガラクトシダーゼ処理などの酵素処理、及びさらなる洗浄によって除去する又はそのコンフォメーションを改変（免疫原を中和するため）することができる。或いは、角膜組織は、エピトープを欠いているノックアウトトランスジェニックブタから採取することができ、したがって、分解ステップを必要とせずに非免疫原性レンチクルを作製することができる。一部の場合では、エピトープ中和の前に、上皮細胞層及び／若しくは内皮細胞層又は残留物をレンチクルから除去することも好ましいことがある。このようなことは、例えば外科用メスでの掻爬によって、又は例えば適切な粗さの研磨材でのこすり落とし（ｒｕｂｂｉｎｇ）によって行うことができる。

【００９８】

[00124]本明細書に記載の実施形態では、脱細胞化レンチクルを作製する方法は滅菌ステップをさらに含むことができ、このステップは包装及び密封と併せてもよい。滅菌は、ウエットな薬剤、ガンマ放射線、又は電子ビームを使用して行うことができる。一実施形態では、コラーゲン足場への損傷が生じる可能性が低いので、脱細胞化レンチクルの滅菌は電子ビームを使用して実行される。或いは、架橋形成を誘導するのに利用される放射線はまた、レンチクルの滅菌に十分なエネルギーを提供することができる。

【００９９】

[00125]一部の実施形態では、採取、形状化及び脱細胞化されたレンチクルの調製は、臨床医がフラップの再切開及びレーザー調整中にレンチクルの適切な配向を維持できるよ

うな形で、レンチクルをマーキングするステップを含むことになる。マーキングは、さまざまな方法で行うことができるが、レンチクルが設置されると、全ての場合において患者にとって不可視となる。一部の実施形態では、マーキングは、レンチクルの上部前方部分又は底部前方部分の顕微鏡下の切痕とすることができる。一部の実施形態では、マーキングは、レンチクルの上部前方又は底部前方に配置された染料でなされた線又は点とすることができる。これらの方法はまた、レンチクルの前面及び後面を確認するのに、レンチクルの周縁上に１つ又は複数の非対称マーカー（文字「Ｌ」のような）を刻み込むステップを含むことができる。

【０１００】

[00126]使用される方法及び材料を例示する本発明及び実施形態は、以下の例示的なプロトコルを参照することによってさらに理解されよう。角膜組織は、ブタのドナーから採取することができる。レンチクルは、レンチクルの前面及び密度がより低い後面にて高密度のコラーゲンタイプＩ原線維又はボーマン膜を維持するように、ドナー実質内の領域から取ることができる。或いは、角膜組織は、自然に高密度化した面の下の実質領域から取ることができる。

【０１０１】

[00127]図１Ａに示すように、ドナー角膜の標的領域を、前面１２、後面１４、及びコラーゲン原線維１６の組織化された層を有する円板状のレンチクル１０Ａに切離することができる。この段階で、レンチクルは直径約０．５～１０ミリメートルまで、及び厚さ２５０マイクロメートル未満を、典型的に有することになる。

【０１０２】

[00128]図１Ｂは、細胞物質が９５～９９．９９％除去されているレンチクルを作製するための、例えば、化学的処理、酵素処理、又は物理的技法による脱細胞化の後の、レンチクルを示す。所望の場合、脱細胞化、形状化レンチクルをさらに処理して、免疫原性エピトープを分解することができる。レンチクルはさらに洗浄及び滅菌することができ、所望の場合、架橋剤をレンチクルの前面及び／又は後面に適用することができる。脱細胞化レンチクル（洗浄剤、界面活性剤及び／又は洗浄液の適用により典型的には膨潤している）は、原線維層１６のより大きい間隔を呈する。一部の実施形態では、レンチクルの上部前面はまた、切痕でマーキングして、患者の実質床におけるレンチクル配向を補助することができる。

【０１０３】

[00129]図１Ｃでは、脱細胞化（かつ潜在的に膨潤した）レンチクルは、レンチクル本体から過剰な流体を追い出すとともにコラーゲン密度を上昇させるために、次いで圧縮に供される。コラーゲン原線維層を一緒に圧縮し、次いで、少なくとも部分的に架橋して、その後の膨潤を防止する。

