

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-527032

(P2006-527032A)

(43) 公表日 平成18年11月30日(2006.11.30)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>A 6 1 B 17/56</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 B	17/56	4 C 0 6 0
<b>A 6 1 L 27/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 L	27/00	4 C 0 8 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2006-515712 (P2006-515712)	(71) 出願人	502030190
(86) (22) 出願日	平成16年6月11日 (2004.6.11)		インターフェース バイオテック エー／
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月2日 (2006.2.2)		エス
(86) 国際出願番号	PCT/DK2004/000408		I N T E R F A C E B I O T E C H A
(87) 国際公開番号	W02004/110512		/ S
(87) 国際公開日	平成16年12月23日 (2004.12.23)		デンマーク、ディーケー-2970 ホー
(31) 優先権主張番号	PA200300871		ショルム、ヴェンリグヘッズヴェイ 6
(32) 優先日	平成15年6月12日 (2003.6.12)		V e n l i g h e d s v e j 6, D K
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		- 2 9 7 0 H o r s h o l m, D e n m
		(74) 代理人	100065248
			弁理士 野河 信太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞の体内移植法

(57) 【要約】

以下の工程：

- i) 欠損の位置を同定する工程、
  - ii) 軟骨細胞、軟骨芽細胞、骨細胞及び骨芽細胞並びにこれらの組合せからなる群より選択される細胞を軟骨又は骨の欠損中に適用する工程
- を含む動物における軟骨又は骨の欠損を治療するための内視鏡法。詳細には、本発明は、
- i) 欠損を含有する腔又は表面に流体を関節鏡視下又は内視鏡視下で適用する工程、及び
- 以下の工程
- ii) 流体により覆われた欠損で実施される、支持体材料と実質的に同時に細胞を欠損に適用する工程、
  - iii) 細胞と支持材料とを混合する工程、
  - iv) 欠損が実質的な量の流体を伴わずに細胞と支持体材料との混合物により覆われるように支持材料を固化させる工程、及び
  - v) 任意に、排出又は吸引により腔又は表面から流体を除去する工程
- を含む、動物体の欠損中への同種又は自家細胞の関節鏡視下又は内視鏡視下の体内移植法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の工程：

i) 欠損の位置を同定する工程、

ii) 軟骨細胞、軟骨芽細胞、骨細胞及び骨芽細胞並びにこれらの組合せからなる群より選択される細胞を軟骨又は骨の欠損中に適用する工程、  
を含む、動物における軟骨又は骨の欠損を治療するための内視鏡法。

## 【請求項 2】

i) 欠損を含有する腔又は表面に流体を関節鏡視下又は内視鏡視下で適用する工程、及び以下の工程

ii) 流体により覆われた欠損で実施される、支持体材料と実質的に同時に細胞を欠損に適用する工程、

iii) 細胞と支持材料とを混合する工程、

iv) 欠損が実質的な量の流体を伴わずに細胞と支持体材料との混合物により覆われるように支持材料を固化させる工程、及び

v) 任意に、排出又は吸引により腔又は表面から流体を除去する工程

を含む、動物体の欠損中への同種又は自家細胞の関節鏡視下又は内視鏡視下の体内移植のための、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

工程 i) が工程 ii) ~ v) の前である請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

工程 i) の流体の適用が工程 ii) の細胞の適用及び工程 iii) の支持媒体の適用と実質的に同時である請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

流体が気体である請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

動物がヒトのような哺乳動物である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

欠損が関節又は骨の欠損である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

欠損が軟骨欠損である請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

細胞が適切な組織を標的とするに適切な起源であり、可視化が内視鏡によりなされる請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

細胞が軟骨細胞、骨細胞又は骨芽細胞である請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

細胞が軟骨細胞である請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

細胞が同種及び/又は自家の軟骨細胞である請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

工程 i) の流体が液体である請求項 2、3、5 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 14】

液体が、塩化ナトリウム溶液、リンゲル溶液、細胞培養培地、細胞フレンドリーな液体及び同様のものからなる群より選択される生理学的に許容される水性媒体である請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

工程 ii) の支持体材料が、可溶性コラーゲン、フィブリノゲン、及びアプロチニンから

10

20

30

40

50

なる群より選択される請求項 2 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

支持体材料が水性組成物の形態で適用される請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

水性組成物が更に、1 若しくはそれより多い接着促進剤及び/又は 1 若しくはそれより多い生理学的に許容されるカルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンのようなイオンを含む請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

工程 ii) の細胞が細胞懸濁液の形態で適用される請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 19】

細胞が 1 又はそれより多い増殖因子を任意に含む例えば適切な増殖培地のような適切な媒体に懸濁される請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

細胞懸濁液が更に、支持体材料との接触の際に支持体材料の固化を開始する 1 又はそれより多い凝固性成分を含む請求項 18 又は 19 に記載の方法。

【請求項 21】

細胞懸濁液が更に、1 若しくはそれより多い接着促進剤及び/又は 1 若しくはそれより多い生理学的に許容されるカルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンのようなイオンを含む請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 22】

凝固性成分がトロンビン又はトロンビン様成分である請求項 20 又は 21 に記載の方法

。

【請求項 23】

支持体材料の固化が支持体材料とトロンビン又はトロンビン様成分との間の相互作用の結果であり、固化が固化した材料中に細胞を包み込む請求項 2 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

細胞懸濁液が支持体材料を含み、凝固剤を含有する溶液を適用する工程を更に含む請求項 18 又は 19 に記載の方法。

30

【請求項 25】

工程 iii) の細胞と支持体材料との混合が陽圧下での支持体材料及び/又は細胞の適用により実施される請求項 2 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

細胞及び支持体材料を含む懸濁液が、陽圧下での凝固剤を含有する溶液の適用により凝固剤と混合される請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

2 つの別個の容器を含み、第 1 の容器は細胞を含み、第 2 の容器は支持体材料を含む請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法で使用するためのキット。

【請求項 28】

第 1 の容器中の細胞が細胞懸濁液の形態である請求項 27 に記載の方法。

40

【請求項 29】

細胞が 1 又はそれより多い増殖因子を任意に含む例えば適切な増殖培地のような適切な媒体に懸濁される請求項 28 に記載のキット。

【請求項 30】

細胞懸濁液が更に、支持体材料との接触の際に支持体材料の固化を開始する 1 又はそれより多い凝固性成分を含む請求項 28 又は 29 に記載のキット。

【請求項 31】

細胞懸濁液が更に、1 若しくはそれより多い接着促進剤及び/又は 1 若しくはそれより多い生理学的に許容されるカルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンのようなイオン

50

を含む請求項 28 ~ 30 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 32】

凝固性成分がトロンビン又はトロンビン様成分である請求項 30 又は 31 に記載のキット。

【請求項 33】

凝固性成分を含む第 3 の容器を更に含む請求項 27 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 34】

2 つの別個の容器を含み、第 1 の容器は細胞を含み、第 2 の容器は凝固剤を含む請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法で使用するためのキット。

10

【請求項 35】

第 1 の容器が支持体材料を含む請求項 34 に記載のキット。

【請求項 36】

支持体材料を含む第 3 の容器を更に含む請求項 34 又は 35 に記載のキット。

【請求項 37】

キットが 2 つの別個のチャンバを含有するシリンジの形態であり、第 1 のチャンバは細胞を含有し、第 2 のチャンバは支持体材料又は凝固剤を含有する請求項 27 ~ 36 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 38】

シリンジが二連シリンジ又は同様なものである請求項 37 に記載のキット。

20

【請求項 39】

キットの使用のための指示書を更に含む請求項 27 ~ 38 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 40】

例えばヒドロキシアパタイト粒子の形態であるヒドロキシアパタイトの適用を更に含む請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

骨芽細胞 / 骨細胞のような細胞のための培養培地としてのヒドロキシアパタイトの使用

【請求項 42】

関節鏡視下で移植される細胞のための培養培地としてのコラーゲン溶液の使用。

30

【請求項 43】

内視鏡視下で移植される細胞のための培養培地としてのコラーゲン溶液の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、関節鏡又は内視鏡の使用を含む細胞の体内移植 (implantation) 又は移植 (transplantation) の方法に関する。この方法は、細胞の関節鏡視下及び / 又は内視鏡視下の体内移植を可能にし、容易、安全で安価な方法である。

40

【背景技術】

【0002】

発明の背景

Mats Brittbergらは、ティシール(登録商標)のようなフィブリン接着剤が、成長ホルモンを伴っても伴わなくても、未成熟軟骨細胞に対して軟骨形成効果を有さず、したがって軟骨又は骨軟骨の欠損の修復を促進するための足場として適切でないことを示した (Brittberg, M, Sjogren-Jansson, Lindahl, A, Peterson, L, 「The influence of fibrin sealant on Osteochondral Defect Repair in the Rabbit Knee」, Goteborg University (スウェーデン) Institute of Laboratory Medicine臨床化学科及びInstitute of Surgical Sciences整形外科のMats Brittbergの学位論文「Cartilage Repair. On cartilaginous

50

tissue engineering with the emphasis on chondrocyte transplantation」, 1996).

