

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7670355号
(P7670355)

(45)発行日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(24)登録日 令和7年4月21日(2025.4.21)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 M	35/00 (2006.01)	A 6 1 M	35/00 Z
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	38/18 (2006.01)	A 6 1 K	38/18
A 6 1 K	31/4745(2006.01)	A 6 1 K	31/4745
A 6 1 K	31/203(2006.01)	A 6 1 K	31/203
請求項の数 37 (全43頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-534166(P2022-534166)	(73)特許権者	319009901
(86)(22)出願日	令和2年12月7日(2020.12.7)		トラスティーズ オブ タフツ カレッジ
(65)公表番号	特表2023-504856(P2023-504856 A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
			2 1 5 5 メドフォード パルー ホール
(43)公表日	令和5年2月7日(2023.2.7)	(74)代理人	100099759
(86)国際出願番号	PCT/US2020/063665		弁理士 青木 篤
(87)国際公開番号	WO2021/113844	(74)代理人	100123582
(87)国際公開日	令和3年6月10日(2021.6.10)		弁理士 三橋 真二
審査請求日	令和5年12月6日(2023.12.6)	(74)代理人	100117019
(31)優先権主張番号	62/944,707		弁理士 渡辺 陽一
(32)優先日	令和1年12月6日(2019.12.6)	(74)代理人	100141977
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 中島 勝
		(74)代理人	100138210
			弁理士 池田 達則
		(74)代理人	100197169
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 組織再生多剤カクテル及びその送達のための装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象の組織における部位での組織再生の刺激のための装置であって：

組織収容端部、前記組織収容端部と反対側にある押圧部材収容端部、及び前記組織を収容するように構成されている内部チャンバを有する外側スリーブ；

押圧部材；

前記外側スリーブ内に設置されている内側スリーブにおいて、再生のための前記組織の部位を収容するための端部、再生のための前記組織の部位を収容する前記端部と反対側にある、前記押圧部材を嵌め合わせるための嵌め合い収容端部、及び再生のための前記組織の部位を収容するように構成されている内部チャンバを有し、

前記押圧部材が、前記押圧部材収容端部を通して前記外側スリーブの前記内部チャンバ内に延びるように且つ、前記組織に向かって前記内側スリーブの前記嵌め合い収容端部をバイアスするように構成されており、

前記押圧部材は、再生のための前記組織の部位の少なくとも一部を、前記内側スリーブの前記内部チャンバの部分と接触して置く、前記内側スリーブ；

前記外側スリーブの前記組織収容端部と嵌め合わせ可能であり、前記組織を収容するように構成されている開口を備える第1エンドキャップ；並びに

前記外側スリーブの前記押圧部材収容端部と嵌め合わせ可能な第2エンドキャップであり、前記第2エンドキャップは、前記押圧部材と連結される、前記第2エンドキャップを備える、装置。

【請求項 2】

前記組織が、付属器官又は器官の部分である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 3】

前記組織収容端部と嵌め合わせ可能な前記第 1 エンドキャップを前記外側スリーブに選択的に連結するための前記外側スリーブの前記組織収容端部内に設置可能である第 1 ネジ式アダプタをさらに備え、前記第 1 エンドキャップが、前記第 1 ネジ式アダプタのネジ山を収容するように構成されている溝を有する、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 4】

前記押圧部材と嵌め合わせ可能な前記第 2 エンドキャップを前記外側スリーブに選択的に連結するための前記外側スリーブの前記押圧部材収容端部内に設置可能である第 2 ネジ式アダプタをさらに備え、前記第 2 エンドキャップが、前記第 2 ネジ式アダプタのネジ山を収容するように構成されている溝を有する、請求項 1 に記載の装置。

10

【請求項 5】

前記押圧部材が、前記内側スリーブの前記嵌め合い収容端部を収容するように構成されているシート部を含み、又は、前記第 2 エンドキャップのシート部にあるように構成されている嵌め合い端部を含む、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 6】

前記内側スリーブの前記嵌め合い収容端部が、前記嵌め合い収容端部において前記内部チャンバを封止により閉鎖する多孔質フィルタ媒体を含む、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 7】

前記多孔質フィルタ媒体が、合成又はポリマー性膜である、請求項 6 に記載の装置。

20

【請求項 8】

前記多孔質フィルタ媒体及び前記押圧部材間に位置付けられている圧縮可能な部材をさらに備える、請求項 6 に記載の装置。

【請求項 9】

前記圧縮可能な部材が、綿又はカプセル化されたゲルを含む、請求項 8 に記載の装置。

【請求項 10】

前記内側スリーブが、前記内側スリーブの前記内部チャンバを少なくとも部分的に充填するタンパク質又はポリマー性マトリックスを含む、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 11】

前記タンパク質又はポリマー性マトリックスが、三次元多孔質足場を含み、前記多孔質足場が、指向性パターンを形成する孔を含む、請求項 10 に記載の装置。

30

【請求項 12】

前記多孔質足場が、実質的に整列したチャンネルを形成する整列した孔を含み、前記タンパク質又はポリマー性マトリックスにおける前記整列したチャンネルが、前記内側スリーブの長手方向軸と平行に配置されている、請求項 11 に記載の装置。

【請求項 13】

前記タンパク質又はポリマー性マトリックスが、シルクフィブロイン及びコラーゲン、又は 3D マトリックスにおいて整列した孔を形成するポリマーからなる群から選択される、請求項 12 に記載の装置。

40

【請求項 14】

前記押圧部材が、再生のための前記組織の部位での成長に応答して移動可能である、請求項 1 に記載の装置。

【請求項 15】

前記押圧部材が、成長する組織に応答して圧縮する弾性部材を備える、請求項 14 に記載の装置。

【請求項 16】

前記弾性部材が、バネを備える、請求項 15 に記載の装置。

【請求項 17】

前記押圧部材と嵌め合わせ可能な前記第 2 エンドキャップを前記外側スリーブに選択的

50

に連結するための前記外側スリーブの前記押圧部材収容端部内に設置可能であるネジ式アダプタにおいて、前記第2エンドキャップが、前記ネジ式アダプタのネジ山を収容するように構成されている溝を有する、前記ネジ式アダプタ；並びに

前記ネジ式アダプタのシート部及び前記押圧部材のシート部間に延びる弾性部材をさらに備える、請求項14に記載の装置。

【請求項18】

前記タンパク質又はポリマー性マトリックスが、治療剤を含む、請求項10に記載の装置。

【請求項19】

アノード及びカソードを含む電気刺激デバイスをさらに備え、前記アノード及び前記カソードが、電源の対応する端子に電氣的に接続されるように構成されており、前記カソードの部分が、前記内側スリーブに設置されている、請求項1に記載の装置。

【請求項20】

前記内側スリーブの前記内部チャンバが、治療組成物をさらに含む、請求項1～19のいずれか1項に記載の装置。

【請求項21】

前記治療組成物が：

成長因子；

プロリルヒドロキシラーゼドメイン（PHD）酵素の阻害剤；

ビタミンA又はその誘導体；及び

脂質メディエーター

を含む、請求項20に記載の装置。

【請求項22】

前記成長因子が、脳由来神経栄養因子（BDNF）、神経成長因子（NGF）、ニューロトロフィン-3（NT-3）、ニューロトロフィン-4（NT-4）、グリア由来神経栄養因子（GDNF）、毛様体神経栄養因子（CNTF）、及び白血病抑制因子（LIF）、並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項21に記載の装置。

【請求項23】

前記成長因子が、BDNFである、請求項22に記載の装置。

【請求項24】

前記PHD酵素の阻害剤が、4, 4 α -ジヒドロ-4-オキソ-1, 10-フェナントロリン-3-カルボン酸（1, 4-DPCA）、N-〔（1, 3-ジシクロヘキシルヘキサヒドロ-2, 4, 6-トリオキソ-5-ピリミジニル）カルボニル]-グリシン、6-アミノ-1, 3-ジメチル-5-〔（2-ピリジニルチオ）アセチル]-2, 4（1H, 3H）-ピリミジンジオン、6-アミノ-1, 3-ジメチル-5-〔〔2-（2-ピリジニル）-4-キノリニル〕カルボニル]-2, 4（1H, 3H）-ピリミジンジオン、N-〔（4-ヒドロキシ-1-メチル-7-フェノキシ-3-イソキノリニル）カルボニル]-グリシン、鉄キレート剤、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項21に記載の装置。

【請求項25】

前記PHD酵素の阻害剤が、4, 4 α -ジヒドロ-4-オキソ-1, 10-フェナントロリン-3-カルボン酸（1, 4-DPCA）である、請求項21に記載の装置。

【請求項26】

前記ビタミンAの誘導体が、レチノイン酸、レチノール、カルボン酸レチニル、トレチノイン、タザロテン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項25に記載の装置。

【請求項27】

前記脂質メディエーターが、レゾルビン、オメガ-3脂肪酸の代謝産物、エイコサペンタエン酸の誘導体、ドコサヘキサエン酸の誘導体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項21に記載の装置。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

前記治療組成物がレゾルビンを含み、前記レゾルビンが、レゾルビン5、インターロイキン6（IL-6）、インターロイキン4（IL-4）、腫瘍壊死因子-アルファ（TNF-α）、活性化B細胞（NF-κB）の核因子カッパー軽鎖エンハンサー、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 21 に記載の装置。

【請求項 29】

前記治療組成物が、近位-遠位位置情報において機能する剤を含み、前記剤が、骨形成タンパク質9（BMP9）、ノード成長分化因子（nodal growth differentiation factor）、アクチビン、形質転換成長因子-ベータ（TGF-β）、線維芽細胞成長因子8（FGF8）、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 21 に記載の装置。

10

【請求項 30】

前記治療組成物が、ペプチド又はタンパク質ホルモンを含む、請求項 21 に記載の装置。

【請求項 31】

前記ペプチドホルモンが、成長ホルモン（GH）、インスリン様成長因子-1（IGF-1）、形質転換成長因子-ベータ-1（TGFβ-1）、上皮成長因子（EGF）、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）、線維芽細胞成長因子 FGF、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 30 に記載の装置。

【請求項 32】

前記成長因子が、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の治療組成物内用量で存在する、請求項 21 に記載の装置。

20

【請求項 33】

前記の PHD 酵素の阻害剤が、 $0.004 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 0.024 \mu\text{g}/\text{ml}$ の治療組成物内用量で存在する、請求項 21 に記載の装置。

【請求項 34】

前記ビタミンA又はその誘導体が、 $0.03 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 0.27 \mu\text{g}/\text{ml}$ の治療組成物内用量で存在する、請求項 21 に記載の装置。

【請求項 35】

前記脂質メディエーターが、 $0.006 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 0.054 \mu\text{g}/\text{ml}$ の治療組成物内用量で存在する、請求項 21 に記載の装置。

30

【請求項 36】

前記ペプチド又はタンパク質ホルモンが、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の治療組成物内用量で存在する、請求項 30 に記載の装置。

【請求項 37】

必要とされる哺乳類における組織の再生を刺激する方法に使用するための、請求項 1 ～ 36 のいずれか一項に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

40

この出願は、2019年12月6日に提出された米国仮特許出願第62/944,707号の優先権の利益を主張し、その全内容が参照により本明細書に援用される。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

この発明は、国立衛生研究所によって与えられた助成金番号AR055993の下で政府支援によりなされたものである。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

技術分野

本発明の分野は、再生医療に関する。より詳細には、本開示は、必要とされる対象において又は対象内で組織の再生を促進するための装置、組成物、及び方法に関する。開示さ

50

れる装置は、ウェアラブルスリーブを含み、開示される組成物は、再生組成物を含む。

【背景技術】

【0004】

米国単独でのヒトの四肢欠損の有病率は、今後30年で大幅に増加することが予期され、2050年までに1年につき3.6百万の個体が罹患し（Ziegler-Graham et al., 2008）、糖尿病患者、戦争の兵役経験者）、心的外傷の生存者（、及び、切断術の事象において選択肢が制限されている）末梢動脈疾患に罹患している個体がそのままになってしまうことになる。

【0005】

これまでの努力は、the use of electrical stimulation (Borgens (1982) Science 217, 747-750; Leppik et al. (2015) Sci. Rep., 5, 18353; Smith, (1981) Bioelectrochem. and Bioenergetics, 8 (6), 661-670)、tissue-guiding biomaterials (Suckow et al. (1999) J. of Invest. Surg., 12 (5), 277-287)、progenitor cell transplantation (Lin et al., (2013) Dev. Cell, 24 (1), 41-51)、及びthe regulation of key molecular pathways (Kawakami et al., (2006) Genes & Dev., 20 (23), 3232-3237; Yokoyama et al., (2001) Dev. Biology, 233 (1), 72-79)を含めた、四肢再生を誘導することを企図したものである。しかし、これらは、新しい四肢の有意な成長及びパターン形成を回復するにおいて、大した成果はなかった。

【0006】

組織再生は、心的外傷又は切断術の際に失った切除器官又は付属器官を復元することに全体に結び付く一連の生物学的事象を含む。典型的な創傷治癒応答及び再生応答間には明確な相違がある。これらの2つのプロセスは、多くの実施形態において類似しているが、完全に異なる最終産物を結果として生じさせる。正常な創傷治癒の過程において、多くの複雑な生物学的構造、例えば、汗腺、管及び毛包が復元され得ない、なぜなら、そうするための生物マシーナリーが利用可能でないからである。典型的な成体哺乳類の皮膚創傷において、これらの構造は、再生されない、なぜなら、これらの組織及び器官の発生は、高度に特異的な生物学的プロセスを含むからである。また、正常な創傷閉鎖及び瘢痕形成は、これらの構造が再生するのに適切な環境を提供しない。付加再生は、一方で、全ての原型構造が、当該原型の複製によって置き換えられるプロセスである。

【0007】

いくつかの複雑な動物、例えば、アホロートルは、四肢、眼、及びそれらの全体にわたる他の全器官を自然に再生するが、哺乳類は、制限された再生を概して示し、有尾類が有するようなかかる柔軟性及び分化転換能を概して示さない。青年期に向かって成熟した無尾類は、切断した組織に埋め込まれた徐放ビーズを通して送達される再生誘発因子に暴露されたとき、それらの切断した又は負傷した四肢を再生することができる。再生プロセスの誘発のための組織前駆細胞もまた、用途を有することもあり；幼生の四肢前駆細胞が、同じWnt、Shhシグナリングを活性化してパターン形成を促進することが示されている。

【0008】

しかし、完全に非再生の強度変態後（成体）ゼノパスが、再生に有用な動物モデルとしてどのように良好に働き得るかは、成体カエルが特徴のない軟骨スパイクを生じる代わりに切断術の際にそれらの後肢を再生することができない（Suzuki et al., (2006) Sci. World J., 6: 26-37)ため、知られていない。

【0009】

再生スリーブは、創傷した組織の組織再生に使用されてきた。従来のスリーブは、針が

10

20

30

40

50

創傷空間内の媒体を繰り返し交換することを可能にする隔膜、創傷を湿った状態に保つ液体リザーバ、及び液体が当該スリーブから出るのを防止する液密シールを含む。しかし、かかる従来のスリーブは、いくつかの制限を受ける。いくつかの場合において、液密シールは、強過ぎて、組織壊死につながる場合がある。針を介しての媒体の置き換えは、創傷床に直接影響する場合がある。

【0010】

さらに、従来の組織再生デバイスは、長期処置には好ましくない膠を利用して対象に典型的には取り付けられる。膠を使用して再生デバイスを取り付けることは、2つの主な不利点を有する。膠は、取り付け後のデバイスに与える可撓性調整が欠如している。また、手術及びデバイスの間に、取り扱いによる合併症が存在する。

10

【0011】

したがって、改良された装置及び再生組成物が所望され、必要とされる。

【発明の概要】

【0012】

生存対象の付属器官に存在する創傷した、損傷した、若しくは負傷した部位などの組織、又は器官における若しくは器官内の創傷した、損傷した、若しくは負傷した部位などの対象内の組織の再生を促進するための装置、組成物、及び方法を開示する。開示される装置、組成物、及び方法は、ウェアラブルスリーブ及び再生組成物を含む又は利用する。

【0013】

一態様において、本開示は、組織を促進するための治療組成物を提供する。いくつかの実施形態において、再生組成物は、複数の成分を含んでよい。ある一定の実施形態において、開示される再生組成物は、例えば、創傷した、損傷した、又は負傷した組織と接触する内側スリーブの材料に存在する治療組成物として、開示される装置において利用される。

20

【0014】

一態様において、治療組成物は、成長因子、プロリルヒドロキシラーゼドメイン (PHD) 酵素の阻害剤、ビタミンA又はその誘導体、及び脂質メディエーターを含む。

【0015】

特定の実施形態において、治療組成物は、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン-3 (NT-3)、ニューロトロフィン-4 (NT-4)、グリア由来神経栄養因子 (GDNF)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、及び白血病抑制因子 (LIF)、並びにこれらの組み合わせから選択される成長因子を含む。特定の実施形態において、治療組成物は、神経成長因子を含む。特定の実施形態において、治療組成物は、脳由来神経栄養因子 (BDNF) を含む。

30

【0016】

いくつかの実施形態において、治療組成物は、4, 4 α -ジヒドロ-4-オキソ-1, 10-フェナントロリン-3-カルボン酸 (1, 4-DPCA)、N-[(1, 3-ジシクロヘキシルヘキサヒドロ-2, 4, 6-トリオキソ-5-ピリミジニル) カルボニル]-グリシン、6-アミノ-1, 3-ジメチル-5-[(2-ピリジニルチオ) アセチル]-2, 4(1H, 3H)-ピリミジンジオン、6-アミノ-1, 3-ジメチル-5-[[2-(2-ピリジニル)-4-キノリニル] カルボニル]-2, 4(1H, 3H)-ピリミジンジオン、N-[(4-ヒドロキシ-1-メチル-7-フェノキシ-3-イソキノリニル) カルボニル]-グリシン、鉄キレート剤、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるPHD酵素の阻害剤を含む。特定の実施形態において、PHD阻害剤は、4, 4 α -ジヒドロ-4-オキソ-1, 10-フェナントロリン-3-カルボン酸 (1, 4-DPCA) である。特定の実施形態において、治療組成物は、4, 4 α -ジヒドロ-4-オキソ-1, 10-フェナントロリン-3-カルボン酸 (1, 4-DPCA) を含む。