【０１０４】

[00130]図２では、コラーゲン原線維層が圧縮及び架橋されている前面領域２２を有するレンチクル２０が示されている。レンチクル２０のバルク領域２４も架橋して、膨潤を防止することができるが、前面領域２２と同程度ではない。

【０１０５】

[00131]図３では、一方の表面（例えば、後面１４）をパターン３２と共に形成して、術後の一体化を促進しているレンチクル３０が示されている。パターン３２は、薬剤の選択的適用、選択的照射、又はこれらの技法の組み合わせによって形成することができる。（パターンは、前面１２、後面１４、又は両面に適用できることは明白である。）

【０１０６】

[00132]図４Ａは、製造及び／又は輸送中、多くの場合では典型的な形状である、平坦な形状にある、本開示によるレンチクル４０Ａを例示する。

【０１０７】

[00133]図４Ｂは、角膜内移植用の例示的な最終湾曲状態にあるレンチクル４０Ｂを例示している。レンチクルは、さまざまな屈折異常又は眼の状態を矯正するのに種々の形状

を取ることができる（下でさらに論議する）。レンチクルは球体又は回転楕円体の形状として一般に例示されているが、同様に楕円体又は任意の望ましい形状（例えば、部分的に環状体）であってもよいことは明白である。このような形状は、患者の視力における乱視又は高次収差を矯正するのに有用であり得る。このような非球面形状は、患者の角膜（ｃｏｒｎｅｌ）又は角膜輪部の形状とマッチする上で有用であり得る。

【０１０８】

[00134]図５Ａは、遠視状態を矯正するために角膜内移植用に設計されたレンチクル５０Ａを例示する。図５Ｂは、近視状態を矯正するために角膜内移植用に設計されたレンチクル５０Ｂを例示する。図５Ｃは、老眼状態を矯正するために角膜内移植用に設計されたレンチクル５０Ｃを例示する。図５Ｄは、円錐角膜として知られる状態を矯正するために角膜内移植用に設計されたレンチクル５０Ｄを例示するが、この場合、角膜の自然なコラーゲン性構造は、損傷、遺伝、又は他の眼の状態、例えば、角膜内の酵素活性又はシグナル伝達活性のインバランスに起因してもろくなっている。レンチクル５０Ａ、５０Ｂ、５０Ｃ及び５０Ｄは、角膜内の実質内（自然の実質の層間）移植用に典型的には設計されている。実質組織２内にレンチクルを配置することによって、上皮領域４と内皮領域６が確保される。

【０１０９】

[00135]図６Ａは、レンチクルの別の実施形態を例示するが、この場合、下でより詳細に論議するように、例えば、全層角膜移植（ＰＫ）又は深層層状角膜移植（ＤＡＬＫ）中に外科的縫合の付着のために、さらなる機械的強度の領域を形成するように強い架橋形成の局所スポット６１とともに、レンチクル６０Ａが製造されている。

【０１１０】

[00136]図６Ｂは、レンチクルのさらに別の実施形態を例示する。この実施形態では、レンチクル６０Ｂは、中程度の架橋形成を有する中央の光学活性ゾーン６５（例えば、約３～６．５ミリメートルの主直径寸法を有する）と、強い架橋形成を有する外周ゾーン又は周辺部ゾーン６３とを含んで、ここでもまた、例えば、外科的縫合の付着のために、又は視覚ゾーンの外側の角膜的にもろくなった実質のサポートにおいて、さらなる機械的強度の領域を形成する。ゾーン６３と６５は同心円である必要はないことに留意されたく、例えば、円錐角膜の治療のような場合、光学活性ゾーンをレンチクルの中心からずらすことが望ましいことがある。

【０１１１】

[00137]図７Ａは、異なるタイプの角膜内移植、すなわち、深層層状角膜移植（ＤＡＬＫ）用の、本開示によるレンチクル７０Ａの使用を例示する。この処置では、眼の前部セグメントが最初に除去され、レンチクル７０が眼内に配置されて、天然のボーマン膜３及び実質２の一部と置き換わる。レンチクル７０Ａは、縫合７によって所定の位置に最初に固定することができる。任意選択で、レンチクル７０Ａは、レンチクル形成の脱細胞化ステップ及び圧縮ステップを通して確保されるインタクトのボーマン膜を有する天然のドナー組織から形成することができる。或いは、レンチクルの前面は、例えば、浅い放射性架橋形成によって選択的に処理して、ボーマン膜様構造を形成することができる。いずれの場合も、角膜内移植に続いて、患者の周辺上皮は移植されたレンチクルの前面にわたって成長することができる。

