

タログ番号102855、MP-Biochemicals製、最終溶液を、 $0.2\mu\text{m}$ のフィルターを通して無菌ろ過し、 4°C で保管した)中のAlexa-488標識ヤギ抗マウス抗体(カタログ番号A11029、Invitrogen製)の1:200希釈を加えて、室温で1時間インキュベートした。試料を、PBS中の $2\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 (カタログ番号H1399、Invitrogen製、 -20°C に保った $10\text{mg}/\text{ml}$ ストック)を用いて30分間対比染色し、PBS中で1回洗浄した。次いで、メンブレインを反転させ、再び24ウェルプレート上の $50\mu\text{l}$ のグリセロール中にマウントした。プレートを 4°C で保管し、1週間以内に走査した。

【0138】

Kinetic Scan (Cellomics製、V2.2.0.0 Build 19)を用い、Bio-applicationソフトウェアTarget Activation V2.0を使用して、画像を分析した。画像を、ハードドライブにCellomics専売特許のフォーマットで保存し、プレートを走査しながら分析した。陽性細胞の閾値に関する設定を、各染色のセッションについて、陰性細胞および陽性細胞のヒストグラムをプロットすることによって得た。固定の間にすべてのウェルから細胞が外れたプレートおよび信号が観察されなかったプレートは、最終的な分析には含めなかった。

【0139】

Opticell (登録商標)メンブレイン上で増殖させた細胞は、BrdUに対して、総計 $21.8 \pm 2.6\%$ 陽性であり、再生マトリックス上で増殖させた場合には、わずか $13.4 \pm 2.0\%$ 陽性に過ぎなかった。初期の接着の差を、接着の直後に細胞をカウントすることによって除外した(すなわち、接着した細胞の総数は、これら2つの試料で同一であった)。

【0140】

2時間で再生マトリックスに接着した線維芽細胞は、対照のOpticell (登録商標)の場合と同数であったが、核のサイズは低下し(多分、アポトーシスの第1段階を示す)、24時間の期間にわたり再生マトリックス上で増殖させた線維芽細胞の場合、BrdU陽性細胞の数は減少している(図28A~Cを参照)。これらの再生マトリックス上でより長期に増殖させた線維芽細胞培養物では、対照の培養物と比較して、線維芽細胞の密度が劇的に減少する(これらの線維芽細胞の一部は、アポトーシスを経ている)。図27は、 $5\mu\text{m}$ ろ過全血から作製した再生マトリックス上で5日間増殖させた線維芽細胞の増殖密度のこの差を示す。

【0141】

(実施例12)

再生マトリックスのヒトアストロサイトに及ぼす*in vitro*における効果
形態変化アッセイを、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)についての染色を使用して行う以外は、線維芽細胞に用いたと同一の処置および培養条件を、アストロサイトに対して使用した。ヒト初代アストロサイト(カタログ番号1800、Science Cell製、San Diego、カリフォルニア州)を、ポリ-D-リジンでコートしたプレート上の基本培地(Astrocyte Medium、カタログ番号1801、Science Cell製)中で培養し、コンフルエンスで継代した。相互作用実験の前日に、細胞をトリプシン処理した後、カウントし、ポリ-D-リジンでコートした96ウェルプレート(カタログ番号354461、BD Falcon製)中にウェルあたり2000細胞で、BrdUのために蒔いた。

【0142】

各パッチについて、上記の分析のために、開始後第0日、第6日、第12日、第15日、第18日および第21日において、試料を採取した。各処置を、各測定について、4回反復した(例えば、試料あたり4つのウェル)。増殖のために、再生マトリックスの存在下の2日後に、BrdU(カタログ番号203806、EMD Biosciences製)を、増殖培地中に、 $400\mu\text{M}$ ストックを1:20で $200\mu\text{l}$ の培地に希釈することによって、 $20\mu\text{M}$ まで添加した。細胞を、 37°C 、 $5\%\text{O}_2$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 、残りはN

2で、さらに1.5時間インキュベートした。培地をデカンテーションによって除去し、細胞を、氷冷70%エタノール（カタログ番号UNI170、EM Science製）を用いて、15mMグリシン（カタログ番号G-8790、Sigma製）中に固定した。固定した細胞を、-20℃で少なくとも24時間保管した。BrdUの検出のために、細胞を、200μlのPBS（カタログ番号MT21-030-CM、Mediatech製）中で1回洗浄し、Kit I I用モノクローナル抗BrdU抗体-スクレア-ゼ試薬（カタログ番号1299964、Roche製）の1:80希釈で処置し、37℃で1時間インキュベートした。細胞をPBS中で2回洗浄し、ブロッキング緩衝液（10%正常ヤギ血清：カタログ番号S26-100M、Chemicon製、5%BSA：カタログ番号2910、Omnipure製、0.1%サポニン：カタログ番号102855、MP-Biochemicals製、最終溶液を、0.2μmを通して無菌ろ過し、4℃で保管した）中のAlexa-488標識ヤギ抗マウス抗体（カタログ番号A11029、Invitrogen製）の1:200希釈を加えて、室温で1時間インキュベートした。試料を、PBS中の2μg/ml Hoechst 33342（カタログ番号H1399、Invitrogen製、-20℃に保った10mg/mlストック）を用いて30分間対比染色し、PBS中で1回洗浄し4℃で保管し、通常1週間以内に走査した。エタノール固定および保管の後、細胞を、2N HCl（カタログ番号2612-14、Mallinckrodt chemicals製）を用いて30分間処理し、100mM Tris、HCl pH8.5（カタログ番号9230、Omnipure製）で中和した後、PBSで2回洗浄した。細胞を、ブロッキング緩衝液中のAlexa-488標識モノクローナル抗BrdU抗体（カタログ番号MD5420、Caltag laboratories製）の1:200希釈の50μl中で、4℃で16時間インキュベートした。細胞を、PBS中で2回洗浄し、ブロッキング緩衝液中のAlexa 546標識ヤギ抗マウス（カタログ番号A11030、Invitrogen製）を加えて3時間インキュベートした。細胞を、PBS中の2μg/ml Hoechstの200μl中で対比染色し、PBS中に保管した。KineticScan（Cellomics製、V2.2.0.0 Build 19）を用い、Bio-applicationソフトウェアTarget Activation V2.0を使用して、画像を分析した。画像を、ハードドライブにCellomics専売特許のフォーマットで保存し、プレートを走査しながら分析した。陽性細胞の閾値に関する設定を、各染色のセッションについて、陰性細胞および陽性細胞のヒストグラムをプロットすることによって得た。固定の間にすべてのウェルから細胞が外れたプレートおよび信号が観察されなかったプレートは、最終的な分析には含めなかった。概して、再生マトリックスの存在下で培養したアストロサイト（13.9±2.3%）は、再生マトリックスなしで培養したアストロサイト（18.5±2.4%）よりも少ないBrdU陽性の核を有し、これは、多分、再生マトリックスで処置した脊髄損傷では、対照と比較して、より少ないグリアの瘢痕化が観察されたことの説明となるであろう。

【0143】

（実施例13）

再生マトリックスの損傷したラット脊髄に及ぼすin vivoにおける効果
再生マトリックスのin vivo活性を評価するために、脊髄損傷モデルの3つのラットモデルを使用した。

【0144】

- ー 完全横切（5mm欠陥）
- ー 片側切断（5mm欠陥、右側）
- ー 挫傷（50mm重量落下）

すべての動物実験を、手術および手術後の標準的な動物の世話の手順を含むIACUC承認プロトコルを使用して行った。これらの実験には、ヌードラット（Biomedical Research Models, Inc. 製、Worcester、マサチューセッツ州）を使用して、ヒト再生マトリックスに対する免疫学的な反応を最小化した。

脊髄にアクセスするために、T8からT11までの脊椎上、正中線で切開し、皮膚および背外側腰椎帯膜を後退させた。脊椎の両側を、鈍的切開によって曝露させた。背側椎弓切除を、T8～T9レベルで行った。硬膜を切断した後、後退させ、脊髄を曝露させた。横切研究では、T8とT9との間で切断した、脊髄の完全な厚さの区域を、長さ5mmに切断し、慎重に取り出した。片側切断SCIモデルでは、上記で記載したように脊髄を曝露させ、右側に、5mmの欠陥を、脊髄中に外科的に生み出した。再生マトリックスのインプラントを使用して、欠陥を満たした。硬膜、上部の靱帯、筋肉および皮膚を、縫合によって閉じた。挫傷モデルでは、脊髄の曝露させた硬膜を、NYU IMPACTORを使用した50mm重量落下によって激突を生じさせた後、ラットを、損傷後2週間回復させた。2週間回復させた後、ラットに、再生マトリックスを、損傷領域に隣接する脊髄中に外科的に移植した。すべてのラットを、それらが属するケージで回復させ、感染を予防するために、抗生物質の皮下注射を3日間投与した。すべてのラットの感覚機能および運動機能を、BBB神経学的スケールの改変版(Basso, D. M. ら、「A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats」、J. Neurotrauma、12巻、1～21頁、1995年)に従って定期的に評価した。BBBスコアを、表12および13に列挙した判断基準を使用して、約2週間に1回記録した。

表12. Basso、BeattieおよびBresnahanの歩行運動評価スケール【0145】

【化15】

評価	歩行運動の描写
0	後肢(HL)の運動が観察されない
1	1つまたは2つの関節(通常、股関節および/または膝関節)のわずかな運動。
2	1つの関節の広範な運動、または1つの関節の広範な運動 および もう1つの関節のわずかな運動。
3	2つの関節の広範な運動。
4	HLの3つの全関節のわずかな運動。
5	2つの関節のわずかな運動および第3の関節の広範な運動。
6	2つの関節の広範な運動および第3の関節のわずかな運動。
7	HLの3つの全関節の広範な運動。
8	重量を支えることのない掃引、または重量を支えることのない足の足底の配置。
9	立位のみ(すなわち、静止状態)で重量を支える足の足底の配置、あるいは稀に、頻繁にまたは常時重量を支える、足底の歩行ではない、背部での歩行。
10	稀に重量を支える足底の歩行はあるが、FL-HLの協調は欠く。
11	頻繁から常時の頻度で重量を支える足底の歩行はあるが、FL-HLの協調は欠く。
12	頻繁から常時の頻度で重量を支える足底の歩行、および稀なFL-HLの協調。
13	頻繁から常時の頻度で重量を支える足底の歩行、および頻繁なFL-HLの協調。

【0146】

【化 16】

14	常時重量を支える足底の歩行、常時のF L - H Lの協調；さらに、足が表面と最初に接触するときおよび姿勢の終わりに足を持ち上げる直前の歩行運動の間に優勢な足底の位置が（内側または外側に）回転するまたは頻繁な足底の歩行が生じ、常時のF L - H Lの協調ならびに稀な臀部での歩行。
15	常時の足底の歩行および常時のF L - H Lの協調；ならびに、肢の前進の間に、つま先のすき間がないか稀にあり、優勢な足底の位置が最初に接触するときには、体に平行である。
16	歩みの間の常時の足底の歩行および常時のF L - H Lの協調；ならびに、肢の前進の間に、つま先のすき間が頻繁に生じ、優勢な足底の位置が、最初に接触するときには平行であり、持ち上げるときには回転する。
17	歩みの間の常時の足底の歩行および常時のF L - H Lの協調；ならびに、肢の前進の間に、つま先のすき間が頻繁に生じ、優勢な足底の位置が、最初に接触するときおよび持ち上げるときに平行である。
18	歩みの間の常時の足底の歩行および常時のF L - H Lの協調；ならびに、肢の前進の間に、つま先のすき間が常時生じ、優勢な足底の位置が、最初に接触するときには平行であり、持ち上げるときには回転する。
19	歩みの間の常時の足底の歩行および常時のF L - H Lの協調；ならびに、肢の前進の間に、つま先のすき間が頻繁に生じ、優勢な足底の位置が、最初に接触するときおよび持ち上げるときに平行であり、かつ、尾が、期間の一部または全部で下がっている。
20	常時の足底の歩行および常時の協調した歩み；つま先のすき間が常時生じ、優勢な足底の位置が、最初に接触するときおよび持ち上げるときに平行であり；ならびに、体躯が不安定であり、尾が常に上がっている。
21	常時の足底の歩行および常時の協調した歩み、つま先のすき間が常時生じ、優勢な足底の位置が、姿勢の間を通して平行であり、体躯が常に安定であり、ならびに、尾が常に上がっている。

(表 13. B B Bの定義)

【0147】

【化 17】

歩行運動	定 義
わずか	関節の運動範囲の半分未満の部分的な関節の運動
広範な	運動範囲の半分超の運動
掃 引	3つの全関節が伸展し、次いで、完全に屈曲し、再び伸展するH Lの律動的な運動；通常、動物は、横臥し、足の足底表面は、地面に接触していてもよいし、接触していてもよい。H Lにわたって重量を支える状態は、明らかではない