40

【0017】

いくつかの実施形態において、治療組成物は、レチノイン酸、レチノール、カルボン酸レチニル、トレチノイン、タザロテン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択され

50

るビタミンAの誘導体を含む。

【0018】

いくつかの実施形態において、治療組成物は、レゾルビン、オメガー3脂肪酸の代謝産物、エイコサペンタエン酸の誘導体、ドコサヘキサエン酸の誘導体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される脂質メディエーターを含む。ある一定の実施形態において、脂質メディエーターは、レゾルビンである。特定の実施形態において、治療組成物は、レゾルビン5、インターロイキン6（IL-6）、インターロイキン4（IL-4）、腫瘍壊死因子-アルファ（TNF-アルファ）、活性化B細胞（NF-κB）の核因子カッパ-軽鎖エンハンサー、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるレゾルビンを含む。

10

【0019】

いくつかの実施形態において、治療組成物は、近位-遠位位置情報において機能する剤を含み、当該剤は、骨形成タンパク質9（BMP9）、ノード成長分化因子（nodal growth differentiation factor）、アクチビン、形質転換成長因子-ベータ（TGF-β）、線維芽細胞成長因子8（FGF8）、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0020】

いくつかの実施形態において、治療組成物は、ペプチド又はタンパク質ホルモンを含む。いくつかの実施形態において、治療組成物は、成長ホルモン（GH）、インスリン様成長因子-1（IGF-1）、形質転換成長因子-ベータ-1（TGFβ-1）、上皮成長因子（EGF）、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）、線維芽細胞成長因子FGF、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるペプチドホルモンを含む。

20

【0021】

いくつかの実施形態において、成長因子は、治療組成物内で、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で存在する。いくつかの実施形態において、PHD阻害剤は、治療組成物内で、 $0.004 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 0.024 \mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で存在する。いくつかの実施形態において、ビタミンA又はその誘導体は、治療組成物内で、 $0.03 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 0.27 \mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で存在する。いくつかの実施形態において、脂質メディエーターは、治療組成物内で、 $0.006 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 0.054 \mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で存在する。いくつかの実施形態において、ペプチド又はタンパク質ホルモンは、治療組成物内で、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で存在する。

30

【0022】

別の態様において、本開示は、哺乳類において組織再生を促進する方法であって、哺乳類における組織再生を促進するのに十分な量で、提供される治療組成物を哺乳類に投与することを含む、上記方法を提供する。

【0023】

なお別の態様において、本開示は、必要とされる哺乳類における組織の再生の刺激のための、治療組成物の使用を提供する。

【0024】

別の態様において、開示される装置は、組織収容及び／又は挿入端部、組織収容端部と反対側にある押圧部材収容端部、並びに組織を収容する及び／又は包含するように構成されている内部チャンバを有する外側スリーブを含む。装置は、外側スリーブ内に設置されている内側スリーブをさらに含み、内側スリーブは、創傷した、損傷した、又は負傷した組織又は付属器官を収容するための端部、押圧部材を嵌め合わせるための嵌め合い収容端部、並びに創傷した、損傷した、又は負傷した組織を収容する及び／又は包含するように構成されている内部チャンバを有する。押圧部材は、押圧部材収容端部を通して外側スリーブの内部チャンバ内に延びるように、且つ、対象の創傷した、損傷した、又は負傷した組織の少なくとも一部が内側スリーブの内部チャンバの部分と接触して置かれるように組織に向かって内側スリーブの嵌め合い収容端部をバイアスするように構成されている。内側スリーブは、限定されないがシルクヒドロゲル材料を含めたポリマー性材料を含んでい

40

50

てよく、及び／又はこれから形成されていてよい。装置は、外側スリーブの組織収容端部と嵌め合わせ可能であり、組織を収容し且つデバイスにおいて組織を維持するように構成されている開口を備える第1エンドキャップ、及び外側スリーブの押圧部材収容端部と嵌め合わせ可能な第2エンドキャップをさらに含む。

【0025】

いくつかの実施形態において、組織は、付属器官又は器官の部分である。

【0026】

いくつかの実施形態において、装置は、組織収容端部と嵌め合わせ可能な第1エンドキャップを外側スリーブに選択的に連結する外側スリーブの組織収容端部に設置可能である第1ネジ式アダプタを含む。いくつかの実施形態において、第1エンドキャップは、第1ネジ式アダプタのネジ山を収容するように構成されている溝を含む。

10

【0027】

いくつかの実施形態において、装置は、押圧部材と嵌め合わせ可能な第2エンドキャップを外側スリーブに選択的に連結するための外側スリーブの押圧部材収容端部に設置可能である第2ネジ式アダプタを含む。いくつかの実施形態において、第2エンドキャップは、第2ネジ式アダプタのネジ山を収容するように構成されている溝を含む。

【0028】

ある一定の実施形態において、押圧部材は、内側スリーブの嵌め合い収容端部を収容するように構成されているシート部を含み、又は、第2エンドキャップのシート部にあるように構成されている嵌め合い端部を含む。

20

【0029】

いくつかの実施形態において、内側スリーブの嵌め合い収容端部は、嵌め合い収容端部において内部チャンバを封止により閉鎖する多孔質フィルタ媒体を含む。いくつかの実施形態において、多孔質フィルタ媒体は、合成又はポリマー性膜である。いくつかの実施形態において、装置は、多孔質フィルタ媒体及び押圧部材間に位置付けられている圧縮可能な部材を含む。いくつかの実施形態において、圧縮可能な部材は、綿又はカプセル化されたゲルを含む。

【0030】

いくつかの実施形態において、内側スリーブは、内側スリーブの内部チャンバを少なくとも部分的に充填するタンパク質又はポリマー性マトリックスを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質又はポリマー性マトリックスは、三次元多孔質足場を含む。いくつかの実施形態において、多孔質足場は、指向性パターンを形成する孔を含んでいてよい。いくつかの実施形態において、多孔質足場は、実質的に整列したチャンネルを形成する整列した孔を含む。タンパク質又はポリマー性マトリックスにおける整列したチャンネルは、内側スリーブの長手方向軸と平行に配置されていてよい。いくつかの実施形態において、タンパク質又はポリマー性マトリックスは、シルクフィブロイン、コラーゲン、又はこれらの組み合わせから選択される。

30

【0031】

いくつかの実施形態において、装置は、アノード及びカソードを含む電気刺激デバイスを含み、アノード及びカソードが、電源の対応する端子に電氣的に接続されるように構成されており、カソードの部分が、内側スリーブに設置されている。

40

【0032】

別の態様において、開示される装置は、創傷した、損傷した、又は負傷した組織の部位における成長に応答して、例えば、創傷した、損傷した、又は負傷した組織に向かって及び／又はこれから離れて軸方向に移動可能である押圧部材を含む。いくつかの実施形態において、押圧部材は、対象の創傷した、損傷した、又は負傷した組織の少なくとも一部が内側スリーブの内部チャンバの一部と接触して置かれるように組織に向かって内側スリーブの嵌め合い収容端部をバイアスし、また、組織が再生するとき及び／又は創傷した、損傷した、又は負傷した組織治癒するとき、再生した組織及び／又は治癒した組織は、嵌め合い収容端部と直接又は間接的に接触するために、創傷から軸方向に離れて押圧部材を移

50

動させる。

【0033】

いくつかの実施形態において、押圧部材は、弾性であり、又は成長する組織に応答して圧縮する弾性部材を含む。弾性部材は、バネであってよい。

【0034】

いくつかの実施形態において、装置は、押圧部材と嵌め合わせ可能な第2エンドキャップを外側スリーブ選択的に連結するための外側スリーブの押圧部材収容端部に設置可能であるネジ式アダプタを含む。第2エンドキャップは、ネジ式アダプタのネジ山を収容するように構成されている溝を含んでいてよい。弾性部材は、ネジ式アダプタのシート部及び押圧部材のシート部間に延びていてよい。

10

【0035】

開示される装置のいくつかの実施形態において、開示される装置の内側スリーブは、創傷した、損傷した、又は負傷した組織が装置に挿入されるとき、創傷した、損傷した、又は負傷した組織と接触して、材料を、内側スリーブにおけるリザーバ内に含む。内側スリーブの材料は、創傷した、損傷した、又は負傷した組織を湿らせるヒドロゲルを含んでいてよい。当該材料は、さらに、組織再生及び／若しくは治癒を促進する治療組成物、並びに／又は抗菌剤を含んでいてよい。

【0036】

なお別の態様において、開示される装置は、創傷した、損傷した、又は負傷した組織を収容するようにサイジングされている第1開口を有する端部、第2開口を有する嵌め合い収容端部を含む内側スリーブを含み、内側スリーブは、第1開口及び第2開口間に延びる内部チャンバを画定し、内部チャンバは、対象の創傷した、損傷した、又は負傷した組織を収容するようにサイジングされている。装置は、内側スリーブの内部チャンバに設置されているマトリックスをさらに含み、マトリックスは、実質的に整列したチャンネルを形成する孔を有する多孔質足場を含む。マトリックスは、限定されないが、任意の好適な形態のコラーゲン及びシルクフィブロインを含んでいてよい、限定されないが、タンパク質などのポリマー性材料を含めた材料を含んでいてよく、並びに／又はこれから形成されていてよい。多孔質足場の整列したチャンネルは、内側スリーブの長手方向軸と平行に配置されていてよい。マトリックスは、再生組成物又は再生カクテルなどの、本明細書において開示される治療組成物を含んでいてよい。

20

【0037】

いくつかの実施形態において、実質的に整列したチャンネルは、第1及び第2開口に対して直交する内側スリーブにおける長手方向軸に対して実質的に平行又は平行である。いくつかの実施形態において、内部チャンバは、フィルタ媒体及びタンパク質マトリックス間に水性溶液又は分散媒体のリザーバを備える。

30

【0038】

いくつかの実施形態において、装置は、内側スリーブの嵌め合い収容端部において第2開口を封入するようにサイジングされているフィルタ媒体をさらに含む。いくつかの実施形態において、フィルタ媒体は、空気が装置内を通ることを可能とするのに十分に大きい孔が、微生物が装置に入ることを防止するのに十分に小さい孔径を有する。

40

【0039】

いくつかの実施形態において、提供される装置の内側スリーブの内部チャンバは、提供される治療組成物を含む。

【0040】

別の態様において、本開示は、哺乳類において組織再生を促進する方法を提供する。方法は、提供される装置を、哺乳類の創傷した付属器官又は組織に取り付けることを含む。

【0041】

別の態様において、本開示は、必要とされる哺乳類における組織の再生の刺激のための、上記の装置の使用を提供する。

【0042】

50

本開示の上記及び他の実施形態及び利点は、以下の詳細な説明から明らかであろう。詳細な説明において、その一部を形成する添付の図を参照しており、非限定例の実施形態を実例として示している。この実施形態は、必ずしも、本開示の全範囲を提示するものではないが、本開示の範囲を解釈するために本明細書における全開示内容をしたがって参照する。

【0043】

本開示を、添付の図を参照して以下に説明し、同様の参照番号は、同様の要素を示している。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】図1は、本開示のいくつかの実施形態による、対象の創傷部位における組織再生の刺激のための装置の側断面の部分拡大図の概略表示である。

【0045】

【図2】図2は、本開示のいくつかの実施形態による、対象の創傷部位における組織再生の刺激のための装置の側断面の部分拡大図の概略表示である。

【0046】

【図3】図3は、切断術線を示す、マウス指の図表示である。

【0047】

【図4】図4は、本開示のいくつかの実施形態による、移動可能な押圧部材を有する、対象の創傷部位における組織再生の刺激のための装置の側断面図の概略表示である。

【0048】

【図5】図5は、本開示のいくつかの実施形態による、圧縮状態における、図4の装置の側断面図の概略表示である。

【0049】

【図6】図6は、本開示のいくつかの実施形態による、図1の装置であるが電気刺激デバイスを含むものの概略表示である。

【0050】

【図7】図7は、本開示のいくつかの実施形態による、対象に搭載した図6の装置の図表示である。

【0051】

【図8A】図8Aは、本開示のいくつかの実施形態による、長軸に沿って整列したチャンネル様孔を有するシルクフィブロイン足場を示すSEMの表示である。

【0052】

【図8B】図8Bは、本開示のいくつかの実施形態による、長軸に対して垂直に整列した孔を有するシルク足場を示すSEMの表示である。

【0053】

【図8C】図8Cは、本開示のいくつかの実施形態による、長軸に沿って整列した孔を有するコラーゲン足場を示す。

【0054】

【図8D】図8Dは、本開示のいくつかの実施形態による、長軸に対して垂直に整列した孔を有するコラーゲン足場を示す。

【0055】

【図9】図9は、以下の処置条件：(i) 提供される多剤処置(MDT)組成物への最初の24時間の暴露後、(ii) バイオドームデバイスへの24時間の暴露後、及び(iii) 無処置；のうちの1つへの暴露後の切断術後の月数(mpa)の関数としての右後肢の長さのグラフ表示である。

【0056】

【図10】図10は、以下の処置条件：(i) 提供される多剤処置(MDT)組成物への最初の24時間の暴露後、(ii) バイオドームデバイスへの24時間の暴露後、及び(iii) 無処置；のうちの1つに暴露した再生物の遠位先端においてVon Freyフ

10

20

30

40

50

イラメントによって評価される、17 mpa後の接触反応のグラフ表示である。平均及びSDを提示する。

【0057】

【図11】図11は、以下の処置条件：(i) 提供される多剤処置(MDT)組成物への最初の24時間の暴露後、(ii) バイオドームデバイスへの24時間の暴露後、及び(iii) 無処置；のうちの1つへの暴露後の切断術後の月数(mpa)の関数としての、マイクロCT及びX線画像によって評価される右後肢の骨長のグラフ表示である。

【0058】

【図12】図12は、以下の処置条件：(i) 提供される多剤処置(MDT)組成物への最初の24時間の暴露後、(ii) バイオドームデバイスへの24時間の暴露後、及び(iii) 無処置；のうちの1つへの暴露後の、切断術後の月数の関数としてマイクロCT及びX線画像によって評価される右後肢の骨量のグラフ表示である。

10

【0059】

【図13】図13は、切断術の18 mpa後、並びに、以下の最初の処置条件：(i) 提供される多剤処置(MDT)組成物への最初の24時間の暴露、(ii) バイオドームデバイスへの24時間の暴露後、及び(iii) 無処置；のうちの1つへの暴露後の、右後肢に染色するアセチル化 α -チューブリン(AAT)によって測定されるATT+神経束の数のグラフ表示である。

【0060】

【図14】図14は、18 mpa後、並びに、以下の最初の処置条件：(i) 提供される多剤処置(MDT)組成物への最初の24時間の暴露、(ii) バイオドームデバイスへの24時間の暴露後、及び(iii) 無処置；のうちの1つへの暴露後の、右後肢に染色するアセチル化 α -チューブリン(AAT)によって測定される神経束径(mm)のグラフ表示である。

20

【0061】

【図15】図15は、18 mpa後、並びに、以下の最初の処置条件：(i) 提供される多剤処置(MDT)組成物への最初の24時間の暴露、(ii) バイオドームデバイスへの24時間の暴露後、及び(iii) 無処置；のうちの1つへの暴露後、フィブロネクチン発現によって評価される粒子の複雑性(ピクセル²)のグラフ表示である。

【0062】

【図16】図16は、18 mpa、並びに、以下の最初の処置条件：(i) 提供される多剤処置(MDT)組成物への最初の24時間の暴露、(ii) バイオドームデバイスへの24時間の暴露後、及び(iii) 無処置；のうちの1つへの暴露後に得られる、再生物におけるラミニン及びSMA+発現によって測定されるラミニン/平滑筋アクチン(SMA+)束の数のグラフ表示である。

30

【0063】

【図17】図17は、0.5 mpa、並びに、以下の最初の処置条件：(i) 提供される多剤処置(MDT)組成物への最初の24時間の暴露、(ii) バイオドームデバイスへの24時間の暴露後、及び(iii) 無処置；のうちの1つへの暴露後に得られる創傷閉鎖直径(cm)のグラフ表示である。

40

【0064】

【図18】図18は、0.5 mpa、並びに、以下の最初の処置条件：(i) 提供される多剤処置(MDT)組成物への最初の24時間の暴露、(ii) バイオドームデバイスへの24時間の暴露後、及び(iii) 無処置；のうちの1つへの暴露後に得られる、創傷部位におけるSOX2+細胞の数のグラフ表示である。

【0065】

【図19】図19は、提供されるMDT組成物からの薬物の累積放出のグラフ表示である。
【発明を実施するための形態】

【0066】

これらの特許、特許出願、及び公開公報の開示内容は、本明細書に記載され且つ特許請

50

求されている本発明の日付において当業者に公知であるとされる最新の技術を本明細書においてより完全に説明するために、全体が、本明細書において参照により本願に援用される。かかる特許、特許出願、及び公開公報と、本開示との間にいずれかの矛盾がある場合には、現開示が支配する。

【0067】

本開示の任意の実施形態を詳細に説明する前に、本開示が、以下の詳細な説明に記載されている又は以下の図に示されている構成要素の構造及び配置の詳細への適用において限定されないことが理解されるべきである。本開示は、他の実施形態を可能とし、且つ実用可能であり、又は、様々な方法で実施可能である。

【0068】

本明細書において使用されている表現及び用語は、説明目的であり、限定的であるとみなされるべきではないことが理解されるべきである。本明細書における、「含む (including)」、「含む／備える (comprising)」又は「有する (having)」並びにこれらの変形の使用は、その後に列挙されている項目及びその等価物、並びに、追加の項目を包含することが意図される。別途特定又は限定されない限り、用語「搭載される」、「接続される」、「支持される」、及び「連結される」、並びにこれらの変形は、広範に使用され、直接及び間接の両方の搭載、接続、支持及び連結を包含する。さらに、「接続される」及び「連結される」は、物理的又は機械的接続又は連結に制限されない。

【0069】

本明細書において使用されているとき、用語「組織」は、一緒になって特定の機能を実施する同じ起源からの同様の細胞及びこれらの細胞外マトリックスの集合体として定義される。本明細書において使用されているとき、「組織」は、限定されないが、指骨（例えば、手指及び足指）、腕、脚、並びに同種のものを含めた付属器官に存在し得る。本明細書において使用されているとき、「組織」は、器官（例えば、肝臓、肺、脾臓、及び同種のもの）に存在し得る。