【0003】

Lazovic及びMessner (Lazovic, Dら、Acta Ortop. Scand, 1993,64:583-586)は、イヌにおいて、切断した前十字靭帯の治癒の改善を試みてフィブリン接着剤(ティシール(登録商標))の使用を試験し、該接着剤を使用して修復した靭帯が、単なる靭帯の縫合(実際、よりずっと高いコラーゲン含量を生じた)に対して、低い程度のコラーゲン発生を示すことを見出した。彼らは、フィブリン接着剤が細胞増殖を化学的に増強するが、形成された修復組織は低品質であると仮定した。ウサギにおける骨軟骨欠損の修復のためにティシール(登録商標)を使用したBrittbergらの実験において、彼らは、ティシール(登録商標)群では修復組織は少ないが、修復組織は、ティシール(登録商標)を使用したか否かにかかわらず、同じ線維-線維軟骨品質であることを見出した。彼らは、ティシール(登録商標)が骨軟骨欠損の修復を改善しないが、支持体として使用した自家又は同種のフィブリン凝塊が更なるインビボ実験に値する十分に有益な効果を示すようにみえることを結論付けた。

10

【0004】

更に、Brittbergらは、軟骨細胞をティシール(登録商標)と共に使用した実験は毒性反応を示さないが、軟骨細胞がティシール(登録商標)凝塊の表面でのみ増殖していることを見出した。このことは、ティシール(登録商標)が、例えば、カバー(例えば、ACIにおいて使用される骨膜移植体のようなカバー)の周縁をシールするような障壁として使用され得ることを示す。しかし、同種フィブリン凝塊を含む実験は、ウサギ及びヒトの両方の軟骨細胞の十分な内部成長(in-growth)を示した。したがって、この型の凝塊は軟骨細胞に対する「足場伝導(scaffold-conductive)」効果を示すことが示された。

20

【0005】

ティシール(登録商標)を用い成長因子(GH)の注射を用いた実験において、足場効果を何ら強化しなかったが、むしろ止血障壁として働く一方、同種(及び自家)フィブリンは、フィブリン凝塊中への軟骨細胞の浸潤及び成長を促進するようであった。したがって、このことは、この型のフィブリンは、足場効果を提示しているかもしれないことを示す。したがって、同種(又は自家)フィブリンは軟骨細胞に対する成長促進効果及びフィブリン中への増大した移動を提示する可能性がある。

【0006】

膝蓋骨の骨軟骨炎、変形性関節症(骨関節症とも呼ばれる)及び軟骨軟化症などの修復に理論的に使用される、軟骨細胞体内移植、より具体的には自家軟骨細胞体内移植に、並びに細胞体内移植法に-加えて軟骨損傷の修復に-適切な関節鏡法の開発は、膝の観血療法の間実施されるACI(自家軟骨細胞体内移植)(著者によってはACT(自家軟骨細胞移植)とも呼ばれる)と比較したとき、費用を有意に引き下げる。次に、軟骨細胞体内移植及び他の細胞体内移植は、整形外科分野におけるACI技術及び他の細胞体内移植技術を、膝関節に加えて他の関節で、より利用し易くする。更に、関節鏡視下の介入を実施する実質的に任意の整形外科クリニックが、ACI技術の使用を利用できるようになり、そのことによってより多くの患者が軟骨欠損の修復でACIを用いて治療されることが可能になる(その後、他の整形外科的疾患に細胞体内移植が利用可能になると、これらの技術はまた、関節鏡視下でガイドされる治療の開発に付される)。

30

40

【0007】

したがって、整形外科の分野における細胞体内移植技術のより十分な利用を可能にするために、関節鏡法を開発する必要がある。

【0008】

足場が欠損中に挿入される種々の形態の足場技術(足場での細胞の増殖を伴っても伴わなくても)を使用する方法は、関節鏡検査によってのみガイドされる細胞体内移植手順の実施の困難性に苦労してきた。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

50

## 発明の詳細な開示

本発明の目的は、人体又は動物の種々の関節における関節軟骨欠損、骨欠損又は軟骨欠損と骨欠損との組合せ(変形性関節症)の関節鏡視下ACI治療法を提供することである。この方法は、細胞懸濁液が入口(鍵穴)を通じて関節中に適用されて、培養細胞の堆積並びに軟骨下骨及び/又は軟骨への細胞の接着を導く技術を提供する。したがって、本発明は、被検体における軟骨又は骨の欠損を治療するための内視鏡法に関し、この方法は、以下の工程を含む：

i)欠損の位置を同定する工程、

ii)軟骨細胞、軟骨芽細胞、骨細胞及び骨芽細胞並びにこれらの組合せからなる群より選択される細胞を軟骨又は骨の欠損中に適用する工程。

10

### 【0010】

関節鏡が工程i)で欠損の位置を同定するために使用され、工程ii)で培養自家又は同種細胞の注入をガイドするために使用される場合、その方法は関節鏡視下ACIと呼ばれる。

### 【0011】

本出願及び本発明に関しては、以下の定義が適用される：

### 【0012】

関節鏡視下自家細胞体内移植(関節鏡視下ACI)は、軟骨又は骨の欠損を治療するための医学的手順であり、この手順によって培養細胞が、例えば「先を丸めた(blunt)」注射針又はカテーテルのようなニードルにより欠損中に体内移植される。この体内移植手順は、関節鏡により可視化され、ガイドされる。

20

### 【0013】

懸濁液は、不溶成分が溶媒に分散しているとき形成する。この特定の発明において、懸濁液は、欠損に適用する細胞を水性媒体と混合するとき形成する。この懸濁液は、次いで、欠損に適用される。

### 【0014】

用語「欠損領域」又は「欠損腔」は、傷害した関節軟骨、骨までの及び/又は骨を含む関節軟骨欠損(変形性軟骨症)、軟骨欠損と骨欠損との組合せ、又は、正常な軟骨又は骨により取り囲まれた骨を意味すると意図される。

### 【0015】

内視鏡は、観血療法の必要なく(すなわち、被検体の皮膚の入口を通じて)、骨組織又は軟骨組織の表面を見るために使用することができるデバイスである。関節鏡は、関節の検査に使用する特別な型の内視鏡である。

30

### 【0016】

本発明に従う関節鏡は、目視検査のために関節中に挿入される道具(内視鏡の1つの型)である。関節鏡は、通常、光ファイバーを含有するチューブ、レンズ及び光源を含み、観血療法なしで関節を検査することを可能にする。

### 【0017】

用語「入口」は、関節鏡及び関節鏡デバイスを関節中に導入するために皮膚に小さな穴を創る小規模操作手順(small operating procedure)を意味すると意図される。

### 【0018】

用語「軟骨外植片」は、適切な道具の使用により哺乳動物から外植された、哺乳動物の関節軟骨の一部を意味すると意図される。外植片は、1より多い種類の組織を含有し得る。例えば膝からの組織の外植の場合、外植片は軟骨組織及び骨組織を含有し得る。

40

### 【0019】

特定の実施形態において、本発明は、動物体の欠損中への同種又は自家の細胞の関節鏡視下又は内視鏡視下の体内移植法を提供することによって、上記の要求を満たす。この方法は、

i)修復すべき欠損の領域又は細胞移植の標的領域に位置させるように、関節鏡又は内視鏡を介して、該欠損を含有する腔又は表面へ流体を適用すること、

ii)細胞を欠損に、結合足場、凝固足場又はゲル化足場として作用する支持材料と実質的

50

に同時に適用すること、  
iii)細胞と支持材料とを混合すること、  
iv)欠損又は標的領域が細胞と支持材料との混合物により覆われるように、支持材料を固化すること、及び  
v)任意に、排水又は吸引により腔又は表面から流体を除去することを含む。

#### 【0020】

工程 i) で用いる流体は、液体、例えば生理学的に許容される塩化ナトリウム溶液、リンゲル液、細胞培養培地などであってもよいし、又は、気体、例えば問題の組織(例えば動物体(例えば、ヒトのような哺乳動物など)の関節又は器官)と両立できる濃度のCO<sub>2</sub>を含む滅菌エアなどであってもよい。通常、約5%のCO<sub>2</sub>濃度が適切である。この流体は通常、関節鏡検査及び内視鏡検査の間に使用され、当業者に周知である。本発明の特定の実施形態では、流体は液体である。流体(例えば液体)を使用する目的は、関節鏡による可視化を可能にするために欠損を拡げるためである。したがって、流体は、それ自体、欠損中に体内移植される細胞を含有しない。更に、欠損中に存在する流体により、流体の上部表面の下に細胞を適用することが可能になる(すなわち、ニードル又はカテーテルを欠損の底にまで導き、即時のゲル化又は凝固が欠損を直接襲う様式で欠損に注入することにより、この様式で流体の下に適用される。更に、下記のように、流体は、2つの必要とされる組成物、すなわち i) 細胞(例えば細胞懸濁液の形態)と ii) 支持体材料(例えば支持体材料を含む組成物の形態)を混合するために適切な媒体である。下記のように、細胞と支持体材料との混合は、欠損に細胞をインサイチュで固定化するために重要である。一旦適用されれば、支持体材料及び細胞は、支持体材料が固化又はゲル化することにより支持体中に細胞が維持される前に、実質的に均質に混合されなければならない。

