

(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2005-506102
(P2005-506102A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int. Cl. ⁷	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00	A 6 1 L 27/00	G	4 C 0 8 1
A 6 1 F 2/28	A 6 1 L 27/00	J	4 C 0 9 7
	A 6 1 F 2/28		

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 51 頁)

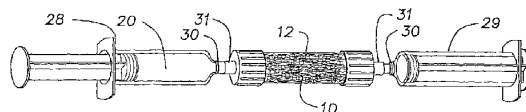
(21) 出願番号	特願2002-567373 (P2002-567373)	(71) 出願人	500064708 ザ クリーブランド クリニック ファウン デーション アメリカ合衆国 オハイオ 44195, クリーブランド, ユークリッド アベ ニュー 9500
(86) (22) 出願日	平成14年2月26日 (2002.2.26)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月28日 (2003.8.28)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/005583	(72) 発明者	ムシュラー, ジョージ, エフ. アメリカ合衆国 オハイオ 44106, クリーブランド ハイツ, チャットフ ールド 2270
(87) 国際公開番号	W02002/068010		
(87) 国際公開日	平成14年9月6日 (2002.9.6)		
(31) 優先権主張番号	09/795, 254		
(32) 優先日	平成13年2月28日 (2001.2.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複合型骨髄移植材、その調製法およびキット

(57) 【要約】

本発明は、均一に分布した多数の始原細胞を含む複合型骨髄移植材料を提供する。当該移植材は、好適には、移植の効果を大きく向上させる働きのある、抗凝固処理していない骨髄吸引液から得られる凝固材を含む。本発明はまた、そのような骨髄移植材料を調製する方法を提供する。さらに、高濃度の複合型骨髄移植材料の調製に有用な無菌器具を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多孔性生物学的適合性移植可能材料と凝固材とを含む、始原細胞の個体数を増加させた複合型骨髄移植片材料。

【請求項 2】

前記始原細胞が結合組織始原細胞を含む、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 3】

前記始原細胞が幹細胞を含む、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 4】

前記幹細胞が多能性幹細胞を含む、請求項 3 に記載の複合型骨髄移植片材料。

10

【請求項 5】

前記移植可能基質が微粒子状骨材料および繊維状骨材料を含む、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 6】

前記微粒子状骨材料が同種異系移植片海綿骨粒子を含む、請求項 5 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 7】

前記繊維状骨材料が同種異系移植片脱塩皮質骨繊維を含む、請求項 5 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 8】

前記基質が、セラミック材、生体ガラス、コラーゲン、鈹化骨、脱塩骨、ヒアルロン酸、および合成生体高分子材料からなるグループから選択される、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

20

【請求項 9】

前記凝固材が骨髄吸引液から得られる骨髄クロットである、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 10】

前記凝固材が血餅である、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 11】

前記凝固材が、血小板ゲル、血小板濃縮物、フィブリン凝固材、およびフィブリングループからなるグループから選択される、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

30

【請求項 12】

全骨髄由来有核細胞に対する始原細胞の比率が少なくとも 1 : 20,000 である、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 13】

前記移植可能基質および前記凝固材が前記移植片材料中に容積比 5 : 1 から 1 : 5 で存在する、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 14】

前記始原細胞、前記凝固材、および前記基質のすべてが、前記複合型骨髄移植片材料中に実質的に均一に分布している、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

40

【請求項 15】

細胞接着分子が前記移植可能基質の表面に結合している、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 16】

前記移植片材料が移植者の骨治癒を引き起こすのに有効である、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 17】

前記移植片材料が移植者の骨再生を引き起こすのに有効である、請求項 1 に記載の複合型骨髄移植片材料。

【請求項 18】

50

- a) 骨髄吸引液を用意する段階、
 b) 多孔性生物学的適合性移植可能基質を用意する段階、
 c) 前記骨髄吸引液と前記基質を接触させて高濃度基質を得る段階、および
 d) 前記高濃度基質を機械的に混合し、始原細胞が前記複合型骨髄移植片材料に実質的に均一に分布した複合型骨髄移植片材料を生成する段階
 を含む複合型骨髄移植片材料の調製方法。

【請求項 19】

前記高濃度基質に凝固材を混合する段階をさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記移植可能基質が微粒子状骨材料および繊維状骨材料を含む、請求項 18 に記載の方法 10

【請求項 21】

前記微粒子状骨材料が同種異系移植片海綿骨粒子を含み、前記繊維状骨材料が脱塩皮質骨繊維を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記移植可能基質がかさ容積約 1 - 25 cc の微粒子状骨粒子と、乾燥重量約 25 - 1000 mg の骨繊維とを含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記骨繊維の長さが 5 mm - 15 cm である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

抗凝固処理していない骨髄吸引液を前記高濃度基質に加える段階をさらに含む、請求項 18 に記載の方法。 20

【請求項 25】

基質容器、第 1 エンドキャップ、および第 1 充填用シリンジを備える複合型骨髄移植片材料調製用キットであって、前記第 1 エンドキャップを前記基質容器に開放可能にとりつけることができ、前記第 1 エンドキャップと前記第 1 充填用シリンジは、前記第 1 充填用シリンジと前記基質容器の間で液体が連通するように、互いに接続するように構成されているキット。