【0148】

【化18】

重量を支えることのない	足の足底の配置の間にHLの伸筋の収縮もなく、後四半部を持ち上げることもない
重量を支える	足の足底の配置の間にHLの伸筋の収縮があるか、後四半部を持ち上げる、すなわち、歩行の間に後四半部および腹部の位置に変化が生じるか否かを観察する。
足底の歩行	足が足底で接触し、重量を支え、次いで、HLが前進し、重量を支える足底の接触が再確立される
背部での歩行	歩行サイクルの何らかの時点で、足の背部表面を介して重量を支える
FL-HL の協調	FL歩行の度に、HL歩行が起こり、次いでHL歩行に代わる (続けて3ステップ超が生じる期間に限って評価する)
稀	<50%
頻繁	51-94%
常時	95~100%、歩行が生じない長期の発作がない場合に限る。
体躯が不安定である	横方向の体重の移動があり、これによって、左右によたついたり、体躯が部分的に倒れたりする。

15 a. 完全横切脊髄損傷ラットモデル

図29は、ラットにおける完全横切研究からの結果を示し、ここでは、横切損傷を再生マトリックスで満たし、対照としては、すき間を血液で満たした。一般的に、脊髄損傷の重症度のために、この種の研究に関連する死亡率のレベルが高く、ここでの結果は、少なくとも第6週で生存したラットにおける神経機能の状態を描写する。BBBスコアを、2週間隔で、移植後12から14週間までモニターした。再生マトリックスを移植し、損傷／移植後少なくとも第6週で生存した7匹の全ラットは、改善されたBBBスコアを示した(図29)。最大の増加が、移植後第6~8週で見られた。少なくとも第6週で生存した3匹の対照ラットは、12週間の評価期間にわたり、実質的な改善を示さなかった。

【0149】

さらに、再生マトリックスを移植したラットにおいては、病変(囊腫)の数および脊髄損傷(手術)部位の上下の各病変の平均体積が、対照ラットと比較して、顕著に減少した(図30)。これは、再生マトリックスが、これらの動物モデルにおいて神経保護効果を示し、その結果、損傷部位の上下における神経組織の保護が高まることを意味する。

【0150】

15 b. 片側切断脊髄損傷ラットモデル

図31は、再生マトリックスを、片側切断によって損傷させた脊髄中に移植した結果の概要を示す。片側切断SCIモデルでは、上記に記載したように脊髄を曝露させた後、脊髄中に5mmの欠損を右側に外科的に生み出した。このモデルは、横切モデルほどには過酷ではなく、ラットは、正常にある程度まで機能することができる。例えば、外科的に誘導した欠損があっても、膀胱の制御は可能であるが、右後肢の運動機能は損なわれる。再生マトリックスを移植する(n=4)と、非移植対照(n=2)と比較して、生存率が上昇し、機能が回復した(n=3)。非移植対照ラットは、第1週における最初のBBB評価の期間の前に死亡した。

【0151】

15 c. 挫傷脊髄損傷ラットモデル

挫傷モデルでは、硬膜を下部の脊髄と共に曝露させ、SCIを、MASCIS IMPACTOR(以前は、NYU IMPACTOR、W. M. Keck Center for Collaborative Neuroscience、Rutgers University製、Piscataway、ニュージャージー州)を使用した50mm重

30

40

50

量落下によって誘発した。ラットを2週間回復させ、次いで、第2の手術を行い、脊髄を曝露させ、再生マトリックスを、損傷領域に隣接させて留置した。図32は、再生マトリックスの移植は、挫傷によって損傷した脊髄を有するラットにおいてもまたBBBスコアを改善することを示す。この研究では、25匹のラットが、脊髄上に与えた挫傷による損傷を有し、19匹のラットは、挫傷後第2週で生存していた。生存したラットのうち、11匹のラットに再生マトリックスを移植し、8匹は対照となり、これらは、生物学的に不活性化した移植を行うか、第2の手術を行わない（したがって、移植なし）のいずれかとした。損傷後第6週で、9匹のマトリックス移植ラット、4匹の不活性化マトリックス移植ラット、および3匹の非移植対照ラットが生存していた。これらの生存ラットについてのBBBスコアを、2週間隔で評価した（図32）。再生マトリックス移植ラットは、完全横切モデルおよび片側切断モデルの場合と同様に回復した。生物学的不活性化マトリックス移植ラットは、部分的に回復し、これは、再生マトリックスの構造上の特性単独でも、マトリックスを投与されなかった対照を上回る顕著な再生の可能性を有することを示している。対照ラットのうちの1匹は、相当な自発的な回復を明らかに示し、これは、不完全な損傷によるものと思われた。しかし、第2の手術の軽度ではあるが、測定可能な衰弱性の効果を、移植マトリックスが克服し、その結果、ラットの顕著な改善を得た。

【0152】

（実施例16）

ヒト再生マトリックスは、実験的脊髄損傷を有するブタにおいて安全で、相容性がよく、機能の回復を支持する

実験的なパイロット研究において、ブタ、雄、体重20から45kgに、異なる種類の脊髄損傷（衝撃、貫通、裂傷、外科的片側切断）を与え、ヒト再生マトリックスまたはブタフィブリン製のプラグを損傷部位に留置した。各種の損傷がブタの歩行運動および感覚の機能性に及ぼす結果についての見解を発生させるため、ならびにどの損傷モデルにおいて再生マトリックスが最もよく働くと思われるかの見解を得るために、異なるモデルを試験した。ヒト再生マトリックスには、SCIを有するブタにおいて機能回復を促進する明確な傾向があり、最も顕著な効果が、裂傷および脊髄組織の欠損を生じる重度の衝撃による損傷で見られた。また、これらの実験は、再生マトリックスインプラントの相容性および想定される安全性を評価する機会も提供した。ブタの脊髄は、T2からL2までの微小環境の点でヒト脊髄と98%超同一であり、したがって、再生マトリックスがヒト脊髄において示す恐れのある、何らかの想定される安全性の懸案事項を決定するための良好なモデルとなる。1～3カ月の間隔をおいた2回に分けた手術で、再生マトリックスを脊髄に2回注入した3匹のブタを含む、ヒト再生マトリックスを移植したいずれのブタにおいても、安全性の懸案事項は検出されなかった。対照ブタと再生マトリックスを移植したブタとの間には、体重ならびに挙動の点で有意な差は見出されなかった。挙動としては、摂食、飲水、社会的相互作用、ならびに排尿および排便の挙動について動物の管理の間に行った一般的な観察があげられる。これは、再生マトリックスが、ブタに移植する場合、相容性がよく、比較的無毒性であることを示している。

【0153】

いくつかのブタにおいて移植1カ月後に採取した組織試料に、Thj-1染色を行ったところ、移植した再生マトリックスが、脊髄損傷の部位において新たな神経細胞の形成を誘導していたことを示した。図37は、移植した再生マトリックスが、移植1カ月以内に新たなTu-j-1陽性神経細胞の形成を誘導するのを示す（200倍の倍率で示す）。

【0154】

これらの予備的なパイロット研究は、ヒト再生マトリックスが、SCIを有するブタにおいて歩行運動の回復を促進することを示唆した。図33は、これらの予備研究の結果を示し、そこでは、改変したASIAスコア化システムを使用して、これらのブタにおける神経学的な回復を評価した。いくつかのブタは、外科的損傷の重症度のために非常に低いASIAスコアで出発したが、その他のブタ（対照ブタのすべてを含む）は、外科的損傷がそれほど重度ではなく、したがって、より高いASIAスコアで出発した。

【0155】

これらのパイロット研究の完了後、7週間の完全二重盲検安全性研究は、ヒト再生マトリックスが、実験的脊髄損傷を与えたブタにおいて、安全で、耐容性がよいことを実証した。これらの二重盲検研究では、ブタに、T8～T9の脊髄の右側に局在する外科的に誘発したSCI-5mm離れた二重片側切断後、脊髄の5mm長の小片を除去を与え、ヒト再生マトリックスまたは同等の量のホモゲナイズしたヒト血餅のいずれかを移植した。左側の脊髄は、実験的手術および移植に関係する非特異的毒性の対照とした。すべてのブタを、全体的な健康状態、体重および歩行運動応答の変化について、SCIおよび移植の後、7週間定期的に観察した。

【0156】

最初に、16匹の、年齢および体重が一致するブタを、各2匹の8群にランダムに割り付け、これらにヒト再生マトリックスまたはヒト血餅のいずれかを移植した。4匹のブタ再生マトリックス処置群で2匹、および血餅処置群で2匹が、重度の脊髄損傷を与えてからほどなくして死亡した。これは、ヒト再生マトリックスは、血餅移植群と比較して、死亡率の増加と関係がないことを示している。

【0157】

ブタにおける再生マトリックスの移植は、血餅を移植した対照ブタと比較して、耐容性がよく、通常は安全であると思われた。図34は、2つの群における週毎のブタの体重増加の概要を示し、それらを比較する。最初の5週間では、ブタの総体重増加の平均について差は検出されなかったが、研究期間の最後の2週間では、再生マトリックス移植ブタの体重増加が対象ブタを上回った。これらのデータは、再生マトリックスが、ブタにおいて耐容性がよく、全身毒性がないことを示唆している。さらに、データは、研究期間の最後の2週間では、再生マトリックス移植ブタは、対照ブタよりも多くの筋肉量がつき始めたことを示唆している。

【0158】

すべてのブタにおいて、歩行運動機能を、動物の後脚のための改変したASIA Sensory and Motor Skillスコア化システムを使用して、SCI後、最初は第72時で、次いで、1週間毎に測定した。図35は、再生マトリックス移植ブタまたはホモゲナイズした血餅移植ブタの歩行運動スコアを示す。

【0159】

これらの研究では、Sensory and Motor Skillベースラインスコアを、外科的SCIおよび移植の72時間後に測定し、初期値として使用し、次いで、1週間毎に7週間スコアを決定した。両方の研究群のブタは、外科的SCIの第1週以内に、歩行運動機能および感覚機能を（脊髄ショックから）回復し始め、これらの値は、移植後第2～4週で、一定のレベルに達した。この第2～4週の時期の間では、再生マトリックス移植群と血餅移植群とで、歩行運動機能および感覚機能について、有意な差を観察せず、これは、再生マトリックスは、SCIブタにおける機能の回復を妨害することなく、脊髄の機能をさらに障害することもないことを示している。

【0160】

感覚機能および歩行運動機能の回復のさらなる増加を、SCI後、およそ第4～6週で、ほとんどのブタで観察した。これらの後期の時点では、血餅移植ブタにおいて観察した回復のレベルよりも、再生マトリックス移植ブタにおいて観察した回復のレベルの方が高かった。第7週の時点でのこれら2群の差を詳細に分析すると、再生マトリックスを受けたブタの右側（損傷を与えた側）の機能に有意な改善（ $p=0.03$ ）があることが示されている（図36）。この第7週の時点で、再生マトリックス移植群内に、対照群よりもはるかに大きいばらつきがあることは、再生マトリックスの生物学的活性が、そのエンドポイント（最終的な運動のスコア）値にまだ達していないことを示している。エンドポイントは、約16週であろう推定された。

【0161】

総合すると、これらの研究は、ブタにおいては、再生マトリックスが、安全で耐容性が

10

20

30

40

50

よく、外科的に誘導したSCI後の感覚および歩行運動の回復を促進することを示している。

【0162】

(実施例17)

ラットGLP毒物学研究

再生マトリックスの移植に関連する全身毒性の可能性を評価するために、GLP、ISO 10993-11に準拠した前臨床研究を策定し、NAMS A (Northwood、オハイオ州)で行った。この研究では、再生マトリックスを、14匹のラット(7匹の雄および7匹の雌)の皮下組織に移植した。対照物質(無菌0.9%食塩水)を、14匹のラット(7匹の雄および7匹の雌)からなる別の群に同様に移植した。ラットを、死亡率および毒性の顕性の兆候について毎日観察した。疾患および異常の臨床的な兆候についての詳細な検査は、毎週行った。移植前および研究を通して1週間毎にラットの体重を求めた。

10

【0163】

第4週において、ラットを安楽死させ、血液学分析および臨床化学分析のために血液検体を採取した(すべての分析は、NAMS Aによって行われた)。死体解剖を行い、選択した臓器を切除、秤量および組織学的に処理した。各ラットから、各移植部位の周囲の皮下組織もまた切除し、顕微鏡的に検査した。移植部位および選択した臓器の顕微鏡的評価は、正規の病理学者が行った。体重、臓器重量、臓器重量/体重の比、血液学の値および臨床化学の値を、統計学的に分析した。

20

【0164】

データからは、ラットにおいて、皮下移植後の試験物質(再生マトリックス)からの全身毒性の証拠を得なかった。毎日の臨床的観察、体重、死体解剖知見、ラット臓器重量および臓器重量/体重の比は、許容限界内であり、試験処置群と対照処置群との間でも、それぞれの群の中でも類似した。雄のラットまたは雌のラットのいずれにおいても、生物学的に有意であるまたは試験物質を用いた処置に関連すると考えられる血液学の値および臨床化学の値の変化はなかった。選択した組織の顕微鏡的評価からは、再生マトリックスを用いて処置した群において、全身毒性の証拠を得なかった。組織学的判断基準に基づくと、雄のラットおよび雌のラット中の再生マトリックスは、食塩水である参照の対照材料と比較すると、中等度の刺激物質であると考えられた。この後者の知見は、生体吸収性材料の評価のためのこの試験施設の経験の範囲内であり、異種間の移植(この場合、ヒト全血から誘導した再生マトリックスをラットに移植した)としては低い範囲に属している。結論として、種を越えた再生マトリックスの局所注入は、何らかの顕著な毒性を生じることではなく、再生マトリックスをヒトSCI患者に移植しても、再生マトリックスが局所的な病態を起こすことはないであろうということが示唆される。