10

20

#### 【0021】

本発明に関して、用語「組織」は、軟組織(器官など)及び硬組織(骨、関節など)を包含するように広義に使用される。

#### 【0022】

一旦欠損が可視化されると、細胞を適用することが可能になる。細胞は同種又は自家の細胞であり、問題の欠損を修復するための使用に適切である型である。本発明に関して用語「同種細胞」は、細胞がそれが適用される組織に適合性であることを意味すると意図される。用語「自家細胞」は、細胞がそれが適用される同じ被検体に由来することを示す。以下では、例えば軟骨細胞及び/又は骨芽細胞(骨細胞)の使用が議論される。適用される細胞は、通常、懸濁液で提供される。すなわち、細胞は、適切な媒体、例えばダルベッコ最少イーグル培地/F12、任意に血清(例えば胎仔ウシ血清又は同種若しくは自家の血清)及び/又は成長因子を含有してもよいDMEM/F12に懸濁され、適用時に、支持材料と混合される。細胞懸濁液は、媒体のみと共に維持されて、その後別の注入システムからの凝塊を形成する成分と混合されてもよいし；又は、細胞懸濁液は、二連シリンジの一方のチャンバ中の1又はそれより多い成分と共に配置されてもよい。この成分はそれ自体該チャンバ中で細胞を凝塊にしないが、二連シリンジの他方のチャンバからの成分と混合された後には、ゲル化又は凝固を引き起こす。混合は、2つのチャンバが、例えば「Y字」接続を介して、1つの単一接続に接続された後に始まる。ここで、ゲル化又は凝固プロセスは、細胞と上記成分を含んで(すなわち、注射針又はカテーテルを通過するとき)開始される。

30

40

#### 【0023】

以下の表は、使用し得るが限定的ではないいくつかの成分の例を提供する。

【表 1】

2連シリンジのチャンバ1及びチャンバ2(又は本発明に従う方法での使用に適切な  
任意の他のキット)中の内容物

組合せ	チャンバ1中の成分の範囲	チャンバ1に含有される細胞	チャンバ2に含有される細胞	チャンバ2中の成分の範囲
コラーゲンⅢ + 他の短鎖コラーゲン	コラーゲンⅢ: 0.5 ~ 20 mg/ml 及び短鎖:0.5 ~ 20 mg/ml + (プラス)	$2 \times 10^5 \sim$ $6 \times 10^6$ 細胞/ml	— (マイナス) 細胞	*トロンビン (任意の 起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び $\text{CaCl}_2$
コラーゲンⅢ + 他の短鎖コラーゲン	コラーゲンⅢ: 0.5 ~ 20 mg/ml 及び短鎖:0.5 ~ 20 mg/ml +	— 細胞	$2 \times 10^5 \sim 6 \times$ $10^6$ 細胞/ml	*トロンビン (任意の 起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び $\text{CaCl}_2$
フィブリノゲン (任意の型又は種)及び いくつかの場合 アプロチニン	フィブロゲン: 1 ~ 20 mg/ml	$2 \times 10^5 \sim$ $6 \times 10^6$ 細胞/ml	— 細胞	*トロンビン (任意の 起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び $\text{CaCl}_2$
フィブリノゲン (任意の型又は種)及び いくつかの場合 アプロチニン	フィブロゲン: 1 ~ 20 mg/ml	— 細胞	$2 \times 10^5 \sim 6 \times$ $10^6$ 細胞/ml	*トロンビン (任意の 起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び $\text{CaCl}_2$
フィブリノゲン (市販)	市販のフィブリノゲン 製品中に使用される量 に対応する濃度率で	$2 \times 10^5 \sim$ $6 \times 10^6$ 細胞/ml	— 細胞	*トロンビン (任意の 起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び $\text{CaCl}_2$
フィブリノゲン (市販)	市販のフィブリノゲン 製品中に使用される量 に対応する濃度率で	— 細胞	$2 \times 10^5 \sim 6 \times$ $10^6$ 細胞/ml	*トロンビン (任意の 起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び $\text{CaCl}_2$

\*任意の起源のトロンピンは、任意の種からであり得、組換えであり得、又はトロンピンからペプチド(凝固又はゲル化を誘導する能力を有する)として調製され得;いくつかの場合、アプロチニンが、例えばティシール又はベリプラストに対応する市販の組合せ中のように添加される。塩化カルシウムは、例えば市販の組合せ中で使用される量で添加される。通常、使用されるトロンピンの濃度は、約 0.5~10 IU であるが、いくつかの市販キットではトロンピンの濃度は 1000 IU 又はそれ以上である。

## 【0024】

上記のように、細胞は、支持体材料と、実質的に同時に、好ましくは同時に、欠損に適用される。このような支持体材料の適用は必要である。なぜなら、例えば上記のような液体中で適用される細胞は欠損の表面に付着し得ず、したがって細胞が確実に欠損と接触するか又は欠損の近傍に保持されるために他の手段が適用されるかもしれないからである。支持体材料は、欠損への適用の際に凝固又は固化し得る材料である。好ましい実施形態では、凝固、固化又はゲル化は、任意に例えばカルシウム又はマグネシウムイオンのようなイオンの存在下で、支持体材料とトロンピン又はトロンピン様材料との接触によって生じる。したがって、支持体材料は、それがインサイチュで固化したときは、欠損又は標的領域に接着する、欠損を充填する堅固なカバーとして機能すべきであり、細胞が欠損又は標的領域で維持されることを可能にすべきである。したがって、細胞は欠損の表面上だけでなく、固化又は凝固した支持体材料全体を通じて存在する。すなわち、細胞は、欠損した

10

20

30

40

50

領域に多層で存在する。したがって、欠損の表面のみが単層の細胞で覆われる場合より相当高い量の細胞を適用することができる。更に、このカバーは、治療される欠損又は標的領域を局所環境の影響から保護する機能を有している。混合して凝固、凝塊(接着性)及び/又はゲル化した細胞/支持体材料を覆う追加の層のカバーは、下記の実施例のいくつかで記載するように、凝固した細胞/支持体を覆う余分の密封性カバー(欠損全体を充填することによって覆われている)を創るために、例えばティシール(Baxter)及び/又はペリプラスト(AventisBehring)のような市販のフィブリンシーラントでさえあり得る。

#### 【0025】

一般に、細胞が混合又は分散される支持材料は、代表的には、凝固性、接着性、結合性、ゲル化性/又はシーラント製品である。支持材料は、欠損又は標的領域へ適切なデバイスを通じて適用する前に、適切な媒体で希釈されてもよい。支持体材料を含む組成物は、例えばフィブリン、I型、III型、II型コラーゲンなどのような適切な材料を、例えばインスリン成長因子(IGF)及び/又は他の成長因子と共に含有してもよい。現在溶液として投与され得るコラーゲンフィル(collagen fill)として使用される組成物は、市販されているもの、例えばゼラチン、III型コラーゲン、I型コラーゲン、II型コラーゲン(フィブロゲン(Fibrogen)(California)により開発中である)及び短鎖コラーゲン(これらのいくつかは市販されている)である。凝固誘導物質は、上記の表に関連して前述されたように、1つの又は別の形態のトロンピンである。凝固用の血液製剤の領域内で、それは、純粋の又精製されていない(例えば寒冷沈降物の一部であるタンパク質のような他のタンパク質を含有する)任意のフィブロゲン(fibrogen)(1つの又は別の形態の、任意の種であるが、好ましくはヒト);トロンピン又はトロンピン様凝固若しくはゲル化を誘導する効果を有する任意の誘導体であり得る。この目的で使用される全てのものは、細胞に対して非毒性であるべきである。

#### 【0026】

2つの異なる液体[すなわち、i)細胞を有する媒体、及びii)支持材料を含む組成物]が実質的に同時に適用されることが重要である。支持材料の流れにより、細胞と材料との必要な混合をして欠損又は標的領域中に導入することが可能になり、固化又は凝固する前に支持体材料における細胞の均一な分布が確実になる。或いは又は追加的に、流体又は気体の流れが代わりに(例えば、これもまた関節鏡を介して)適用されてもよい。

#### 【0027】

本発明は、本発明の第1の部分では、関節鏡の一般的な使用法(流体は可視化用の関節開口を維持するために使用される)を用いて、流体のカバーの下で実施される支持材料(その中に細胞が適用の間に混合される)と同時の細胞の体内移植の利用を包含する。本発明の第2の部分として、また関節鏡との組合せで、本発明は、執刀医が治療下領域を可視化するのを助けるための(例えば他の内視鏡(例えば腹部検査など用)で使用されるような)ある種の圧のガイドされた滅菌エア-又は僅かな陽圧を提供する。ここで、エア-(例えば大気とCO<sub>2</sub>(混合された細胞/凝固性支持体材料によって十分に寛容される濃度の)との組合せのような)はある種の圧の下で供給される。本発明のこの第2の部分では、「カバー」が使用される。このカバーの下のエア-ポケット(圧は約20~30mmHgであり得る)下に、混合された細胞/凝固支持体材料が配置され得る。

#### 【0028】

本発明の第3の部分は、流体の下又は膨張したエア-の下のいずれかで適用される凝固性物質(支持体材料)の層に関する。この支持体材料は、それ自体は細胞を含まないが、それが固化する前にインサイチュで細胞と混合される

#### 【0029】

固化した層の厚さは、欠損のサイズ及び特定の動物種に依存する。ヒトについては、厚さは一般に2~6mmである。

#### 【0030】

本発明のこの第1の部分は、支持体材料を細胞と混合する間又はしない間、支持体材料(例えば細胞と組み合わされた支持体材料)を適所(例えば軟骨欠損の底又は他の標的領域)

に維持するために圧力を利用することによる、細胞(例えば軟骨欠損の修復のためには軟骨細胞のような細胞)と混合された液体物質の体内移植を制御することと組み合せた、関節鏡視下又は内視鏡視下でガイドされる手順の間の流体の存在の利用、関節における流体の圧力(及び恐らくは滅菌エアーの圧力)の変化の可能性に関する。最後のシナリオが生じてもよい。このとき、覆っているフィブリン又は他の細胞非含有シーラントの余分の層が細胞/支持体凝固物、凝塊又はゲル一面に配置される。この方法は、2つの異なる媒体、すなわち、i)欠損を可視化するために欠損に適用される流体(流体のカバー)、及びii)関節鏡を介して支持体を適用するために使用される媒体、における支持体材料の溶解度の差を利用する。支持体材料は、流体のカバーとして使用される流体の存在にかかわらず、固化又は凝固して欠損に接着するように選択される。