【請求項 26】

多孔性生物学的適合性移植可能基質をさらに含む、請求項 25 に記載のキット。 30

【請求項 27】

ヘパリン吸引シリンジおよび吸引針をさらに備える、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 28】

前記基質容器と一致することによりアプリケーションシリンジを形成するように構成されたシリンジアダプタをさらに備える、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 29】

取り外し可能な底蓋と、漏斗とを有する混合ボウルをさらに備え、前記漏斗の一端が前記混合ボウルの開口端と、他端が前記アプリケーションシリンジと一致するように構成されている、請求項 28 に記載のキット。

【請求項 30】

一方の端にプランジャを有するへら具をさらに備え、前記プランジャは移植片材料を前記基質容器に詰めるように構成されている、請求項 25 に記載のキット。 40

【請求項 31】

基質材料を前記容器内に保持するのに効果的な多孔性膜をさらに備える、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 32】

前記基質容器が基質カラムである、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 33】

第 2 充填用シリンジと第 2 エンドキャップとをさらに備え、前記第 2 エンドキャップは前記基質容器に開放可能にとりつけることができ、前記第 2 エンドキャップと前記第 2 充填 50

用シリンジは、前記第2充填用シリンジと前記基質容器の間で液体が連通するように、互いに接続するように構成されている、請求項25に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

骨移植は、骨折や不癒合の治療や、関節固定を促すために広く使用されている。移植者の体の一部から採取して移植者の別の部位に移植される自原性海綿骨は、現在最も有効な骨移植である。自原性海綿骨は骨治癒反応の広がりを持する足場、および新規軟骨または骨を形成する始原細胞となる。しかしながら、自原性骨の採取にかかる費用は大きく、また、傷、失血、苦痛をもたらす、手術およびリハビリテーションに時間が掛かる、ならびに感染症の危険があるなど、健康に与える悪影響が大きい。さらに、移植部位の容量が可能な自己移植の容量を超える場合がある。

10

【0002】

このため自己移植に代わる方法が開発されてきた。セラミック、生体高分子、合成同種異系移植骨、およびコラーゲン基質を含む複数の精製物質または合成物質が研究され、或いは自己移植の代用として利用されている。FDAは、局所的な骨の欠損への使用に多孔性のサンゴから得られる剛性ヒドロキシアパタイトセラミックを承認した。また、精製したコラーゲン/セラミック複合型材料が急性長骨骨折への使用に承認されている。これらの材料は、自己移植片の採取に伴う健康への悪影響を避け、また入手可能な自己移植片が限られていることに関する問題を排除するものであるが、一般に複合型材料の臨床的有効性は自己移植片に依然として劣る。また、合成移植材料も骨髄細胞の担体として使用されている。上述の複合型材料を骨格の欠損に移植すると、始原細胞が骨格組織に変化する。

20

【0003】

複合型移植片は、細胞懸濁液中の合成移植片と、同量またはそれよりも少ない量の骨髄吸引液を混合することによりつくられる場合がある。しかしながら、軟骨に変化する能力を有する始原細胞、骨、筋肉、繊維組織、およびその他結合組織は骨髄中にわずかしか存在しない。骨髄1ml当たりの始原細胞の数は、約100から20,000までと、患者によって大きく異なる。これは、骨髄吸引液中の有核細胞の平均値が約20,000に1つから40,000に1つであることを表している。よって、所定の容量の合成移植材をそれに匹敵する容量の新鮮な骨髄中に混合してなる複合型移植片に含まれる始原細胞の数は比較的微量である。

30

【0004】

このため、これまでに複合型移植片中の始原細胞の相対濃度を増大させるための技術が開発されている。この技術は、骨髄細胞の懸濁液を組織培養皿に移植する段階と、細胞を選択培地中で1または数日培養し、始原細胞の個体数を増大させる段階と、次いで細胞を組織培養皿から剥離し、個体数が増加した始原細胞を含む細胞懸濁液を調製する段階を含む。次いで合成セラミック担体をこの始原細胞を多く含む懸濁液に含浸することにより複合型移植片を作成する。残念ながら、この複合型移植片調製法には時間が掛かり過ぎる。さらに、移植者から採取した骨髄吸引液から元となる始原細胞を採取する場合、移植者は複数回の外科処置を受けなければならない。すなわち、一度骨髄採取処置を行い、後日また複合型移植片を移植する処置を行わなければならない。その結果移植者に少なくとも2回の麻酔を行うことになる。