30

【0165】

(実施例18)

脊髄再生研究からの切片の顕微鏡的評価

10mm長の脊髄が外科的に除去されている実験ラットに、再生マトリックスを移植した。10日後に、脊髄を、組織学的に検査した。顕微鏡的には、脊髄欠陥の中心は、中心の軸索の重度のウォーラー変性および好中球の壊死からなり、これは、1cm長の脊髄の外科的除去によって生じた中心から約4.5mmの半径(1cmの全幅)で伸長していた。再生マトリックスインプラントの周囲には、反応性のグリア細胞および格子細胞のシートが存在し、これらの中には、ヘモシデリンを有するものもあり、さらに、明らかに原始的な間葉系/網様型の細胞のシートも存在し(図38Aおよび38Bを参照)、これは、脊髄欠陥内に広がりつつある(脊髄欠陥を満たしつつある)ように見えた。これらの細胞は、新たな神経組織の発生および脊髄の再生に関与すると思われた。欠陥の周辺には、反応性の線維増殖を伴う軟膜の肥厚が存在した。線維増殖は、これらの明らかに原始的な間葉系/網様型の細胞を支持する枠組みとして、軟膜に沿って広がっているように見え、損傷した脊髄の再生を支持しているよう思われた。

40

50

【0166】

前述の説明は、本来、説明のためのものであって、本発明、または本発明の応用もしくは使用に関する詳説を制限するためのものではない。当業者であれば、本明細書に記載する本発明の1つ以上の実施形態に、特定の改変をなすことができることが理解されるであろう。しかしながら、そのような改変は、本発明の範囲内である。発明を実行するための別の方法および材料、ならびに追加の応用例が、当業者には明らかであろう。それらは、随伴する請求の範囲内に含まれることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【0167】

随伴する図面を参照すると共に、以下の詳細な説明を参照することによって、本発明の前述の特長がより容易に理解されるであろう。図中、「RMx」は、再生マトリックスを指す。

【図1】図1A、1Bおよび1Cは、マクロファージのフォン・ヴィレブランド因子陽性内皮様細胞への分化形質転換を示す。2A：ブタにおける移植2週後の脊髄損傷および再生マトリックス移植の部位のマクロファージ（明るい染色）およびフォン・ヴィレブランド因子（+）（暗い染色）細胞。二重染色が黒色に写っている。200倍の倍率で示す。2B：黒い染色＝フォン・ヴィレブランド因子を発現するマクロファージ（明るい染色）。400倍の倍率で示す。2C：フォン・ヴィレブランド因子を発現するマクロファージが、血管を形成しつつある。400倍の倍率で示す。

【図2】図2A、2B、2Cおよび2Dは、ラットの脊髄組織に対する再生マトリックスの治療効果を示す。Aは、再生マトリックス非存在下の健康な血管を有する健康なラットの脊髄を示す。Bは、CNS組織がほとんど見えず、健康な血管が存在しない損傷したラットの脊髄を示す。Cは、再生マトリックスを用いて治療した、損傷したラットの脊髄の光景を示し、ここでは、再生した健康なCNS組織および血管の横断面が見えている。Dは、Cの損傷した脊髄組織の別の光景であり、再生したCNS組織および健康な血管の縦方向切片を示す。

【図3】図3は、Opticeil（登録商標）生成用カセットに含有されている、非凝固血および1.2μmの最終ろ過を使用して生成した再生マトリックスの写真である。

【図4】図4は、ヒト全血から作製した3週が経過した再生マトリックスのパラフィン切片を示す。再生マトリックスは、未変化の細胞または核の兆しを何ら示さない。ヘマトキシリン染色は、分析したすべての切片において完全に陰性であったが、材料は、エオシンで強く染色した。高い数値の開口レンズ（高解像度）を使用すると、ビーズ様構造を明確に分解することができる。RMxの大部分をなすビーズ様構造以外に、より緻密な構造からなると思われる平坦なシートの小さな領域を観察することができる。

【図5】図5A、5B、5Cおよび5Dは、凝固血および5μmの最終ろ過を使用して生成した再生マトリックスの走査型電子顕微鏡写真を示す。A－200倍、B－1000倍、C－7500倍、D－7500倍。

【図6】図6A、6B、6Cおよび6Dは、凝固血および1.2μmの最終ろ過を使用して生成した再生マトリックス（第21日）の走査型電子顕微鏡写真を示す。A－200倍、B－1000倍、C－7500倍、D－7500倍。

【図7】図7A、7B、7Cおよび7Dは、非凝固血（EDTAを使用）および1.2μmの最終ろ過を使用して生成した再生マトリックス（第21日）の走査型電子顕微鏡写真を示す。A－200倍、B－1500倍、C－5000倍、D－10000倍。

【図8】図8は、非凝固血および1.2μmの最終ろ過を使用して形成した再生マトリックスの光学顕微鏡写真（100倍の倍率）を示す。

【図9】図9は、組織試料から調製し、5μmのフィルターを通した21日が経過した再生マトリックスの透過型電子顕微鏡観察（TEM）を示す。このTEMでは、走査型電子顕微鏡写真（図5～7）に見られた丸みのある球が、これらの球からなるはるかに大きく、比較的均質な構造または凝集体の一部となっていることが明らかである。核の証拠はない。

10

20

30

40

50

【図10】図10は、ヒト全血から作製した8週が経過した再生マトリックスの透過型電子顕微鏡観察を示す。再生マトリックスは均質に染色し、各凝集体の外側表面は、3週が経過した再生マトリックス（図9を参照）よりも、突き出ている球がより大きく、幾分か蜂巣状の形状（粒子の最も有効な配置方法）であった。再生マトリックスの多くの新しい凝集体が、再生マトリックス材料の長い糸に沿って形成された。

【図11】図11は、ヒト全血から作製した8週が経過した再生マトリックスの透過型電子顕微鏡観察を示す。再生マトリックスは均質に染色し、各凝集体の外側表面は、3週が経過した再生マトリックス（図9を参照）よりも、突き出ている球がより大きく、幾分か蜂巣状の形状（粒子の最も有効な配置方法）であった。

【図12】図12Aおよび12Bは、5つの異なるバッチからの再生マトリックスのSDS-PAGE分析を示す。第15日（A）および第21日（B）の再生マトリックス中の全タンパク質を、クーマシーブルーで染色した。主なタンパク質の種は、1～6の番号を付けて示し、それぞれのデンストメトリーのグラフに示す。分子量の標準（KDa）をゲルの左側に示す。

【図13】図13は、対照と比較した、 α -アamaniチン（RNA II ポリメラーゼ阻害剤）、アフィディコリン（DNAポリメラーゼ阻害剤）またはシクロヘキサミド（タンパク質合成阻害剤）の存在下で形成した再生マトリックスおよび第21日の培養物の上清（5 μ mでろ過）中の全RNA含有量（ μ g）を示す。

【図14】図14は、対照と比較した、 α -アamaniチン（RNA II ポリメラーゼ阻害剤）、アフィディコリン（DNAポリメラーゼ阻害剤）またはシクロヘキサミド（タンパク質合成阻害剤）の存在下で形成した再生マトリックスおよび第21日の培養物の上清（5 μ mでろ過）中の全タンパク質含有量を示す。

【図15】図15は、対照と比較した、 α -アamaniチン（RNA II ポリメラーゼ阻害剤）の存在下で形成した再生マトリックスおよび第21日の培養物の上清（1 μ mでろ過）中の全タンパク質含有量を示す。

【図16】図16は、対照と比較した、 α -アamaniチン（RNA II ポリメラーゼ阻害剤）の存在下で形成した再生マトリックスおよび第21日の培養物の上清（1 μ mでろ過）中の全脂質含有量を示す。

【図17】図17は、PAGE上で、1 μ mでろ過したマトリックスから5 μ mでろ過したマトリックスまで、マトリックスおよび媒体について、クーマシー染色タンパク質バンドを比較したものを示す。

【図18】図18は、神経細胞遺伝子の上方制御について、異なる補助剤を有する処理媒体中で生成した再生マトリックス（およびそれらに使用した上清、それぞれ）の効果を示す。A：NT-3、B：NCAM-1、C：GAP-43。

【図19】図19は、SH-SY5Y細胞上における再生マトリックスによって生じた遺伝子の上方制御の倍増および熱不活性化再生マトリックスを示す。SH-SY5Y細胞を、再生マトリックスと共に3時間インキュベートし、次いで、RT-PCRを使用して、GAPDH、NT-3、NT-6、NCAM-1、FGF-9、GDNF、Netrin-1およびGAP-43の遺伝子発現について分析した。PBS中で3回洗浄した再生マトリックスは、未洗浄の再生マトリックスに類似する活性を有した。60℃で30分間インキュベートした再生マトリックスは、遺伝子上方制御活性を有さなかった。

【図20】図20は、再生マトリックスを用いて処置したNeuroscreen（登録商標）細胞による神経突起の伸長を示す。左の図は、基本培地中で増殖したNeuroscreen（登録商標）細胞の代表的な領域を示す。右の図は、再生マトリックスを用いて処置した細胞の代表的な領域を示す。細胞の核を青で染色し、チューブリンを緑で染色した。

【図21】図21は、Neuroscreen（登録商標）細胞の神経突起の伸長を、再生マトリックスの存在下と非存在下とで培養して比較した場合を示す。結果を、NGF処置細胞の神経突起伸長指数のパーセントとして表す。結果は、四つ組で行った4つの独立した実験の平均である。エラーバーは、平均の標準偏差を示す。再生マトリックス処理細

10

20

30

40

50

胞の値および再生マトリックス未処理細胞の値は、0.01未満の差のP値を有して異なる(t検定)。

【図22】図22は、再生マトリックスをEGFおよびbFGFの増殖因子補助剤の存在下と非存在下とで生成し、これらの再生マトリックスの存在下で培養したNeuroscreen(登録商標)細胞の神経突起の伸長を比較した場合を示す。結果を、NGF処置細胞の神経突起伸長指数のパーセントとして表す。結果は、少なくとも六つ組の試料の平均である。エラーバーは、平均の標準偏差を示す。すべての値は、0.01未満の差のP値を有して相互に異なる(t検定)。

【図23】図23は、異なる濃度のNGFのNeuroscreen(登録商標)細胞の神経突起の伸長に対するNGF用量応答曲線を示す。

【図24】図24は、TR-10処理媒体中で生成した再生マトリックスを適用する場合の、NGFの陽性対照(図23; 100ng/ml NGF)と比較した、神経突起伸長の全長の平均に関する増倍(減弱)を示す。再生マトリックスは、全血または血漿-血小板-バフィーコート画分のいずれかから生成した。

【図25】図25は、対照であるラット胎仔脊髄の初代細胞を示し、単一細胞懸濁培養6日後の神経細胞のチューブリン(Tuj1)およびグリア(GFAP)を標識している(2コマは、すべての染色された成分を示している)。平均して、4.2%の細胞が、Tuj1陽性であり、0.4%の細胞がGFAP陽性であった。100倍の倍率。

【図26】図26は、再生マトリックスのラット胎仔脊髄の初代細胞に及ぼす効果を示し、単一細胞懸濁培養6日後の神経細胞のチューブリン(Tuj1)およびグリア(GFAP)を標識している(2コマは、すべての染色された成分を示している)。平均して、55%の細胞が、Tuj1陽性であり、92%の細胞がGFAP陽性であった。二重陽性(Tuj1およびGFAPに陽性)細胞は、三相性の神経前駆細胞を示している。100倍の倍率。

【図27】図27A、27B、27Cおよび27Dは、5日間培養したヒト線維芽細胞のβ-チューブリン(A)およびF-アクチン(B)についての免疫細胞化学染色に関して、再生マトリックス(CおよびD)上と対照(AおよびB)上との比較を示す。対照の培養物で使用した培地は、再生マトリックスを生成するために使用する処理媒体であった。再生マトリックスと接触させて培養したヒト線維芽細胞は、対照の培養物と比較して、コンフルエントなレベルが顕著に低かった(アポトーシスを経ているようでもあった)。

【図28】図28は、再生マトリックスの線維芽細胞の接着、線維芽細胞の核領域、およびBrdU陽性線維芽細胞パーセントに関して、2日間培養と対照との比較を示す。

【図29】図29は、SCIの完全横切ラットモデル(5mm)への再生マトリックスの移植が、運動機能の回復を誘導することを示す。BBBスコアによって測定した歩行運動機能の回復を、損傷および再生マトリックス移植後2週間に1回記録した。個々の動物(再生マトリックス-Mおよび対照-C)についてのBBBスコア。

【図30】図30は、再生マトリックス移植を受けた、脊髄損傷の横切ラットモデルにおける嚢腫形成の発生率の減少を示す。再生マトリックス移植ラット(n=19)では、SCI部位およびその周囲での嚢腫形成の発生率が15.8%であり、対照ラット(n=5)では、SCI部位の周囲での嚢腫形成の発生率が60%であった。