10

#### 【0031】

圧力の適用により、流体のカバーと混合しなくとも、支持体材料を含む組成物の局在が制御される。換言すれば、支持体材料又は支持体材料を含む組成物は、その適用の間、関節に存在する近接の流体に可溶ではない。すなわち、支持体材料は適用領域(例えば関節の底)に維持され、そこで支持体材料が固化し適用領域に接着する。細胞の同時適用により、細胞もまた適用領域で維持されるように、支持材料が細胞を組み込むか又は包み込むことが可能になる。細胞は、その後48時間以内に又はそれより長くで、それ自体がマトリクスを産生し始める。このマトリクスは、最終的に、接着を助け、後には接着性軟骨マトリクスとなる。支持体材料は、最終的には、短期間後又は長期間後に吸収される可能性が最も高い。

20

#### 【0032】

流体又は(関節中の圧力と比較して)増加した圧力若しくは陽圧の存在を組み合わせるこの方法は、新規な技術であり、外科医が細胞/支持体材料、細胞を含有しないが細胞/支持体材料に積層され、適用された材料が関節中に漏れるのを予防するフィブリンシーラント材(例えば市販製品)の適用を実施するために、細胞と共に又は細胞を伴わずに物質を適用する間に固化及び接着が体内移植物を欠損中の適所に保持するに十分となれば圧力の減少及び/又は圧力の除去を実施するために、及び、体内移植した細胞を危険に曝す圧力を越えることなく、必要に応じて、流体の圧力を変更する(又はエアーガスが使用される場合にはそのガスの圧力を変更する)ために、十分な視覚化を提供する。軟骨細胞の増殖及び移動を可能にするある種のフィブリンの能力は、上記のように、Mats Brittbergにより記載されている。しかし、Brittbergによりなされたこの手順は、例えば可視化に使用される流体又は気体の下で、「二相」系として実施されない。

30

#### 【0033】

本発明の別の観点では、流体又はエアー圧力下で支持材料に混合された細胞を配置することを含む記載された方法がまた、例えば骨関節炎病巣の底部分が流体及び/又はエアー圧力下で実施される骨形成細胞と支持材料との混合物で最初に治療され、次いで軟骨形成細胞と支持材料との混合物が流体及び/又はエアー圧力下で第1の細胞/支持材料(層1)一面に積層される二工程手順を可能にするために、1より多い細胞型、例えば軟骨形成細胞(軟骨細胞/軟骨芽細胞又は他の軟骨形成細胞)及び骨形成細胞(例えば骨芽細胞、骨細胞、又は他の細胞)などの適用のために使用され得ることである。

40

#### 【0034】

本発明のなお別の観点では、培養した骨形成細胞を含有するか又は骨形成細胞と共に送達されるかいずれかのヒドロキシアパタイト粒子(例えば、Bio-Oss, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland)を送達することである。混合物中の全ては、欠損(例えば関節における骨関節炎欠損)で、流体及び/又はエアー圧力下に、支持材料を即座に伴って適用される。次に、軟骨形成細胞/支持材料の混合物の層が、ヒドロキシアパタイト粒子からなる底層一面に積層される。

#### 【0035】

細胞と適切な支持材料の混合物又は細胞とヒドロキシアパタイトと支持材料の混合物が例えば関節鏡視下の介入の間に又はこの介入を介して配置される本発明の上記の部分にお

50

いては、カバー層はフィブリン(例えばティシール(登録商標)生物学的糊のような)の無細胞層(ここでは例えば軟骨細胞は内部に移動しない)である。この場合、上部のカバー層では、細胞をほとんど又は全く凝固しない。関節における陽圧の存在の間でも、陽圧なしでも、外科医は、その領域一面を実質的に概観している限り、シーラントを適用している。

【0036】

フィブリン(例えばティシール(登録商標)複合物)のカバー層は、周囲の健全な軟骨に対して接線方向の関節表面に面するカバーを強化するために、フィブリン又はティシール(登録商標)と混合された可溶性物質として別のタンパク質(例えばコラーゲン(例えばI型コラーゲン))と混合されてもよい。これは、例えば流体又はエアー圧力下で、関節鏡検査の間になされてもよい。

10

【0037】

カバーはまた、欠損のサイズにカットされた膜(例えばI/III型コラーゲン膜)であってもよく、細胞/凝固支持体材料が細胞をカバー中へ許容するのを防ぎ、同時に細胞/凝固支持体材料に縛り付けるために、側部が細胞/凝固支持体材料に面し、新鮮な高濃度の同種若しくは支持体材料で又は新鮮なティシール(登録商標)でコートされている。この膜はまた、それ自体が細胞/凝固支持体材料へ接着してもよい。

【0038】

したがって、関節鏡法を使用するとき、支持体材料と共に軟骨細胞(例えば自家軟骨細胞)の適用を実施できることが必要である。自家軟骨細胞体内移植を実施するためのガイドとしての関節鏡の使用のため、関節における(滅菌)生理食塩水又は栄養培地の存在にかかわらず、細胞が維持されるべき領域に残存する(接着する)支持体材料における軟骨細胞の適用を制御することができる。

20

【0039】

本発明者によって開発された方法は、例えば軟骨欠損(cartilage defect)(例えば軟骨欠損(chondral defect)、骨軟骨欠損)中の制御された領域に軟骨細胞含有物質を配置するという新たな概念のために、顕著に新規であり、物質(例えばヒドロキシアパタイトなど)中に細胞(例えば骨芽細胞/骨細胞)を、骨関節炎に罹患している関節中に薄い底層として適用し、その後軟骨細胞/物質の第2の層を適用することができるとき、並びに、標的器官又は標的領域(例えば肝臓、心臓など)に内視鏡視下手順を通じて細胞を適用するときでさえ、顕著に新規である。物質は、天然物であり、同時に、細胞に対して毒性でない。軟骨細胞の場合、流体下で適用される物質は、軟骨細胞に対して毒性であってはならず、或いは、軟骨細胞の内部成長及び/又は成熟段階(この段階で、細胞はまた、最後には新たな軟骨となるマトリクス構造を産生する)に促進さえしてもよい。

30

【0040】

混合物のために使用される適切な支持体材料の異なる濃度レベル、及び凝固、接着及び/又はゲル化時間の変動、並びにその支持材料と混合する細胞の容量及び濃度の変動は、本発明の一部である。更に、細胞及び/又は支持材料は、適切な成長因子(例えばIGF-1のような)と混合されてもよい。成長因子は、フィブリン中での分化した軟骨細胞形態の維持を助け得る(Fortier, LAら, Am. J. Vet. Res. 2002, 63(2) 301-305)。

【0041】

上記のように、本発明の不可分の一部はまた、使用時に外科医が凸形又は凹形の関節表面(ここに以下の図面に示されるような欠損が存在する)にフィブリンを適用することを可能にする拡大出口を作製することにより、フィブリン若しくはティシール(登録商標)、又は比較的強力な引張強度を有する滑面を作り得る別のタンパク質(例えば可溶性コラーゲンのような)と共に適用されるか若しくは種々の構成成分(例えば可溶性コラーゲン、及び修復された軟骨領域の滑面を提供する他の物質などのような)と恐らく混合されるこれらの薬剤の1つのいずれかの表面として上記のカバーを作製することである。関節鏡検査の間、軟骨の表面を覆って広がり、流体又はエアー圧力下で注入されるときフィブリン/細胞混合物及びフィブリンカバーを裏打ちしそして制限する一時的に穿孔された膜が配置されてもよい。この膜は、関節鏡検査の間に使用される流体(又は膨張するエアー)に対して

40

50

容易に透過性であるべきである。この膜は、次いで、フィブリン/細胞混合物及びフィブリンカバーが適所で凝固すると、切開部の1つから除去される。

【0042】

本発明の他の観点は、以下の項目及び添付の特許請求の範囲から明らかである。該当するときはいつでも、本明細書中に記載される詳細及び細目はこれらの観点に必要な変更を加えて適用される。

【0043】

より具体的には、本発明は以下の項目に関する：

1. 以下の工程：

i) 欠損の位置を同定する工程、  
ii) 軟骨細胞、軟骨芽細胞、骨細胞及び骨芽細胞並びにこれらの組合せからなる群より選択される細胞を軟骨又は骨の欠損中に適用する工程、  
を含む、動物における軟骨又は骨の欠損を治療するための内視鏡法。