40

【0005】

複合型骨移植片基質を製造するために開発された別の技術では、培養方法に利点を持ちながら、時間も掛からず複数の外科処理も必要としない。この技術では、所定の容量の基質材料とそれよりも多い骨髄吸引液を接触させることにより始原細胞を多く含む複合型基質を製造する(特許文献1および2参照)。本技術においては、選択的に始原細胞と結合する表面を有する多孔性基質材に始原細胞を含む骨髄吸引液を通過させることにより、基質内に始原細胞を保持し、それ以外の他の細胞(血液細胞および骨髄から得られるその他有核細胞など)を通過させる。こうして始原細胞を多く含む移植片基質を患者に移植する。

50

【0006】

しかしながら、始原細胞は非常に強固に、且つ選択的に一部基質の表面（例えば同種異系移植片）に結合するので、基質全体に均一に分布せず、骨髓吸引液と基質材料の最初の接触位置の近傍に集中する始原細胞の高濃度ポケットを複数形成する。その結果、移植された基質内における始原細胞の分布が不均一であることにより、この技術により調製された骨移植片には、移植後の骨治癒が均一に起こらないという欠点がある。加えて、基質移植後の骨治癒の進行が比較的遅い。

【特許文献1】

米国特許第5824084号明細書

【特許文献2】

米国特許第6049026号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、手術中に行うことが可能な、始原細胞を多く含む複合型骨髓移植材の新規調製方法が所望される。つまり、移植者からの骨髓採取と同時に行うことができ、移植材全体に一様に分布する始原細胞が得られ、且つ移植により治癒を促進する方法が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

多孔性で生物学的適合性の基質と凝固材とを含む複合型骨髓移植材を提供する。本複合型骨髓移植材料は始原細胞を多く含む。また、複合型骨髓移植材料の調製法を提供する。本方法は、骨髓吸引液を用意する段階、多孔性生物学的適合性移植可能基質を用意する段階、骨髓吸引液と基質を接触させて高濃度の基質を用意する段階、および高濃度の基質を機械的に混合し、始原細胞が実質的に一様に分布した複合型骨髓移植材料を生成する段階を含む。

【0009】

さらに、複合型骨髓移植材料を調製するためのキットを提供する。本キットは、基質容器、第1エンドキャップ、および第1充填用シリンジを含む。第1充填用シリンジを第1エンドキャップに取り付けることにより、第1充填用シリンジと基質容器との間で液体が流れることが可能となる。第1エンドキャップは基質容器に開放可能に取り付けられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本明細書において、5 - 25、または5から25と言った場合、好適には、上と下の限界値としてそれぞれ独立的に、5以上、且つ、25未満を意味する。本明細書で使用する「始原細胞」という表現は、結合組織始原細胞および/または幹細胞など、いかなる始原細胞も含む。この細胞群は多能性で、様々な組織（例えば、骨、軟骨、脂肪、腱、じん帯、筋肉、神経組織、造血組織、内皮および血管組織、ならびに肝臓）に変化可能な細胞を含む。

【0011】

本発明による多数の始原細胞を有する複合型骨髓移植材料調製方法は、一般に次に挙げる段階を含む。すなわち、骨髓吸引液を採取する第1段階、（例えば基質内に吸引液を通すことにより）骨髓吸引液を多孔性且つ生物学的適合性で移植が可能な基質に接触させ、始原細胞の個体数を増大させた高濃度基質を得る第2段階、高濃度基質を混合し、始原細胞を全体にほぼ均一に分布させる第3段階、および余分な液体中の基質を排出する第4段階を含む。好適には、当該方法は、高濃度基質に凝固材を追加する段階も含む。このようにして調製された複合型骨髓移植材料は次いで患者または移植者に移植され、骨治癒および/または骨再生を有効に促す。

【0012】

上述の方法の段階に含まれる複数の機能要素について以下に説明する。このような機能要

10

20

30

40

50

素には、骨髓吸引液、多孔性生物学的適合性移植可能基質、および好適には凝固材が含まれる。これら機能要素について説明した後、本発明の複合型骨移植片を調製するための好適な方法および装置について説明する。後述の説明は例示のみを目的とし、限定的なものではないことに注意されたい。

【0013】

骨髓吸引液

骨髓吸引液には、血漿、有核始原細胞（始原細胞）、有核造血細胞、内皮細胞、および赤血球と血小板とを含む抹消血から得られた細胞が含まれている。骨髓吸引液が抹消血を含むため、吸引液は抗凝固薬を含むシリンジに集めることが好ましい。適当な抗凝固薬として、ヘパリン、クエン酸ナトリウム、およびEDTAを挙げることができる。好適には、本発明の方法に使用する骨髓吸引液は、移植を受ける患者（移植者）から採取する。それ程好適ではないが、骨髓吸引液を免疫学的に適合する別のドナーから採取してもよい。

10

【0014】

多孔性生物学的適合性移植可能基質

当該基質は、多孔性で、生物学的に適合性の、移植可能な基質からなる。好適には、基質は生物活性表面を有する。生物活性表面を有する多孔性生物学的適合性の移植可能な移植片基質材料の例としては、ヒドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムなどのリン酸カルシウムを含むセラミック、ならびに脱塩または鈹化骨基質が挙げられる。その他の適切な基質材料は、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリガラクトン酸、ポリカプロラクトン、酸化ポリエチレン、酸化ポリプロピレン、ポリスルホン、ポリエチレンおよびポリプロピレンなどの生体高分子を含む。また、それ以外の適切な基質材料はヒアルロン酸で、架橋、生体ガラス、およびコラーゲンにより精製してもしなくてもよい。