【0070】

用語「治療組成物」、「再生組成物」、「再生カクテル」及び「多剤治療化合物」又は「MDT」は、組織再生を刺激又は開始する治療薬物の組み合わせを含む配合物を包含し、いくつかの実施形態において、対象に投与されると相乗効果を有する。

【0071】

以下の考察は、当業者が本開示の実施形態をなすこと及び使用することを可能にするために提示される。示される実施形態に対する様々な変形は、当業者に容易に明らかであろうし、本明細書における一般原理は、本開示の実施形態から逸脱することなく、他の実施形態及び用途に適用される得る。そのため、本開示の実施形態は、示される実施形態に限定されることは意図されていないが、本明細書において開示される原理及び特徴と一致する最も広い範囲が与えられるべきである。以下の詳細な説明は、図を参照して読み取られるべきであり、異なる図における同様の要素は、同様の参照番号を有する。図は、必ずしもスケール通りではなく、選択された実施形態を示しており、本開示の実施形態の範囲を限定することは意図されていない。当業者は、本明細書において提供される例が、多くの有用な代替を有すること及び本開示の実施形態の範囲内であることを認識するであろう。

【0072】

組織再生のための装置

本開示は、組織再生を補助するための装置を提供する。図1～3を参照すると、対象1の組織再生の刺激のための装置200が示されている。いくつかの実施形態において、装置200は、対象1の創傷した又は負傷した組織9を封入するのに使用される。創傷した又は負傷した組織9は、対象1の外側又は内側の箇所位置してよい。示される実施形態において、装置200は、付属器官3（例えば、マウス指）に位置する創傷した組織9の組織再生を刺激することに関して記載されており、先端2が、遠位指骨4の少なくとも一部を通して線5に沿って切断されており、これにより、再生した組織が、他の組織の

10

20

30

40

50

中でも、骨組織 6、筋肉組織 7、及び皮膚組織 8 を含み得る。図 1 ～ 7 を説明する際の説明目的で、例示的な「組織」を含むとして「付属器官」を参照する場合がある。

【0073】

いくつかの実施形態において、装置 200 を使用した組織再生の刺激に関しての、創傷した又は負傷した組織 9 は、上皮組織、結合組織、筋肉組織、又は神経組織を含む。再生のための例示的な創傷した又は負傷した組織 9 として、限定されないが、扁平上皮、立方上皮、移行上皮、多列円柱上皮、円柱上皮、腺上皮、骨、腱、靱帯、脂肪、疎性結合組織、血液組織、内臓筋、平滑筋、骨格筋、心筋、及び神経組織が挙げられる。

【0074】

図 1 ～ 2 を参照すると、装置 100 は、付属器官収容端部 204 及び押圧部材収容端部 206 間に延びる外側スリーブ 202 を含む。いくつかの実施形態において、外側スリーブ 202 は、処置される組織 3（例えば、付属器官）及び創傷した又は負傷した組織 9 を収容するようにサイジングされている内部チャンバ 208 を画定する中空シリンダである。内部チャンバ 208 は、付属器官収容端部 204 における第 1 開口及び押圧部材収容端部 206 における第 2 開口間に延びる通路を形成する。いくつかの実施形態において、付属器官収容端部 204 における第 1 開口は、付属器官 3 を収容するようにサイジングされており、第 2 開口は、押圧部材 214 を収容するようにサイジングされている。

【0075】

外側スリーブ 202 は、装置 200 が使用中である間の創傷 9 の観察を可能とする透明な材料から形成され得る。いくつかの実施形態において、外側スリーブ 202 は、使用の際に体壁のいずれの撓み又は圧痕も防止して確実に所望の創傷空間体積を維持する、及び創傷した又は負傷した組織 9 を保護するのに十分に剛性である。外側スリーブ 202 の構造体の例示的な材料として、限定されないが、透明なナイロン管類が挙げられる。外側スリーブ 202 は、外側スリーブ 202 の内部チャンバ 208 内の流体の置き換えを容易にする 1 つ以上の開口（図示せず）を含んでいてよい。例えば、1 つ以上の開口は、針が内部チャンバ 208 内に流体を入れる及び当該流体を置き換えることを可能にする隔膜を含んでいてよい。

【0076】

装置 200 は、創傷収容端部 218 と、創傷収容端部 218 とは反対側にある嵌め合い収容端部 220 との間に延びる内側スリーブ 216 を含む。いくつかの実施形態において、内側スリーブ 216 は、創傷 9 を収容するようにサイジングされている内部チャンバ 222 を画定する中空シリンダである。内部チャンバ 222 は、創傷収容端部 218 における第 1 開口及び嵌め合い収容端部 220 における第 2 開口間に延びる通路を形成する。装置 200 が組み立てられるとき、内側スリーブ 216 は、創傷 9 を封入するように構成されており、押圧部材 214 は、創傷 9 が内部チャンバ 222 の少なくとも一部と接触して置かれるように付属器官 3 に向かって嵌め合い収容端部 220 をバイアスするように構成されている。いくつかの実施形態において、押圧部材 214 は、創傷 9 を、内側スリーブ 216 の内部チャンバ 222 内に設置されているタンパク質マトリックス 228 と接触して置く。タンパク質マトリックス 228 は、指向的に組織成長をガイドし、及び／又は、創傷 9 に治療剤を付与して、組織再生を刺激し得る。

【0077】

いくつかの実施形態において、嵌め合い収容端部 220 は、内側スリーブ 216 の第 2 開口を封止する多孔質ろ過媒体 230 を含む。装置 200 に多孔質ろ過媒体 230 を組み込むことにより、汚染を防止し、且つ、周囲環境との空気及び媒体交換を可能にする。多孔質ろ過媒体 230 は、壊死を低減しながら、創傷 9 を湿らせ且つ細胞生存を高く維持することを助ける。圧縮可能な部材又は媒体交換部材 232 は、フィルタ媒体 230 及び押圧部材 214 間に位置付けられて、内部チャンバ 222 と流体連通する水性溶液又は分散媒体のリザーバを付与し得る。いくつかの実施形態において、外側スリーブ 202 は、水性溶液又は分散媒体を含んでいてよく、ろ過媒体 230 を介して内側スリーブ 216 の内部チャンバ 222 と流体連通して置かれ得る。いくつかの実施形態において、圧縮可能な

10

20

30

40

50

部材又は媒体交換部材 232 は、水性溶液若しくは分散媒体を含むゲル、又は、水性溶液若しくは分散媒体によって所望により湿らせた綿を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質マトリックス 228 は、水性溶液又は分散媒体のリザーバによってろ過媒体 230 からずらされる。

【0078】

好適な水性溶液又は分散媒体として、限定されないが、水、細胞培養培地、緩衝液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール、及び同種のもの）、並びにこれらの好適な混合物が挙げられる。いくつかの実施形態において、分散媒体は、治療剤を含む。

【0079】

装置 200 は、外側スリーブ 202 の付属器官収容端部 204 と嵌め合わせ可能な第 1 エンドキャップ 234 を含む。第 1 エンドキャップ 234 は、対象 1 の付属器官 3 を収容するようにサイジングされている開口 236 を含む。いくつかの実施形態において、ガスケット又は隔膜 238 は、第 1 エンドキャップ 234 及び外側スリーブ 202 の付属器官収容端部 204 の間に位置付けられていてよい。ガスケット又は隔膜 238 は、付属器官 3 を収容するようにサイジングされている貫通孔 240 を含み、液体が外側スリーブ 202 の内部チャンバ 208 を避けることを防止するシールを付与する。いくつかの実施形態において、隔膜 238 は、シリコンから構成される可撓性側部 242、及びポリテトラフルオロエチレン（PTFE）を含む剛性側部 244 を含む。

【0080】

装置 200 は、付属器官収容端部 204 と嵌め合わせ可能な第 1 エンドキャップ 234 を外側スリーブ 202 に選択的に連結するための付属器官収容端部 204 内に設置可能である第 1 調整可能アダプタ 246 を含んでいてよい。いくつかの実施形態において、調整可能アダプタ 246 は、ネジ式アダプタであり、第 1 エンドキャップ 234 は、調整可能アダプタ 246 のネジ山 250 を収容する溝 248 を含む。第 1 エンドキャップ 234 は、組み立てられるとき、ガスケット又は隔膜 238 が調整可能アダプタ 246 の先端部 252 と接触して置かれることにより付属器官 3 を外側スリーブ 202 内に固定するように締め付けられ得る。

【0081】

装置 200 は、外側スリーブ 202 の押圧部材収容端部 206 と嵌め合わせ可能である第 2 エンドキャップ 254 を含む。第 2 エンドキャップ 254 は、押圧部材 214 と連結して、内側スリーブ 216 の嵌め合い収容端部 220 に向かって押圧部材 214 をバイアスする。図 1 を参照すると、押圧部材 214 は、第 2 エンドキャップ 254 に直接取り付けられていても、その一部を形成していてもよい。図 2 を参照すると、押圧部材 214 は、第 2 エンドキャップ 254 から分離していてもよい。いくつかの実施形態において、押圧部材 214 は、第 2 エンドキャップ 254 のシート部 258 にあるように構成されている嵌め合い端部 256 を含む。いくつかの実施形態において、押圧部材 214 は、内側スリーブ 216 の嵌め合い端部 220 を収容するように構成されている嵌め合い端部 256 の反対側にあるシート部 260 を含む。押圧部材 214 は、創傷 9 における組織の成長にตอบสนองして変形又は圧縮する剛性材料又は弾性材料から形成されていてよい。

【0082】

装置 200 は、押圧部材収容端部 206 と嵌め合わせ可能な第 2 エンドキャップ 254 を外側スリーブ 202 に選択的に連結するための押圧部材収容端部 206 内に設置可能である第 2 調整可能アダプタ 262 を含んでいてよい。いくつかの実施形態において、第 2 調整可能アダプタ 262 は、ネジ式アダプタであり、第 2 エンドキャップ 254 は、第 2 調整可能アダプタ 262 のネジ山 266 を収容するように構成されている溝 264 を含む。第 2 エンドキャップ 254 は、創傷 9 における圧力を制御するように調整され得る。従来のデバイスの 1 つの不利点は、創傷 9 界面における圧力の制御を欠いており、このことは、いずれかのタイプのギャップ（流体の集合、空気など）が存在するとき組織再生の成果の変動につながる。装置 200 は、創傷 9 と接触してタンパク質マトリックス 228 を

10

20

30

40

50

保持するのに十分な調整可能な圧力を有利には付与する。また、従来のデバイスとは異なり、装置 200 は、長期の取り付け（数週間、数ヶ月、数年、又はそれを超える）を容易にし、再生中の組織の成長を容易にするように調整可能である。

【0083】

図 4～5 を参照すると、いくつかの実施形態において、装置 200 は、移動可能又は調整可能な押圧部材 214 を含む。例えば、押圧部材 214 は、組織成長に応答して移動することができ又は延びることができる場合がある（図 4 及び 5 において Δx で示されている）。いくつかの実施形態において、弾性部材 268 は、押圧部材 214 におけるシート部 270 及び第 2 調整可能アダプタ 262 におけるシート部 272 間に延びるように構成されている。いくつかの実施形態において、弾性部材 268（例えば、バネ、圧縮可能な材料、変形可能な材料）は、後方への線形移動を作り出す抵抗力を生じる（例えば、第 2 エンドキャップ 254 のネジが外されたとき）。いくつかの実施形態において、調整可能な押圧部材 214 は、組織成長に応答して経時的に延びることができる連動スペーサ、又はスクリュース延長システムを含む。

【0084】

図 6～7 を参照すると、いくつかの実施形態において、装置 200 は、内側の創傷断端流を付与し且つ創傷部位付近の細胞タイプの神経支配及び遊走について電氣的ガイダンスキューを付与するとされる、創傷部位 9 を通して長手方向の電界を確立する電気刺激デバイス 300 も含む。電気刺激デバイス 300 は、リード 308、310 を通して、電源の対応する端子 306 に電氣的に接続されているアノード 302 及びカソード 304 を含む。

【0085】

いくつかの実施形態において、カソード 304 は、創傷 9 に隣接して設置されているステンレス鋼ワイヤの形態である。カソード 304 の部分は、装置 200 の外側に存在してリード 308 に接続可能であり、カソード 304 の部分は、内側スリーブの内部チャンバ 222 内に存在する。アノード 302 は、創傷部位 9 から遠く離れている箇所において対象 1 に挿入され得る導電性ワイヤである。装置 200 が付属器官 3 に設置されている示される実施形態において、アノード 302 は、付属器官 3 が延びる四肢（前脚）の上部に設置される。アノード 302 は、リード 310 を介して電源 306 に接続される白金／インジウム合金ワイヤを含んでいてよい。アノード 302 は、永久に埋め込まれてもよく、又は必要に応じて一時的に挿入されてもよい。

【0086】

電源 306 は、電池パック 312 及び電気回路 314 を含み、これらの両方が、ハウジング 316 に封入されており、接続されたときに電極 302、304 に一定の低レベルの電流を付与するように構成されている。図 6 に示される実施形態において、電源 306 は、対象 1 の外側に存在しており、電極 302、304 は、電源 306 と取り外し可能に接続可能であるように構成されている。この配置において、電気刺激が使用されるとき、カソード 304 及びアノード 302 は、電気刺激処置の継続期間の間、電源 306 に電氣的に接続されており、次いで、電気刺激処置間で切断される。電源 306 及びリード 308、310 は、それぞれ電極 302、304 から引き離され得るため、この配置により、電気刺激が断続的にのみ使用される処置パラダイムの間の、組み合わせられた装置 200 及び電気刺激デバイス 300 の全体の嵩を好都合に低減する。

【0087】

いくつかの実施形態において、タンパク質マトリックス 228 は、生体適合性ポリマーを含む。装置 100 と共に使用するのに好適な生体適合性ポリマーとして、限定されないが、ポリエチレンオキシド（PEO）、ポリエチレングリコール（PEG）、コラーゲン、フィブロネクチン、ケラチン、ポリアスパラギン酸、ポリリシン、アルギネート、キトサン、キチン、ヒアルロン酸、ペクチン、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシアルカノエート、デキストラン、ポリ無水物類、ポリマー、PLA-PGA、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ポリカプロラクトン、ポリフマレート、コラーゲン、シルクフィブロイン、キトサン、アルギネート、ヒアルロン酸及び他の生体適

10

20

30

40

50

合性及び／又は生分解性ポリマーが挙げられる。いくつかの実施形態において、タンパク質マトリックス 228 は、シルクフィブロイン及び／又はコラーゲンである。

【0088】

いくつかの実施形態において、タンパク質マトリックス 228 は、約 1 % のシルク～約 50 % のシルクのシルク溶液濃度を有するシルク溶液（例えば、水性溶液）から処理される。いくつかの実施形態において、シルクフィブロイン系材料は、シルク溶液から処理されて、多様な材料フォーマット、例えば、ファイバ、フォーム、粒子、フィルム、及び／又はヒドロゲルを形成する。

【0089】

いくつかの実施形態において、タンパク質マトリックス 228 は、多孔質であり、又は、多孔率を有する。本明細書において使用されているとき、用語「多孔率」は、材料における空隙の尺度を指し得、0～100 % の百分率としての、合計体積に対する体積又は空孔の分率である。多孔率の決定は、標準技術、例えば、水銀ポロシメトリー及びガス吸着（例えば、窒素吸着）を使用して当業者に公知である。

【0090】

いくつかの実施形態において、タンパク質マトリックス 228 は、創傷した又は負傷した組織の再成長を最適化するために装置 200 において固定されている組織の表面積（サイズ）と適合する孔を有する。いくつかの実施形態において、タンパク質マトリックス 228 は、約 1 μm ～約 1500 μm 、又は約 350 μm 、約 400 μm 、約 450 μm 、約 500 μm 、約 550 μm 、約 600 μm 、約 650 μm 、約 700 μm 、約 750 μm 、約 800 μm 、約 850 μm 、約 900 μm 、約 950 μm 、約 1000 μm 、約 1050 μm 、約 1100 μm 、約 1150 μm 、約 1200 μm 、約 1300 μm 、約 13350 μm 、約 1400 μm 、約 1450 μm 、又は約 1500 の孔径を有する。孔径の用語において、概して、約 100 μm ～約 300 μm 又は約 100 μm 、約 150 μm 、約 200 μm 、約 250 μm 、又は約 300 μm が、細胞及び組織成長に好適な隙間を付与しつつ、十分な酸素、栄養素及び廃棄物輸送を支援するのに好適である。他の実施形態において、より小さい孔径、例えば、約 50 μm ～約 100 μm 、又は約 50 μm 、約 60 μm 、約 70 μm 、約 80 μm 、約 90 μm 、又は約 100 μm は、より小さい組織、例えば、神経又は血液細胞に好適である。より高い多孔率は、栄養素移動及び廃棄物除去の改良に起因して組織の成果の改良を容易にし得る。

【0091】

タンパク質マトリックス 228 は、創傷 9 における組織の成長をガイドするのに使用される指向性パターンを形成する孔を有し得る。いくつかの実施形態において、指向性パターンは、実質的に整列したチャネルを形成している整列した孔を含む。整列した孔は、内側スリーブ 216 の長手方向軸と平行であるように配置されていてよい。いくつかの実施形態において、整列した孔は、導電性基材を冷熱源（例えば、液体窒素）と統合することによって誘発される急な温度勾配を用いて導電性基材（例えば、アルミニウム板）においてタンパク質溶液（例えば、シルク又はコラーゲン溶液）を凍結することによって形成される。冷面から成長する氷晶の指様柱状物が、凍結したタンパク質内でチャネル様構造を内部に作り出すことが予期される。凍結したタンパク質は、次いで、継続期間（例えば、24 時間）にわたって凍結乾燥されて、水を除去する。得られる生成物は、実質的に整列した孔を有するタンパク質マトリックス 228 である。

【0092】

いくつかの態様において、タンパク質マトリックスは、シルクフィブロインを含む。本明細書において使用されているとき、「シルクフィブロイン」又は「SF」は、カイコフィブロイン及び昆虫又はクモの糸のタンパク質から生成されるバイオポリマーを指し得る。例えば、本開示に有用なシルクフィブロインは、限定することなく：アンテラエア・ミリッタ（*Antheraea mylitta*）；アンテラエア・ペルニイ（*Antheraea pernyi*）；アンテラエア・ヤママイ（*Antheraea yamamai*）；ガレリア・メロネラ（*Galleria mellonella*）；ボンビクス・