10

【0044】

2. i) 欠損を含有する腔又は表面に流体を関節鏡視下又は内視鏡視下で適用する工程、及び以下の工程

ii) 流体により覆われる欠損で実施される、支持体材料と実質的に同時に細胞を欠損に適用する工程、

iii) 細胞と支持材料とを混合する工程、

iv) 欠損が実質的な量の流体を伴わずに細胞と支持体材料との混合物により覆われるように支持材料を固化させる工程、及び

20

v) 任意に、排出又は吸引により腔又は表面から流体を除去する工程

を含む、動物体の欠損中への同種又は自家細胞の関節鏡視下又は内視鏡視下の体内移植のための項目1に記載の方法。

【0045】

3. 工程 i) が工程 ii) ~ v) の前である項目2に記載の方法。

【0046】

4. 工程 i) の流体の適用が工程 ii) の細胞の適用及び工程 iii) の支持媒体の適用と実質的に同時である項目2に記載の方法。

【0047】

5. 流体が気体である項目4に記載の方法。

30

【0048】

6. 動物がヒトのような哺乳動物である先行する項目のいずれか1項に記載の方法。

【0049】

7. 欠損が関節又は骨の欠損である先行する項目のいずれか1項に記載の方法。

【0050】

8. 欠損が軟骨欠損である項目7に記載の方法。

【0051】

9. 細胞が適切な組織を標的とするに適切な起源であり、可視化が内視鏡によりなされる先行する項目のいずれか1項に記載の方法。

40

【0052】

10. 細胞が軟骨細胞、骨細胞又は骨芽細胞である先行する項目のいずれか1項に記載の方法。

【0053】

11. 細胞が軟骨細胞である項目10に記載の方法。

【0054】

12. 細胞が同種及び/又は自家の軟骨細胞である先行する項目のいずれか1項に記載の方法。

【0055】

13. 工程 i) の流体が液体である項目2、3、5 ~ 12のいずれか1項に記載の方法。

50

## 【0056】

14. 液体が、塩化ナトリウム溶液、リンゲル溶液、細胞培養培地、細胞フレンドリーな液体及び同様のものからなる群より選択される生理学的に許容される水性媒体である項目13に記載の方法。

## 【0057】

15. 工程ii)の支持体材料が、可溶性コラーゲン、フィブリノゲン、及びアプロチニンからなる群より選択される項目2～14のいずれか1項に記載の方法。

## 【0058】

16. 支持体材料が水性組成物の形態で適用される項目15に記載の方法。

## 【0059】

17. 水性組成物が更に、1若しくはそれより多い接着促進剤及び/又は1若しくはそれより多い生理学的に許容されるカルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンのようなイオンを含む項目16に記載の方法。

10

## 【0060】

18. 工程ii)の細胞が細胞懸濁液の形態で適用される先行する項目のいずれか1項に記載の方法。

## 【0061】

19. 細胞が1又はそれより多い増殖因子を任意に含む例えば適切な増殖培地のような適切な媒体に懸濁される項目18に記載の方法。

## 【0062】

20. 細胞懸濁液が更に、支持体材料との接触の際に支持体材料の固化を開始する1又はそれより多い凝固性成分を含む項目18又は19に記載の方法。

20

## 【0063】

21. 細胞懸濁液が更に、1若しくはそれより多い接着促進剤及び/又は1若しくはそれより多い生理学的に許容されるカルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンのようなイオンを含む項目18～20のいずれか1項に記載の方法。

## 【0064】

22. 凝固性成分がトロンビン又はトロンビン様成分である項目20又は21に記載の方法。

## 【0065】

23. 支持体材料の固化が支持体材料とトロンビン又はトロンビン様成分との間の相互作用の結果であり、固化が固化した材料中に細胞を包み込む項目2～22のいずれか1項に記載の方法。

30

## 【0066】

24. 細胞懸濁液が支持体材料を含み、凝固剤を含有する溶液を適用する工程を更に含む項目18又は19に記載の方法。

## 【0067】

25. 工程iii)の細胞と支持体材料との混合が陽圧下での支持体材料及び/又は細胞の適用により実施される項目2～23のいずれか1項に記載の方法。

## 【0068】

26. 細胞及び支持体材料を含む懸濁液が、陽圧下での凝固剤を含有する溶液の適用により凝固剤と混合される項目24に記載の方法。

40

## 【0069】

27. 2つの別個の容器を含み、第1の容器は細胞を含み、第2の容器は支持体材料を含み先行する項目のいずれか1項に規定される方法で使用するためのキット。

## 【0070】

28. 第1の容器中の細胞が細胞懸濁液の形態である項目27に記載の方法。

## 【0071】

29. 細胞が1又はそれより多い増殖因子を任意に含む例えば適切な増殖培地のような適切な媒体に懸濁される項目28に記載のキット。

## 【0072】

50

30. 細胞懸濁液が更に、支持体材料との接触の際に支持体材料の固化を開始する 1 又はそれより多い凝固性成分を含む項目 28 又は 29 に記載のキット。  
【0073】
31. 細胞懸濁液が更に、1 若しくはそれより多い接着促進剤及び/又は 1 若しくはそれより多い生理学的に許容されるカルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンのようなイオンを含む項目 28 ~ 30 のいずれか 1 項に記載のキット。  
【0074】
32. 凝固性成分がトロンビン又はトロンビン様成分である項目 30 又は 31 に記載のキット。  
【0075】
33. 凝固性成分を含む第 3 の容器を更に含む項目 27 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のキット。 10  
【0076】
34. 2 つの別個の容器を含み、第 1 の容器は細胞を含み、第 2 の容器は凝固剤を含む先行する項目のいずれか 1 項に規定される方法で使用するためのキット。  
【0077】
35. 第 1 の容器が支持体材料を含む項目 34 に記載のキット。  
【0078】
36. 支持体材料を含む第 3 の容器を更に含む項目 34 又は 35 に記載のキット。  
【0079】
37. キットが 2 つの別個のチャンバを含有するシリンジの形態であり、第 1 のチャンバは細胞を含有し、第 2 のチャンバは支持体材料又は凝固剤を含有する項目 27 ~ 36 のいずれか 1 項に記載のキット。 20  
【0080】
38. シリンジが二連シリンジ又は同様なものである項目 37 に記載のキット。  
【0081】
39. キットの使用のための指示書を更に含む項目 27 ~ 38 のいずれか 1 項に記載のキット。  
【0082】
40. 例えばヒドロキシアパタイト粒子の形態であるヒドロキシアパタイトの適用を更に含む項目 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。  
【0083】
41. 骨芽細胞/骨細胞のような細胞のための培養培地としてのヒドロキシアパタイトの使用。 30  
【0084】
42. 関節鏡視下で移植される細胞のための培養培地としてのコラーゲン溶液の使用。  
【0085】
43. 内視鏡視下で移植される細胞のための培養培地としてのコラーゲン溶液の使用。  
【0086】
- 以下の実施例は、本発明を例示する意図であり、如何なる方法であっても本発明の範囲を限定する意図ではない。
- 【実施例】
- 【0087】 40
- 実施例 1
- 動物に由来する関節(例えばブタ若しくはウマ又は他の動物からの膝関節)を関節鏡検査に付し、細胞/支持材料が関節鏡を介して適用される流体又は気体と混合しない様式で、標的領域に接着する能力が保持されて、細胞と混合された支持材料を適用することを可能にするために、0.9%滅菌食塩水のような流体又は気体をその関節に充填して、例えば軟骨欠損のような領域の関節鏡視下修復のために標的とされる領域を可視化する。
- 【0088】
- 或いは、細胞及び又はヒドロキシアパタイト懸濁液(例えばBio-Oss)中で混合されるか若しくはその中で増殖された細胞は、シリンジを通じて送達されてもよく、処置されるべき領域中へのシリンジの出口で混合されてもよい。

## 【0089】

## 実施例 2

本実施例では、細胞の体内移植の前に他の液体からの圧力下で、支持体材料が配置され得る。この場合、支持材料は、例えば固化まで関節鏡を介して働く圧力により適所に維持される他の液体の下に配置されてもよい。次いで、流体圧力により適所に維持される支持材料中に細胞を単に注入することにより、液状物質の配置後又は固化が開始した後の任意の時点で細胞が注入される。

## 【0090】

## 実施例 3

第2のフィブリンシーラントと組み合わせた関節鏡視下の自家軟骨細胞の体内移植(前臨床)

10

## 第1の外科的関節鏡視下介入

5匹のヤギを前臨床試験に使用する。ヤギを2つの外科的介入に付する。第1の外科的介入は、ヤギの膝からの軟骨生検の関節鏡視下採集である。ヤギをデンマークAalborg Sygehus Sydの認可された動物施設で飼育する。麻酔後、小さな切開を通じて前内側又は前外側のいずれかの進入により関節鏡検査を実施する。膝の内側及び外側に2つの異なる切開を準備する。挺子を用いて、50~200mgの軟骨を鋭利な挺子により除去し、滅菌ダルベッコMEM/F12及びウシ胎仔血清を含有する輸送管に無菌的に移す。パンチ器具を用い、3~5週間後に細胞の体内移植に使用するために、0.6cm(直径)円形の全層軟骨損傷を準備する。生検をインターフェースバイオテック エー/エスのリサーチ細胞研究所に運び、

20

## 【0091】

## 第2の外科的関節鏡視下介入

軟骨細胞培養物が4~10百万細胞に拡大したら(通常は3~5週間要する)、細胞を二連シリンジに、該二連シリンジの一方のチャンバ中のヒト組換えIII型コラーゲン+例えば短いコラーゲンファイバの添加のような化合物の溶液と共にパッケージングして動物施設に戻す。短いコラーゲンファイバは、細胞増殖に有害効果を有さず、コラーゲングルと混合したとき、成分がIII型コラーゲンのみであるとき(短いコラーゲンファイバを含まない)と比較して100~1000倍高い透過性が証明されており(Gentleman E, Nauman, EA, Dee KC and Livesay GA, Tissue Eng. (2004) 10(3-4):421-427を参照)、したがって(最終的に二連シリンジの他方のチャンバからの細胞+トロンビン(及び塩化カルシウム)と混合されるとき)組換えコラーゲンにより引き起こされる如何なる可能性のある縮小も制限する。二連シリンジの他方のチャンバは、1~10百万細胞の範囲の細胞濃度でトロンビン(及びCaCl<sub>2</sub>)を含有する。一方のシリンジチャンバの先端からのラインは、他方のシリンジチャンバからの別のラインと接続している。ニードル/カテーテルを通過するときコラーゲン混合物を含有する混合物がトロンビン及び細胞と混合されるように、18ggのサイズの先を鈍らせたニードル/カテーテルを2つのラインに接続する。ニードル/カテーテルの鈍い端部は、外科的操作のために作製された切開の1つを通じて関節鏡によりガイドされて、打ち抜かれた0.6cm(直径)軟骨欠損に進められる。予め打ち抜かれた0.6cm軟骨欠損は、コラーゲン混合物-トロンビン/細胞混合物(凝固に関与する成分の相対的濃度に依存して30~