【０１１２】

[00138]図７Ｂはレンチクル７０Ｂの使用を例示するが、このレンチクル７０Ｂは、図７Ａに示したＤＡＬＫレンチクルに類似するが、典型的にはより薄く（例えば、２００マイクロメートル未満）、患者のインタクトのボーマン膜３の上であるが上皮４の下の配置向けに構成されている。この処置では、「表層角膜移植術」と呼ばれることもあるが、レンチクル７０Ｂをここでも縫合７で所定の位置に固定することができる。

【０１１３】

[00139]図７Ｃは、本開示によるレンチクル７０Ｃのさらに別の実施形態を例示し、この場合、全層角膜移植（ＰＫ）術用に設計されている。レンチクル７０Ｃは、図７Ａに示

したＤＡＬＫレンチクルに類似しているが、中央の角膜組織の全深さ、すなわち角膜後部の内皮６、実質２及びボーマン膜３と完全に置き換わるように構成されている。レンチクル７０Ｃは、ここでも縫合７によって所定の位置に固定することができる。レンチクル７０Ｃの角膜内移植に続いて、患者の周辺上皮は、移植されたレンチクルの前面にわたって成長することができる。

【０１１４】

[00140]図８Ａ、図８Ｂ及び図８Ｃは、例えば、ＤＡＬＫ術及びＰＫ術で有用なものなどの、厚いレンチクルの周辺部用の２つの代替設計を例示する。図８Ａに、単純な、例えば、円筒形又は円錐形の周縁を有するレンチクル８０Ａが示されている。図８Ｂに、レンチクルの周辺部にジグザグ又は階段状の縁を有するレンチクル８０Ｂが示されている。形状化された縁は、天然の角膜に形成されている相補的な構造と対合するように設計されて、レンチクル８０Ｂの残留している天然の角膜組織への接合をさらに補助することができる。階段状の変形形態（例えば、逆のジグザグ）も用いることができる。図８Ｃに示すように、周縁のさらにより高度化した形状を用いて、天然の角膜への機械的なラッチイン又はロックインを可能にすることができる。ロックイン機能は、一部の場合では、ラッチインエッジに沿った外科的縫合の必要性を低減又は排除することができる。そのようなレンチクルの周辺部は、中央部分よりも強く架橋することができる。

【０１１５】

[00141]一部の場合では、これらの厚いレンチクルの厚さは、中央から縁まで変化することができる。例えば、レンチクルの厚さは中央での約４００マイクロメートルから周縁での５５０マイクロメートルまで変化することができる。このことは、ほとんどの角膜に見られる自然な厚さの変化と一致しているが、この場合、典型的なインタクトの角膜は中央角膜の厚さ約５００マイクロメートルを呈し、一方、角膜の周辺セグメントは５５０～約６５０マイクロメートル程度の厚さを呈することができる。

【０１１６】

[00142]図９は、本発明によるコラーゲン足場を圧縮するのに使用するためのプレス９０を概略的に例示する。プレス９０は、フレーム９２及び可動ステージ９４を含むことができる。フレームは、上部プレス要素９６を保持し、ステージは、底部プレス要素９８を保持する。これらの要素のうちの少なくとも１つは、非平面であり、足場の所望の最終形状に一致するように成形されている。要素９６及び９８は、推進力の適用（ウォームスクリュー９１によって概略的に例示されている）によって圧縮に至ることができる。ある特定の実施形態では、プレス要素９６と９８の間での圧縮に保持されている足場を、足場が成型されているのと同時に、例えば、ＵＶ放射線源９３によって照射することができるように、プレス要素９６、９８のうちの少なくとも１つは透明とすることができる。