【図31】図31は、SCIの片側切断ラットモデル(5mm)への再生マトリックスの移植が、運動機能の回復を誘導することを示す。BBBスコアによって測定した歩行運動機能の回復を、損傷および再生マトリックス移植後2週間に1回記録した。再生マトリックスの移植を受けた個々の動物についてのBBBスコア。非移植対照は、最初の評価時点まで生存しなかった。

【図32A】図32A: 5mm完全横切を有するラット脊髄への再生マトリックス移植後の機能の回復。図32B: 挫傷(50mm)による損傷2週後のラット脊髄への再生マトリックス移植後の機能の回復。図32C: 脊髄損傷の治療における再生マトリックスの効力を示す、組合せ(完全横切および挫傷)モデル。対照ラットは、両方の損傷モデルからの空の対照および生物学的不活性化再生マトリックス対照を含む。図32A、32Bおよ

10

20

30

40

50

び32Cのそれぞれについて、上の線は、再生マトリックス移植ラットからのデータを示し。下の線は、対照ラットからのデータを示す。

【図32B】図32A：5mm完全横切を有するラット脊髄への再生マトリックス移植後の機能の回復。図32B：挫傷（50mm）による損傷2週後のラット脊髄への再生マトリックス移植後の機能の回復。図32C：脊髄損傷の治療における再生マトリックスの効力を示す、組合せ（完全横切および挫傷）モデル。対照ラットは、両方の損傷モデルからの空の対照および生物学的不活性化再生マトリックス対照を含む。図32A、32Bおよび32Cのそれぞれについて、上の線は、再生マトリックス移植ラットからのデータを示し。下の線は、対照ラットからのデータを示す。

【図32C】図32A：5mm完全横切を有するラット脊髄への再生マトリックス移植後の機能の回復。図32B：挫傷（50mm）による損傷2週後のラット脊髄への再生マトリックス移植後の機能の回復。図32C：脊髄損傷の治療における再生マトリックスの効力を示す、組合せ（完全横切および挫傷）モデル。対照ラットは、両方の損傷モデルからの空の対照および生物学的不活性化再生マトリックス対照を含む。図32A、32Bおよび32Cのそれぞれについて、上の線は、再生マトリックス移植ラットからのデータを示し。下の線は、対照ラットからのデータを示す。

【図33】図33は、再生マトリックス移植が、衝撃および／または外科的片側切断（5mmの脊髄の除去を含む）によって生じたブタ脊髄損傷において、運動機能の回復を誘導することを示す。ブタ00-6-5および113-1は、裂傷および脊髄組織の欠損を生じる重度の衝撃による損傷を受けた。ブタ80-1は、14ゲージ針による貫通による損傷を受けた。ブタ55-1、53-2、54-5および54-2、ならびに全部の対照ブタは、右側の外科的片側切断（5mm長の右側の脊髄を除去した）を受けた。改変した数値的なASIAスコアによって測定した歩行運動機能の回復の結果を、損傷および再生マトリックス移植の後、毎週記録した。

【図34】図34は、再生マトリックス移植ブタとホモゲナイズした血餅移植ブタとの7週間にわたる平均体重および平均体重増加の比較を示す。

【図35】図35は、右側の片側切断（5mm長の右側の脊髄を除去した）による脊髄損傷後の再生マトリックス移植ブタとヒト血餅移植ブタとの7週間にわたる右側運動技能の回復の比較を示す。

【図36】図36は、SCI後の第7週におけるヒト再生マトリックス処置ブタと血餅処置ブタとの歩行運動機能の回復の比較を示す。（内部対照として用いた）未損傷の左側は、両群で同一であったが、損傷した右側は、再生マトリックスを用いた場合の方が、血餅を用いた場合より、より顕著に回復した（ $p=0.03$ ）。

【図37】図37は、再生マトリックス移植後第1月のブタにおいて脊髄損傷（および脊髄除去）の部位で新たに形成されつつある神経細胞（褐色）を示す。明るい色＝細胞の核。暗い色＝Tuj-1陽性細胞。黒色＝二重染色。倍率は、200倍である。

【図38】図38は、ラット脊髄再生研究からの縦方向切片の顕微鏡的評価を示す。38A：再生マトリックスに関連する原始的な細胞が、脊髄の欠陥を満たしつつある。10倍の倍率で撮影。38B：再生マトリックスを10mmの脊髄欠陥中に移植した10日後における、新たな神経組織の形成部位の原始的な細胞。40倍の倍率で撮影。

10

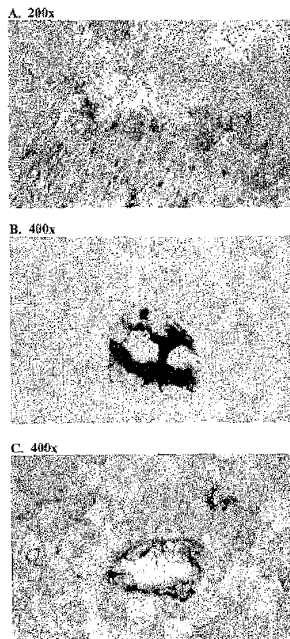
20

30

40

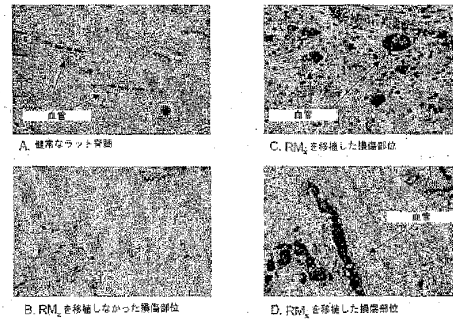
【図 1】

Figure 1. マクロファージのフォン・ヴィーランド因子陽性内皮様細胞への分化形質転換



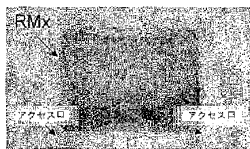
【図 2】

Figure 2. 再生マトリックスが、ラットの損傷した腎臓組織において血管新生を支持する



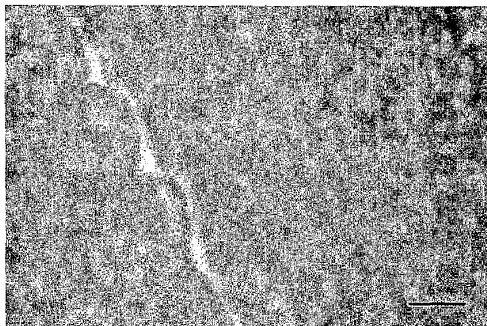
【図 3】

Figure 3. OptiCell 6 6 生成用カセットに含有されている、非細胞性および 1、2 μm の最終ろ過を使用して生成した再生マトリックスの写真



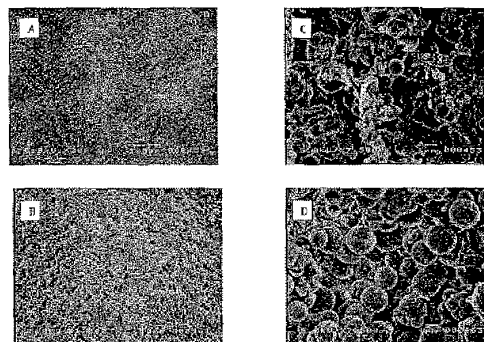
【図 4】

Figure 4. 金から生成した再生マトリックスは、未変化の細胞または核の喪失を両方示さない



【図 5】

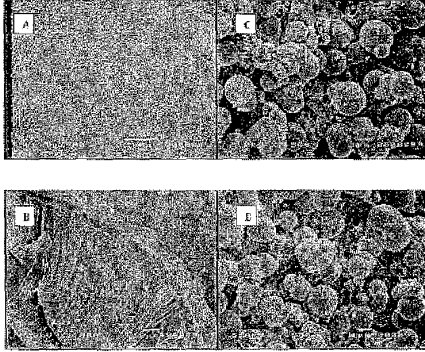
Figure 5. 細胞および 6 μm の最終ろ過を使用して生成した再生マトリックスの電子顕微鏡写真。 A - 200x, B - 1000x, C - 7500x, D - 7500x.



【図 6】

Figure 6. 凍結前および 1、2 μm の最終ろ過を使用して生成した再生マトリックス（第 2 1 日）の定量的電子顕微鏡写真。

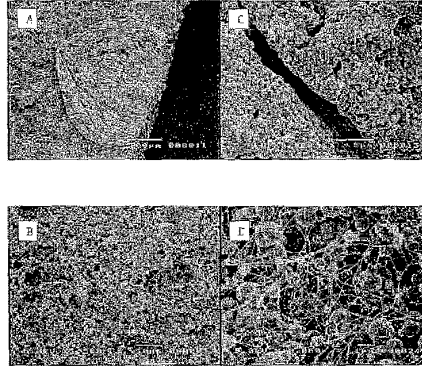
A - 200x, B - 1000x, C - 7500x, D - 7500x.



【図 7】

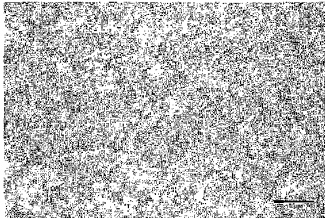
Figure 7. 非成膜前（セ D T A を使用）および 1、2 μm の最終ろ過を使用して生成した再生マトリックス（第 2 1 日）の電子顕微鏡写真。

A - 200x, B - 1500x, C - 5000x, D - 10000x.



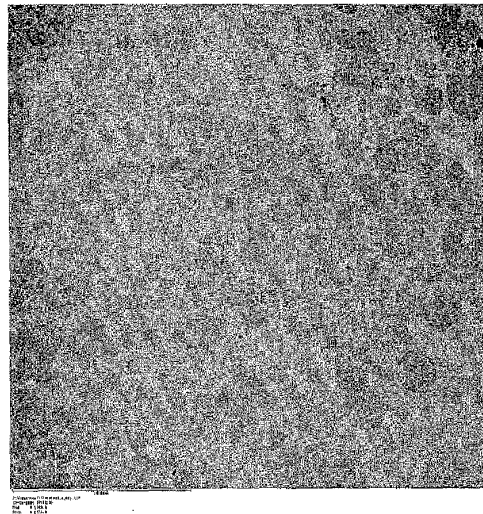
【図 8】

Figure 8. 凍結前および 1、2 μm の最終ろ過を使用して生成した再生マトリックスの定量的電子顕微鏡写真（100倍の倍率）。



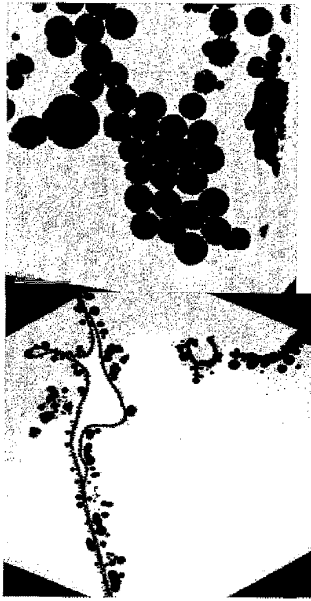
【図 9】

Figure 9. 再生マトリックスの透過型電子顕微鏡写真。



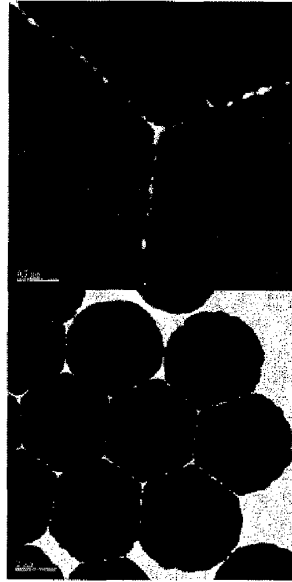
【図 10】

Figure 10. 再生マトリックスの透過型電子顕微鏡観察



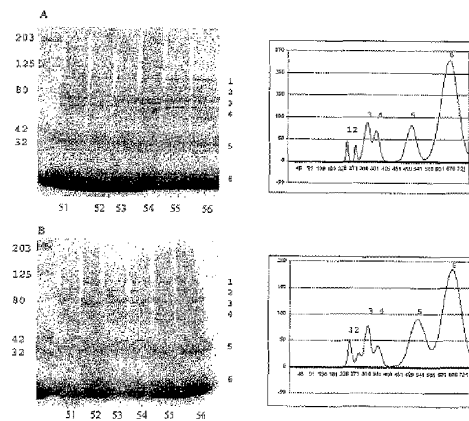
【図 11】

Figure 11. 再生マトリックスの透過型電子顕微鏡観察



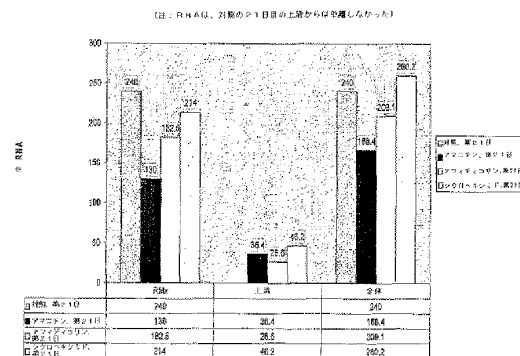
【図 12】

Figure 12. 再生マトリックスのSDS-PAGE分析

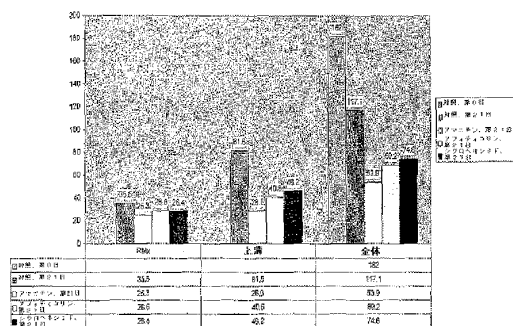


【図 13】

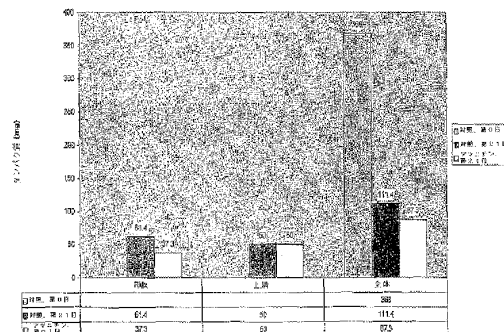
Figure 13. 再生マトリックス、上清および全 Opticell®培養物 (1 μmろ過) 中の全RNA含有量 (μg)