モリ (*Bombyx mori*) ; ボンビクス・マンダリナ (*Bombyx mandarina*) ; ガレリア・メロネラ (*Galleria mellonella*) ; ネフィラ・クラビペス (*Nephila clavipes*) ; ネフィラ・セネガレンシス (*Nephila senegalensis*) ; ガステラカンタ・マモサ (*Gasteracantha mammosa*) ; アルギオペ・オーランティア (*Argiope aurantia*) ; アラネウス・ディアデマツス (*Araneus diadematus*) ; ラトロデクツス・ゲオメトリクス (*Latrodectus geometricus*) ; アラネウス・ビセンテナリウス (*Araneus bicentenarios*) ; テトラグナタ・ベルシカラー (*Tetragnatha versicolor*) ; アラネウス・ベントリコサス (*Araneus ventricosus*) ; ドロメデス・テネブロサス (*Dolomedes tenebrosus*) ; ユーアグラス・チソセウス (*Euagrus chisoseus*) ; プレクトレウリス・トリステリス (*Plectreurys tristis*) ; アルギオペ・トリファスシアタ (*Argiope trifasciata*) ; 及びネフィラ・マダガスカリエンシス (*Nephila madagascariensis*) を含めた多数の種によって生成されるものであってよい。代替的には、本開示において利用されるシルクは、人工プロセス、例えば、細胞又は生物 (例えば、遺伝子組み換え細菌、酵母、哺乳類細胞、動物を含めた非ヒト生物、又はトランスジェニック植物) の遺伝子操作を通して調製され得る。

【0093】

SF は、固有の特徴を有するが、コラーゲンのような構造タンパク質である：外部環境内に生存する複合生物によるアミノ酸性溶液の噴出から生成されるが、コラーゲンは、細胞産生モノマーの自己集合によって細胞外空間においてインビボで産生され、外部環境に分泌されない。SF の特性は、親水性の酸性スパーサによって交互配列された疎水性ブロックからなる、その構造に由来する。その自然状態において、SF は、タンパク質から形成されるタンパク質材料に強度及び弾力性を付与する、非晶質領域と交互になっている β シート結晶によって、半結晶性材料に構造化される。再生した SF が低～高タンパク質濃度及び低～高分子量で処理され得る形態の多様性は、いくつかのハイテクアプリケーションにとって魅力的なものにする。

【0094】

SF の処理は、概して、多数の技術 (例えば、溶媒キャスト、凍結乾燥、塩浸出、超音波処理) によって、例えば、フィルム、スポンジ、ゲル、球体 (ミクロン～ナノサイズ) 及びフォームを形成する、フィブロイン溶液 (約 1 wt % ~ 約 15 wt % のタンパク質含量) の部分的又は全体脱水を含む。これらの製作プロセスは、機械的強度を生化学的特性と合わせる堅牢な材料を提供する。

【0095】

本明細書において提供される方法及び組成物において使用されるシルクフィブロイン溶液は、例えば、カイコ (ボンビクス・モリ (*Bombyx mori*)) などからのカイコシルクが溶解された溶液から得られてよい。代替的には、シルクフィブロイン溶液は、例えば、ネフィラ・クラビペス (*Nephila clavipes*) などからのクモの糸が溶解された溶液から得られてよい。シルクフィブロイン溶液はまた、例えば、細菌、酵母、哺乳類細胞、トランスジェニック動物又はトランスジェニック植物からの遺伝子組み換えシルクを含有する溶液から得られてもよい。例えば、国際公開第 97/08315 号パンフレット及び米国特許第 5,245,012 号明細書を参照。遺伝子組み換えシルクは、例えば、治療剤、例えば、サイトカイン、酵素、又はいずれかの数のホルモン若しくはペプチド系薬物、抗菌剤及び関連基質との融合タンパク質も含み得る。

【0096】

シルクフィブロイン溶液は、当業者に公知のいずれの従来の方法によって調製されてもよい。いくつかの実施形態において、シルク溶液は、水性シルク溶液である。他の実施形態において、シルク溶液は、固体状態 (例えば、ポリエチレングリコール、コラーゲン、ヒアルロン酸、及び同種のもの) への移行を容易にする第 2 ポリマーを含有してよい。

【0097】

カイコの繭のシルクは、2つの構造タンパク質、フィブロイン重鎖（約350kDa（ 5.81×10^{-19} g）；及び、繭を形成する際に一緒にフィブロイン鎖を接着する、セリシンと呼ばれる非構造タンパク質のファミリーに関連する、フィブロイン軽鎖（約25kDa（ 4.15×10^{-20} g））を含有する。重及び軽フィブロイン鎖は、2のサブユニットのC末端においてジスルフィド結合によって連結されている（Takei, et al., *J. Cell Biol.*, 105:175, 1987を参照；Tanaka, et al., *J. Biochem.* 114:1, 1993；Tanaka, et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1432:92, 1999；Kikuchi, et al., *Gene*, 110:151, 1992も参照）。セリシンは、材料に粘着性を与えるシルクの高分子量の可溶性糖タンパク質成分である。これらの糖タンパク質は親水性であり、水「脱ガム」における沸騰によって繭から容易に除去され得る）。

10

【0098】

いくつかの実施形態において、本組成物によって利用されるシルクポリペプチド組成物は、セリシンを実質的に含まない（例えば、検出可能なセリシンを含有しない又は当業者が具体的な使用に関して無視できるとみなすであろうレベルでセリシンを含有する）。

【0099】

シルクポリペプチド組成物を得る1つの例示的な方法において、ボンビクス・モリ（*B. mori*）を、限定されないが、約0.02M Na_2CO_3 などの水性溶液において約30分間沸騰させる。沸騰（脱ガム）時間は約5分～約120分の範囲内であり、沸騰（脱ガム）温度は、約30℃（303.15K）～約120℃（393.15K）の範囲内である。繭は、セリシンタンパク質を抽出するように、例えば、水によって濯がれてよく、抽出されたシルクは、水性塩溶液に溶解される。この目的に有用な例示的な非限定的な塩として、臭化リチウム、チオシアン酸リチウム、硝酸カルシウム、及びシルクを可溶化することが可能である他の化学物質が挙げられる。例えば、抽出されたシルクは、約9M～約12MのLiBr溶液に溶解される。塩は、次いで、例えば、透析によって除去される。

20

【0100】

所望により、溶液は、次いで、当該分野において公知のいずれの方法を使用して濃縮されてもよい。例えば、吸湿性ポリマー、例えば、PEG、ポリエチレンオキシド、アミロース又はセリシンに対しての透析がなされ得る。PEGは、約8,000g/mol～約10,000g/molの分子量を有し、約25%～約50%の濃度を有する。任意の透析システム、例えば、Slide-a-lyzer透析カセット（Pierce、MWCO3500）が使用され得る。溶液を、結果としてシルク溶液の最終濃度が約1%～約30%となるのに十分な期間にわたって透析する。いくつかの場合において、約2時間～約12時間の透析が充分である。

30

【0101】

いくつかの実施形態において、本開示は、組織再生を必要とする対象の付属器官又は組織に装置200を取り付ける方法を提供する。方法は、対象1の創傷した付属器官又は組織9を、内側スリーブ216の創傷収容端部218に接触させることを含む。創傷した付属器官又は組織9は、提供される治療組成物を含むタンパク質マトリックス228に接触させて又は隣接させて置かれてよい。いくつかの実施形態において、創傷した付属器官又は組織9をタンパク質マトリックス228に接触させる前に、創傷した付属器官又は組織9を、ガasket又は隔膜238及び第1エンドキャップ234の開口236を通してスライドさせる。

40

【0102】

方法は、内側スリーブ216が外側スリーブ202の内部チャンバ208内に位置付けられるように、対象の付属器官3を、外側スリーブ202の付属器官収容端部204を通して置くことをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、押圧部材214が嵌め合い収容端部220を付属器官3に向かってバイアスするように、第1エンドキャ

50

ップ234及び第2エンドキャップ254を外側スリーブ202に選択的に嵌め合わせることを含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、創傷9が内側スリーブの内部チャンバ222の少なくとも一部と接触して置かれるように押圧部材214を付属器官3に向かってバイアスすることを含む。創傷した付属器官又は組織9及びタンパク質マトリックス228間の接触圧は、第2エンドキャップ254を選択的に嵌め合わせる又は解放する（例えば、溝264及びネジ山266を介して第2エンドキャップ254を締め付ける又は緩める）ことによって調整され得る。

【0103】

いくつかの実施形態において、創傷した付属器官又は組織9は、組織再生を促進する継続期間にわたって装置200内に維持される。いくつかの実施形態において、継続期間は、約1分、若しくは約10分、若しくは約30分、若しくは約1時間、若しくは約2時間、若しくは約3時間、若しくは約4時間、若しくは約5時間、若しくは約6時間、若しくは約12時間、若しくは約24時間、若しくは2日、若しくは約3日、若しくは約4日、若しくは約5日、若しくは約1週間、若しくは約2週間、若しくは約3週間、若しくは約1ヶ月、若しくは約6ヶ月、若しくは約1年、又はこれらの値のいずれかによって囲まれる継続期間範囲内である。継続期間の過程で、タンパク質マトリックス228は、緩衝溶液を内側スリーブ216内に添加する又は当該溶液を取り替えることによって湿潤して維持され得る。

【0104】

組織再生のための治療組成物

組織再生用治療組成物及び「多剤処置」組成物（MDT）も本明細書において開示される。治療組成物は、単独で、又は開示される装置と併せて利用されてよい。

【0105】

本発明による装置と共に使用される治療組成物は、組織再生を刺激する、開始する、又は直接若しくは間接的に援助するいずれの組成物であってもよい。代替的には、本発明による治療組成物は、相乗的に作用して組織再生を刺激する、又は開始する、又は直接若しくは間接的に援助する成分の組み合わせであってよい。例えば、治療組成物中の提供される成分（例えば、成分、例えば、成長因子、プロリルヒドロキシラーゼドメイン（PHD）酵素の阻害剤、ビタミンA若しくはその誘導体、脂質メディエーター、又はペプチド／タンパク質ホルモンのうちの2つ以上）が、無処置による対照の実験と比較して、相乗的に作用して、創傷した付属器官又は組織部位において再生速度を増加させる（例えば、軟組織長さ、骨長、骨量、増加した接触反応、ATT＋神経束の数、ATT＋神経束の径、フィブロネクチン発現による再生粒子の複雑性、ラミニン／SMA＋束の数、処置の開始時の創傷直径の低減、SOX2＋細胞の数によって測定される組織再生を増加させる）。

【0106】

いくつかの実施形態において、提供される治療組成物中の成分の少なくとも2つが、相乗的に作用して、再生速度を増加させ、又は、かかる成分の少なくとも3つ、若しくはかかる成分の少なくとも4つ、若しくはかかる成分の少なくとも5つ、若しくはかかる成分の全てが相乗的に作用して再生速度を増加させる。

【0107】

一例において、開示される装置は、内側スリーブ内（例えば、内側スリーブにおけるリザーバ内）に治療組成物を含んでいてよい。治療組成物は、創傷部位と接触する材料又はマトリックスに存在していてよく、治療組成物は、装置が対象の付属器官に装着されると、創傷部位に送達されてよい。治療組成物を含み且つ送達するウェアラブル装置が当該分野で公知である。（例えば、Herrera-Rincon et al., Cell Reports 25, 1593–1609（2018）を参照。

【0108】

開示される治療組成物は、限定されないが、シルクヒドロゲル材料などのポリマー性材料において存在していてよい。治療組成物及び薬物をヒドロゲル材料内に投入する方法が当該分野において公知である。例えば、治療組成物が投入されたシルクヒドロゲル材料は

10

20

30

40

50

、以下のように調製され得る。治療組成物は、シルク溶液（例えば、3 % w / v シルク溶液）に添加され得、次いで、試薬、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（例えば、約 20 U / ml の濃度のシルク溶液）を、過酸化水素（例えば、最大 0.01 % w / v の濃度）と共に添加することを介してゲルに誘導される。シルクはまた、この酵素反応によって、pH の降下、エネルギーの添加を介して、例えば、多くの選択肢のうちのいくつかとして、超音波処理若しくはボルテックス、電界の印加、又はメタノールの添加を介して、ゲル化することもできる。

【0109】

開示される治療組成物は、軸索／神経突起成長及び／又は通常の細胞増殖を増加させるもう1つの剤を含んでいてよい。好ましくは、開示される治療組成物は、細胞における多能性を促進せず、及び／又は、奇形腫形成につながらない。

10

【0110】

開示される治療組成物は、組織再生及び／又は治癒を促進する1つ以上の剤を含んでいてよい。いくつかの実施形態において、治療組成物は、成長因子、低酸素誘導性因子1- α （HIF1- α ）の阻害剤を阻害する剤、ビタミンA又はその誘導体、脂質メディエーター、例えば、オメガ-3脂肪酸の代謝産物のうちの1つ以上を含み、エイコサペンタエン酸又はドコサヘキサエン酸、成長ホルモン、ステロイド、及び脱分極剤から誘導されてよい。

【0111】

いくつかの実施形態において、開示される治療組成物は、成長因子、例えば、神経栄養因子を含んでいてよい。神経栄養因子は、発達の際に神経細胞の成長及び生存を促進し且つ成体神経細胞の維持を促進するタンパク質である。（例えば、Terenghi, J. Anat. 1999; 194 (Pt 1): 1-14 を参照。例示的な神経栄養因子として、限定されないが、脳由来神経栄養因子（BDNF）、神経成長因子（NGF）、ニューロトロフィン-3（NT-3）、ニューロトロフィン-4（NT-4）、グリア由来神経栄養因子（GDNF）、毛様体神経栄養因子（CNTF）、白血病抑制因子（LIF）、及びこれらの組み合わせが挙げられる。成長因子は、少なくとも約0.1 μ g / ml、約0.2 μ g / ml、約0.3 μ g / ml、約0.4 μ g / ml、約0.5 μ g / ml、約0.6 μ g / ml、約0.7 μ g / ml、約0.8 μ g / ml、約0.9 μ g / ml、若しくは約1.0 μ g / ml 又はこれらの値のいずれかによって囲まれる用量範囲内の治療組成物内用量で存在していてよい。成長因子が、開示される装置の構成要素に存在するとき（例えば、成長因子が、内側スリーブに又は内側スリーブの構成要素に投入されるとき）、装置は、少なくとも約0.1 μ g / 装置、約0.2 μ g / 装置、約0.3 μ g / 装置、約0.4 μ g / 装置、約0.5 μ g / 装置、約0.6 μ g / 装置、約0.7 μ g / 装置、約0.8 μ g / 装置、約0.9 μ g / 装置、若しくは約1.00 μ g / 装置又はこれらの値のいずれかによって囲まれる濃度範囲内の濃度の成長因子を含んでいてよい。成長因子は、1つ以上の組織タイプの成長を促進する。

20

30

【0112】

開示される治療組成物は、例えば、HIF-1 α タンパク質の構成的発現を安定化するために、プロリルヒドロキシラーゼドメイン（PHD）酵素阻害剤（すなわち、PHD阻害剤）を含んでいてよい。（例えば、Ariazi et al., J. Pharmacol. Expt. Therap. (2017), 363 (3) 336-347; 及びNangaku et al., Arterioscler., Thromb. Vasc. Biol. 2007; 27: 2548-2554 を参照）。好適なPHD阻害剤として、限定されないが、4, 4 α -ジヒドロ-4-オキソ-1, 10-フェナントロリン-3-カルボン酸（1, 4-DPCA）、N-[(1, 3-ジシクロヘキシルヘキサヒドロ-2, 4, 6-トリオキソ-5-ピリミジニル)カルボニル]-グリシン（すなわち、GSK1278863又はDaprodustat）、6-アミノ-1, 3-ジメチル-5-[(2-ピリジニルチオ)アセチル]-2, 4(1H, 3H)-ピリミジンジオン（すなわち、TM6089）、6-アミノ-1, 3-ジメチル-5-[[2-(2-ピリジニル)-4-

40

50

キノリニル]カルボニル] - 2, 4 (1H, 3H) - ピリミジンジオン (すなわち、TM 60008)、N-[(4-ヒドロキシ-1-メチル-7-フェノキシ-3-イソキノリニル)カルボニル]-グリシン (すなわち、FG4592又はRoxadustat)、鉄キレート剤、及びこれらの組み合わせを挙げることができる。所望により、PHD阻害剤は、少なくとも約0.004 µg/ml、約0.006 µg/ml、約0.008 µg/ml、約0.010 µg/ml、約0.012 µg/ml、約0.014 µg/ml、約0.016 µg/ml、0.018 µg/ml、約0.020 µg/ml、約0.022 µg/ml、若しくは0.024 µg/ml又はこれらの値のいずれかによって囲まれる用量範囲内の治療組成物内用量で存在してよい。PHD阻害剤が、開示される装置の構成要素に存在するとき (例えば、PHD阻害剤が、内側スリーブに又は内側スリーブの構成要素に投入されるとき)、装置は、少なくとも約0.087 µg/装置、約0.092 µg/装置、約0.097 µg/装置、約0.102、約0.107 µg/装置、約0.112 µg/装置、約0.117 µg/装置、約0.122 µg/装置、約0.127 µg/装置、若しくは約0.132 µg/装置又はこれらの値のいずれかによって囲まれる濃度範囲内の濃度のPHD阻害剤を含んでいてよい。PHD阻害剤は、創傷部位における過剰なコラーゲン堆積を制御する。