20

【0015】

さらに好適には、細胞接着分子を基質基板の表面に結合させる。「細胞接着分子」という表現には、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、血管細胞接着分子（V-CAM）、細胞間接着分子（I-CAM）、テネイシン、トロンボスポンジン、オステオネクチン、オステオポンチン、骨シャロ蛋白、コラーゲン、または基板表面に対する始原細胞の選択的接着促進効果を有する他のあらゆる分子または成分を含む。

【0016】

基質は、同一の外形寸法を有する非多孔性の固体と比較して、始原細胞の接着に使用可能な基質表面積が少なくとも2倍、好適には3倍、5倍、7倍、さらには10倍となるに十分な多孔性を有することが好ましい。粉末、果粒、繊維、それらの組み合わせ、または単一の超多孔性基板塊を使用することにより、そのような総表面積の増大を図ることができる。始原細胞が孔開口部を通して基質材料の空隙容量内へ浸透し、それにより孔内の表面積が利用されるのを促すために、基質中の孔の大きさは好適には20 μ mより大きく、さらに好適には50 μ m、100 μ m、さらには500 μ mより大きく、最も好適には1000 μ mより大きい。

30

【0017】

特に適当な基質材料には、分離した鈹化海綿骨切片、鈹化骨の粉末または果粒、脱塩海綿骨切片、脱塩骨の粉末または果粒、グアニジンHCl抽出脱塩骨基質、皮質骨または海綿骨、Interpore 500（登録商標）またはInterpore 200（登録商標）という名称でInterpore社より市販されているサンゴ質ヒドロキシアパタイト、Zimmer社により市販されている骨移植片の代用品Collagraft（商標）に含まれるような果粒状セラミック、Orthovita社により市販されている移植片の代用品Vitos（商標）に含まれるような顆粒状またはブロック状セラミック、およびOrquest社によりコラーゲンからつくられているような糸状海綿が含まれる。

40

【0018】

好適な基質は、骨基質の微粒子と繊維状の骨材料との組み合わせとして用意される。微粒子状の骨基質は、ヒトの海綿質骨から、好適には海綿骨から（例えばヒト長骨の末端から）採取するのが好ましい。繊維状骨材料は、皮質骨から採取することが好ましい。微粒子

50

状骨材料および繊維状骨材料のどちらも骨バンクから得ることができ、或いは随意で移植者から採取してもよい。移植者から採取した場合、骨材料は、所望の微粒子および繊維特性に適合するように、手術中手術室において周知の骨処理手段により処理される。

【0019】

用意する微粒子状の骨材料は、最適には、塊、小片または切片の形態の同種異系移植片海綿骨の粒子であり、その大きさは平均粒径にして1 - 15 mm、好適には2 - 8 mmの範囲である。用意する繊維状の骨材料は、最適には、同種異系移植片脱塩皮質骨繊維であり、その長さは5 mm以上、さらに好適には1 cm以上、2 cm以上、3 cm以上、さらには4 cm以上で、最適には5 cm以上である。繊維状の骨材料は、随意で、5 mm - 2 cm、5 mm - 3 cm、5 mm - 4 cm、5 mm - 5 cm、5 mm - 15 cm、またはその

10

【0020】

微粒子状および繊維状骨材料を混合し、次のようにして好適な複合型基質を形成する。骨繊維、好適には上述の長さを有する脱塩皮質骨繊維を、次のような好適な配合で微粒子状骨粒子と混合する。すなわち、乾燥時重量が約225 mg、それより徐々に望ましさは低下するが、200 - 300 mg、150 - 375 mg、100 - 450 mg、75 - 500 mg、或いは25 - 1000 mgの脱塩皮質骨繊維と、約10 cc（かさ容量）、それより徐々に望ましさは低下するが、8 - 12 cc、6 - 14 cc、4 - 16 cc、2 - 18 cc、或いは1 - 25 ccの、平均粒径1 - 15 mm、好適には2 - 8 mmの微粒子状骨粒子とを混合する。随意で、脱塩皮質骨繊維は同じような繊維を含む柔軟なマットから取得してもよい。そのようなマットを使用する場合、存在する可能性のある毒性または高浸透圧物質をすべて排除するために、等張液でまず洗浄する。次いでマットを食塩水または他の適当な等張液に浸し、個々の骨繊維の分離を促す。分離した骨繊維を微粒子状骨材料と次のような配合で混合し、好適な複合型基質を形成する。すなわち、当初の大きさが2.5 cm x 5 cm x 約2.5 mm（当初の容積約3.1 cm³）である1つのマットと、平均粒径1 - 15 mm、好適には2 - 8 mmの微粒子状骨粒子約10 cc（かさ容量）、それより徐々に望ましさは低下するが、8 - 12 cc、6 - 14 cc、或いは4 - 16 ccを合わせる。