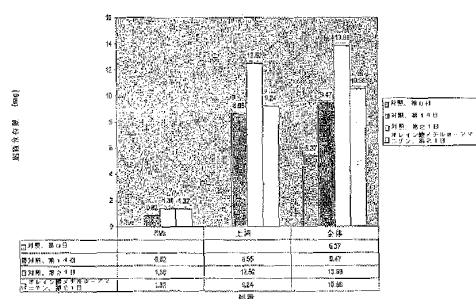
【図 14】

Figure 14, 再生マトリックス、上清および全 Opticell 培養物 (5 μ m 網) 中の全タンパク質含有量

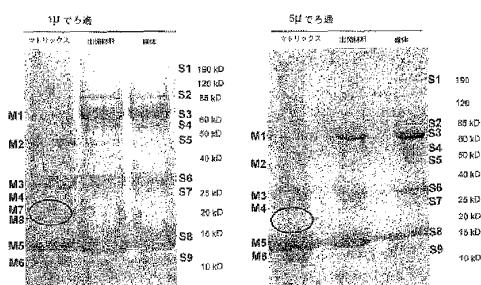
【図 15】

Figure 15, 再生マトリックス、上清および全 Opticell 培養物 (1 μ m 網) 中の全タンパク質含有量

【図 16】

Figure 16, 再生マトリックス、上清および全 Opticell 培養物 (1 μ m 網) 中の全タンパク質含有量

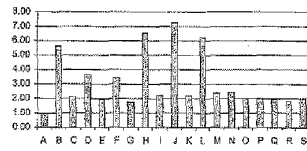
【図 17】

Figure 17, PAGE 上で、1 μ m でろ過したマトリックスから 5 μ m でろ過したマトリックスまで、マトリックスおよび培養液について、ターマシー染色タンパク質バンドを比較した。otein

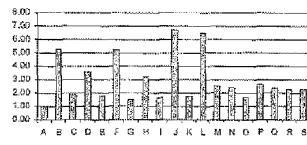
【図 18】

Figure 18, 再生マトリックスの神経細胞遺伝子発現阻害性

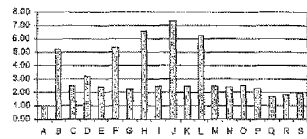
A. NT-3.



B. NCAM-1.



C. GAP-43.

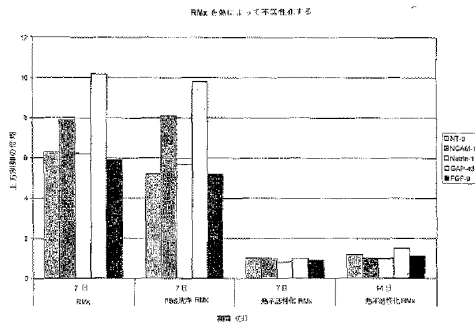


凡例

A=RM+神経細胞の完全な増殖;
 B=第12日、会、RM+1
 C=第12日、会、CM+1
 D=第12日、ITS、RM+1
 E=第12日、ITS、CM+1
 F=第12日、EGF+ITS、RM+1
 G=第12日、EGF+ITS、CM+1
 H=第12日、FGF+ITS、RM+1
 I=第12日、FGF+ITS、CM+1
 J=第12日、なし、RM+1
 K=第12日、なし、CM+1
 L=第12日、神経なし、RM+1
 M=第12日、神経なし、CM+1
 N=第0日、EGF+ITS、Rep-1
 O=第0日、EGF+ITS、Rep-2
 P=第0日、FGF+ITS、Rep-1
 Q=第0日、FGF+ITS、Rep-2
 R=第0日、なし、Rep-1
 S=第0日、なし、Rep-2

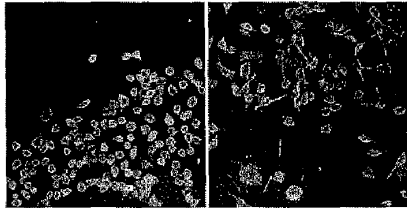
【図 19】

Figure 19, 再生マトリックスを5H-5Y5細胞と共にインキュベートした後の遺伝子の発現阻害性 (および誘導性) 再生マトリックス



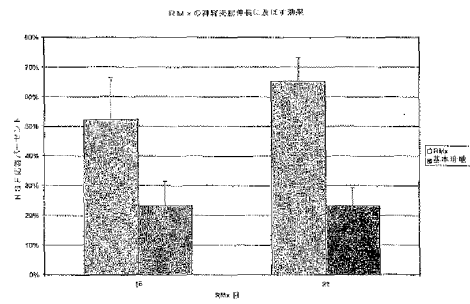
【図 20】

Figure 20, 再生マトリックスを用いて処理した Neuroscreen® 細胞による神経突起の伸長



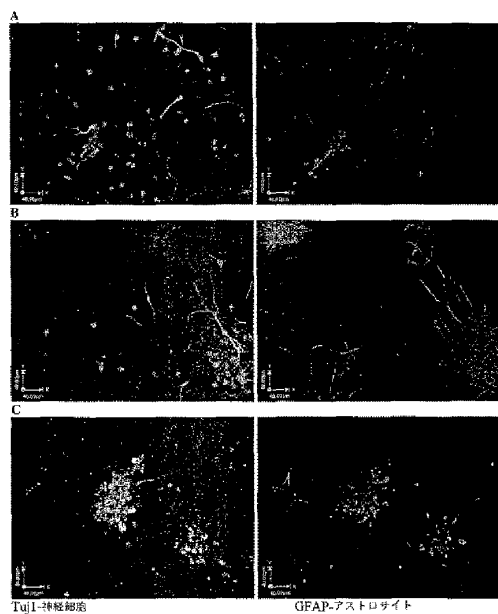
【図 21】

Figure 21, Neuroscreen® 細胞の神経突起の伸長を、再生マトリックスの存在下と存在下とで培養して比較した



【図 26】

Figure 26. 神経細胞の第7日の再生マトリックスとの相互作用



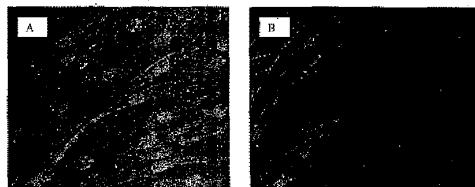
Tuj1-神経細胞

GFAP-アストロサイト

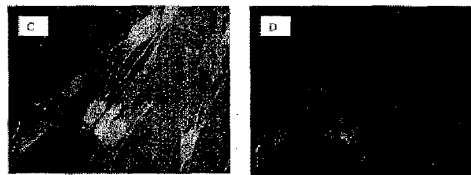
【図 27】

Figure 27. 再生マトリックス生成媒体中で培養したヒト線維芽細胞および再生マトリックスと共に培養したヒト線維芽細胞の免疫細胞化学

再生マトリックス媒体 (対照)



再生マトリックス

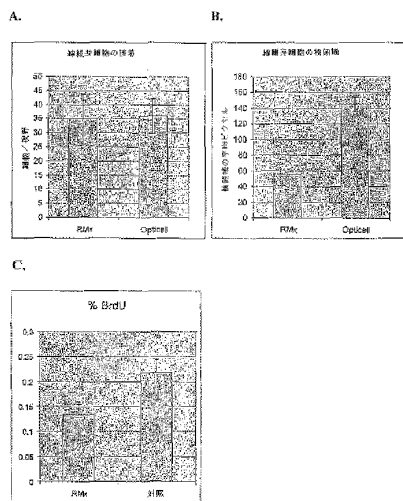


β-チューブリン

F-アクテン

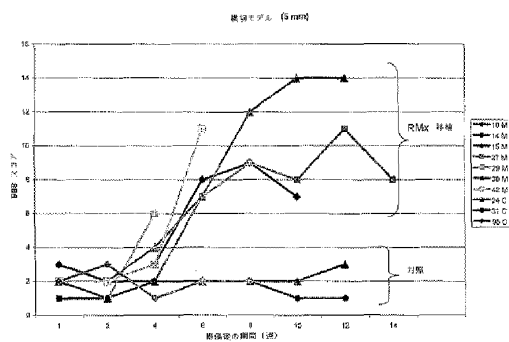
【図 28】

Figure 28. 再生マトリックスの線維芽細胞の接着、線維芽細胞の核領域、およびβ-actin陽性線維芽細胞パーセントに及ぼす効果



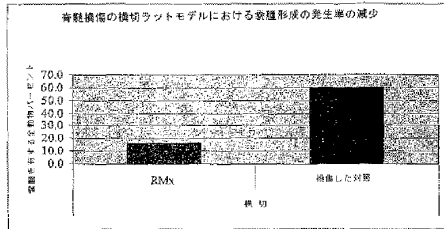
【図 29】

Figure 29. S.C.I.の完全壊切ラットモデル (5 mm) への再生マトリックスの移植が、運動機能の回復を誘導する



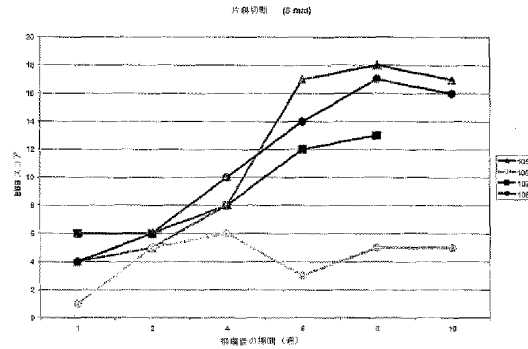
【図 30】

Figure 30. 再生マトリックス移植を受けた、腎臓損傷の横切ラットモデルにおける糸球体形成の発生率の減少



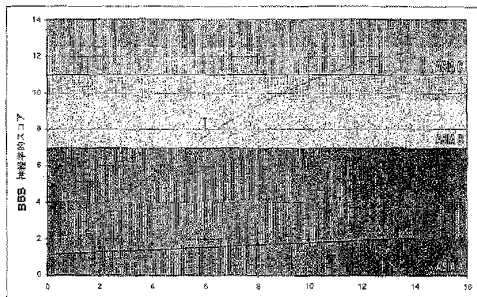
【図 31】

Figure 31. SC1の片側切筋ラットモデル (5mm) への再生マトリックスの移植が、運動損傷の回復を誘導する



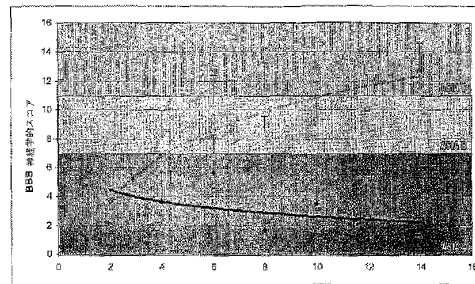
【図 32 A】

Figure 32A. 5mm完全横切を有するラット腎臓へのRMTx移植後の機能の回復



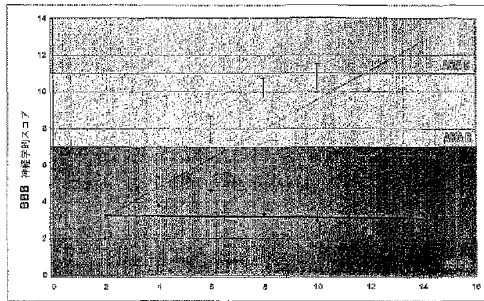
【図 32 B】

Figure 32B. 評価 (5.0mm) による損傷2週後のラット腎臓への再生マトリックス移植後の機能の回復



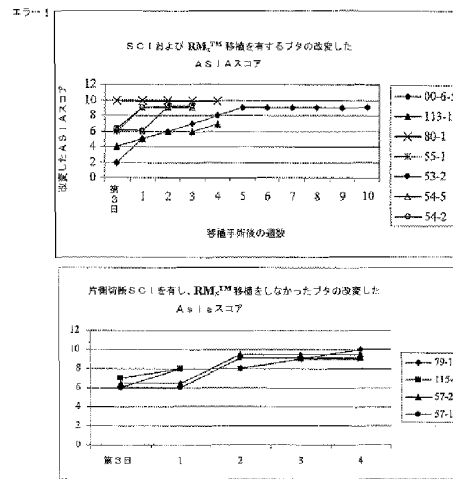
【図 3 2 C】

Figure 32C. 脊髄損傷の治療における再生マトリックスの効力を示す、組合せ（完全横切および挫傷）モデル



【図 3 3】

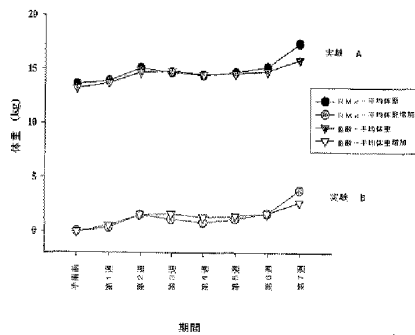
Figure 33. 再生マトリックス移植が、衝撃および/または外科的片側切断（5mmの脊髄の除去を含む）によって生じた脊髄損傷において、運動機能の回復を誘導する



【図 3 4】

Figure 34.