【0113】

開示される組成物は、ビタミンA又はその代謝産物若しくは誘導体又は近位-遠位位置情報において機能する任意の剤を含んでいてよい。ビタミンAの例示的な誘導体として、限定されないが、レチノイン酸、レチノール、カルボン酸レチニル (例えば、酢酸レチニル、プロピオン酸レチニル、及びパルミチン酸レチニル)、トレチノイン、並びにタザロテン、並びに、これらの組み合わせが挙げられる。近位-遠位位置において機能し得る剤として、限定されないが、骨形成タンパク質9 (BMP9)、ノード成長分化因子 (nodal growth differentiation factor) (すなわち、HTX5又はNODAL)、アクチビン、形質転換成長因子-ベータ (TGF-β)、及び線維芽細胞成長因子8 (FGF8) が挙げられる。ビタミンA又はその代謝産物若しくは誘導体又は近位-遠位位置情報において機能する任意の剤は、少なくとも約0.03 µg/ml、約0.06 µg/ml、約0.09 µg/ml、約0.12 µg/ml、約0.15 µg/ml、約0.18 µg/ml、約0.21 µg/ml、約0.24 µg/ml、若しくは約0.27 µg/ml又はこれらの値のいずれかによって囲まれる用量範囲内の治療組成物内用量で存在してよい。ビタミンA若しくはその誘導体 (又は近位-遠位位置情報において機能する剤) が、開示される装置の構成要素に存在するとき (例えば、ビタミンA若しくはその誘導体又は近位-遠位位置情報において機能する剤が、内側スリーブに又は内側スリーブの構成要素に投入されるとき)、装置は、少なくとも約0.03 µg/装置、約0.06 µg/装置、約0.09 µg/装置、約0.12 µg/装置、約0.15 µg/装置、約0.18 µg/装置、約0.21 µg/装置、約0.24 µg/装置、若しくは約0.27 µg/装置又はこれらの値のいずれかによって囲まれる濃度範囲内の濃度のビタミンA若しくはその誘導体又は近位-遠位位置情報において機能する剤を含んでいてよい。

【0114】

開示される治療組成物は、炎症応答の解消を促進するオメガ-3脂肪酸の生成物による脂質メディエーター及び/又は代謝物 (すなわち、抗炎症剤) を含んでいてよい。好適な脂質メディエーターは、オメガ-3脂肪酸族の誘導体 (例えば、生成物による代謝物)、及び/又は炎症応答の解消を促進するエイコサペンタエン酸若しくはドコサヘキサエン酸の誘導体 (すなわち、抗炎症) を含んでいてよい。例示的な脂質メディエーターとして、限定されないが、レゾルビン、例えば、レゾルビン5、インターロイキン6 (IL-6)、インターロイキン4 (IL-4)、腫瘍壊死因子-アルファ (TNF-α)、活性化B細胞 (NF-κB) の核因子カッパー-軽鎖エンハンサー、及びこれらの組み合わせを挙げることができる。所望により、脂質メディエーターは、少なくとも約0.006 µg/ml、約0.012 µg/ml、約0.018 µg/ml、約0.024 µg/ml、

10

20

30

40

50

約0.030 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.036 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.042 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.048 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、若しくは約0.054 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 又はこれらの値のいずれかによって囲まれる用量範囲内の治療組成物内用量で存在してよい。脂質メディエーターが、開示される装置の構成要素に存在するとき（例えば、脂質メディエーターが、内側スリーブに又は内側スリーブの構成要素に投入されるとき）、装置は、少なくとも約0.005 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.011 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.017 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.023 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.029 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.035 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.041 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.047 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、若しくは約0.053 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 又はこれらの値のいずれかによって囲まれる濃度範囲内の濃度の脂質メディエーターを含んでいてよい。

【0115】

開示される治療組成物は、ペプチドホルモン、例えば、成長、細胞繁殖、及び細胞再生を刺激するペプチドホルモンを含んでいてよい。（例えば、Schmidmaier et al., Bone (2002) 31 (1): 165-72; 及び Schneider et al., J. Clin. Invest. 115 (8): 2083-98を参照。例示的なホルモンペプチド又はタンパク質として、限定されないが、成長ホルモン（GH）、インスリン様成長因子-1（IGF-1）、形質転換成長因子-ベータ-1（TGF β -1）、上皮成長因子（EGF）、顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）、及び線維芽細胞成長因子FGFが挙げられる。成長ホルモン又はステロイドは、少なくとも約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、若しくは約1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 又はこれらの値のいずれかによって囲まれる用量範囲内の治療組成物内用量で存在してよい。成長ホルモン又はステロイドが、開示される装置の構成要素に存在するとき（例えば、成長ホルモン又はステロイドが、内側スリーブに又は内側スリーブの構成要素に投入されるとき）、装置は、少なくとも約0.1 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.2 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.3 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.4 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.5 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.6 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.7 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.8 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、約0.9 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 、若しくは約1.0 $\mu\text{g}/\text{装置}$ 又はこれらの値のいずれかによって囲まれる濃度範囲の濃度の成長ホルモン又はステロイドを含んでいてよい。

【0116】

開示される治療組成物は、脱分極剤を含んでいてよい。好適な脱分極剤として、限定されないが、イソホロン（例えば、イオンチャネル開口剤又は遮断剤）を挙げることができる。好適な脱分極剤として、限定されないが、モネンシン、グルコン酸カリウム、グルコン酸ナトリウム、及び同種のを挙げることができる。

【0117】

開示される治療組成物は、処置を必要とする対象を処置するのに使用され得る。本明細書において使用されているとき、「対象」は、ヒト又は動物を意味する。通常、動物は、脊椎動物、例えば、霊長類、齧歯動物、家畜又は狩猟である。霊長類として、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、及びマカク、例えば、アカゲザルが挙げられる。齧歯動物として、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ及びハムスターが挙げられる。家畜及び狩猟動物として、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、水牛、ネコ種、例えば、イエネコ、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、鳥類、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、及び魚類、例えば、トラウト、ナマズ及びサーモンが挙げられる。本明細書に記載されている態様のある一定の実施形態において、対象は、哺乳類、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。対象は、雌性又は雄性であり得る。好ましくは、対象は、哺乳類である。哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、又はウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳類は、組織修復、再生及び／又は再構成の動物モデルを表す対象として使用され得る。また、本明細書に記載されている方法及び組成物は、家畜動物及び／又はペットを処置するのに使用され得る。

【0118】

いくつかの実施形態において、開示される治療組成物は、組織再生の刺激を必要とする

10

20

30

40

50

対象の創傷した又は負傷した付属器官又は組織を処置するために使用され得る。組織又は付属器官は、対象の内側であっても外側であってもよい。再生を必要とする対象内の例示的な創傷した又は負傷した組織として、限定されないが、扁平上皮、立方上皮、移行上皮、多列円柱上皮、円柱上皮、腺上皮、骨、腱、靱帯、脂肪、疎性結合組織、血液組織、内臓筋、平滑筋、骨格筋、心筋、及び神経組織が挙げられる。

【0119】

いくつかの実施形態において、本開示は、対象に、有効量で開示される化合物を含む開示される治療化合物を投与して、創傷した又は負傷した付属器官又は組織のを少なくとも一部を再生する方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記方法は、創傷した又は負傷した付属器官又は組織を、提供されるヒドロゲル中に存在していても存在していなくてもよい治療化合物に接触させることを含む。いくつかの実施形態において、提供される治療化合物又は提供されるヒドロゲルを本明細書において提供される装置内の創傷した又は負傷した付属器官又は組織に接触させる。

10

開示される装置及び／又は治療組成物は、組織再生を促進する。組織再生は、当該分野において公知の任意の方法、例えば、限定されないが、本開示による装置及び／又は治療組成物で処置した組織対開示される装置及び／又は治療組成物で処置していない組織において、山中因子、Sox2、Oct3/4、Klf4、及び／又はc-Mycの発現を測定することによって測定され得る。

【0120】

動物モデル試験

20

青年期に向かって成熟した無尾類は、切断した組織に埋め込まれた徐放ビーズを通して送達される再生誘発因子に暴露されたとき、それらの切断した又は負傷した四肢を再生することができる。しかし、完全に非再生の強度変態後（成体）ゼノパスは、特徴のない軟骨スパイクを生じる代わりに切断術の際にそれらの後肢を再生することができない（Suzuki et al., (2006) The Scientific World JOURNAL, 6.）。このモデルを使用して、再生誘発因子が再生を刺激し得るか否かを試験した。

【0121】

以下の実施例に記載されているように、成体ゼノパスの後肢切断術における複雑な介入を試験して、四肢再生のいくつかの態様に取り組んだ。ウェアラブルバイオリアクタ（「バイオドーム」）を使用して、インビボでの創傷の局所微小環境に対する制御を獲得した。メカニズムを探求したところ、再生カクテルへの短い暴露期間が、連続的なマイクロマネージメントなしに長期にわたる内因性形態形成カスケードを始動させる。再生前活性を誘発する様々な刺激、例えば、炎症を低減し、神経温存を促進し、且つ成長全体を誘発する剤を選択した。

30

【0122】

いくつかの小分子化合物が注入されたシルク含有ウェアラブルバイオリアクタへの短い暴露期間（例えば、24時間）は、ゼノパスにおける切断術の後、劇的な伸長、パターン形成、及び感覚運動機能を誘発することが見出された。処置された動物は、創傷閉鎖の著しい遅延、続いて、骨長の増加、軟組織パターン形成、及び神経筋修復を含めた長期（約16ヶ月）の成長の成果を示した。組織学的には、新しい四肢が、神経、血管を示す平滑筋を含んでおり、細胞外マトリックスタンパク質の再構造化は、四肢の再形成を含んだ。トランスクリプトミクス解析は、中間及び短期経路並びに芽体における介入の転写標的を同定した。RNA-seq試験により、脳における完全処置デバイスに対する迅速な応答（偽対照と比較して）も明らかになった。再生した骨は、野生型形態に特徴的な解剖学的特徴を示し、遠位四肢の軟組織は、指様突出部を示した。また、動物は、新しく形成された四肢を使用して、野生型カエルと同様に歩き回った。また、感覚運動経路が、完全処置条件に暴露した動物において元の状態になり、組織－再パターン形成が、求心性神経並びに神経筋組織界面の再延長又は再成長を含んだことを示した。

40

【0123】

50

これらのデータは、成体ゼノパスにおいて、遺伝子治療又は幹細胞移植を必要とすることなく簡単なトリガーによって非常に有意な長期にわたる再生応答が誘発され得ることを実証し、また、創傷及び遠位の脳において起こるこのプロセスの分子、細胞及び組織レベルの構成要素を明らかにしている。

【0124】

以下の例は、本開示が使用又は実行され得る方法を詳細に記載しており、当業者が本開示の原理をより容易に理解することを可能にするであろう。以下の例は、実例として提示されており、何ら、限定的であることは意図されていない。

【実施例】

【0125】

動物

5 cm～6.25 cm（鼻から尾まで）と測定された成体雄性アフリカツメガエル（ $n=115$ ）（Nasco, Fort Atkinson, WI）を、実験前の2週間、貯蔵タンクに順応させた。動物を規定のカエル水（リーフソルト、Seachem Laboratories、約1.65 k Ω の伝導率、7.8～8.0のpH）を含有する10 Lのプラスチックタンクにおいて18℃（291.15 K）で維持し、12時間の明暗サイクルに暴露した。実験前に、動物を、切断術後の四肢断端の細菌汚染を最小にするために、広域スペクトルゲンタマイシン抗生物質に2時間浸漬した（Gibco, Fisher Scientific, USA）。

【0126】

四肢切断術

後肢切断術の手術を、Golding et al. (2016), PLoS One 11, e0155618、及びHerrera et al. (2018), Cell Rep 25, 1593–+によって公開されている、先に確立されているプロトコルに従って実施した。簡潔には、動物に、まず、0.05%ベンゾカインを含有する緩衝カエル水に全身浸漬することにより麻酔する。指先を挟んだときの反射作用が損失しているときは、切断される脚の対側にある側線の直下に75 mg/kgブプレノルフィン（ブプレノルフィン）を皮下注射した。ストレートカットを使用して滅菌マイクロ手術ブレードによって脛腓骨の途中で右後肢を切断した。骨の切除を実施せず、創傷部位上の組織フラップも縫い付けなかった。止血後、動物の意識を取り戻させ、最小60分間で滅菌カエル水において回復させた。

【0127】

デバイス取り付け

動物を3つの処置条件：デバイスなし、バイオドームのみ、又はカクテル処置を伴うバイオドーム（「バイオドーム製作及びカクテル組成物」において後述）のうちの1つにランダムに割り当てた。デバイス取り付け手技の前に第2の麻酔（0.05%ベンゾカイン浸漬、75 mg/kgブプレノルフィン）を先行させた。意識を失った動物に、次いで、モノフィラメント外科縫合を使用して切断術部位の断端に固定したデバイスを装着させた（7-0 Monosof, 18" P-16 cutting, Covidien, USA）。脚のいずれかの側に皮膚を通して2つの縫合をした。これらのステッチは、デバイスを適所で保持するのに充分であり、下部の深筋膜層を損傷しなかった。取り付け後、動物をホームタンクに戻し、このときに意識を取り戻させ、自由に泳がせた。対照動物を、デバイスを収容したものと同様に扱ったが、創傷断端にデバイスを取り付けなかった。本明細書にお提示されている結果を、縫合バイオドームを使用して生じさせた。

【0128】

代替的には、調整可能なバイオドームを使用してよい。調整可能なバイオドームの取り付け手技は、キャップ及びドーナツ形状の隔膜を通して適した位置において切断した四肢を押すこと、並びに、生体接着剤Skin-Tite Bioadhesive, Smooth-On, PA）を使用して四肢を固定することを含む。足場含有バイオドームインサートを、切断した指に取り付け、少量の接着剤で固定した。アクリルの保護キャップを頂部キャップ内にねじ込み、続いて、カスタムワッシャを用いて創傷床により近接してイ

ンサートを押し、第2キャップによって閉鎖した。取り付け期間にわたって組織を湿潤して維持するために、約4 μ Lの滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS) 1Xを、31G針を使用してインサートにゆっくり注入した。PBSを2日毎に変えて、細胞廃棄物を除去し、組織を新鮮に維持した。動物を後の分析のために犠牲にするまでデバイスを取り付けて維持した。

【0129】

バイオドーム製作

縫合バイオドームは、制御放出基質及び薬物担体としてシルクヒドロゲルを含有する軟質シリコンインサートから構成された。デバイスの製作は、他のいずれかで報告されている(Golding et al., (2016) PLoS One **11**, e0155618)。簡潔には、外側の円筒形シリコンスリーブ(20mm高さ×18mm径)を、CADソフトウェア(Solidworks, Waltham, MA, USA)を使用して設計してFormlab 3Dプリンタ(Somerville, MA, USA)を使用して印刷した3D印刷金型に対して、シリコンエラストマー(Dragon skin 10, Smooth-on, Macungie, PA)をキャストすることによって製作した。

【0130】

調整可能なバイオドームは、1cm長さの円筒形チューブで切断されたアクリルチューブ(#8532K13, McMaster-Carr, Elmhurst, IL)から構成されており、装置100の本体として使用した。ネジ式アダプタを、3DCADソフトウェア(Inventor Professional, Autodesk, San Rafael, CA)を使用して設計し、光造形法による3Dプリンタ(Form2, Formlab, Somerville, MA)を使用して印刷した。アダプタを、医療グレードの強力瞬間接着剤を使用してアクリルチューブに接着させた。2mL HPLCバイアルキャップ(Agilent, (Santa Clara, CA)。PTFE/シリコン隔膜を3mm生検パンチによって穿孔して、動物の四肢用の点検口を生じさせた。動物の脚が当該口を通過するためのさらなる部屋を付与するために、隔膜を、4箇所、互いから離れた四半円において、中心孔に沿って切断した。カスタムワッシャを、ソフトリソグラフィを使用してPDMSから作製し、又は3Dプリンタを使用して3D印刷した。装置100のインサートの円筒状の壁部を、透明なポリエステル膜フィルタ(0.45 μ m孔径、12 μ m厚、#1300016, Sterlitech, Kent, WA)から製作した。フィルタを矩形(7mm×5mm)に切断し、1.5mm直径の金属棒(#8907K62, McMaster)の回りに巻いた。次いで、壁部を、シリコン接着剤(Dragon Skin 10 FAST, Smooth-on, Macungie, PA)を使用してシリコン底部に接着させ、インサートを完成させた。

【0131】

保護ケージを、ネジ式キャップ、透明なアクリル本体、及びアダプタから組み立てた。1方向の曲げを可能にするのみであるドーナツ形状の隔膜を設けて、動物の移動及び干渉に起因する装置の分離を防止した。カスタムワッシャは、底部キャップと一緒に、創傷床に対して足場インサートをしっかりと保持し且つこの位置を長期の実験にわたって安定に維持するのに十分な調整可能な圧力を付与する。これもまた、媒体交換用の点検口も装備している。装置インサートは、膜形成性側壁及びシリコン底を含む。側壁は、組織を湿潤して維持し且つガス交換を容易にするのに必要な液体を保持し得、シリコン底は、媒体交換用の針の挿入のための隔膜として機能する。

【0132】

デバイスの除去及びメンテナンス

24時間後、動物に麻酔し、先に記載されているように鎮痛剤で処置した。デバイスを次いで、脚のいずれかの側で単一の縫合を切断することによって除去し、カエルを、殺菌剤(1mL/10Lカエル水の濃度のコルドンメチレンブルーを含むタンクに戻して入れた。さらに24時間後、水を新たな100%カエル水で置き換えた。一旦これらのデバイ

スを除去したら、動物をカエル水中で18ヶ月維持し、この水を毎日変えた。終点の安楽死を、0.2%ベンゾカインを有するカエル水に全身を浸漬することによって実施した。再生体、反対側の四肢、及び脳組織を組織学的分析用に収集及び処理した。

【0133】

シルク処理

シルクフィブロイン溶液を、0.02M炭酸ナトリウム (Na_2CO_3) 溶液中5gのボンビクス・モリ (*Bombyx mori*) 繭 (Tajima Shoji, Yokohama, Japan) を45分間切断及び脱ガムして非必須タンパク質基質 (すなわち、セリシン) を除去することによって調製した。繊維を脱イオン (DI) 水で数回洗浄して Na_2CO_3 を除去し、次いで、22°C (295.15 K) でドラフト内において一晚乾燥させた。乾燥シルクファイバを次いで9.3M臭化リチウムの20% (w/v) 溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) に溶解し、60°C (333.15 K) に設定したオープンにおいて4時間置いた。溶液を、次いで、透析カセット (3.5 kDa (5.81×10^{-2} g) の分子量カットオフ、Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用して穏やかに攪拌しながらDI水において透析した。水を48時間の期間にわたって6回変えた。透析した溶液を、13,000 gで、4°C (277.15 K) において20分間、3回遠心分離し、それぞれ、続いて、細胞ろ過器 (40 µm孔径、Thermo Fisher) を通してろ過して、不純物を除去した。ろ過した溶液の濃度を求めるために、0.5 mlのサンプルをオープンにおいて一晚、完全に乾燥させた。水分を蒸発させたら、乾燥したシルクを秤量し、%濃度 (wt/v) を0.5 mlの初期体積に対する乾燥したシルクの重量の比として算出した。