【０１１７】

[00143]図１０Ａ及び図１０Ｂは、本発明による２パーツの密封圧縮及び保管容器又はモールド１０１を例示する。容器／モールド１０１はモールドベース１０２とモールド上部１０４を備えることができ、モールドベース１０２とモールド上部１０４の間にチャンバ１０５を画定する。モールド１０１の目的は、足場１００Ａ、例えば、脱細胞化された実質のコラーゲン性（細胞外マトリックス）足場を圧縮すること、及び同時に足場から流体を除去することである。図１０Ａは、足場の圧縮前の状態のモールド１０１を例示する。シール１０６、例えば、Ｏリング又はフラットガスケットシールは、モールド上部１０４とモールド底部１０２を最初のうちは分けている。一部の場合では、足場１００Ａによって占められていないチャンバ１０５の残りを流体１０７で満たして、圧縮中に足場でのガスの巻込みを回避することが望ましい場合もある。シール１０６は、足場から追い出された流体、並びにチャンバ１０１の足場を最初のうちは囲んでいる任意の流体を収容するように構成されている。図５Ａに、圧縮前であるが、シール１０６が周囲環境からの隔離を生み出すその最初の瞬間にある、モールドが示されている。

【０１１８】

[00144]モールドの上部分１０４は、足場を架橋するために活性放射線が足場を通過す

ることを可能とするように、少なくとも部分的に透明又は半透過性とすることができる。或いは、又は加えて、モールド底部１０２を、活性放射線に対して透明とすることができる。モールドの透明部分は、モールドが放射線透過を可能にするのに十分に透明又は半透過性である限り、プラスチック、ガラス、セラミック若しくは金属、又はこのような材料の任意の組み合わせで作製することができる。

【０１１９】

[00145]図１０Ｂは、足場１００Ｂの圧縮後のモールド１０１を例示する。シール、例えば、Ｏリング１０６は溝（ｇｒｏｖｅ）１０３内を移動することができ、その結果、溝は追い出された流体を収容する。（他の種々の排水機構も用いることができる。）この状態で、モールド１０１を、架橋形成及び滅菌に使用することができる。放射線の適切な波長とフルエンスが選択されている場合、このような滅菌を架橋と同時に行うことができる。（多くの場合、ウイルスの活力喪失に必要な放射線量は、架橋形成に必要な線量よりもはるかに少なくなる）圧縮され、滅菌されたモールドは、運送又は長期保管にさらに使用することができる。活性架橋放射線、例えば、ＵＶ放射線の場合、滅菌の目的についても効果的とするために、放射線はこのプロセス中にレンチクルの全ての表面に到達する必要がある。したがって、シール（例えば、選択した活性放射線に透過性であるＯリング又はフラットガスケット）を用いることが望ましいことがある。例えば、成型中にレンチクルを架橋も滅菌も両方するようにＵＶ光を使用する場合、シールは、フルオロポリマーなどの、例えば、ポリテトラフルオロエチレン（ＰＴＦＥ）、フッ素化エチレンプロピレン（ＦＥＰ）、エチレンテトラフルオロエチレン（ＥＴＦＥ）又はパーフルオロアルコキシ（ＰＦＡ）の組成物であるが、ＵＶ透過性又は半透過性材料から作製することができる。

【０１２０】

[00146]圧縮前の足場又はレンチクルの形状とモールドのマッチング形状は、圧縮後もレンチクルの密度が依然として均一のままであることを、典型的には確実にする。例えば、圧縮は、垂直寸法を半減し、密度を２倍に均一に高めることができる。

【０１２１】

[00147]図１１は、足場１６１を伸展させるための本発明によるさらなる装置１１０を例示するが、この足場は、天然の脱細胞化実質摘出物であっても、脱細胞化され最初の圧縮処理を受けた足場であってもよい。この実施形態では、足場１６１は、例えば、平坦な２つフランジの間で足場１６１の周縁を圧着することによって、密閉機構１６７によって、チャンバ１６３の開口部に付着されている。（圧着の代わりに、又は圧着に加えて、他の種々の密閉機構を用いて、足場とチャンバの開口部との間の液密接続を形成することができる。）次いで、流体１６６を、制御された圧力導管１６５を介してチャンバ１６３に導入して、チャンバの内部を満たし、足場１６１に圧力を加える。例えば、水平方向及び／又は接線方向の伸展は、チャンバ内で十分な静水圧、例えば、約３０～約５００ｍｂａｒまで、好ましくは約５０～約２００ｍｂａｒまで（又は約２２．５～約３７５Ｔｏｒｒまで、好ましくは約３７．５～約１５０Ｔｏｒｒまで）の圧力を維持することによって得ることができる。