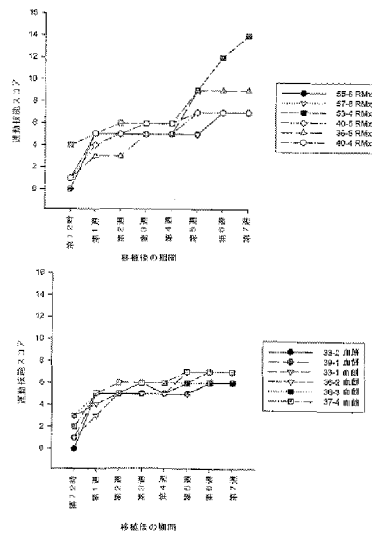
RMx 移植ブタとホモゲナイズしたヒト血漿移植ブタとの平均体重および平均体長増加の比較



【図 3 5】

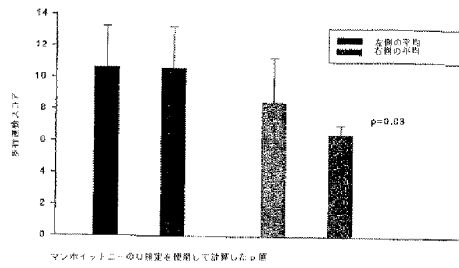
Figure 35.

部分的横切による脊髄損傷後の RMx 移植ブタとヒト血漿移植ブタとの右側運動機能の回復の比較



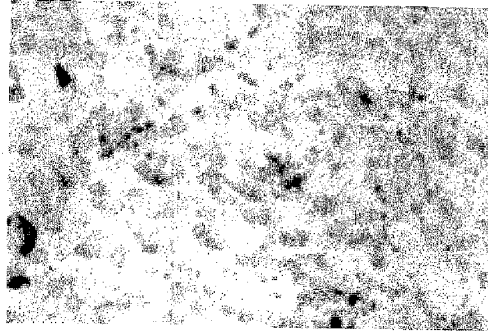
【図 36】

Figure 36. SC1後の第7週におけるヒト再生マトリックス移植ブタと
血球死産ブタとの歩行運動速度の回復の比較



【図 37】

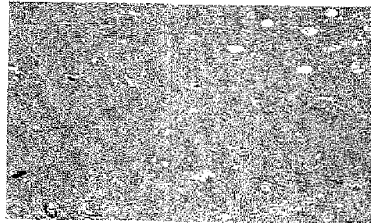
Figure 37. 再生マトリックス移植後第1週のブタにおいて脊髄損傷の部位で新たに
形成されつつある神経細胞 (褐色)。200倍の倍率で示す



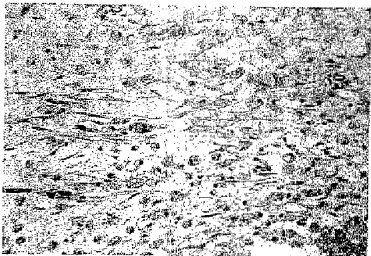
【図 38】

Figure 38. ラット脊髄再生研究からの横方向切片の顕微鏡的評価

A.



B.



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/042016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61L27/36		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VACANTI M P ET AL: "Identification and initial characterization of spore-like cells in adult mammals." JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 2001, vol. 80, no. 3, 2001, pages 455-460, XP002422838 ISSN: 0730-2312 cited in the application abstract page 456, column 2, paragraphs 3,4 page 458, column 1, paragraph 2 - page 459, column 1, paragraph 3	1-94
A	US 2004/137613 A1 (VACANTI MARTIN P [US] ET AL) 15 July 2004 (2004-07-15) claims 1,13,18,23 paragraphs [0040] - [0042] examples 2-5	1-94
-/-		
☒ 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 document 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) "C" 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. "B" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 March 2007		Date of mailing of the international search report 15/03/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Peris Antoli, Berta

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

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/042016

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 632 778 A (GOLDSTEIN STEVEN [US]) 27 May 1997 (1997-05-27) claim 1 column 6, line 53 - column 7, line 6 column 8, lines 56-60 example 1	1-94
A	US 2003/187515 A1 (HARIRI ROBERT J [US] ET AL) 2 October 2003 (2003-10-02) claims 1,22-25 paragraph [0012]	1-94
A	US 6 576 265 B1 (SPIEVACK ALAN R [US]) 10 June 2003 (2003-06-10) claims 1-3,8,11 column 2, lines 17,18	1-94

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

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/042016

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004137613	A1	15-07-2004	NONE
US 5632778	A	27-05-1997	AT 265191 T 15-05-2004
		AU 1931495 A 03-10-1995	
		CA 2185447 A1 21-09-1995	
		DE 69532976 D1 03-06-2004	
		DE 69532976 T2 04-05-2005	
		DK 871414 T3 30-08-2004	
		EP 0871414 A1 21-10-1998	
		ES 2219660 T3 01-12-2004	
		JP 9510108 T 14-10-1997	
		PT 871414 T 31-08-2004	
		WO 9524873 A1 21-09-1995	
		US 5899936 A 04-05-1999	
		US 5613982 A 25-03-1997	
		US 5843182 A 01-12-1998	
US 2003187515	A1	02-10-2003	AU 2003226018 A1 13-10-2003
		CA 2479903 A1 09-10-2003	
		CN 1791331 A 21-06-2006	
		EP 1575572 A2 21-09-2005	
		JP 2006507851 T 09-03-2006	
		MX PA04009188 A 20-06-2005	
		WO 03082201 A2 09-10-2003	
		US 2004048796 A1 11-03-2004	
US 6576265	B1	10-06-2003	US 2003054022 A1 20-03-2003
			US 2003059404 A1 27-03-2003
			US 2003059405 A1 27-03-2003
			US 2003059406 A1 27-03-2003
			US 2003059407 A1 27-03-2003
			US 2003059409 A1 27-03-2003
			US 2003059410 A1 27-03-2003
			US 2003064111 A1 03-04-2003
			US 2003059411 A1 27-03-2003
			US 2003064112 A1 03-04-2003
			US 2003133916 A1 17-07-2003

Form PCT/IS/A/210 (patent family annex) (April 2005)

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/30	
A 6 1 K 35/26 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/37 (2006.01)	A 6 1 K 35/26	
A 6 1 K 35/32 (2006.01)	A 6 1 K 35/37	
A 6 1 K 35/36 (2006.01)	A 6 1 K 35/32	
A 6 1 K 35/44 (2006.01)	A 6 1 K 35/36	
A 6 1 K 35/48 (2006.01)	A 6 1 K 35/44	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/48	
A 6 1 K 35/50 (2006.01)	A 6 1 K 35/14	
A 6 1 K 35/54 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 K 35/50	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/54	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
	A 6 1 P 9/00	
	A 6 1 P 43/00	1 0 7

(81)指定国 AP(BW,CH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),
 EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,
 BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TC),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,
 CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,L
 A,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MC,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NL,NO,NZ,OM,PC,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE
 ,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 アールフォース, ジャンーエリック ダブリュー.
 アンティグア・バーブーダ国 セント ジョンズ, ヒューズ ポイント, ピーオー ボックス
 1 9 1 5

Fターム(参考) 4C081 AB02 AB13 AB18 AB31 BA12 BA13 BA16 BB02 BB04 BB06
 CD112 CD27 CD29 CD34 CE02 CE03 DA01 DA13 EA02
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB34 BB35 BB38 BB43 BB45 BB46 BB47
 BB48 BB49 BB57 BB59 BB63 BB64 CA03 CA04 CA05 CA06
 DA02 DA03 DA15 DA21 DA23 DA27 DA32 MA16 MA23 MA66
 NA14 ZA01 ZA02 ZA20 ZA22 ZA31 ZA36 ZB09 ZB22

PRINTER RUSH
(PTO ASSISTANCE)

Application: 14759895

Examiner: Davis

GAU: 1651

From:

Location: RTFM

Creation Date: 03/05/2020

Week Date: 1/13/2020

<u>DOC CODE</u>	<u>DOC DATE</u>	<u>MISCELLANEOUS</u>
☐ 1449 ☒ IDS ☐ CLM ☐ IIFW/FWCLM ☐ SRFW ☐ DRW ☐ OATH ☐ 312 ☐ SPEC	<u>02/26/2020</u>	☐ Continuing Data ☐ Foreign Priority ☐ Document Legibility ☐ Fees ☐ Petition (TC) ☐ Other

[RUSH] Message:

Please respond to the 02/26/20 IDS

thank you

[XRUSH] Response:

Initials: _____

Examiner: PUBS contact - James Leija, (703) 756-1197

NOTE: This form will be included as part of the official USPTO record with the response document coded as XRUSH.

REV: AUG 16



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
14/759,895	07/08/2015	Ryanne Early	SYG-19-1252US/426329-002	3358
35811 7590 03/18/2020 IP GROUP OF DLA PIPER LLP (US) ONE LIBERTY PLACE 1650 MARKET ST, SUITE 5000 PHILADELPHIA, PA 19103			EXAMINER DAVIS, RUTH A	
			ART UNIT 1651	PAPER NUMBER
			NOTIFICATION DATE 03/18/2020	DELIVERY MODE ELECTRONIC

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.

The time period for reply, if any, is set in the attached communication.

Notice of the Office communication was sent electronically on above-indicated "Notification Date" to the following e-mail address(es):

pto.phil@us.dlapiper.com



UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
U.S. Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

APPLICATION NO./ CONTROL NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR/ PATENT IN REEXAMINATION	ATTORNEY DOCKET NO.
14/759,895	07/08/2015	Early, Ryanne	SYG-19-1252US/426

IP GROUP OF DLA PIPER LLP (US) ONE LIBERTY PLACE 1650 MARKET ST, SUITE 5000 PHILADELPHIA, PA 19103		EXAMINER	
		RUTH A DAVIS	
		ART UNIT	PAPER
		1651	20200314

DATE MAILED: _____

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.

Commissioner for Patents

The information disclosure statement (IDS) submitted on February 26, 2020 was filed after the mailing date of the Notice of Allowance on January 13, 2020. The submission is in compliance with the provisions of 37 CFR 1.97. Accordingly, the information disclosure statement is being considered by the examiner.

Any inquiry concerning this communication or earlier communications from the examiner should be directed to RUTH A DAVIS whose telephone number is (571)272-0915. The examiner can normally be reached on Monday - Friday (Am - Ppm).

Examiner interviews are available via telephone, in-person, and video conferencing using a USPTO supplied web-based collaboration tool. To schedule an interview, applicant is encouraged to use the USPTO Automated Interview Request (AIR) at <http://www.uspto.gov/interviewpractice>.

If attempts to reach the examiner by telephone are unsuccessful, the examiner's supervisor, Renee Claytor can be reached on 571-272-8394. The fax phone number for the organization where this application or proceeding is assigned is 571-273-8300.