30

40

## 【0092】

別の二連シリンジを用いて、無細胞フィブリン糊或いはティシール(Baxter, Austria)又はPantaject(登録商標)の形態若しくはスプレーセット(Beriject(登録商標))の形態のベリプラスト(共にAventis-Behring)のいずれかのようなフィブリンシーラントを、細胞混合物の適用直後に、欠損において凝固中の細胞混合物を全体的に覆って適用する。次いで、シーラントを凝固させて切開を閉じる。第2の関節鏡視下介入を完了した後、軟骨移植片(体内移植片)が膝関節の極大屈曲により破裂することを回避するためにヤギに(術後の)包帯をする。

## 【0093】

50

次いで、ヤギを、最後の関節鏡視下治療の1～2ヶ月後に、修復した軟骨欠損の関節鏡視下での制御に付する。関節鏡視下治療の6ヶ月後に、動物及び、関節鏡視下での軟骨細胞体内移植で修復膝を麻酔する。整形外科医が損傷を検査し、写真、ビデオ撮影し、デンスitometa測定を行い、「治療した」領域を採取して組織学的、組織化学的及び免疫組織化学的分析に付する。

【0094】

実施例4

第2のフィブリンシーラントなしでの関節鏡視下の自家軟骨細胞の体内移植(前臨床)

第1の外科的関節鏡視下介入

5匹のヤギを前臨床試験に使用する。ヤギを2つの外科的介入に付する。第1の外科的介入は、ヤギの膝からの軟骨生検の関節鏡視下採集からなる。ヤギをデンマークAalborg Sygehus Sydの認可された動物施設で飼育する。麻酔後、小さな切開を通じて前内側又は前外側のいずれかの進入により関節鏡検査を実施する。膝の内側及び外側に2つの更なる切開を準備する。挺子を用いて、50～200mgの軟骨を鋭利な挺子により除去し、滅菌ダルベッコMEM/F12及びウシ胎仔血清を含有する輸送管に無菌的に移す。パンチ器具を用い、3～5週間後に細胞の体内移植に使用するために、0.6cm(直径)円形の全層軟骨損傷を準備する。生検をインターフェースバイオテック エー/エスのリサーチ細胞研究所に運び、外植片からの培養に付する。

【0095】

第2の外科的関節鏡視下介入

軟骨細胞培養物が4～10百万細胞に拡大したら(通常は3～5週間要する)、細胞を二連シリンジに、該二連シリンジの一方のチャンバ中のヒト組換えIII型コラーゲン+例えば短いコラーゲンファイバの添加のような化合物の溶液と共にパッケージングして動物施設に戻す。短いコラーゲンファイバは、細胞増殖に有害効果を有さず、コラーゲングルと混合したとき、成分がIII型コラーゲンのみであるとき(短いコラーゲンファイバを含まない)と比較して100～1000倍高い透過性が証明されており(Gentleman E, Nauman, EA, Dee KC and Livesay GA, Tissue Eng. (2004) 10(3-4):421-427を参照)、したがって(最終的に二連シリンジの他方のチャンバからの細胞+トロンピン(及び塩化カルシウム)と混合されるとき)組換えコラーゲンにより引き起こされる如何なる可能性のある縮小も制限する。二連シリンジの他方のチャンバは、1～10百万細胞の範囲の細胞濃度でトロンピン(及びCaCl<sub>2</sub>)を含有する。一方のシリンジチャンバの先端からのラインは、他方のシリンジチャンバからの別のラインと接続している。ニードル/カテーテルを通過するときコラーゲン混合物を含有する混合物がトロンピン及び細胞と混合されるように、18ggのサイズの先を鈍らせたニードル/カテーテルを2つのラインに接続する。ニードル/カテーテルの鈍い端部は、外科的操作のために作製された切開の1つを通じて関節鏡によりガイドされて、打ち抜かれた0.6cm(直径)軟骨欠損に進められる。

【0096】

予め打ち抜かれた0.6cm軟骨欠損は、コラーゲン混合物-トロンピン/細胞混合物(凝固に参与する成分の相対的濃度に依存して30～180秒以内に凝固する)が充填される。第2のシーラントは使用されない。

【0097】

第2の関節鏡視下介入を完了した後、軟骨移植片(内殖片)が膝関節の極大屈曲により破裂することを回避するためにヤギに(術後の)包帯をする。

【0098】

次いで、ヤギを、最後の関節鏡視下治療の1～2ヶ月後に、修復した軟骨欠損の関節鏡視下での制御に付する。関節鏡視下治療の6ヶ月後に、動物及び関節鏡視下での軟骨細胞体内移植で修復した膝を麻酔する。整形外科医が損傷を検査し、写真、ビデオ撮影し、デンスitometa測定を行い、「治療した」領域を採取して組織学的、組織化学的及び免疫組織化学的分析に付する。

【0099】

## 実施例 5

第 2 のフィブリンシーラントと組み合わせた、フィブリノゲン - トロンビンアプローチを用いる関節鏡視下の自家軟骨細胞の体内移植(前臨床)

## 第 1 の外科的関節鏡視下介入

5 匹のヤギを前臨床試験に使用する。ヤギを 2 つの外科的介入に付する。第 1 の外科的介入は、ヤギの膝からの軟骨生検の関節鏡視下採集からなる。ヤギをデンマーク Aalborg Sygehus Syd の認可された動物施設で飼育する。麻酔後、小さな切開を通じて前内側又は前外側のいずれかの進入により関節鏡検査を実施する。膝の内側及び外側に 2 つの更なる切開を準備する。挺子を用いて、50 ~ 200mg の軟骨を鋭利な挺子により除去し、滅菌ダルベッコ MEM/F12 及びウシ胎仔血清を含有する輸送管に無菌的に移す。プランジャを用い、3 ~ 5 週間後の細胞移植(細胞の体内移植)の時点での使用のために、0.6cm(直径)円形の全層軟骨損傷を準備する。生検をインターフェースバイオテック エー/エスのリサーチ細胞研究所に運び、外植片からの培養に付する。

10

## 【0100】

## 第 2 の外科的関節鏡視下介入

軟骨細胞培養物が 1 ~ 10 百万細胞に拡大したら(通常は 3 ~ 5 週間要する)、細胞を二連シリンジに、該二連シリンジの一方のチャンバ中のフィブリノゲンの溶液と共に、0.5cc のフィブリノゲン溶液中に 1 ~ 10 百万細胞の細胞濃度でパッケージングして動物施設に戻す。二連シリンジの他方のチャンバは、トロンビン(及び  $\text{CaCl}_2$ )を含有する。或いは、フィブリノゲン溶液は第 1 のチャンバにあり、細胞は、他方のチャンバにおいてトロンビン及び塩化カルシウムと組み合わせられていてもよい。一方のシリンジチャンバの先端からのラインは、他方のシリンジチャンバからの他のラインと接続している。ニードル/カテテルを通過するとき細胞及びフィブリノゲンを含有する混合物がトロンビン及び細胞と混合されるように、18gg のサイズのニードル/カテテルを 2 つのラインに接続する。ニードル/カテテルの鈍い端部は、外科的操作のために作製された切開の 1 つを通じて関節鏡によりガイドされて、打ち抜かれた 0.6cm(直径)軟骨欠損に進められる。

20

## 【0101】

予め打ち抜かれた 0.6cm 軟骨欠損は、細胞 - フィブリノゲン - トロンビン混合物、或いはフィブリノゲン - トロンビン/細胞混合物(30 ~ 180 秒以内に凝固する)が充填される。

## 【0102】

別の二連シリンジを用いて、無細胞フィブリン糊或いはティシール(Baxter, Austria)又は Pantaject(登録商標)の形態若しくはスプレーセット(Beriject(登録商標))の形態のベリプラスト(共に Aventis-Behring)のいずれかのようなフィブリンシーラントを、細胞混合物の適用直後に、欠損中の凝固性細胞混合物を全体的に覆って適用する。次いで、シーラントを凝固させて切開を閉じる。第 2 の関節鏡視下介入を完了した後、軟骨移植片(体内移植片)が膝関節の極大屈曲により破裂することを回避するためにヤギに(術後の)包帯をする。

30

## 【0103】

次いで、ヤギを、最後の関節鏡視下治療の 1 ~ 2 ヶ月後に、修復した軟骨欠損の関節鏡視下での制御に付する。関節鏡視下治療の 6 ヶ月後に、動物及び関節鏡視下での軟骨細胞体内移植で修復した膝を麻酔する。整形外科医が損傷を検査し、写真、ビデオ撮影し、デンスitometa 測定を行い、「治療した」領域を採取して組織学的、組織化学的及び免疫組織化学的分析に付する。

40

## 【0104】

## 実施例 6

第 2 のフィブリンシーラントなしで、フィブリノゲン - トロンビンアプローチを用いる関節鏡視下の自家軟骨細胞の体内移植(前臨床)

## 第 1 の外科的関節鏡視下介入

5 匹のヤギを前臨床試験に使用する。ヤギを 2 つの外科的介入に付する。第 1 の外科的介入は、ヤギの膝からの軟骨生検の関節鏡視下採集からなる。ヤギをデンマーク Aalborg