【０１２２】

[00148]足場に機械的応力を適用する流体が純水又は平衡塩類溶液（ＢＳＳ）である場合でも、この流体圧力の適用はまた、足場を解膨潤（遊離水を放出）させることができる。流体は、足場から任意の方向に流出することができる（例えば、加圧流体チャンバへの移動若しくは足場の外面からの滲出による移動、又はその両方の移動）。高張液又は低張液をチャンバ１６３で用いて、この効果を増強又は制限することもできる。

【０１２３】

[00149]ＥＣＭ足場をこのタイプの伸展に曝露することによって、コラーゲン原線維を整合させて湾曲した形状を構築することができる。所望の湾曲が得られる場合、示されるように、架橋形成によって、例えば、活性放射線１６８によって、形状を確保（又は固定）することができる。

【０１２４】

[00150]図１２では、図６の装置と同様であるが、足場の同時である伸展及び圧縮のための、並びに架橋放射線への曝露を容易にするための、圧縮を加えるプレート要素１７１の付加を伴う、さらに別の代替装置１２０が示されている。水平方向及び／又は接線方向の伸展は、チャンバ内で約３０～約５００ｍｂａｒ、好ましくは約５０～約２００ｍｂａｒの十分な静水圧を維持することによって、ここでももたらされる。垂直圧縮／ラジアル圧縮は、上部プレート１７１によって同時に適用することができる。好ましくは、上部プレート１７１は、足場を架橋するために活性放射線が上部プレートを通して足場へと通過することを可能とするように、少なくとも部分的に、透明である、例えば、清明又は半透過性である。

【０１２５】

[00151]上部プレート１７１は平坦なプレートとして例示されているが、この圧縮性要素のトポグラフィは、コラーゲン原線維の構成が適切に固定されて所望の形状のレンチクルを構築することを確実にするように、所望の任意の形状及び／又は湾曲をとることができる。このような所望の任意の形状及び／又は湾曲は、放射線誘導架橋形成によって、ここでも確保又は固定することができる。

【０１２６】

[00152]図１３は、本開示に従って作製されたレンチクルの透明度を測定するための装置１３０を例示する装置１３０は、光源１３２、キュベット１３４（レンチクル１３５を置くことができる）、レンズ１３６、及び検出器１３８を含む。光源、例えば、導波管／ファイバ及びビームコリメータ（図示せず）を備えた発光ダイオード（ＬＥＤ）は、好ましくは、コリメート光線１３３のビームを発生する。ビームは、そのビーム幅Ｄ（例えば、約５～７ｍｍ）にわたって平坦な（非ガウス）強度プロファイルの状態で空間的に干渉性である必要がある。例えば、光源１３２は、中央波長約５００ナノメートル及び帯域幅約５～１０ナノメートルを有する緑色光を発生することができる。

【０１２７】

[00153]光源１３２からの光は、レンチクル１３５が屈折率整合流体１３７（例えば、約１．３７６の屈折率ｎを有する、水と非混和性であり化学的に不活性であるシリコーンオイル又は他の流体）に懸濁されている、キュベット１３４に向けられる。ｎ＝１．３７６の値は、天然の角膜組織の名目又は平均屈折率を表す。一部の場合では、異なる屈折率のレンチクルを有することが有利であり得る。このような場合、キュベットの流体は、試験中のレンチクルの特定のｎ値にマッチするように選択されるであろう。次いで、キュベット１３４（及びレンチクル１３５）を通過する光は、選択されたビーム波長での球面収差が無い高品質レンズであるレンズ１３６に向けられる。レンズ１３６は、焦点距離ｆを有し、レンズ１３６の焦点面に位置する検出器１３８へと合焦された光を向ける働きをする。レンチクルの透明度が完全である場合（光源１３２からの光が検出器１３８に通過する光学要素に対して理想的な光学的透明度を仮定して）、検出器（焦点面に位置する）の間に衝突するビームのサイズは、均一強度の回折限界スポットであることになる。実際には、レンチクルは完全に透明であることはなく、検出器でのビーム強度画像は、足場内の光の前方散乱に起因してある程度のかすみを呈することになる。（レンズの焦点距離は、ビーム直径とともに、回折限界の角度の望ましい分解能を課すように選択する必要がある。）