【0134】

シルクヒドロゲルを架橋液体シルクフィブロインによって形成した。45 mbシルク3% w/v) 及び西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 溶液 (20 U/mlを24ウェル板にキャストし、37°C (310.15 K) で45分間インキュベートして、ゲル化を完了した。ゲルのゲル圧縮強度及び係数を、Golding et al. (2016), PLOS One 11, e0155618の方法に従って試験した。

【0135】

整列した孔を有する足場

整列した孔を有するシルク足場を、5 µlの4% (wt/v) シルク溶液を使用して製作した。溶液をアルミニウム板の頂部に置き、急な温度勾配を、液体窒素 (LN2) において板を融合させることによって誘発した。冷面から成長する氷晶の指様柱状物は、固化されたまま、シルク溶液内で、チャンネル様構造を内部に作り出した。冷却の10分後、凍結した溶液を24時間にわたって凍結乾燥して、水を除去した。スポンジをインサートとしてのバイオドームに合わせてトリミングし、エチレンオキシド中で滅菌し、使用まで滅菌状態において室温で貯蔵した。

【0136】

整列したチャンネル様多孔質構造を有するコラーゲン足場を、(シルク足場と同様の方式で) 1.5% (wt/wt) コラーゲン溶液の制御された指向性凍結及び凍結乾燥によって製作した。足場を円筒形状 (4 mm長さ及び1.5 mm径) に切断し、ハサミを使用してバイオドームインサート内に置いた。

【0137】

材料の特性決定

足場の形態を、走査電子顕微鏡 (SEM) 及び蛍光顕微鏡を使用して特性決定した。SEM画像化のために、足場を、カミソリを使用して半分に切断して、孔の内部の幾何学形状を露出させた。画像化の前に、足場に金をスパッタコーティングし、伝導率を増加させた。SEM画像化を5 kVに設定した顕微鏡 (Zeiss EVO MA10) において行った。蛍光画像化のために、足場をPBS中2 µg/mlのフルオレセインイソチオシアネート (FITC) によって染色し、Keyence顕微鏡 (BZ-X800, Keyence

n c e , J a p a n) を使用して画像化した。足場の圧縮剛性及び弾性モジュラスを、インストロン試験システムを使用して求めた。図 8 A は、長軸に沿って整列したチャンネル様孔を有するシルク足場である。図 8 B は、長軸に対して垂直に整列した孔を有するシルク足場である。図 8 C は、長軸に沿って整列した孔を有するコラーゲン足場の S E M 画像である。図 8 D は、長軸に対して垂直に整列した孔を有するコラーゲン足場である。

【0138】

治療組成物

ヒドロゲルを、3 % (w / v) シルク溶液、2 0 U / m l の西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) 、及び過酸化水素 (H 2 O 2) の 0 . 0 1 % w t / v の最終濃度で調製した。液体溶液をシリコンスリーブに注ぎ入れ、3 0 分間ゲル化させた後、動物の四肢断端に取り付けた。カクテル投入デバイスでは、0 . 0 1 4 μ g / m l の 1 , 4 (ジヒドロフェノンスロリン-4-オン-3カルボン酸) D P C A (カタログ番号 7 1 2 2 0 、 C a y m e n C h e m i c a l s , M I , U S A) 、0 . 5 μ g / m l の脳由来神経栄養因子 (B D N F) (カタログ番号 4 5 0 - 0 2 、 P e p r o t e c h , M A , U S A) 、0 . 5 μ g / m l の成長ホルモン (G H) (カタログ番号 1 0 0 - 4 0 、 P e p r o t e c h , M A , U S A) 、0 . 0 3 6 μ g / m l のレゾルビン D 5 (カタログ番号 1 0 0 0 7 2 8 0 、 C a y m e n C h e m i c a l s , M I , U S A) 、0 . 0 1 5 μ g / m l のレチノイン酸 (カタログ番号 1 1 0 1 7 、 C a y m e n C h e m i c a l s , M I , U S A) を液体シルク溶液に投入した後、シリコンスリーブ内に挿入してゲル化した。

【0139】

インビトロ放出研究

本例において使用する薬物の放出プロファイルを決定するために、特定の量の特定の薬物が投入された 5 0 μ L の各ヒドロゲル溶液を 1 . 5 m l の微小遠心管に添加し、3 7 ° C (3 1 0 . 1 5 K) で 4 5 分間インキュベートしてゲル化を完了させた。次いで、1 m l のダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D P B S 1 X , G i b c o) を各バイアルに添加し、続いて、3 7 ° C (3 1 0 . 1 5 K) でインキュベートした。定められた時点において、3 0 0 μ l の上清を分析用に収集した。薬物不含シルクヒドロゲルの放出溶液を対照として使用した。既知の濃度を有する溶液の光学密度を測定することによって検量線を求めた。全ての放出実験を 3 連で実施して正確さを確保した。R A 及び 1 , 4 - D P C A では、放出溶液の光学密度は、S o f t M a x P r o 6 ソフトウェアによって操作するマイクロプレートリーダー S p e c t r a M a x M 2 (M o l e c u l a r D e v i c e s , S a n J o s e , C A) を使用して U V 透明 9 6 ウェル板 (C o r n i n g , C o r n i n g , N Y) において求めた。それぞれ 1 , 4 - D P C A 及び R A 溶液について 2 8 0 n m 及び 3 5 0 n m の波長で検出を行った。

【0140】

放出サンプルにおける B D N F 及び G H の濃度を、B D N F 及び G H について設計したモノクローナル抗体を含有する酵素結合免疫吸着検査法 (E L I S A) キット (# B G K 2 3 5 6 0 及び # B G K 0 1 2 4 1 、 P e p r o t e c h , R o c k y H i l l , N J , U S A) を使用して求めた。サンプル調製及び測定を製造者のプロトコルに従って実施した。調製したサンプルの光学密度を、S p e c t r a M a x M 2 プレートリーダーを使用して 4 5 0 n m において読み取った。レゾルビン D 5 の放出サンプルをタンパク質ろ過カラム (M W C O = 3 k D a (4 . 9 8 × 1 0 ⁻²¹ g) , # U F C 5 0 0 3 2 4 , F i s h e r) によってろ過して、高分子量のフィブロイン分を除去した。次いで、サンプルの光学密度を、S p e c t r a M a x M 2 プレートリーダーを使用して 2 4 4 n m の波長において求めた。

【0141】

軟質組織画像化

1 8 ヶ月の維持期間にわたって定期的な間隔で、動物を軟組織の再パターン形成及び骨の再成長に関して評価した。先に記載されているように動物に麻酔し、これらの創傷部位の高解像度画像及び再生体寸法を、D S L R カメラ (C a n o n E O S R e b e l T

10

20

30

40

50

7 i) を使用して獲得した。再現性を確保するために、切断術面が全測定用の標準参照点として機能した。切断術の部位を、切開点における四肢の確実な漸減によって容易に同定した。各測定は、切断術部位及び再生体の最遠位端部間の長さの線形アセスメントからな

【0142】

インビボでのX線及びマイクロCT骨造影

軟組織測定に加えて、骨長を、Golding et al. (2016) PLoS One 11, e0155618、及びHerrera-Rincon, et al.、(2018) Cell Rep 25, 1593-+の画像化プロトコルに従って、0.20秒の暴露時間で、60kV、2.5mAの標準画像化設定を使用してハンドヘルドX線デバイス(Nomad Pro 2TM)を使用して評価した。どの動物も、定められた時点において同じ用量(0.12mSv)に供した。viva CT40スキャナ(Scanco Medical, Switzerland)におけるコンピューター断層撮影(CT)を実施して、ベンゾカイン過剰用量(0.2%の全身浸漬)による安楽死後18ヶ月再生期間の終わりの骨の詳細な微細構造を可視化した。遠位骨梁及び中軸皮質骨切片(615スライス/動物、76µm/スライス、300msの積分時間)を可視化し、3D画像としてさらに定量化した。放射線量は、453mGy~1255mGyの範囲内の、局所CT用量指標(CTDI)を使用して確立した製造者ガイドラインによるものであった。

【0143】

組織学及び免疫組織化学

切断術後の四肢の再成長及び再パターン形成に対する処置の効果を特性決定するために、組織学的分析を、再生体及び対側の四肢において、定められた間隔で経時的に実施した。組織を18mpaで収集した。長期の再生体組織をPBS中4%のパラホルムアルデヒド(PFA)において一晩固定し、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)(pH7.4)の増加する濃度(10%~15%)に暴露することによって2週間脱灰した。脱灰したら(x線を使用して確認)、組織を30%スクロースに徐々に平衡化した後にOCT(Sakura Finetek, USA)に埋め込んだ。サンプルを液体窒素において凍結した。四肢組織を、クリオスタット(Leica CM1850)を使用して14µmで順次切片化し、ガラススライドに置いた。断面を元の切断術部位上の脛腓領域から四肢の終端のパターン形成された領域まで四肢を横断して14µm間隔で採取した。パターン形成を可視化するために、四肢の端部を14µm間隔で水平に切片化した。切片を少なくとも1時間乾燥した後、-80℃(193.15K)で貯蔵した。

【0144】

免疫組織化学では、スライドを室温で少なくとも2時間平衡化した後、染色した。スライドを、4%PFA中で5分間、後固定し、次いで、ブロッキングバッファー(0.1%Triton X-100及び10%正常ヤギ血清を含むPBS)において1時間ブロックした。アセチル化α-チューブリン(1:100)、TGF-β(1:250)、平滑筋アクチン(1:100)、ラミニン(1:100)、フィブロネクチン(1:500)、及びホスホヒストンH3(1:250)に対して一次抗体を使用した。スライドを抗平滑筋アクチン及び抗ラミニンを除く各抗体で個々に染色し、これらを一緒に染色した。一次抗体をスライドにおいて一晩インキュベートした。PBS中で洗浄後、alex-a-fluor二次抗体(1:500、ThermoFisher Scientific)をブロッキングバッファー中に2時間適用した。スライドをPBSにおいて再び洗浄し、PBS中DAPI1:200によって20分間染色した。スライドをFluoromount-G(ThermoFisher Scientific)に搭載して少なくとも24時間治癒し後に画像化した。

【0145】

切片を、EVOS FL自動画像化システム(ThermoFisher Scientific)を使用して画像化した。全切片を収集し、分析用に一緒に縫い合わせた。

【0146】

免疫染色した切片の分析

全ての統計分析をIBM SPSSバージョン20ソフトウェアにおいて実施した。ANOVA、t検定、及び関連する分析（Pearsonのr）を含めたパラメトリック試験の使用の前に、正規性の想定を試験した。非パラメトリック分析、マンホイットニー・ウィルコクソン検定又はクラスカル・ウォリス検定を、データが通常は分布しない比較用に行った。p値が0.05の閾値未満であるとき、有意差を仮定した（両側仮説検証）。

【0147】

感覚運動閾値のアセスメント

再生体の感覚運動能力を評価するために、動物を切断術後18ヶ月で評価した。各動物を2Lのカエル水で充填したガラスタンク内に入れ、移動が完全に停止するまで5分間順応させた。ビデオカメラ（iPod（登録商標）Touch第5世代、Apple, CA, USA）を筐体上に置き、試験手技の記録を獲得した。標準化されたVon Fryフィラメント（Touch Test, Stoelting, IL, USA）を使用して再生体の知覚閾を評価した。力で0.008g~300gの範囲のフィラメントを、最低の力から最高の力まで、再生体の遠位部に適用した。明らかな応答（静止位置からの移動）を誘発した第1フィラメントを記録した。動物を2日の期間にわたって2回試験し、平均閾値を報告した。

【0148】

統計分析

全ての統計分析をIBM SPSS v20において実施した。まず、データをLeveneの検定によって等分散性について試験した。単一遺伝子分析を、対応のない、両側スチューデントt検定（2つの独立群）、又は一方向ANOVA試験（複数の独立群）、続いてのポストホックScheffeの検定（ $P < 0.05$ であるとき）によって、正規分布データにおいて実施した。可変の「時間」を考慮したとき、二要因分析を二方向ANOVAによって実施した。それぞれ特定の時点における処置群（デバイスなし、バイオドームのみ及びカクテル処置）間の統計的有意差を、スチューデントt検定を使用することによって求めた。非正規分布データにおいて、クラスカル・ウォリス検定、続いてポストホックDunn試験（ $P < 0.05$ であるとき）をそれぞれ行った。有意水準を全ての場合において0.05に設定した。統計値を、示す場合には、平均±標準偏差又は平均±平均の標準誤差として報告する。適切な場合、ドット又は散布図を、それぞれ実験群内の個々の変動を強調するのに使用する。

【0149】

RNA抽出

切断術、デバイス取り付け及び除去、並びに24時間の処置後、再生体組織を、次世代シーケンシング（NGS）のために、切断術後11-、24-、及び72時間で収穫した。サンプルは、遠位創傷部位からの1cm厚の組織ブロックからなった。脳も収集してフラッシュ凍結した。組織を製造者のプロトコルによるTRIzol（ThermoFisher Scientific）を使用して抽出し、全RNAの質及び量を、Nanodrop分光光度計（ThermoFisher Scientific）を使用して評価した。

【0150】

次世代シーケンシング（NGS）

1.1µgの全RNAをTufts Genomic Coreに送付した。RNAの質を、バイオアナライザを介して評価し、高品質のRNAを、RiboZero Goldを備えたTruSeq標準RNAライブラリー調製キット（Invitrogen）によるライブラリー調製に使用した。ライブラリーを次いで多重化し、単一の端の、50ntのシーケンシングをIllumina HiSeq2500において実施した。生の読み取りファイルをジョスリン糖尿病センターにおけるバイオインフォマティクス&生物統計コアに送付した。

【0151】

NGS分析

アフリカツメガエルの参照ゲノムを、NCBIゲノムデータベース、アセンブリGCA_001663975.1からダウンロードした。読み取りを、STARアライナを使用して整列させ(Dobin et al., Bioinform. (2013); 29(1):15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635. Epub Oct 25. PubMed PMID:23104886; PubMed Central PMCID:PMC3530905.)、整列した読み取りを、featureCountsを使用してカウントした(Liao et al., (2014) Bioinform. 30(7):923-30)。少なくとも3のサンプルにおいて発現カウントが百万あたり1を超えるカウント(cpm)である遺伝子を分析に含ませて、M値の加重トリム平均によって正規化した(TMM, Robinson et al., (2010) Genome Biol. 11, R25.)。Voom変換を実施して(Law et al., Genome Biol. 15, R29.) カウントをlogCPMに変換した: $CPM = 1e + 6 * \text{遺伝子カウント} / (\text{サンプル合計カウント} * \text{サンプルの正規化係数})$ 。Voom変換はまた、平均一分散関係も推定し、これを使用して観察レベル重量を計算するため、さらなる読み取り深さにより、さらなる重量を与える。異常値をさらに重み付けするために、サンプル-特異的な良質の重量(Ritchie et al., (2006) BMC Bioinform. 7, 261.)を収集し、観察レベル重量と合わせた。

10

20

【0152】

異なって発現した遺伝子を、リムマを使用して同定した(Ritchie et al., Nucl. Acids Res. 43, e47.)。モデレーテッドt検定を実施して、2つの群間で異なって発現された遺伝子を検出した。FDR<0.25を有する遺伝子を有意に変化したとみなした。

【0153】

経路解析用の遺伝子セットをMSigDBコレクションから得、正準経路(CP)又は遺伝子オントロジー(GO)に属する遺伝子セットを選択した。分析を、リムマRパッケージ(Wu et al., (2010) Bioinform. 26, 2176-2182.)における回転遺伝子セットテスト(Roast)においてFry機能によって実施した。協調的に上方、協調的に下方、及び混合された遺伝子セット全てを、 $P < 0.05$ 及び $FDR < 0.05$ であるとき有意とみなした。

30

【0154】

ネットワーク分析

遺伝子モジュールを、四肢切断術後11時間、24時間、及び7日における対照群及びカクテル-処置群についてのlogCPM値に基づいたR(Russo et al., 2018)においてCeMiToolにおける共発現分析によって同定した。CeMiToolにおいて、分散安定化変換を適用して平均及び分散パラメータ間の差を除去し、遺伝子を $p < 0.1$ の閾値で発現レベルに基づいてフィルタリングした。共発現遺伝子のモジュールを、30の遺伝子の自動生成スケーリング値ベータ($\beta = 10$)及び最小モジュールサイズに基づいたデータセット内で同定した。これらのモジュールのエンリッチメントが時間及び群についてどのように変化したかを評価するために、モジュールエンリッチメントをサンプル注釈に基づいて算出した。どの生物学的機能がそれぞれのモジュールに関連しているかを決定するために、過剰表現分析を、Reactomeからの経路データベースを使用して実施し、経路を $p < 0.05$ で有意であるとみなした。注釈付きモジュールにより、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)及びChemical and Genetic Perturbations(CGP)からの組み合わせた遺伝子-遺伝子相互作用データをグラフ化し、それぞれのモジュールに含まれる相互作用遺伝子をマッピングする。

40

【0155】

50

qPCR法

RNAseq解析用に提起された同一の全RNAは、RQ1RNase不含DNaseキット (Promega Corp., Madison, WI, USA) を使用して処理したDNaseであった。得られたRNA (0.5 µg) は、第2のDNase処置、続いて、Verso cDNA合成キット (ThermoFisher Scientific) を使用したcDNA合成を経た。Step One Plus Real Time System (Applied Biosystems, USA) を使用する遺伝子産物の量の定量分析。それぞれ10 µlの反応を、二連で行い、これは：5 µlの2x PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA)、0.5 µlの、10 µMの正及び逆遺伝子特異的プライマー、並びに、1.33 µlの希釈されたDNA鋳型を含有した。関連発現を、全サンプルの較正器として使用される、時点にわたっての全てのND発現の平均を用いてデルターデルタCt法を使用して分析した。

【0156】

結果

1. 多剤再生処置による脚再生の誘発

成体ゼノパスの後肢を脛骨及び腓骨に沿って中点で切断し、5-薬物多剤処置 (MDT) によるシルク系ヒドロゲル又はヒドロゲルのみのいずれかを含有するバイオドームデバイスを取り付けた。対照動物を処置せずに切断した。バイオドームに24時間暴露した後、デバイスを除去し、動物を、後肢再生体の再生及び再パターン形成の定期アセスメントにより最大18ヶ月間維持した。長期化される観察ウインドウを、イモリの断端直径を使用した投影モデリングに基づいて無尾類の四肢を再生させるのに約1.5年を必要とすることを予測しているAlibardiの(2018) 算出に基づいて選択した。