20

30

【0021】

様々な大きさの移植片が必要な場合、本発明による繊維状骨対微粒子状骨の配合比（上述）に準拠する様々な大きさの複合型基質を用意することができることに注目されたい。例えば、微粒子状骨20 cc（推定均一かさ密度）を骨繊維450 mgと混合し、好適な複合型基質をつくることができる。

【0022】

凝固材

凝固材は、移植者（または免疫学的に適合するドナー）の静脈または動脈から採取した血液から形成される血餅でよい。さらに好適には、凝固材は、最適には移植者から採取した抗凝固処理されていない骨髄吸引液から形成される骨髄クロットである。骨髄クロットが形成される骨髄吸引液は、手術中移植片処理段階において移植者から採取することが好ましい。それができない場合、凝固材は、従来技術に周知のフィブリングルー、フィブリン凝固材、血小板ゲル、および/または血小板濃縮物でもよい。

40

【0023】

（抗凝固処理されていない骨髄吸引液から得た）骨髄クロットを始原細胞の濃度を高めた移植片基質に加えることにより得られる複合型骨髄移植片材料の有効性は、凝固材を加えない複合型移植片と比較して驚くほど大きく向上する。骨髄クロットのみに対し、（2倍以上の始原細胞を含み）50 - 70%多い有核細胞を産む同様の高濃度基質に骨髄クロットを加えた場合に得られる移植片は、高濃度基質のみの場合、および非高濃度基質と骨髄クロットを混合した場合のいずれよりも品質が優れていた。したがって、骨髄クロットを

50

始原細胞の濃度を高めた基質に加えることにより、移植片の性能を向上させることができる。

【0024】

特定の理論のいずれにも縛られることなく、以下の理由のうちの1つまたは複数により、骨髄クロットの添加は複合型骨移植片の有効性を向上させると考えられる。第1に、骨治療が成功するまでの過程に重要な細胞のいくつかは移植片基質に付着せず、したがって移植位置に十分に集中しない(または排除されることさえある)可能性があり、その結果当該位置においては効果を示さないか、または効果が不十分である。凝固カスケード(後述)の結果としてフィブリンにフィブリノーゲンを重合させると、移植位置における治癒反応に重要な細胞の付着および移動を促す貴重な追加的基質を得ることができる。そのような細胞には、増殖して血管形成により血管を形成する重要な前駆物質である環状構造を形成する移動性内皮細胞が含まれる。

10

【0025】

第2の可能性は、移植位置での血餅形成の生理学的過程により、該位置に移植された骨形成原細胞の環境が向上することである。特に、抗凝固処理されていない骨髄吸引液が凝固すると、それに含まれる血小板が活性化し、血小板の脱果粒が起こる。次いで血小板の脱果粒により、そうでない場合には移植位置に存在しなくなる場合のある成長因子と骨帰還サイトカインを放出する。この段階において放出されるいくつかの重要な生物活性因子には、血小板由来成長因子(PDGF)、上皮成長因子(EGF)、繊維芽細胞成長因子(FGF)、および形質転換成長因子ベータ(TGF- β)が含まれる。また、凝固カスケードの結果であるフィブリノーゲンから形成されるフィブリン基質により、手術直後の期間中移植位置において重要な安定性を得ることができる。さらに、移植片の移植後数日間に亘って起こる線維素溶解活動の過程により、移植片が取り込まれる初期段階において、血管由来因子の追加的供給源(例えば、周知のフィブリン分解生成物)が与えられる。移植後移植位置において得られる血管形成により、該位置での新規血管の形成が促され、それが新しく移植された始原細胞およびその他細胞の栄養源となって骨治癒および成長が起こり、よって治癒反応を促進すると考えられる。

20

【実施例1】

【0026】

本発明による複合型骨移植片作成方法の好適な実施例を説明する。本明細書に開示する装置部分は、好適には透明または半透明のプラスチックから作られることが好ましい。本発明の第1の好適な実施例では、図1に示すように、上述のように用意した複合型生物学的適合性移植可能基質10を基質容器内に配置する。該容器は最適にはカラム12である。(基質10は、その材料および構造によって、隙間無く充填しても、ゆるく充填してもよい。)カラム12は、特定の移植片のために必要な基質の量を収容するのに適した大きな内部容量を有するようにつくることができる。本明細書で使用する基質容量とは、特定の基質と同一の外形寸法を有する非多孔性固体の排除体積を指す。例えば、内部容量が5、10、15、20、25、30cc、またはその他であるカラムを、様々な基質容量を収容するために使用することができる。好適には、カラム12の内径は0.5-3.0cm、さらに好適には1-2cm、さらには1-1.5cmである。カラム12の好適な長さは、内径の1.5倍以上、さらに好適には2倍以上、最適には3倍以上である。ねじ込み接続、スナップ接続、またはその他任意の接続手段により、エンドキャップ14が着脱可能にカラム12に取り付けられる。