【０１２８】

[00154]したがって、レンチクルの透明度は、検出されたビームの強度プロファイルを測定することによって評価することができる。強度又は輝度プロファイルを測定するための適切な光検出器としては、例えば、写真乾板、ＣＣＤアレイ又は走査ピンホール検出器を挙げることができる。

【０１２９】

[00155]図１４は、レンチクルの散乱角度（本明細書では「Θ」又は「シータ」と呼ばれる）を測定することによって透明度を定量化するそのような方法の例示である。図１４は、レンズの焦点面で測定した輝度分布曲線を例示する。このガウス的分布は、散乱波面

の全ての寄与の合計を表す。レンチクルでの散乱が多いほど、検出されるビームの幅が大きくなる。散乱（光学的透明度の低下）の一尺度は、図１４に示すように、垂直半値の全幅（ＦＷＨＶ）である。図１４のガウス的曲線は理想化されたものであり、実際の輝度曲線はノイズ又はその他の偽信号によって歪む場合があることを理解されたい。複数の測定と平均化（又は既知の他のノイズ低減信号処理技法）を使用して、レンチクルによる散乱の最良のデータ表現を得ることができる。焦点距離ｆで割ったＦＷＨＶ値は、ビームの角発散（ラジアン表示で）の測定値をもたらす。

Θ＝ＦＷＨＶ／ｆ［ｒａｄ］

【０１３０】

[00156]シータは、散乱の量にのみ従属し、変換式：１ａｒｃｍｉｎ＝２９１ｍｉｃｒｏｒａｄを使用して分角で表現することもできる。本明細書に開示の方法によって製造されたレンチクルは、角度Θが４分角未満、好ましくは３又は２分角未満、より好ましくは一部の場合では１分角未満である場合、満足な透明性を呈する（例えば、角膜内移植の場合）。

【０１３１】

[00157]本明細書で引用の全ての特許文献又は刊行物は、参照によりその全体が組み込まれる。出願人の教示は様々な実施形態と併せて説明されるが、出願人の教示がそのような実施形態に限定されることは意図されていない。それどころか、当業者によって理解されるように、出願人の教示は、様々な代案、改変、及び均等物を包含する。一実施形態に関連して示される任意の要素又は特徴は、他の任意の実施形態に示される任意の要素又は特徴と交換可能に組み合わせて、又はそれに加えて使用することができ、要素及び特徴に関するかかる入替え全てが、本開示によって包含されると理解されるべきである。したがって、本発明は、本明細書に開示の実施形態に限定されるべきものではなく、法の下で認められる限り幅広く解釈されるべきである以下の特許請求の範囲から理解されるべきものであることが理解されよう。