Information regarding the status of an application may be obtained from the Patent Application Information Retrieval (PAIR) system. Status information for published applications may be obtained from either Private PAIR or Public PAIR. Status information for unpublished applications is available through Private PAIR only. For more information about the PAIR system, see <http://pair-direct.uspto.gov>. Should you have questions on access to the Private PAIR system, contact the Electronic Business Center (EBC) at 866-217-9197 (toll-free). If you would like assistance from a USPTO Customer Service Representative or access to the automated information system, call 800-786-9199 (IN USA OR CANADA) or 571-

/RUTH A DAVIS/
Primary Examiner, Art Unit 1651

Form PTO-1449 US DEPARTMENT OF COMMERCE PATENT AND TRADEMARK OFFICE				ATTY. DOCKET NO. SYG-19-1252US/426329-002		SERIAL NO. 14/759,895		
LIST OF PUBLICATIONS CITED BY APPLICANT (Use several sheets if necessary)				APPLICANT ISE Professional Testing & Consulting Services, Inc.				
				FILING DATE July 8, 2015		GROUP 1651		
US PATENT DOCUMENTS								
EXAMINER INITIAL*		DOCUMENT NUMBER	DATE	NAME	CLASS	SUBCLASS	FILING DATE IF APPROPRIATE	
	AA							
	AB							
	AC							
	AD							
	AE							
	AF							
	AG							
	AH							
	AI							
	AJ							
	AK							
FOREIGN PATENT DOCUMENTS								
		DOCUMENT NUMBER	DATE	COUNTRY	CLASS	SUBCLASS	TRANSLATION	
							YES	NO
	AL	2009-510091 A (corr. to WO '686)	03/12/09	JP			X	
	AM	2007/038686 A2 (corr. to JP '091)	04/05/07	WO				
	AN	2004-521935 A (corr. to WO '720)	04/22/04	JP			X	
	AO	02/078720 A2 (corr. to JP '935)	10/10/02	WO				
	AP	2007-532153 A (corr. to WO '219)	11/15/07	JP			X	
OTHER PUBLICATIONS (Including Author, Title, Date, Pertinent Pages, Etc.)								
	AR	Notice for Reasons of Refusal from counterpart Japanese Patent Appln. No. 2018-224475 dated February 3, 2020, and its English translation.						
	AS							
	AT							
EXAMINER				DATE CONSIDERED				
*EXAMINER: Initial if publication considered, whether or not citation is in conformance with MPEP 609; Draw line through citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to Applicant.								

EAST\172518209.5

Form PTO-1449 US DEPARTMENT OF COMMERCE PATENT AND TRADEMARK OFFICE				ATTY. DOCKET NO. SYG-19-1252US/426329-002		SERIAL NO. 14/759,895		
LIST OF PUBLICATIONS CITED BY APPLICANT <i>(Use several sheets if necessary)</i>				APPLICANT ISE Professional Testing & Consulting Services, Inc.				
				FILING DATE July 8, 2015		GROUP 1651		
US PATENT DOCUMENTS								
EXAMINER INITIAL*		DOCUMENT NUMBER	DATE	NAME	CLASS	SUBCLASS	FILING DATE IF APPROPRIATE	
	AA							
	AB							
	AC							
	AD							
	AE							
	AF							
	AG							
	AH							
	AI							
	AJ							
	AK							
FOREIGN PATENT DOCUMENTS								
		DOCUMENT NUMBER	DATE	COUNTRY	CLASS	SUBCLASS	TRANSLATION	
							YES	NO
	AL	2005/097219 A1 (corr. to JP '153)	10/20/05	WO				
	AM	2009-513269A	04/02/09	JP			X	
	AN							
	AO							
	AP							
OTHER PUBLICATIONS (Including Author, Title, Date, Pertinent Pages, Etc.)								
	AR							
	AS							
	AT							
EXAMINER				DATE CONSIDERED				
/RUTH A DAVIS/				03/14/2020				
*EXAMINER: Initial if publication considered, whether or not citation is in conformance with MPEP 609; Draw line through citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to Applicant.								

EAST\172518209.5

PRINTER RUSH
(PTO ASSISTANCE)

Application: 14759895

Examiner: Davis

GAU: 1651

From:

Location: RTFM

Creation Date: 03/05/2020

Week Date: 1/13/2020

<u>DOC CODE</u>	<u>DOC DATE</u>	<u>MISCELLANEOUS</u>
☐ 1449 ☒ IDS ☐ CLM ☐ IIFW/FWCLM ☐ SRFW ☐ DRW ☐ OATH ☐ 312 ☐ SPEC	<u>02/26/2020</u>	☐ Continuing Data ☐ Foreign Priority ☐ Document Legibility ☐ Fees ☐ Petition (TC) ☐ Other

[RUSH] Message:

Please respond to the 02/26/20 IDS

thank you

[XRUSH] Response:

IDS considered.

/R.A.D/ (03/14/2020)

Initials: _____

Examiner: PUBS contact - James Leija, (703) 756-1197

NOTE: This form will be included as part of the official USPTO record with the response document coded as XRUSH.

REV: AUG 16

Page 1/1
RegenX Science Exhibit 1004
Page 1858

To: pto.phil@us.dlapiper.com,,
From: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Cc: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Subject: Private PAIR Correspondence Notification for Customer Number 35811

Mar 18, 2020 03:58:37 AM

Dear PAIR Customer:

IP GROUP OF DLA PIPER LLP (US)
ONE LIBERTY PLACE
1650 MARKET ST, SUITE 5000
PHILADELPHIA, PA 19103
UNITED STATES

The following USPTO patent application(s) associated with your Customer Number, 35811 , have new outgoing correspondence. This correspondence is now available for viewing in Private PAIR.

The official date of notification of the outgoing correspondence will be indicated on the form PTOL-90 accompanying the correspondence.

Disclaimer:

The list of documents shown below is provided as a courtesy and is not part of the official file wrapper. The content of the images shown in PAIR is the official record.

Application	Document	Mailroom Date	Attorney Docket No.
14759895	M327	03/18/2020	SYG-19-1252US/426329-002
	1449	03/18/2020	SYG-19-1252US/426329-002

To view your correspondence online or update your email addresses, please visit us anytime at <https://sportal.uspto.gov/secure/myportal/privatepair>.

If you have any questions, please email the Electronic Business Center (EBC) at EBC@uspto.gov with 'e-Office Action' on the subject line or call 1-866-217-9197 during the following hours:

Monday - Friday 6:00 a.m. to 12:00 a.m.

Thank you for prompt attention to this notice,

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
PATENT APPLICATION INFORMATION RETRIEVAL SYSTEM



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	ISSUE DATE	PATENT NO.	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
14/759,895	04/14/2020	10617790	SYG-19-1252US/426329-002	3358

35811 7590 03/25/2020
IP GROUP OF DLA PIPER LLP (US)
ONE LIBERTY PLACE
1650 MARKET ST, SUITE 5000
PHILADELPHIA, PA 19103

ISSUE NOTIFICATION

The projected patent number and issue date are specified above.

Determination of Patent Term Adjustment under 35 U.S.C. 154 (b) (application filed on or after May 29, 2000)

The Patent Term Adjustment is 0 day(s). Any patent to issue from the above-identified application will include an indication of the adjustment on the front page.

If a Continued Prosecution Application (CPA) was filed in the above-identified application, the filing date that determines Patent Term Adjustment is the filing date of the most recent CPA.

Applicant will be able to obtain more detailed information by accessing the Patent Application Information Retrieval (PAIR) WEB site (<http://pair.uspto.gov>).

Any questions regarding the Patent Term Extension or Adjustment determination should be directed to the Office of Patent Legal Administration at (571)-272-7702. Questions relating to issue and publication fee payments should be directed to the Application Assistance Unit (AAU) of the Office of Data Management (ODM) at (571)-272-4200.

APPLICANT(s) (Please see PAIR WEB site <http://pair.uspto.gov> for additional applicants):

Ryanne Early, Fleming Island, FL;
ISE Professional Testing & Consulting Services, Inc., Eustis, FL;

The United States represents the largest, most dynamic marketplace in the world and is an unparalleled location for business investment, innovation, and commercialization of new technologies. The USA offers tremendous resources and advantages for those who invest and manufacture goods here. Through SelectUSA, our nation works to encourage and facilitate business investment. To learn more about why the USA is the best country in the world to develop technology, manufacture products, and grow your business, visit SelectUSA.gov.

To: pto.phil@us.dlapiper.com,,
From: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Cc: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Subject: Private PAIR Correspondence Notification for Customer Number 35811

Mar 26, 2020 04:37:04 AM

Dear PAIR Customer:

IP GROUP OF DLA PIPER LLP (US)
ONE LIBERTY PLACE
1650 MARKET ST, SUITE 5000
PHILADELPHIA, PA 19103
UNITED STATES

The following USPTO patent application(s) associated with your Customer Number, 35811 , have new outgoing correspondence. This correspondence is now available for viewing in Private PAIR.

The official date of notification of the outgoing correspondence will be indicated on the form PTOL-90 accompanying the correspondence.

Disclaimer:

The list of documents shown below is provided as a courtesy and is not part of the official file wrapper. The content of the images shown in PAIR is the official record.

Application	Document	Mailroom Date	Attorney Docket No.
14759895	ISSUE.NTF	03/25/2020	SYG-19-1252US/426329-002

To view your correspondence online or update your email addresses, please visit us anytime at <https://sportal.uspto.gov/secure/myportal/privatepair>.

If you have any questions, please email the Electronic Business Center (EBC) at EBC@uspto.gov with 'e-Office Action' on the subject line or call 1-866-217-9197 during the following hours:

Monday - Friday 6:00 a.m. to 12:00 a.m.

Thank you for prompt attention to this notice,

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
PATENT APPLICATION INFORMATION RETRIEVAL SYSTEM

PATENT ASSIGNMENT COVER SHEET

Electronic Version v1.1
 Stylesheet Version v1.2

EPAS ID: PAT6338753

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT
CONVEYING PARTY DATA	
Name	Execution Date
SYNOGEN MANAGEMENT GROUP, INC.	10/05/2020
RECEIVING PARTY DATA	
Name:	JONELLE TOOTHMAN
Street Address:	13709 PROGRESS BLVD., BOX 11
City:	ALACHUA
State/Country:	FLORIDA
Postal Code:	32615
PROPERTY NUMBERS Total: 3	
Property Type	Number
Patent Number:	10617790
Application Number:	16801956
Application Number:	61750555
CORRESPONDENCE DATA	
Fax Number:	
<i>Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent using a fax number, if provided; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.</i>	
Phone:	352-214-0385
Email:	GERARD@PATENT-ARTS.COM
Correspondent Name:	GERARD BENCEN
Address Line 1:	10 E. UNIVERSITY AVENUE
Address Line 4:	GAINESVILLE, FLORIDA 32601
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	RE-1US
NAME OF SUBMITTER:	GERARD H. BENCEN
SIGNATURE:	/GERARD H. BENCEN/
DATE SIGNED:	10/07/2020
This document serves as an Oath/Declaration (37 CFR 1.63).	
Total Attachments: 3	
source=SYN_NGNPATENT_ASSIGNMENT_not#page1.tif	
source=SYN_NGNPATENT_ASSIGNMENT_not#page2.tif	
source=SYN_NGNPATENT_ASSIGNMENT_not#page3.tif	

ASSIGNMENT

WHEREAS, Synogen Management Group, Inc., a corporation of Florida, with its principal place of business located at 101 SE 2nd Place, Suite 201 B, Gainesville, Florida 32601 ("Assignor"), is the owner of the entire right, title and interest in and to U.S. Provisional Patent Application No. 61/750,555, PCT International Patent Application No. PCT/US2014/010890, together with the patents and patent applications including but not limited to those listed in Schedule A, and of the invention(s) therein described; and

WHEREAS, NeXtGen Biologics, Inc., a corporation of Delaware, with its principal place of business located at 13709 Progress Blvd, Box 11, Alachua, FL, 32615 ("Assignee"), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in U.S. Provisional Patent Application No. 61/750,555, PCT International Patent Application No. PCT/US2014/010890, together with the patents and patent applications including but not limited to those listed in Schedule A, and of the invention(s) therein described;

NOW, THEREFORE, in consideration of One Dollar (\$1.00) and of other good and valuable consideration, receipt of which is acknowledged, the undersigned, intending to be legally bound, does hereby sell, assign and transfer to the Assignee the entire right, title and interest, for the United States of America, its territories and possessions, and for all foreign countries, in said U.S. Provisional Patent Application No. 61/750,555, PCT International Patent Application No. PCT/US2014/010890, all divisions and continuations thereof, all rights to claim priority based thereon, all rights to file foreign applications on said inventions, and all letters patents and reissues thereof, issuing for said inventions and any improvements thereon in the United States of America and in any and all foreign countries including the patents and patent applications listed in Schedule A.

It is agreed that the undersigned shall be legally bound, upon request of the Assignee, or its successors or assigns or a legal representative thereof, to execute all instruments proper to patent the inventions in the United States of America and foreign countries in the name of the Assignee, and to execute all instruments proper to carry out the intent of this instrument.

The rights and property herein conveyed by the undersigned are free and clear of any encumbrance.

[Signature Page Follows]

EXECUTED under seal on October 5, 2020.

Synogen Management Group, Inc.

By: Jamie M. Grooms

Name: Jamie M. Grooms

Title: Director

State of Florida

County of Hillsborough

On October 5, 2020, before me, the undersigned, personally appeared Jamie Grooms, known to me or satisfactorily proven to be the person(s) who executed the within instrument, and who acknowledged herself/himself to be the Director of Synogen Management Group, Inc., and, being authorized to do so, executed the foregoing instrument for the purposes therein contained by signing the name of the said company by herself/himself as such Jamie Grooms

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and official seal.