30

40

【0027】

随意で、吸引液20を通す一方で基質10の粒子を保持する効果のあるスクリーンまたは膜15をエンドキャップ14に設けることができる(図8参照)。好適には、そのような膜は、直径が少なくとも20 μ m、好適には30 μ m、さらに好適には40 μ mの開口を複数有する。

【0028】

(好適には抗凝固薬を含む)骨髄吸引液20は、好ましくは移植者から、周知の手段によ

50

り採取する。次いで吸引液 20 を第 1 充填用シリンジ 28 に充填する。最初、吸引液 20 は始原細胞 32 とそれ以外の有核細胞 33 を、1 : 20, 000 から 1 : 40, 000 の比率で含んでいる (図 2 A 参照)。吸引液はまた、血小板、赤血球、および血清 (血清に溶解または懸濁可能な分子を含む) を含んでいる。充填用シリンジ 28 には、エンドキャップコネクタ 31 と一致するように構成されたシリンジコネクタ 30 を取り付け、充填用シリンジ 28 の対応する内部容積とカラム 12 との間を液体が流れることができるようにする。第 2 充填用シリンジ 29 にも、同様にエンドキャップコネクタ 31 と一致するように構成されたシリンジコネクタ 30 を取り付ける。図 2 に示すように、第 1 および第 2 充填用シリンジ 28、29 をカラム 12 の両側で先述のコネクタを介してエンドキャップ 14 に取り付け、よって第 1 充填用シリンジ 28、カラム 12、および第 2 充填用シリンジ 29 の間で液体が流れることが可能になる。

10

【0029】

次いで第 1 充填用シリンジ 28 を押し込むと、吸引液 20 はカラム 12 内に流入して該カラム内の基質 10 を通過するか、または基質 10 と接触し、その後カラム 12 の反対側で第 2 充填用シリンジ 29 内に回収される。骨髓吸引液と基質とを接触させることで、基質内に吸引液を流すこと、基質を吸引液内で培養すること、または別の周知の手段により、濃度の高い基質を得ることができる。或いは、任意の周知の方法により吸引液 20 に基質 10 を接触させ、濃度の高い基質を得る。始原細胞は、有利にはおよび選択的に基質 10 の表面に付着し、よって基質内に保持される。一方、他の余剰細胞 (血球および骨髓由来の有核細胞) は基質内を比較的自由に流れ、第 2 充填用シリンジ 29 に回収される。基質 10 内の始原細胞の固体数を増やすために、基質 10 内を流れる吸引液 20 の容積は基質の容積を超えることが好ましい。このようにして、吸引液容積内に存在する始原細胞は好適に基質容積内で濃縮され、濃度の高い基質を得ることができる。ここで使用する「濃度の高い」という表現は、全有核骨髓細胞に対する始原細胞の比率が、元の骨髓吸引液内よりも基質内で高いことを意味する。好適には、濃度の高い基質内における、全骨髓由来有核細胞に対する始原細胞の比率は、1 : 20, 000 以上、好適には 1 : 10, 000 以上、さらに好適には 1 : 5, 000 以上であり、これは始原細胞の浸透率または濃度が 2 倍以上、好適には 4 倍以上になっていることを示す。さらに好適には、濃度の高い基質内における始原細胞の濃度は、骨髓クロットを含むが濃度を高めていない基質の 5 倍以上、好適には 6 倍以上、さらに好適には 8 倍以上である。吸引液容積 : 基質容積の比は、2 : 1

20

30

【0030】

随意で、第 1 および第 2 充填用シリンジ 28、29 を交互に押し込むことにより、カラム 12 内の基質 10 に吸引液 20 を両方向に流してもよい。特定の基質への細胞および前駆体の結合率に応じて、吸引液 20 を基質 10 に通して流すというこの手順を少なくとも 1 回、好適には 2 回以上、さらに好適には 3 回以上、さらには 4 回以上繰り返す。随意で、元の骨髓吸引液の懸濁液及び何らかの流出液が基質 10 を通過した後に洗浄液を基質 10 に通してもよい。洗浄液は、pH 範囲が 7.3 から 7.5 である、無菌で等張性の緩衝液からなることが好ましい。適当な洗浄液は、リン酸緩衝生理食塩水、ハンクス平行塩類溶液、ヒト血清、および必要最小限の媒体を含む。

40

【0031】

上述の手順の後、充填用シリンジ 28、29 をエンドキャップ 14 から取り外す。図 3 に示すように、基質 10 に保持された始原細胞 32 は、基質 10 内で不均一に分布している。特に、基質 10 内には始原細胞の濃度勾配が存在し、始原細胞 32 は、骨髓吸引液 20 がカラム 12 内に流入したとき最初に基質材料に接触した地点であるカラム 12 の端部近傍の領域に集中している (図 3 B 参照)。その結果、基質 10 の中央の領域においては始

50

原細胞 3 2 の個体数がずっと少ない (図 3 A 参照) 。これは、カラム 1 2 に流入した際に始原細胞およびその他細胞が基質表面に急速に付着するためである。したがって、始原細胞がもっと均一に分布した濃度の高い基質を製造するのに、機械的混合段階を設けることが効果的である。