【図１Ａ】

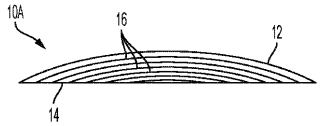


FIG. 1A

【図１Ｂ】

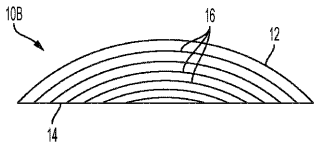


FIG. 1B

【図１Ｃ】

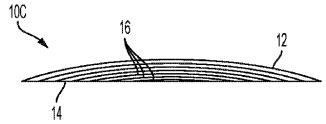


FIG. 1C

【図２】

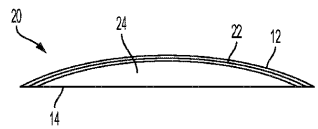


FIG. 2

【図３】

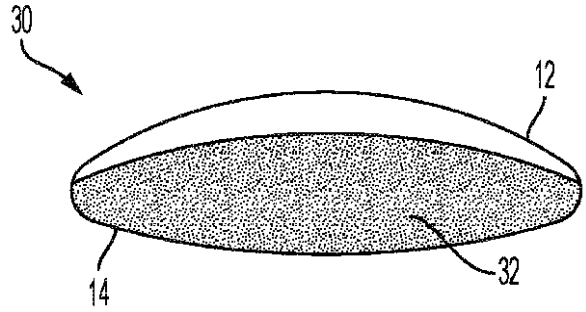


FIG. 3

【図４Ａ】



FIG. 4A

【図４Ｂ】

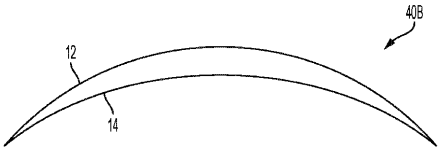


FIG. 4B

【図５Ａ】

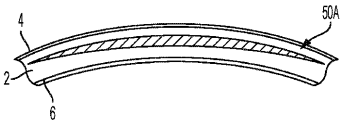


FIG. 5A

【図５Ｂ】



FIG. 5B

【図５Ｃ】

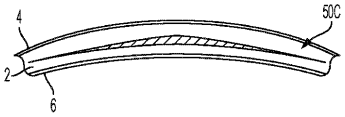


FIG. 5C

【図５Ｄ】

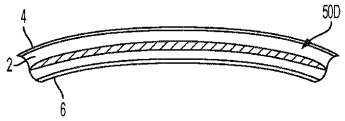


FIG. 5D

【図６Ａ】

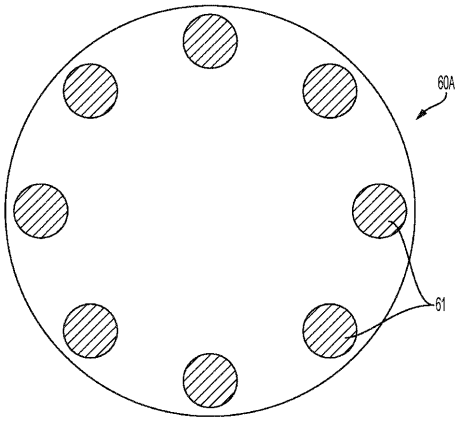


FIG. 6A

【図６Ｂ】

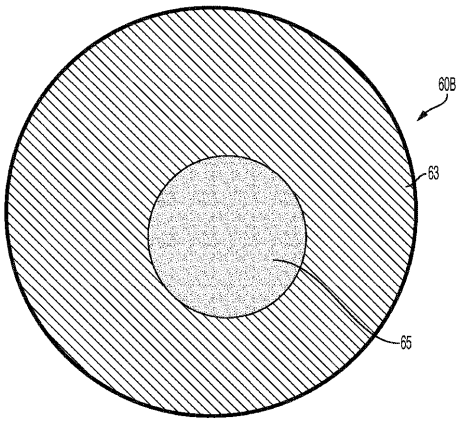


FIG. 6B

【図７Ａ】

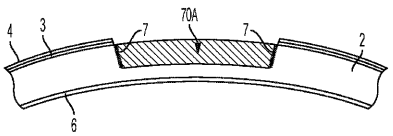


FIG. 7A

【図７Ｂ】

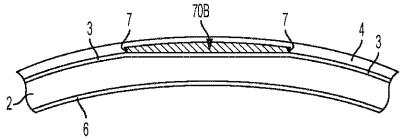


FIG. 7B

【図７Ｃ】

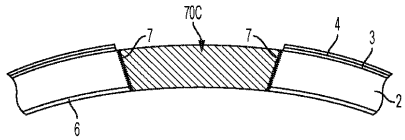


FIG. 7C

【図８Ａ】

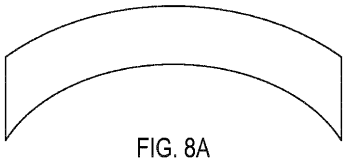


FIG. 8A

【図８Ｂ】

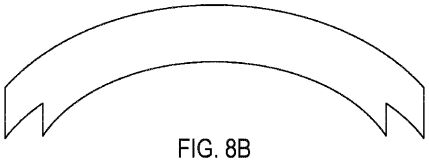


FIG. 8B

【図８Ｃ】



FIG. 8C

【図９】

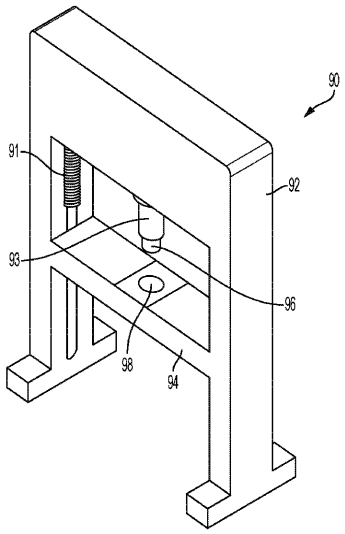


FIG. 9

【図１０Ａ】

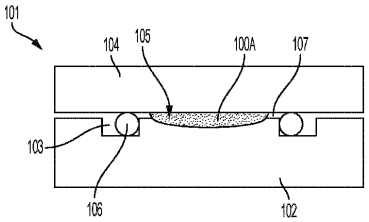


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

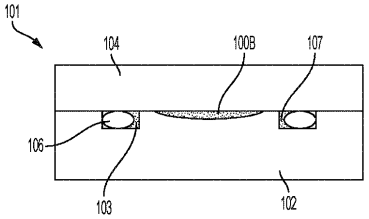


FIG. 10B

【図１１】

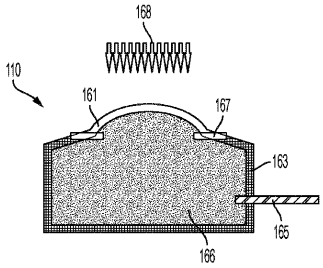


FIG. 11

【図１２】

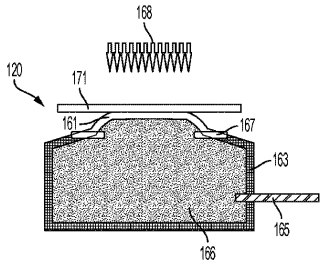


FIG. 12

【図１３】

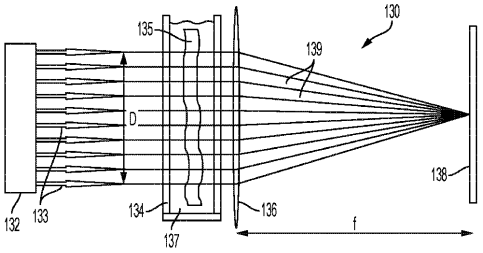


FIG. 13

【図１４】

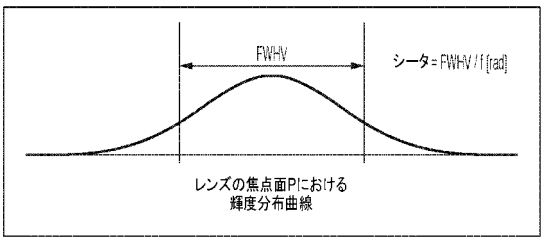


FIG. 14

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2019/000779

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61F2/14
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)
A61F 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, 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 2012/010728 A1 (SUN WENDELL [US] ET AL) 12 January 2012 (2012-01-12) paragraph [0005] - paragraph [0042]	1-56