Jamie Grooms
G 652-453-59-383-0
Exp 10/23/27

Stormy Posey
Notary Public
G G 908716
Exp 9/28/23

(SEAL)



SCHEDULE A

Country	Application Number	Filing Date
Canada	2,897,662	January 9, 2014
China	201780013359.0	January 9, 2014
Europe	14737892.1	January 9, 2014
Hong Kong	16108111.9	January 9, 2014
Israel	239828	January 9, 2014
Japan	2015-552775	January 9, 2014
	2018-224475 (Divisional)	November 30, 2018
Korea	10-2015-7021367	January 9, 2014
United States	61/750,555	January 9, 2013
	14/759,895	July 8, 2018
	16/801956 (Continuation)	April 30, 2019
WIPO	PCT/US2014/010890	January 9, 2014

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Patent No.	: 10,617,790	Customer No. 035811
Issued	: April 14, 2020	
Appl. No.	: 14/759,895	Docket No.: SYG-19-1252US/
Appl. Filed	: July 8, 2015	426329-000002
First Named		
Inventor	: Rynne Early	Confirmation No.: 3358
Title	: DECELLULARIZED BIOMATERIAL	
	FROM NON-MAMMALIAN TISSUE	Dated: November 10, 2022

PETITION FOR A CERTIFICATE OF CORRECTION

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Patentee hereby requests that a Certificate of Correction be issued in the captioned case according to the enclosed document. The changes are to correct errors made to the patent. Since these changes were not made during the printing of the patent, we have electronically submitted the fee in the amount of \$160.00. The Commissioner is authorized to charge any insufficiency to Deposit Account No. 50-2719.

Respectfully submitted,

/CH/
Chris Halliday
Reg. No. 42621

CH/jmc
(215)656-2452

CERTIFICATE OF CORRECTION

PATENT NO.: 10,617,790

DATED: April 14, 2020

INVENTOR(S): Early

It is certified that error appears in the above-identified patent and that said Letters Patent is hereby corrected as shown below:

At column 12, line 17, "250 mm" should read --250 microns--.

At column 19, line 24, "post-cyromilling" should read --post-cryomilling--.

At column 20, line 52 in claim 8, "The tissue graft of claim 6" should read --The tissue graft of claim 7--.

ADDRESS OF SENDER:

Chris Halliday (SYG-19-1252US)
DLA Piper LLP (US)
1650 Market Street, Suite 5000
Philadelphia, PA 19103

PATENT NO. 10,617,790

EAST\198118994.1

RegenX Science Exhibit 1004
Page 1867

EX-2021
RegenX Science, Inc. v. NeXtGen Biologics, Inc.
1867

Electronic Patent Application Fee Transmittal				
Application Number:		14759895		
Filing Date:		08-Jul-2015		
Title of Invention:		DECELLULARIZED BIOMATERIAL FROM NON-MAMMALIAN TISSUE		
First Named Inventor/Applicant Name:		Ryanne Early		
Filer:		Thomas Daniel Christenbury/Janice Casciato		
Attorney Docket Number:		SYG-19-1252US/426329-002		
Filed as Large Entity				
Filing Fees for U.S. National Stage under 35 USC 371				
Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Basic Filing:				
Pages:				
Claims:				
Miscellaneous-Filing:				
Petition:				
Patent-Appeals-and-Interference:				
Post-Allowance-and-Post-Issuance:				
CERTIFICATE OF CORRECTION	1811	1	160	160

Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Extension-of-Time:				
Miscellaneous:				
Total in USD (\$)				160

Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	47002026
Application Number:	14759895
International Application Number:	
Confirmation Number:	3358
Title of Invention:	DECELLULARIZED BIOMATERIAL FROM NON-MAMMALIAN TISSUE
First Named Inventor/Applicant Name:	Ryanne Early
Customer Number:	35811
Filer:	Thomas Daniel Christenbury/Janice Casciato
Filer Authorized By:	Thomas Daniel Christenbury
Attorney Docket Number:	SYG-19-1252US/426329-002
Receipt Date:	10-NOV-2022
Filing Date:	08-JUL-2015
Time Stamp:	15:38:30
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	DA
Payment was successfully received in RAM	\$160
RAM confirmation Number	E2022A0F40211695
Deposit Account	
Authorized User	
The Director of the USPTO is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayment as follows:	

File Listing:					
Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Request for Certificate of Correction	SYG-19-1252USPetforCOC.pdf	102262	no	1
			5d10840850fac984a011c0caa9969fd771aa399a		
Warnings:					
Information:					
2	Request for Certificate of Correction	SGY-19-1252USCOC.pdf	91274	no	1
			2fce2ea77554d1db4d7cba0ce470019a16094df		
Warnings:					
Information:					
3	Fee Worksheet (SB06)	fee-info.pdf	38183	no	2
			098c4cdf385c703812933b1e6cd5304ae608caca		
Warnings:					
Information:					
Total Files Size (in bytes):			231719		
This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503. <u>New Applications Under 35 U.S.C. 111</u> If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application. <u>National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371</u> If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course. <u>New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office</u> If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.					

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
CERTIFICATE OF CORRECTION

PATENT NO. : 10,617,790 B2
APPLICATION NO. : 14/759895
DATED : April 14, 2020
INVENTOR(S) : Early

Page 1 of 1

It is certified that error appears in the above-identified patent and that said Letters Patent is hereby corrected as shown below:

In the Specification

At Column 12, Line 17, "250 mm" should read --250 microns--.

At Column 19, Line 24, "post-cyromilling" should read --post-cryomilling--.

In the Claims

At Column 20, Line 52, in Claim 8, "The tissue graft of claim 6" should read --The tissue graft of claim 7--.

Signed and Sealed this
Twentieth Day of December, 2022


Katherine Kelly Vidal
Director of the United States Patent and Trademark Office

PATENT ASSIGNMENT COVER SHEET

Electronic Version v1.1
 Stylesheet Version v1.2

EPAS ID: PAT7785334

SUBMISSION TYPE:	CORRECTIVE ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	Corrective Assignment to correct the ASSIGNEE'S NAME previously recorded on Reel 053947 Frame 0941. Assignor(s) hereby confirms the ASSIGNEE'S NAME IS SYNOGEN MANAGEMENT GROUP, INC..
CONVEYING PARTY DATA	
Name	Execution Date
ISE PROFESSIONAL TESTING & CONSULTING SERVICES, INC.	07/24/2020
RECEIVING PARTY DATA	
Name:	SYNOGEN MANAGEMENT GROUP, INC.
Street Address:	101 SE 2ND PLACE
Internal Address:	SUITE 201 B
City:	GAINESVILLE
State/Country:	FLORIDA
Postal Code:	32601
PROPERTY NUMBERS Total: 3	
Property Type	Number
Application Number:	61750555
Application Number:	14759895
Application Number:	16801956
CORRESPONDENCE DATA	
Fax Number:	(215)656-3301
<i>Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent using a fax number, if provided; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.</i>	
Phone:	2156562452
Email:	pto.phil@us.dlapiper.com
Correspondent Name:	IP GROUP OF DLA PIPER LLP (US)
Address Line 1:	ONE LIBERTY PLACE
Address Line 2:	1650 MARKET ST, SUITE 5000
Address Line 4:	PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA 19103
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	SYN-19-1252US-CON2
NAME OF SUBMITTER:	CHRIS HALLIDAY
SIGNATURE:	/chris halliday/
DATE SIGNED:	02/08/2023
This document serves as an Oath/Declaration (37 CFR 1.63).	

Total Attachments: 5

source=SYG-19-1252US-CON2_Corrective_Assignment#page1.tif

source=SYG-19-1252US-CON2_Corrective_Assignment#page2.tif

source=SYG-19-1252US-CON2_Corrective_Assignment#page3.tif

source=SYG-19-1252US-CON2_Corrective_Assignment#page4.tif

source=SYG-19-1252US-CON2_Corrective_Assignment#page5.tif

PATENT ASSIGNMENT COVER SHEET

Electronic Version v1.1
 Stylesheet Version v1.2

EPAS ID: PAT6330614

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT
CONVEYING PARTY DATA	
Name	Execution Date
ISE PROFESSIONAL TESTING & CONSULTING SERVICES, INC.	07/24/2020
RECEIVING PARTY DATA	
Name:	SYNOGEN MANAGEMENT, INC. <u>SYNOGEN MANAGEMENT GROUP, INC.</u>
Street Address:	101 SE 2ND PLACE
Internal Address:	SUITE 201 B
City:	GAINESVILLE
State/Country:	FLORIDA
Postal Code:	32601
PROPERTY NUMBERS Total: 3	
Property Type	Number
Application Number:	61750555
Application Number:	14759895
Application Number:	16801956
CORRESPONDENCE DATA	
Fax Number:	(215)656-3301
<i>Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent using a fax number, if provided; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.</i>	
Phone:	215-656-3300
Email:	pto.phil@us.dlapiper.com
Correspondent Name:	IP GROUP OF DLA PIPER LLP (US)
Address Line 1:	ONE LIBERTY PLACE
Address Line 2:	1650 MARKET STREET, SUITE 5000
Address Line 4:	PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA 19103
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	SYG-19-1252/US-CON
NAME OF SUBMITTER:	SIMA SINGADIA KULKARNI
SIGNATURE:	/sima singadia kulkarni/
DATE SIGNED:	10/01/2020
Total Attachments: 3	
source=ISE to Synogen#page1.tif	
source=ISE to Synogen#page2.tif	

506283866

PATENT
REEL: 053947 FRAME: 0941

RegenX Science Exhibit 1004
 Page 1875

PATENT

REEL: 053947 FRAME: 0942

RegenX Science Exhibit 1004
Page 1876

EX-2021

RegenX Science, Inc. v. NeXtGen Biologics, Inc.

ASSIGNMENT

WHEREAS, ISE Professional Testing & Consulting Services, Inc., a corporation of Florida, with its principal place of business located at 2785 S. Bay Street G, Eustis, FL 32726 ("Assignor") is the owner of the entire right, title and interest in and to U.S. Provisional Patent Application No. 61/750,555, PCT International Patent Application No. PCT/US2014/010890, together with the patents and patent applications including but not limited to those listed in Schedule A, and of the invention(s) therein described; and

WHEREAS, Synogen Management Group, Inc., a corporation of Florida, with its principal place of business located at 101 SE 2nd Place, Suite 201 B, Gainesville, FL 32601 ("Assignee"), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and U.S. Provisional Patent Application No. 61/750,555, PCT International Patent Application No. PCT/US2014/010890, together with the patents and patent applications listed in Schedule A, and of the invention(s) therein described.

NOW, THEREFORE, in consideration of One Dollar (\$1.00) and of other good and valuable consideration, receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned, intending to be legally bound, does hereby sell, assign and transfer to the assignee the entire right, title and interest, for the United States of America, its territories and possessions, and for all foreign countries, in said U.S. Provisional Patent Application No. 61/750,555, PCT International Patent Application No. PCT/US2014/010890, all divisions and continuations thereof, all rights to claim priority based thereon, all rights to file foreign applications on said inventions, and all letters patents and reissues thereof, issuing for said inventions and any improvements thereon in the United States of America and in any and all foreign countries including the patents and patent applications listed in Schedule A.

It is agreed that the undersigned shall be legally bound, upon request of the assignee, or its successors or assigns or a legal representative thereof, to execute all instruments proper to patent the inventions in the United States of America and foreign countries in the name of the assignee, and to execute all instruments proper to carry out the intent of this instrument.

The rights and property herein conveyed by the undersigned are free and clear of any encumbrance.

[Signature Page Follows]

EAST\169538779.3

PATENT
REEL: 053947 FRAME: 0943

RegenX Science Exhibit 1004
Page 1877

EXECUTED under seal on July 24, 2020.

ISE Professional Testing & Consulting Services, Inc.

By: [Signature]

Name: Ryanne Early

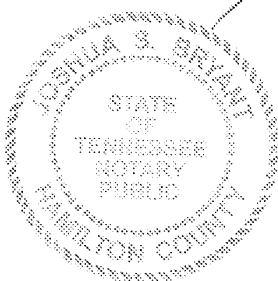
Title: President

STATE OF Tennessee :
COUNTY OF Hamilton : ss
:

On July 24, 2020, before me, the undersigned, personally appeared, Ryan Early, known to me or satisfactorily proven to be the person(s) who executed the within instrument, and who acknowledged herself/himself to be the President of ISE Professional Testing & Consulting Services, Inc., and, being authorized to do so, executed the foregoing instrument for the purposes therein contained by signing the name of the said company by herself/himself as such Ryan Early.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and official seal.

[Signature] (SEAL)
Notary Public
ex 11-07-2021



EAST\169538779.3

PATENT
REEL: 053947 FRAME: 0944

RegenX Science Exhibit 1004
Page 1878

EX-2021
RegenX Science, Inc. v. NeXtGen Biologics, Inc.
1878

SCHEDULE A

Country	Application Number	Filing Date
Canada	2,897,662	January 9, 2014
China	201780013359.0	January 9, 2014
Europe	14737892.1	January 9, 2014
Hong Kong	16108111.9	January 9, 2014
Israel	239828	January 9, 2014
Japan	2015-552775 2018-224475 (Divisional)	January 9, 2014 November 30, 2018
Korea	10-2015-7021367	January 9, 2014
United States	61/750,555 14/759,895 16/801956 (Continuation)	January 9, 2013 July 8, 2018 April 30, 2019
WIPO	PCT/US2014/010890	January 9, 2014

EAST\169538779.3

RECORDED: 10/01/2020

PATENT
REEL: 053947 FRAME: 0945