50

Sygehus Sydの認可された動物施設で飼育する。麻酔後、小さな切開を通じて前内側又は前外側のいずれかの進入により関節鏡検査を実施する。膝の内側及び外側に2つの異なる切開を作製する。挺子を用いて、50~200mgの軟骨を鋭利な挺子により除去し、滅菌ダルベッコMEM/F12及びウシ胎仔血清を含有する輸送管に無菌的に移す。プランジャを用い、3~5週間後の細胞移植(細胞の体内移植)の時点での使用のために、0.6cm(直径)円形的全層軟骨損傷を準備する。生検をインターフェースバイオテック エー/エスのリサーチ細胞研究所に運び、外植片からの培養に付する。

【0105】

第2の外科的関節鏡視下介入

軟骨細胞培養物が1~10百万細胞に拡大したら(通常は3~5週間要する)、細胞を二連シリンジに、該二連シリンジの一方のチャンバ中のフィブリノゲンの溶液と共に、0.5ccのフィブリノゲン溶液中に1~10百万細胞の細胞濃度でパッケージングして動物施設に戻す。二連シリンジの他方のチャンバは、トロンビン(及びCaCl<sub>2</sub>)を含有する。或いは、フィブリノゲン溶液は第1のチャンバにあり、細胞は、他方のチャンバにおいてトロンビン及び塩化カルシウムと組み合わされていてもよい。一方のシリンジチャンバの先端からのラインは、他方のシリンジチャンバからの他のラインと接続している。ニードル/カテーテルを通過するとき細胞及びフィブリノゲンを含有する混合物がトロンビンと混合されるように、18ggのサイズのニードル/カテーテルを2つのラインに接続する。ニードル/カテーテルの鈍い端部は、外科的操作のために作製された切開の1つを通じて関節鏡によりガイドされて、打ち抜かれた0.6cm(直径)軟骨欠損に進められる。

【0106】

予め打ち抜かれた0.6cm軟骨欠損は、細胞-フィブリノゲン-トロンビン混合物、或いはフィブリノゲン-トロンビン/細胞混合物(個々の凝固性成分の濃度に依存して30~180秒以内に凝固する)が充填される。

【0107】

第2の関節鏡視下介入を完了した後、軟骨移植片(体内移植片)が膝関節の極大屈曲により破裂することを回避するためにヤギに(術後の)包帯をする。

【0108】

次いで、ヤギを、最後の関節鏡視下治療の1~2ヶ月後に、修復した軟骨欠損の関節鏡視下での制御に付する。関節鏡視下処置の6ヶ月後に、動物及び関節鏡視下での軟骨細胞体内移植で修復した膝を麻酔する。整形外科医が損傷を検査し、写真、ビデオ撮影し、デンストメータ測定を行い、「治療した」領域を採取して組織学的、組織化学的及び免疫組織化学的分析に付する。

【図面の簡単な説明】

【0109】

【図1】

【図2】

【 図 1 】

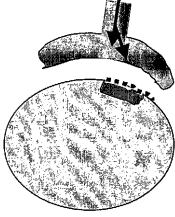
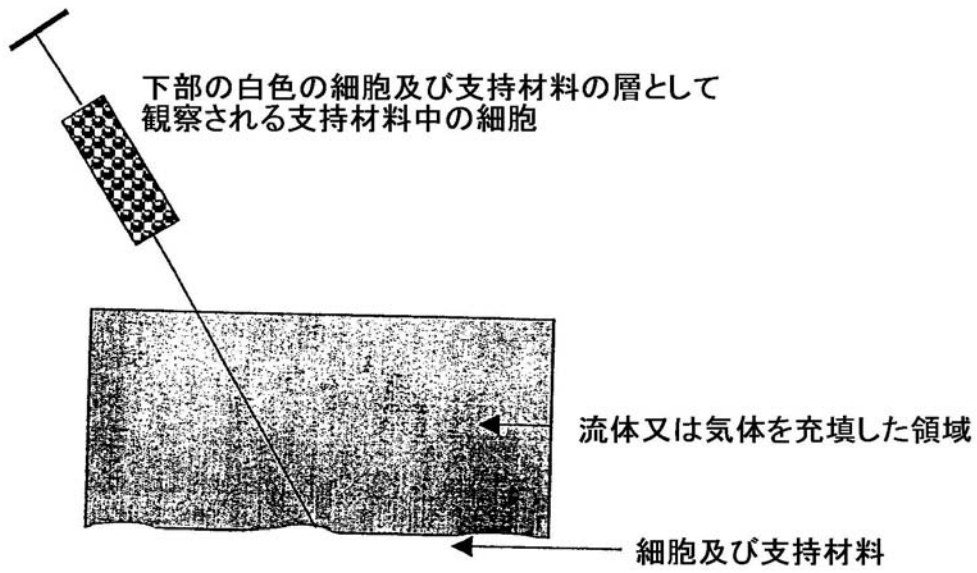


Fig. 1

【 図 2 】



細胞と混合した支持体を含有するシリンジ出口

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/DK2004/000408
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61L27/38 A61L27/54 A61K35/32 C12N5/06 A61B17/32		
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) IPC 7 A61L C12N A61F A61B A61K		
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, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2001/051834 A1 (DOMB ABRAHAM J ET AL) 13 December 2001 (2001-12-13) paragraphs [0005] - [0008], [0010] - [0013], [0016] - [0021], [0024] - [0026] ----- -/--	1-40
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 21 September 2004		Date of mailing of the international search report 18 MAR 2005
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 Böhm, I

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DK2004/000408

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/06949 A (STORGAARD PETER ; INTERFACE BIOTECH AS (DK); OSTHER KURT (US)) 1 February 2001 (2001-02-01) page 1, lines 4-6 page 3, lines 28-30 page 4, lines 14-31 page 5, lines 26-36 page 6, lines 27-34 page 8, lines 29-38 page 9, lines 8-11 page 11, lines 5-8,36-39 page 18, lines 31-36 sentences 1-26; example 4 sentences 32,33; example 5 claims; figures	1-40
A	DE 100 13 223 A (CO DON AG) 11 October 2001 (2001-10-11) paragraphs [0001] - [0004], [0009], [0014], [0018], [0021], [0022]	1-40
A	ROBINSON D ET AL: "Articular cartilage chondrocytes are more advantageous for generating hyaline-like cartilage than mesenchymal cells isolated from microfracture repairs" 2001, CELL AND TISSUE BANKING, XX, XX, PAGE(S) 23-30, XP002902414 ISSN: 1389-9333 the whole document	1-26,40
A	WO 02/39946 A (SMITH & NEPHEW INC) 23 May 2002 (2002-05-23) page 2, lines 15-25 page 7, lines 1-12 claims	1-40
A	DE 100 54 857 A (BOHMANN ANTON ; KETTEL EDITH (DE)) 16 May 2002 (2002-05-16) the whole document	1-40
A	DE 39 41 023 A (BIOPLASTY INC) 13 June 1990 (1990-06-13) the whole document	1-40
A	DE 195 40 487 A (SCHULTZ OLAF ; BURMESTER GERD R PROF DR MED (DE); SITTINGER MICHAEL DR) 24 April 1997 (1997-04-24) column 1, lines 17-26 column 2, lines 18-33 claims; examples 1,2	1-40
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/DK2004/000408

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 181 908 A (VTS HOLDINGS LTD) 27 February 2002 (2002-02-27) paragraphs [0001], [0002], [0009], [0011] claims	1-40
A	----- US 5 736 372 A (VACANTI CHARLES A ET AL) 7 April 1998 (1998-04-07) column 4, lines 23-67 claims	1-26
A	----- US 5 429 603 A (MORRIS MICHAEL) 4 July 1995 (1995-07-04) the whole document -----	27-39

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DK2004/000408**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 1-26,40 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see annex

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ DK2004/ 000408

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-40 (entirely)

Claims 1-26,40 :

An endoscopic method for treating cartilage or bone defects

Claims 27-39 :

A kit for use in a method [...], the kit comprises two separate containers, the first container comprises the cells and the second container comprises the support material

---

2. claim: 41 (entirely)

Use of hydroxy apatite as culturing medium for cells such as osteoblasts/osteocytes.

---

3. claims: 42,43 (entirely)

Claim 42 :

Use of collagen solutions as culturing medium for the cells to be arthroscopically transplanted.