【 0 0 3 2 】

図 4 に示すように、カラム 1 2 からエンドキャップを取り外し、カラム 1 2 にシリンジアダプタ 1 3 を取り付けてアプリケーションシリンジ 5 0 を形成する。シリンジアダプタ 1 3 は、カラム 1 2 を押し込み、そこから基質材料を放出するように構成されたプランジャを備える。このようにして、始原細胞の濃度を高めた基質材料 1 1 をカラム 1 2 から放出し、所定量の凝固材 1 8 とともに混合ポウル 4 0 に移す。凝固材 1 8 は、好適には、上述のよう
10
に凝固することが可能な、移植者から採取した抗凝固処理されていない骨髄吸引液である。随意で、抗凝固処理されていない骨髄吸引液を高濃度基質と合わせてから凝固させ、混合段階中および後に凝固が起こるようにすることもできる。凝固材の容量：始原細胞の濃度を高めた基質材料容量の比率は約 1 : 1 であることが好ましく、それが無理な場合は、約または最低 1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、2 : 1、3 : 1、4 : 1 または 5 : 1
20
でもよい。混合ポウル 4 0 内に入れた高濃度基質材料 1 1 と凝固材 1 8 とを機械的に混ぜ合わせ、不均質の移植可能な複合型骨移植片のほぼ一様な組成の混合物 8 を用意する (図 5 参照) 。ほぼ一様な組成とは、複合型骨移植片混合物 8 が、繊維状および微粒子状の複合基質からなる骨材料と、個体数が増加した始原細胞と、凝固材とを含み、それらのすべてが混合物全体にほぼ均一に分布しており、よっていずれの構成要素についてもかさ濃度
30
勾配をほとんど示さないことを意味する。このような機械的混合は、例えば、混合ポウル 4 0 内でへら具 3 8 により行うか、或いはその他任意の既知の機械的混合手段により行う。

【 0 0 3 3 】

図 5 に示すように、漏斗 4 1 を (まだ複合型骨髄移植片材料 8 を含む) 混合ポウル 4 0 に取り付け、アプリケーションシリンジ 5 0 を漏斗 4 1 に取り付ける。図 5 の器具全体を、図 6 のようにほぼ上下を逆転させ、混合ポウル 4 0 の底蓋 4 2 を取り外す。随意で、ポウルの内容物を、アプリケーションシリンジ 5 0 に取り付けた漏斗 4 1 に注ぐか、またはすくい集めてもよい。次いで、移植可能な複合型骨髄移植片材料 8 をアプリケーションシリンジ 5 0 に詰める。該材料を詰めるのを補助するのにへら具 3 8 を使用することができる。随意で、
30
図 6 に示すように、アプリケーションシリンジ内に材料を詰めるためのプランジャーの一方の端部にへら具 3 8 を装備してもよい。詰め込み後、アプリケーションシリンジ 5 0 を漏斗 4 1 から取り外し、移植可能な複合型骨髄移植片材料 8 を患者に適用するために使用することができる。移植片材料 8 は、移植位置に骨治癒または骨再生を引き起こすのに効果がある。随意で、従来技術による他の機械的手段により、複合型骨髄材料を混合ポウルから患者に直接移してもよい。

【 実施例 2 】

【 0 0 3 4 】

本発明による複合型骨髄移植片材料は、第 2 の好適な実施例にしたがって次のようにして調製することもできる。複合型基質 1 0 および骨髄吸引液 2 0 (好適には抗凝固薬を含む) を別個に用意して上述のように調製し、上述の実施例 1 で開示したものと同様の割合で
40
混合ポウル 4 0 内に別個に配置する。次いでへら具 3 8 またはその他周知の機械的混合手段を使用して基質と吸引液を機械的に混合し、高濃度の基質を得る。その後高濃度基質 1 1 から液状吸引液 2 0 を以下のようにして排出する。図 7 に示すように、漏斗 4 1 を混合ポウル 4 0 に取り付け、カラム 1 2 を漏斗 4 1 に取り付けて、カラム 1 2 の反対側の端部に単一のエンドキャップ 1 4 を接続する。またエンドキャップ 1 4 には、吸引液を通過させる一方、高濃度基質 1 1 を保持する開口を複数有する膜またはスクリーン (図示せず) を取り付ける。開口の径は、20 μ m 以上、好適には 30 μ m 以上、さらに好適には 40 μ m 以上であることが好ましい。排水シリンジ 4 5 を既知の接続手段を介してエンドキャップ 1 4 に取り付け、それにより排水シリンジ 4 5 の対応する内部容積とカラム 1 2 の間
50

を液体が流れるようにする。このような器具の全体図は、図 7 に示すように逆様になっており、底蓋 4 2 は必要であれば取り外すことができる。混合ボウル 4 0 内の液体を、カラム 1 2 を通して排水シリンジ 4 5 内に引き込む、または排出する。液体をカラム 1 2 に押し戻しても良い。上述したように、この両方向への操作を数回繰り返すことができる。その後使用済みの液体を廃棄する。