【0157】

X線画像を取得し、四肢長さを切断術後の月数の関数として測定した。X線は、バイオドームのみ及び多剤処置 (MDT) 条件の両方に関連する再生体が4ヶ月後の対照 (デバイスなし) 再生体よりも長かったことを示しており、効果は、4ヶ月後に現れ、次いで8ヶ月で再び現れ、経時的に持続した (二方向ANOVA、対象間因子処置暴露、対象内因子再生時間 $F(2, 19) = 61.9$, $p < .05$)。切断術部位と比較した四肢長さは、切断術後の月数 (mpa) が0.5と早く且つ4mpa持続する他の群と比較してMDT群についてより大きく ($p < 0.05$)、MDTが成長速度を早期に増加させたことを示唆した。6~8ヶ月目において、成長は有意に遅延し、バイオドームのみの群に関連する後肢再生体は、MDT-暴露動物と比較して匹敵する長さを達成した ($p > 0.05$)。9mpa後の後期の成長の二次的増加は、MDT群が、他の群と比較して長い四肢を再び表示したことを示しており、効果は、18mpaにおける最終測定まで持続した ($p < 0.01$)。そのため、MDT群は、他の処置群と比較して脚の長さが最終的に増加することを示すだけでなく、他の処置群、特に、デバイスなし群において存在しない二次的な成長期間も示す。これらのデータは、MDT及びバイオドームへの短い暴露が、より長い脚の再成長を容易にすることを示唆している。

【0158】

脚の長さが増加しただけでなく、MDTに暴露した動物の76%もが、デバイスなし群の特徴のない重度に着色したスパイクと比較して、より厚い、より複雑な再生体形態を表示した。具体的には、MDT群に関連する後肢再生体の遠位セグメントは、指に特徴的な芽体を突出して、平坦なパドル様構造を提示した。対照的に、デバイスなし及びバイオドームのみの条件は、特徴のない再生体スパイクと専ら関連しており、提供されるMDT条件は、遠位芽体が存在する、パターン形成されたパドル様構造を確実に生じた。バイオドーム群は、中間の表現型を有しており、バイオドーム動物の20%が、より厚い軟骨スパイク及びフック様遠位突出部を表示したが、パターン形成は限定されなかった。デバイスなし群では、いずれの動物も、特有の表現型を表示しなかった。

【0159】

2. 誘発された脚は感覚機能を示す

次いで、18 mpaの再生体が感覚機能を取り戻したかを評価するために、感覚運動アセスメントを行った。標準化されたVon Frey (VF) フィラメント（最小の力：0.008 g；最大の力：300 g）を使用して、再生した右後肢を、最大の力が印加されるまでフィラメントの強度を増加させて、最も遠位の端部で調査した。明らかな応答（静止位置からの移動）を誘発する第1フィラメントを記録し、挙動アッセイを2日にわたって平均化した。MDT処置した後肢再生体は、非切断群と匹敵する刺激-応答パターンを表示し（ $p > 0.01$ ；図10）、有意な再神経支配及び神経筋再建を示した。バイオドーム群において、応答は、ほぼ正常なレベルで実施する群及び刺激を検出できない群（ 56.6 ± 98.8 g）では個々の動物間で著しく変化した。非処置動物は、確実に、最大300 g（包含）のいずれの値においても力の印加に対するいずれの応答も表示することができなかった。そのため、本発明者らは、MDT処置が、切断しなかった四肢のものと同様に感覚運動の統合を容易にしたと結論づける。興味深いことに、バイオドーム単独群もまた、損傷を受けていない感覚系を有する四肢の再成長を容易にすることが可能である場合があった。これは、神経支配を維持し且つ神経再成長を容易にするためには水分補給及び構造的支持が重要であり得ることを示している。

10

【0160】

3. MDT暴露は、後肢骨長及び複雑性を増加させた

再生体の内部構造を、マイクロCT及びX線画像を使用して特性決定した。後肢長さ全体が処置によって有意に改良されたため（図9）、再生体の骨成分の研究を後に研究した。再生体のマイクロCT及びX線画像は、バイオドームのみ及び対照と比較して、提供されるMDT組成物に関連して骨量及び長さが増加したことを明らかにしている。

20

【0161】

X線画像により、バイオドームのみ及びデバイスなし対照実験と比較して、MDT再生体において、複雑な形態の存在及び骨長の増加を確認した。2.5 mpaにおける測定から始めて、切断術部位から外側に突出する緻密な組織がMDT及びバイオドーム群において観察されたが、デバイスなし対照では観察されなかった。MDT群はまた、再生体の遠位端部において、緻密な、セグメント化された骨断片も表示した。予測通りに、MDT条件は、（軟組織測定と同様に）およそ8 mpaでの変曲を伴って4 mpaで開始する他の条件と比較して増加した骨長を表示した（ $p < 0.05$ ）。図11に示されるように、MDT群及びバイオドーム群間の骨長の差を定期的に観察したが、これらの群及びデバイスなし対照間の長さの差が全体に維持された（ $p < 0.05$ ）。

30

【0162】

再生した骨の微細構造のより良好な理解を得るために、MicroCTを18 mpaで実施した。MicroCT画像化は、下層の骨の三次元レンダリングを可視化すること、及び、外側の軟組織を阻害することなく骨量の測定を行うことを可能にした。MicroCTデータにより、MDT後肢の遠位領域において骨断片化の存在を確認した。とりわけ、断片化は、切断術部位では起こらないが、代わりに、対側の関節と等価である骨に沿った点において成長期間後に自発的に出現する。これらの再パターン形成されたセグメント化は、MDT群内で共通であった。図12に示されるように、マイクロCTデータを通して測定した骨量は、他の群と比較して、MDT群の後肢再生体でより多かった。容積測定による定量化により、提供されるMDT再生体における成長の増加を確認した（一方向ANOVA（ $F(2, 15) = 11.15$, $p < 0.001$ ））。X線断層写真もまた、非切断及びMDT-処置の骨アトミー間で著しい類似性も明らかにした。再パターン形成は、筋肉組織の取り付けに通常は関連する骨特徴の再発現を含め、提供されるMDT再生体において顕著に表れた。具体的には、17 mpaにおいて、MDT群が、筋肉付着に特徴的な骨の特徴、並びに、関節セグメント化の存在を表示した。これらのデータは、骨を再成型し且つ予め切断した四肢に近似する特徴の形態的な複雑性を最終的に達成する積極的なプロセスと合致して、MDT条件が骨アトミーの有意な再形成に関連することを示している。

40

50

【0163】

4. 再生した四肢の複雑性

M D T ー処置動物は骨成長の増加を示したが、再生した四肢における細胞レベルでの分子変化も評価した。免疫組織化学を実施して、18 m p a 後の再生及び再パターン形成に関連する組織構造を評価した。図13に示されるように、アセチル化 α -チューブリン (A A T) 染色によって測定される再神経支配により、デバイスなし群と比較して24時間 M D T 条件に関連する A A T + 神経束の数の有意な増加が明らかになった ($U = 13$ 、 $P = 0.0014$)。A A T 束の数は、デバイスなし及びバイオドームのみ群と比較したとき匹敵しており、M D T 処置が、再生体の神経束再成長及び神経支配に影響したことを示した。図14に示されるように、さらなる束が存在しただけでなく、24時間 M D T 群もまた、デバイスなし群と比較して有意に大きい A A T 束直径も示した。バイオドームのみ及びデバイスなし群間には束サイズの有意な増加はなかった。

10

【0164】

クラスカルーウォリス検定は、18 m p a における A A T 陽性束の数が条件にわたって有意に異なったことを示した ($H(15.12) = p < 0.005$)。マンホイットニー U ポストホック分析により、主な分散源が、負傷していない動物と比較して24時間 M D T 条件に関連する A A T 束の増加であったことを明らかにした ($U = 13$ 、 $P = 0.0014$)。A A T 束の数は、負傷していない動物及びバイオドームのみ群と比較して匹敵していた ($p = 0.1812$)。次いで、本発明者らは、A T T 束寸法を検査して、条件にわたっての有意差を明らかにした ($H(11.74) = p = 0.0028$)。24時間 M D T 群は、負傷していない動物と比較して大きい A T T 束直径を示した。また、バイオドームのみ及び負傷していない動物群と比較したとき、有意であることは同定されなかった。

20

【0165】

結合組織構造への変化を評価するために、本発明者らは、18 m p a 後のフィブロネクチン発現パターンを評価した。図15に示されるように、M D T ー処置の再生体における粒子の複雑性の増加は、M D T 条件において観察される構造的複雑性の程度を反映した。具体的には、蛍光画像は、最初の切断術及び多剤処置への暴露後18ヶ月の再生体における神経再生及び細胞外マトリックス再パターン形成の増加を明らかにした。他の結果と合致して、24時間 M D T 群は、バイオドームのみ及びデバイスなし群の両方と比較して粒子の複雑性の増加を表示した。これは、M D T 自体が、再生体における軟骨及び結合組織の同化を容易にする傾向があることを示している。

30

【0166】

再生体の血管新生を評価するために、18 m p a におけるラミニン及び平滑筋アクチン (S M A) 発現を、図16に示されるように、条件にわたって比較した。切断術後18ヶ月で得た再生体の断面の蛍光画像を、血管新生の2つのマーカー：一方が平滑筋に関連し (S M A ー赤)、他方が基底膜に関する (緑)；について二重染色した。切片の比較により、デバイスのみ又は非処置群と比較して、多剤処置群において S M A / ラミニン陽性束の著しい増加が明らかになった ($H(19.84) = p < 0.001$)。各切片において同定される血管の数は、バイオドームのみ及びデバイスなしの両方の群と比較して、M D T ー処置群において有意に多かった ($H(19.84) = p < 0.001$)。これは、M D T が、デバイスなし条件に対して M D T ー処置の再生体において血管の数を倍増させるよりも再生体の血管新生を容易にすることを示している。

40

【0167】

5. 創傷閉鎖、S o x 2 発現の増加、及び再上皮形成

顕著な長期的成果を考慮して、切断術後の早い時点での M D T の効果をこのプロセスの初期の間に評価した。本発明者らは、まず、0.5 m p a における創傷閉鎖が、デバイスなしの動物と比較して M D T 群において有意に減少したことに気付いた ($p < 0.05$ ；図17)。M D T ー暴露動物は、バイオドーム群 ($1.25 \text{ cm} \pm 0.41 \text{ cm}$) 又はデバイスなし群 ($0.56 \text{ cm} \pm 0.17 \text{ cm}$) よりも有意に大きい $2.02 \text{ cm} \pm 0.40 \text{ cm}$ の平均創傷直径を表示した。遅延した創傷閉鎖は、18 m p a での再パターン形成

50

の成功を予測するものであったが、0.5 mpaにおいて最も大きい創傷部位を有した動物は、1.8 mpaにおいて最も大きい成長及び再パターン形成を示した。

【0168】

特定の理論に拘束されないが、創傷部位が大きいほど、より大きい芽体を提供し得、より多くの材料を四肢再成長に寄与させ得ることが予期される。図18に示されるように、芽体増殖を、増殖性細胞マーカーSOX2について免疫組織化学を介して評価した。MDT群では他の群と比較して有意にさらなるSOX2発現細胞が存在した ($p < 0.05$)。これは、新たな四肢を生じるより増殖性の組織が存在することを示している。そして、2.5ヶ月における軟組織は同様に予測されたが、対照と比較してMDT後肢において、組織がより厚く、骨長が増加した。2.5 mpaで得た蛍光画像により、MDT組成物への24時間の暴露が、幹細胞らしさを増加させ、創傷形成の障害が、早期の再生プロセスにおいてより長い再生体を結果として生じさせることが明らかになった。軟組織成長及び再上皮形成の増加もまたMDT-暴露群において切断術後2.5ヶ月で観察され、x線画像化によって確認される骨組織の長さの増加を映し出した。

【0169】

6. 再生誘発のトランスクリプトミクス解析

MDT処置への急性暴露に応答する遺伝子発現変化のより注意深い理解を得るために、介入の下流の転写機構を特性決定した。RNAシーケンシング (RNAseq) を、切断術後11時間、24時間、及び7日におけるMDT対非処置動物から得た芽体のトランスクリプトームを比較して実施した。デバイスなし処置と比較したMDT動物の遺伝子発現レベルを比較するヒートマップは、24HPAまで持続する、11HPAにおける有意な差次的遺伝子発現を示している。7DPAでは、しかし、動的遺伝子発現のレベルが通常に戻り、切断術の24時間以内の動的遺伝子発現の期間を示している。

【0170】

差次的に発現した遺伝子の数を、複数の試験によってp値を補正した後に求めた。Q値を0.05の偽発見率 (FDR) に設定し、差次的に発現した遺伝子を、このFDRをパスしたこれらの転写産物及び2のlog2倍数変化を示すものとみなした。MDT動物の芽体を非処置動物と比較したとき、切断術後7日にわたって発現プロファイルの大きな動的变化があった。過剰発現している又は発現下にある同じ遺伝子に、7日後の活性の切り替えの後、24時間経過させる。これらの遺伝子の劇的に改変された発現において狭くするために、FDRを3のlog3又は倍数変化に設定し、頂部の15の差次的に発現した遺伝子を群間で比較した。MDT-処置を野生型芽体組織と比較したとき、頂部の15の高度に上方調節された遺伝子が、切断術後11時間で最も高く発現する、神経調節 (例えば、脳特異的キナーゼ (BRSK)、神経ペプチドFF、D1Cドーパミン受容体、ニューロリギン) 脳に関係したことが見出された。この発現レベルは、切断術後 (dpa) 24時間及び7日で減少した。前部-後部軸の発達に關与する遺伝子Wnt7aもまた、切断術後 (hpa) 11時間で上方調節され、その後、切断術後7日で増加した。逆に、下方調節された主な遺伝子は、主として、筋肉構造 (ミオシン-4、ミクロフィブリル関連糖タンパク質) 及び代謝 (例えば、サルコリピン) に関連した。MDT-処置及び対照の芽体間で差次的に発現した遺伝子のパターンは、下方調節された遺伝子が11hpaから7dpaで増加したという点において、上方調節された遺伝子のものとは逆であった。

【0171】

MDT動物における高度に調節された遺伝子を、デバイスなしの動物における遺伝子と比較した。上方調節された遺伝子は、切断術直後の神経保護タンパク質の重要な役割を示唆する神経系特異的転写産物を含む。下方調節された遺伝子は、代謝及び筋肉関係転写産物を含み、リソースが、組織の安定化に向かって筋肉維持から離れる方に向かって示唆している。代謝及び生合成経路のGO分析により、7dpaで速度が増加する早期の下方調節 (11HPA及び24HPAにおける) が明らかになる。表1は、11hpa、24hpa、及び7dpaでのデバイスなし処置と比較した、MDT動物の遺伝子発現レベルを示す。

【表 1】

表 1

遺伝子名	11hpa	24hpa	7dpa
神経増殖分化及び対照タンパク質 1 様	4.43	3.76	-0.777
脳特異的キナーゼ 146L ホモログ	3.47	0	-1.81
神経ペプチド FF 受容体 1L ホモログ	3.37	2.59	-0.421
メタロホスホエステラーゼドメイン含有タンパク質 1	3.16	0.17	-1.1
MAM ドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカータンパク質 2 様	3.07	0.57	0.903
ニューロリギン-1 様	2.8	0.91	-1.27
タンパク質 Wnt-7a 様	2.79	2.46	-1.5
乏突起膠細胞系統転写因子 2L ホモログ	2.79	3.58	-0.419
脳由来神経栄養因子様	2.7	0	1.83
D(1C)ドーパミン受容体 S ホモログ	2.47	1.84	-0.516
過分極活性化環状ヌクレオチド依存性カリウムチャネル 1L ホモログ	2.45	3.09	-0.419
サルコリピン様	-3.33	-4.17	-3.71
セリンプロテアーゼ 33 様	0.86	-1.39	-3.73
ミオシン-4 様	-0.866	0.656	-3.81
トリプトファン水酸化酵素 1L ホモログ	0.855	1.01	-3.94
アルファテクトリン様	1.05	1.56	-4.19
マイクロフィブリル関連糖タンパク質 4 様 S ホモログ	0.589	2.91	-4.21
ミオシン重鎖、骨格筋様	-4.26	-3.76	-4.31
ミオシン-4 様	-3.02	-4.28	-4.9
カリウム／ナトリウム過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャネル 4 様	1.91	3.81	-4.95
キモトリプシン様プロテアーゼ CTRL-1	1.84	1.85	-4.97
ケラチン I 型細胞骨格 12 様	-1.19	-3.23	-5.08
ミオシン-4 様	-0.104	0.0797	-5.22
チロトロピン放出ホルモン L ホモログ	1.73	1.42	-5.23
レビチド (Levitide) S ホモログ	0.848	2	-5.87

【0172】

遺伝子のクラスを同定するエンリッチメント解析は、群間の生物学的プロセスのプロファイルの著しい差を示した。CEMiTool（共発現モジュール同定ツール）のウェブベースのバージョンを使用して、MDT（CT）及びデバイスなし（ND）の動物における共変遺伝子セットを同定した。高倍数変化の共変遺伝子セットをモジュール（M1-M4）に分類した。

【0173】

切断術（11hpa）後早期に、MDT及び対照間で異なる代謝調節に関与するさらなる遺伝子があった。また、この時点で、さらなる動的遺伝子発現がある。これは、MDTと、組織の再構造化又は細胞機能ランドスケープの再設定との間の遅く（7dpa）且つ大幅な変化を解決するものである。