X	US 4 793 344 A (CUMMING J STUART [US] ET AL) 27 December 1988 (1988-12-27) column 2, line 8 - column 2, line 18	1-56
X	WO 2013/081943 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; MURPHY CHRISTOPHER J [US] ET AL.) 6 June 2013 (2013-06-06) paragraph [0004]; figure 4	1-56

☐ 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 January 2020	20/03/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Farizon, Pascal

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2019/000779

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-56

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB2019/000779

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-56

Collagenous lenticule for use as an implantable lenticule obtained from a dried, decellularized, cross linked ,formed scaffold from corneal donor source and method of forming it.

---

2. claims: 57-61

Storage container comprising to bodies and a cavity suitable at least partially radiation transmissive for sterilisation of a lenticule.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2019/000779

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012010728 A1	12-01-2012	AU 2011276246 A1	10-01-2013
		CA 2804592 A1	12-01-2012
		CA 3054722 A1	12-01-2012
		CN 103068413 A	24-04-2013
		EP 2590691 A1	15-05-2013
		EP 3581211 A1	18-12-2019
		JP 5967721 B2	10-08-2016
		JP 2013535240 A	12-09-2013
		US 2012010728 A1	12-01-2012
		US 2017100509 A1	13-04-2017
		WO 2012006390 A1	12-01-2012
US 4793344 A	27-12-1988	NONE	
WO 2013081943 A1	06-06-2013	US 2014330374 A1	06-11-2014
		WO 2013081943 A1	06-06-2013

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＲＩＴＯＮ

(72)発明者　クロポテック,　ピーター,　ジェイ.
ドイツ連邦共和国,　７５２４２　ノイウハウゼン,　モンバッハシュトラーセ　５
Ｆターム(参考) 4C097 AA24　BB01　CC01　DD15　EE19　MM02　MM03　MM05