Claim 43 :

Use of collagen solutions as culturing medium for the cells to be endoscopically transplanted.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DK2004/000408

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2001051834 A1	13-12-2001	US 2001014475 A1	16-08-2001
		US 6637437 B1	28-10-2003
		US 6378527 B1	30-04-2002
		US 2004117033 A1	17-06-2004
		US 2004044408 A1	04-03-2004
		AU 3626700 A	09-10-2000
		CA 2366669 A1	28-09-2000
		EP 1171057 A1	16-01-2002
		WO 0056251 A1	28-09-2000
		US 2002123142 A1	05-09-2002
		US 2002133235 A1	19-09-2002
		US 2002012705 A1	31-01-2002
WO 0106949 A	01-02-2001	AU 6566000 A	13-02-2001
		CA 2378079 A1	01-02-2001
		CZ 20020341 A3	11-09-2002
		WO 0106949 A2	01-02-2001
		EP 1206225 A2	22-05-2002
		EP 1441028 A2	28-07-2004
		JP 2003505143 T	12-02-2003
		NO 20020439 A	28-01-2002
		NZ 517199 A	28-11-2003
		US 2002082623 A1	27-06-2002
		ZA 200200514 A	30-06-2003
		DE 10013223 A	11-10-2001
AU 3928701 A	24-09-2001		
CA 2403120 A1	13-09-2002		
WO 0168811 A2	20-09-2001		
EP 1265986 A2	18-12-2002		
US 2003153078 A1	14-08-2003		
WO 0239946 A	23-05-2002	AU 3418402 A	27-05-2002
		CA 2426600 A1	23-05-2002
		EP 1339348 A2	03-09-2003
		JP 2004513848 T	13-05-2004
		WO 0239946 A2	23-05-2002
		US 2002112981 A1	22-08-2002
DE 10054857 A	16-05-2002	DE 10054857 A1	16-05-2002
DE 3941023 A	13-06-1990	DE 3941023 A1	13-06-1990
		GB 2227176 A ,B	25-07-1990
		JP 2243160 A	27-09-1990
		JP 2694372 B2	24-12-1997
		NL 8903049 A ,B,	02-07-1990
		US 5571182 A	05-11-1996
		US 5258028 A	02-11-1993
DE 19540487 A	24-04-1997	DE 19540487 A1	24-04-1997
		WO 9715655 A2	01-05-1997
		EP 0801676 A2	22-10-1997
		JP 10511884 T	17-11-1998
		JP 3452366 B2	29-09-2003
		US 6143501 A	07-11-2000
		US 5932459 A	03-08-1999
EP 1181908 A	27-02-2002	US 5759190 A	02-06-1998

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DK2004/000408

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 1181908	A	US 5989269 A	23-11-1999	
		DE 29724585 U1	16-05-2002	
		EP 1181908 A1	27-02-2002	
		EP 1384452 A1	28-01-2004	
		EP 1459709 A1	22-09-2004	
		SI 1006950 T1	31-12-2004	
		AT 256443 T	15-01-2004	
		AT 263524 T	15-04-2004	
		AU 731162 B2	22-03-2001	
		AU 4171097 A	19-03-1998	
		BR 9711967 A	18-01-2000	
		CA 2264138 A1	05-03-1998	
		CA 2419644 A1	05-03-1998	
		DE 69726896 D1	29-01-2004	
		DE 69726896 T2	28-10-2004	
		DE 69728569 D1	13-05-2004	
		DK 1181908 T3	13-04-2004	
		DK 1006950 T3	19-07-2004	
		DK 200200177 U1	04-06-2002	
		DK 200200178 U1	04-06-2002	
		EP 1006950 A2	14-06-2000	
		ES 2211722 T3	16-07-2004	
		ES 2218697 T3	16-11-2004	
		HU 0002980 A2	29-01-2001	
		JP 2002502272 T	22-01-2002	
		JP 2003159266 A	03-06-2003	
		KR 2000035886 A	26-06-2000	
		NO 990933 A	26-02-1999	
		NZ 334400 A	26-01-2001	
		NZ 508145 A	26-07-2002	
		NZ 518474 A	26-09-2003	
		PL 331834 A1	02-08-1999	
		PT 1181908 T	30-04-2004	
		PT 1006950 T	31-08-2004	
		RU 2214197 C2	20-10-2003	
		SK 24099 A3	12-03-2001	
		TR 9900437 T2	21-05-1999	
		TR 200102871 T2	21-06-2002	
		TR 200102883 T2	21-06-2002	
		US 2002116014 A1	22-08-2002	
		US 6120514 A	19-09-2000	
		US 2002116015 A1	22-08-2002	
		US 2002151912 A1	17-10-2002	
		US 2002091396 A1	11-07-2002	
		WO 9808469 A2	05-03-1998	
		US 2002173806 A1	21-11-2002	
		US 6283980 B1	04-09-2001	
		US 2004019361 A1	29-01-2004	
		US 2003195532 A1	16-10-2003	
<hr/>				
US 5736372	A	07-04-1998	US 5041138 A	20-08-1991
			AT 142511 T	15-09-1996
			AU 635025 B2	11-03-1993
			AU 5556890 A	16-11-1990
			CA 2051663 A1	18-10-1990
			DE 69028524 D1	17-10-1996
			DE 69028524 T2	13-02-1997
			DK 469070 T3	30-09-1996

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DK2004/000408

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5736372	A	EP 0469070 A1	05-02-1992
		ES 2095252 T3	16-02-1997
		JP 6006155 B	26-01-1994
		JP 4505717 T	08-10-1992
		WO 9012603 A1	01-11-1990
		US 5567612 A	22-10-1996
		US 5804178 A	08-09-1998
		US 5759830 A	02-06-1998
		US 6309635 B1	30-10-2001
		US 2002115165 A1	22-08-2002
		AT 139432 T	15-07-1996
		CA 1340581 C	08-06-1999
		DE 3751843 D1	25-07-1996
		DE 3751843 T2	12-12-1996
		EP 0299010 A1	18-01-1989
		JP 7102130 B	08-11-1995
		JP 1501362 T	18-05-1989
		WO 8803785 A1	02-06-1988
		US 5770193 A	23-06-1998
		US 5770417 A	23-06-1998
US 5429603	A	04-07-1995	
		AU 9027491 A	08-07-1992
		WO 9210225 A1	25-06-1992
		EP 0560831 A1	22-09-1993

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, 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, IT, LU, 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, TG), 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 オスザー, カート

アメリカ合衆国、アリゾナ 85259、スコッツデール、イースト ベッカー レーン 11805

Fターム(参考) 4C060 LL13 MM24

4C081 AB04 AB05 BA12 CD111 CD121 CD171 CD18 CD23 CD34 DA15  
DC13

专利名称(译)	体内植入细胞的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006527032A</a>	公开(公告)日	2006-11-30
申请号	JP2006515712	申请日	2004-06-11
申请(专利权)人(译)	接口生物ER / ES		
[标]发明人	オスザーカート		
发明人	オスザー, カート		
IPC分类号	A61B17/56 A61L27/00 A61B17/00 A61K35/12 A61K35/32 A61L27/38 A61L27/54 C12N5/077		
CPC分类号	A61B17/00491 A61K35/12 A61K35/32 A61L27/3817 A61L27/3821 A61L27/3847 A61L27/3852 A61L27/54 A61L2300/414 A61L2300/418 C12N5/0655 C12N2533/54 C12N2533/56		
FI分类号	A61B17/56 A61L27/00.G		
F-TERM分类号	4C060/LL13 4C060/MM24 4C081/AB04 4C081/AB05 4C081/BA12 4C081/CD111 4C081/CD121 4C081/CD171 4C081/CD18 4C081/CD23 4C081/CD34 4C081/DA15 4C081/DC13		
优先权	200300871 2003-06-12 DK		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

以下步骤：i) 确定缺陷的位置，ii) 在软骨或骨缺损期间应用选自软骨细胞，成软骨细胞，骨细胞和成骨细胞及其组合的细胞一种治疗动物软骨或骨缺损的内窥镜方法，包括：特别地，本发明是，i) 通过关节镜或内窥镜将流体施加到包含缺陷的腔或表面，以及以下步骤 ii) 在与流体覆盖缺陷一起进行的支撑材料的基本上同时将细胞施加到缺陷处，iii) 混合细胞和支持材料，iv) 固化支撑材料，使得缺陷被细胞和支撑材料的混合物覆盖，而没有大量的流体，和 v) 通过抽空或抽吸任选地从腔或表面移除流体 包括同种异体或自体细胞的关节镜或内窥镜体进入动物体内的缺损以内部移植方法。

組合せ	チャンバ1中の成分の範囲	チャンバ1に含有される細胞	チャンバ2に含有される細胞	チャンバ2中の成分の範囲
コラーゲンⅢ + 他の短鎖コラーゲン	コラーゲンⅢ: 0.5 ~ 20 mg/ml 及び短鎖: 0.5 ~ 20 mg/ml + (プラス)	2 x 10 <sup>5</sup> ~ 6 x 10 <sup>6</sup> 細胞/ml	— (マイナス) 細胞	*トロンビン (任意の起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び CaCl <sub>2</sub>
コラーゲンⅢ + 他の短鎖コラーゲン	コラーゲンⅢ: 0.5 ~ 20 mg/ml 及び短鎖: 0.5 ~ 20 mg/ml +	— 細胞	2 x 10 <sup>5</sup> ~ 6 x 10 <sup>6</sup> 細胞/ml	*トロンビン (任意の起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び CaCl <sub>2</sub>
フィブリノゲン (任意の型又は種) 及びいくつかの場合 アプロチニン	フィブrogen: 1 ~ 20 mg/ml	2 x 10 <sup>5</sup> ~ 6 x 10 <sup>6</sup> 細胞/ml	— 細胞	*トロンビン (任意の起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び CaCl <sub>2</sub>
フィブリノゲン (任意の型又は種) 及びいくつかの場合 アプロチニン	フィブrogen: 1 ~ 20 mg/ml	— 細胞	2 x 10 <sup>5</sup> ~ 6 x 10 <sup>6</sup> 細胞/ml	*トロンビン (任意の起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び CaCl <sub>2</sub>
フィブリノゲン (市販)	市販のフィブリノゲン製品中使用される量に対応する濃度率で	2 x 10 <sup>5</sup> ~ 6 x 10 <sup>6</sup> 細胞/ml	— 細胞	*トロンビン (任意の起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び CaCl <sub>2</sub>
フィブリノゲン (市販)	市販のフィブリノゲン製品中使用される量に対応する濃度率で	— 細胞	2 x 10 <sup>5</sup> ~ 6 x 10 <sup>6</sup> 細胞/ml	*トロンビン (任意の起源) 0.5 IU ~ 1000 IU/ml 及び CaCl <sub>2</sub>