【0174】

MDT-暴露によって調節されるプロセスのタイプを明らかにするために、リッチ化された経路を、「大規模機能」を考慮してグループ分けした。共発現分析により、四肢切断

術後11時間、24時間、及び7日における対照群及びカクテル処置群にわたる4の遺伝子モジュールを同定した。これらのモジュールは、共有の発現レベル及び統計的有意性に基づいた遺伝子のカテゴリー化を提示する。モジュール1は、損傷後の組織破壊を代表し得る、細胞外マトリックス組織化、コラーゲン形成、コラーゲン生合成及び修飾酵素、並びに、止血経路内で有意に提示された ($p < 0.00509$) 607の遺伝子を含んだ。モジュール2は、細胞間連絡及び接着を代表し得る、細胞結合組織化、ラミニン相互作用、細胞間連絡、細胞接着タンパク質のアポトーシス開裂、及び非インテグリン膜ECM相互作用に関連する経路内に有意に存在する ($p < 0.00009$) 142の遺伝子を含んだ。モジュール3における105の遺伝子は、筋肉の収縮、アセチルコリン活性、及び筋形成経路に有意に存在した ($p < 0.01096$)。モジュール4は、グルコース代謝、筋肉の収縮、グルコース新生、及び解糖経路内で有意に ($p < 0.00142$) 過剰提示された54の遺伝子を含んだ。モジュール2、3、及び4を有意にリッチ化 ($p < 0.00024$) し且つ全時点にわたってMDT処置芽体において上方調節したとき、前再生カクテルを受けたカエルが、バイオドームのみ及びデバイスなし対照と比較して、細胞通信、筋形成、及びグルコース代謝に関連する、持続性の遺伝子上方調節を有することを示唆している。対照的に、これらのモジュールをリッチ化したが ($p < 0.012$)、評価した全時点において処置デバイスを収容しなかった群においては下方調節した。しかし、7日の時点で、モジュール2を同じ非処置群において有意に上方調節した ($p = 0.00074$) が、これは、切断術後1週間での処置群及び非処置群間の細胞間連絡経路のエンリッチメントに殆ど差がないことを示唆している。非処置群において上方調節した ($p < 0.011$) ECM及びコラーゲン-エンリッチメントモジュール1を、全時点にわたって非処置サンプルにおいて下方調節する ($p < 0.00027$)。

【0175】

概して、M2、M3、及びM4を全時点にわたってMDT条件対ND条件において上方調節し、24HPAでピークに達した。11HPAで最も高度に且つ7DPAまで減少させてMDT条件において下方調節したM1は除く。

【0176】

7. 提供されるMDT組成物からの薬物の累積放出

デバイスヒドロゲルにおける多剤処置 (MDT) に関する累積放出を評価するために、MDT薬物のそれぞれを投入したヒドロゲルを1xDPBS (ThermoFisher) に懸濁させ、37°C (310.15 K) で25分間インキュベートした。上清を5分毎に収集し、それぞれの薬物の濃度を、マイクロプレートリーダーを介して求めた。それぞれの薬物/ヒドロゲル混合物が、同様の放出動態を示し、10分以内に合計薬物濃度の70%程度を放出し、投入した合計量の80%を超えては放出しなかった (レチノイン酸を除く、25分で薬物の全てを放出した)。

【0177】

本開示の他の特徴、目的、及び利点は、続く詳細な説明において明らかである。しかし、詳細な説明は、本開示の実施形態を示しているが、限定することなく実例としてののみ与えられていることが理解されるべきである。本開示の範囲内の様々な変更及び変形が、詳細な説明から当業者に明らかになるであろう。

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

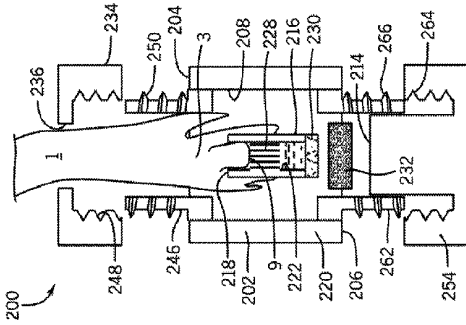


FIG. 1

【図 2】

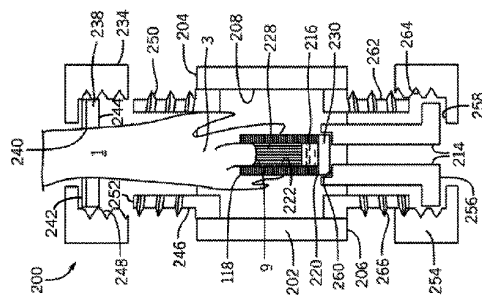


FIG. 2

【図 3】

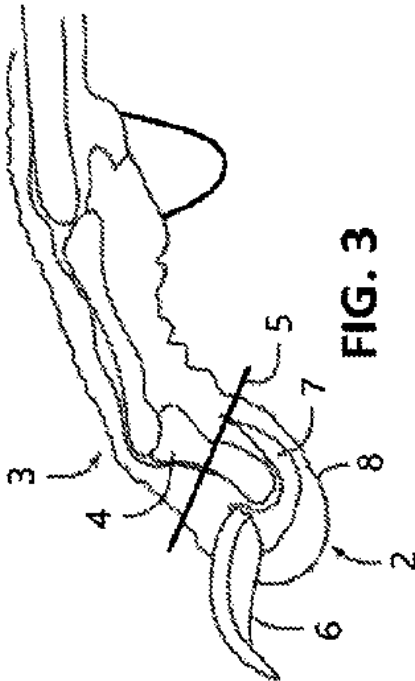


FIG. 3

【図 4】

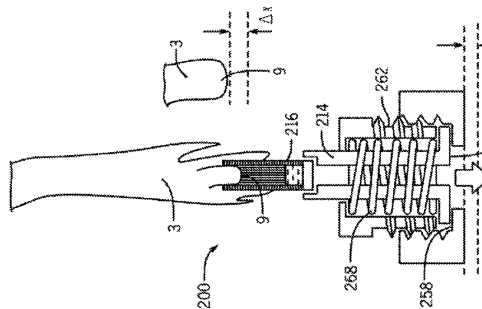


FIG. 4

10

20

30

40

50

【図 5】

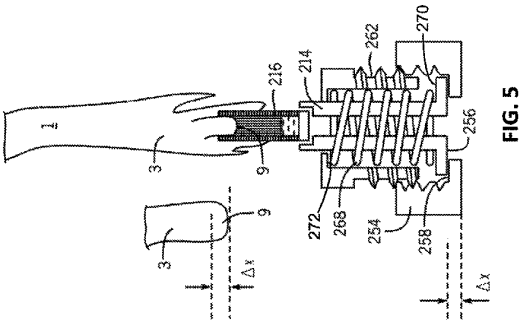


FIG. 5

【図 6】

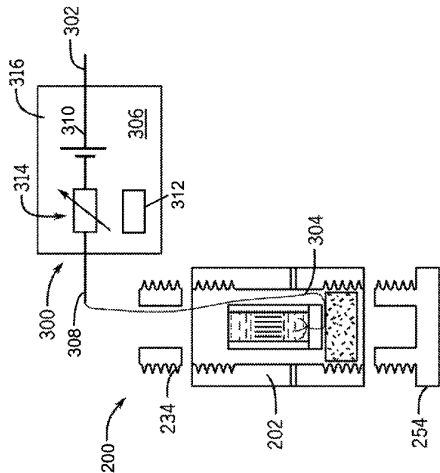


FIG. 6

【図 7】

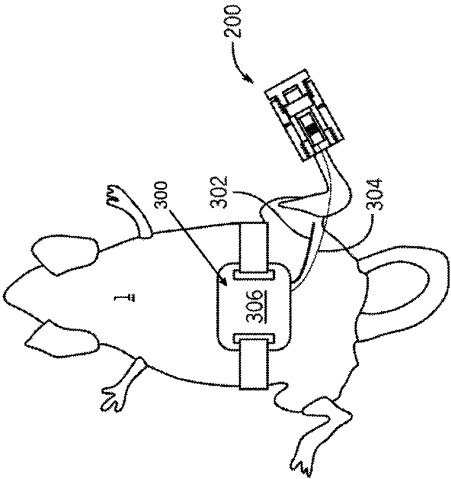


FIG. 7

【図 8 A】



FIG. 8A

10

20

30

40

50

【図 8 B】

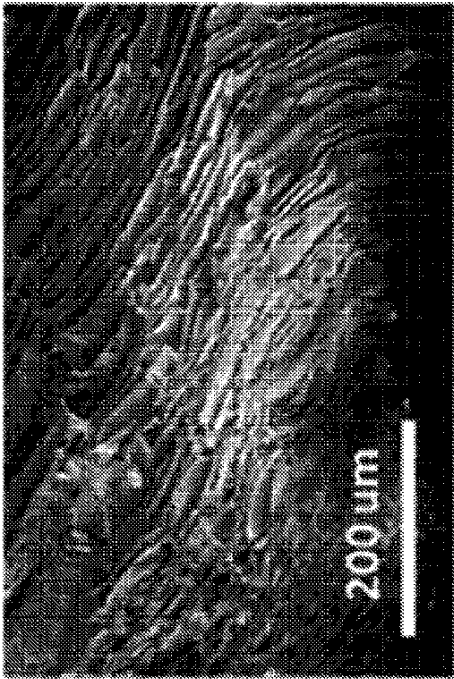


FIG. 8B

【図 8 C】



FIG. 8C

【図 8 D】



FIG. 8D

【図 9】

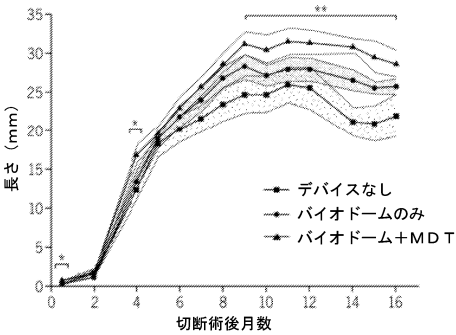


FIG. 9

10

20

30

40

50

【図 1 0】

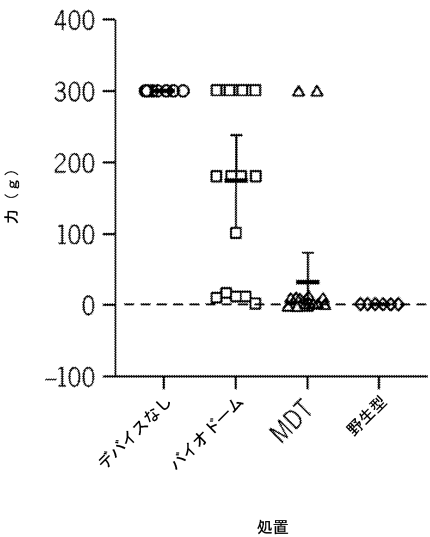


FIG. 10

【図 1 1】

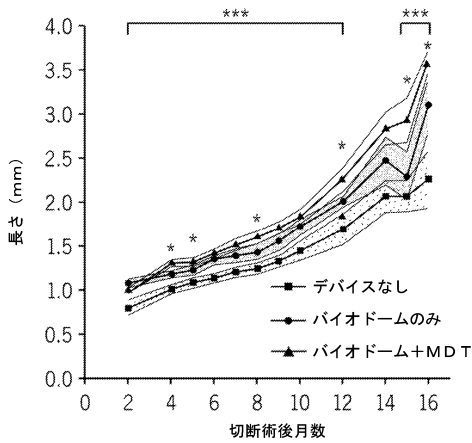


FIG. 11

【図 1 2】

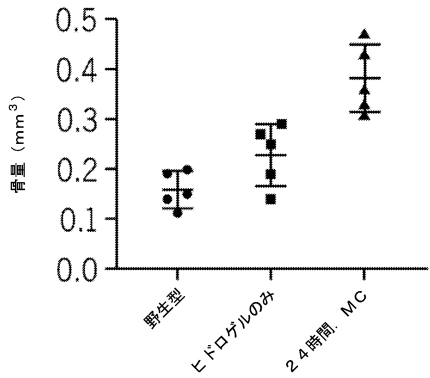


FIG. 12

【図 1 3】

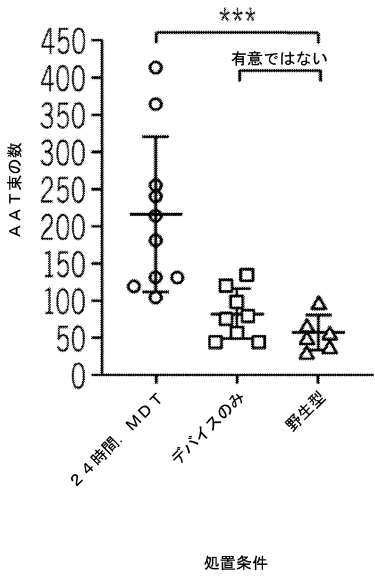


FIG. 13

10

20

30

40

50

【図 1 4】

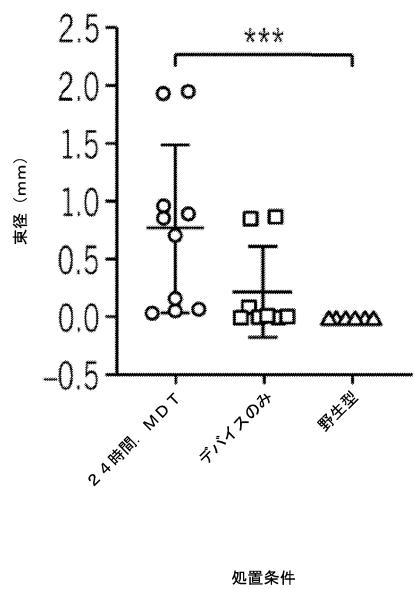


FIG. 14

【図 1 5】

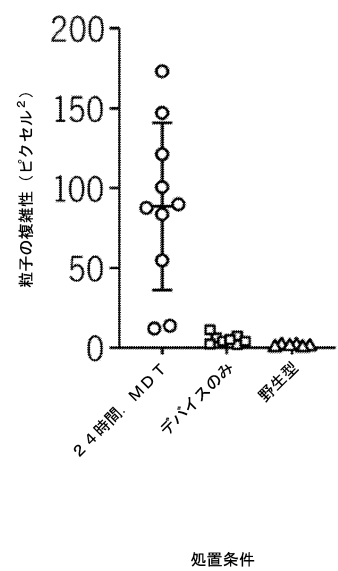


FIG. 15

【図 1 6】

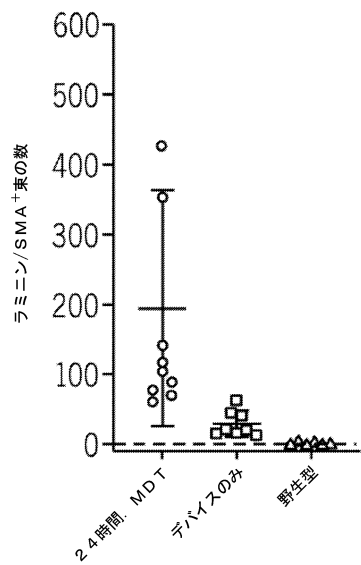


FIG. 16

【図 1 7】

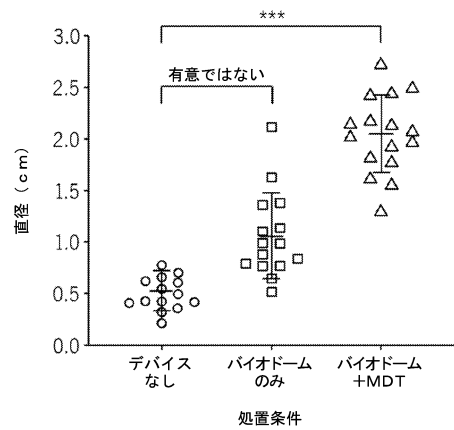


FIG. 17

10

20

30

40

50

【図 18】

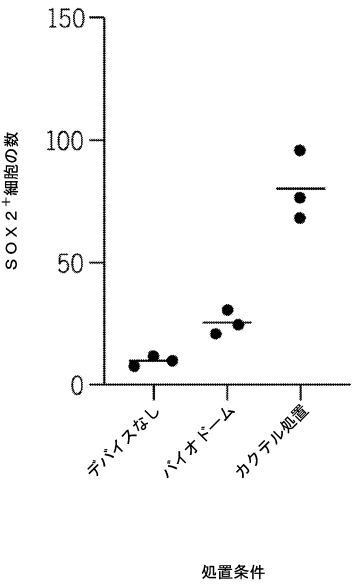


FIG. 18

【図 19】

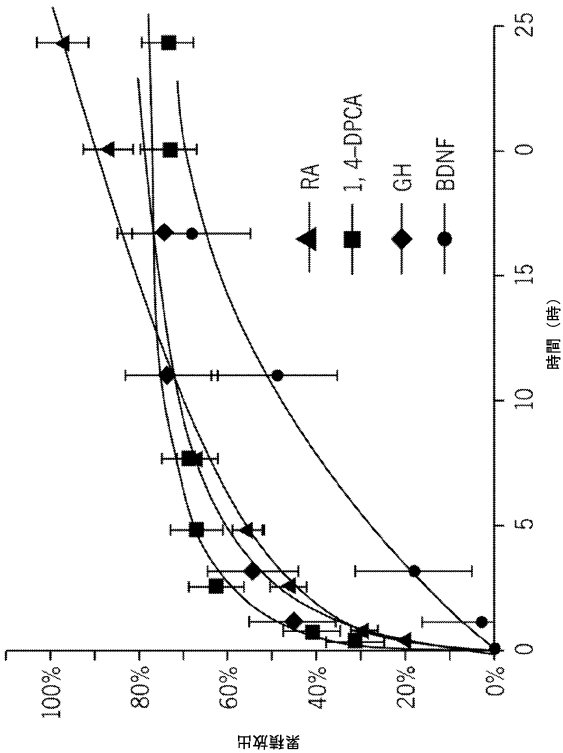


FIG. 19

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/202 (2006.01)	A 6 1 K	31/202
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19
A 6 1 K	38/30 (2006.01)	A 6 1 K	38/30
A 6 1 K	38/27 (2006.01)	A 6 1 K	38/27
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 N	1/20 (2006.01)	A 6 1 N	1/20

弁理士 柴田 潤二

(72)発明者 マイケル レビン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 01915, ビバリー, ネプチューン ストリート 44

(72)発明者 デビッド エル. カプラン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 01742, コンコード, ポンド ストリート 46

(72)発明者 ニロシャ ジェイ. ムルガン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 02155, メドフォード, バルー ホール, シー/オー ト
ラスティーズ オブ タフツ カレッジ

審査官 村上 勝見

(56)参考文献 特表2010-532224 (JP, A)

米国特許出願公開第2013/0245716 (US, A1)

米国特許第04911688 (US, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 M 35/00
A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 38/18
A 6 1 K 31/4745
A 6 1 K 31/203
A 6 1 K 31/202
A 6 1 K 38/20
A 6 1 K 38/19
A 6 1 K 38/30
A 6 1 K 38/27
A 6 1 P 17/02
A 6 1 N 1/20