【 0 0 3 5 】

或いは、液状吸引液 2 0 は、容器の一方の壁部（例えば混合ボウル 4 0 の底）と多孔性スクリーンまたは膜（図示せず）との間で高濃度基質を圧縮することにより、高濃度基質から排出させてもよい。当該スクリーンまたは膜は、吸引液は通過させるが容器の壁部に対して圧縮された高濃度基質を保持するように構成された開口を複数有する。次いで、膜を透過した液状吸引液を注ぎ出し、容器の壁部と多孔性膜の間で圧縮された高濃度基質を容器に残す。好適には、容器は、その出口の上流に多孔性膜を取り付けたシリンジであり、容器の壁部はシリンジプランジャである。この好適な実施例では、基質をシリンジ内で多孔性膜の方向へ押し出すことによって、吸引液を出口から放出し、一方で高濃度基質をシリンジ内に残すことにより、高濃度基質の圧縮を行う。

10

【 0 0 3 6 】

こうして濃度が高まった基質 1 1 は、図 4 に示すように、次に所定量の凝固材 1 8 と合わせ、その後好適な実施例 1 で説明したものと同様の方法により処理し、移植者の骨治療および骨再生を引き起こすのに有効な移植可能複合型骨髄移植片材料 8 をつくる。

【 0 0 3 7 】

随意で、上述の両実施例のそれぞれにもう 1 つの段階を加えることができる。移植可能骨髄移植片材料 8 を移植する前に、一定量の抗凝固処理されていない骨髄吸引液を、凝固する前（例えば移植片材料 8 がアプリケーションシリンジ 5 0 内にある間）の移植片材料 8 に（放出するなどして）加える。このようにすることで液状吸引液は移植片材料 8 の空隙容積に浸透し、最終的にそこで凝固する。吸引液は、移植片材料に有効に浸透するのに十分な時間に亘って液状に保持されることを確実にするために、吸引後直ちに当該材料 8 に注入されなければならない。この段階は、移植可能移植片材料 8 に、追加的な骨髄由来有核細胞（追加的始原細胞を含む）を与える。

20

【 0 0 3 8 】

本発明の複合型骨髄移植片材料調製法を完了するのに必要な時間は、典型的に 6 0 分未満である。よって、本方法は骨髄ドナー / 移植者が手術室にいる間に行うことができる。したがって、本発明の方法を使用することにより、複合型骨髄移植片を受けるために移植者が受けなければならない外科処置の回数を減らすことができる。

30

【 実施例 3 】

【 0 0 3 9 】

本発明により、外科医が本発明の方法を行う際の補助となるキットもまた提供される。図 8 に示すように、そのようなキットは、好適には上述の好適な実施例のいずれかによる方法を実行することができ、滅菌された、好適にはプラスチックからなる透明または半透明の、少なくとも以下に挙げる器具を備える。該器具とは、1 つの基質容器（例えば基質カラム 1 2）、既知の取り付け手段によって基質容器に開放可能に取り付けることができる少なくとも 1 つのエンドキャップ 1 4、エンドキャップ 1 4 に取り付ける、充填用シリンジと液体を連通させるためのエンドキャップコネクタ 3 1、エンドキャップ 1 4 と液体を連通させるためのシリンジコネクタ 3 0 を有する少なくとも 1 つの充填用シリンジ 2 8、取り外し可能な底蓋 4 2 を有する混合ボウル 4 0、一方の端部が混合ボウル 4 0 の開口端と一致し、他方の端部がカラム 1 2 と一致するように取り付けられる漏斗 4 1、カラム 1 2 をアプリケーションシリンジに変換するシリンジアダプタ 1 3、およびへら具 3 8 である。最適には、キットは、上述したものと同様に構成される第 2 充填用シリンジ 2 9 と第 2 エンドキャップ 1 4 をさらに備える。随意で、キットには、骨移植片基質として使用するための多孔性生物学的適合性移植基板と、基質容器内に基質を保持するための多孔性膜 1 5 を加えてもよい。随意で、本発明のキットは、ヘパリン骨髄吸引液シリンジ、吸引針、追

40

50

加の充填用シリンジ、または骨移植術に有益な他の器具をさらに備えてもよい。

【0040】

以下の治験例により本発明の様々な特徴をさらに説明する。

【0041】

治験例 1

高濃度基質を有する骨移植片材料が、濃度を高めていない移植片（特許文献 1 および 2 参照）よりも高い性能を示すということは既に示した。以下の実験は、高濃度基質と吸引した骨髄クロット（ABMC）を混合した骨材料のさらなる効果を実証した。

【0042】

後部脊椎固定術を 22 匹のビーグル犬に施した。各個体について、3 つの異なる脊椎固定位置において部分固定を行った（L1-2、L3-4、および L5-6）。基質材料に海綿骨片を用いて 3 種類の複合型骨移植片を調製した。犬 11 匹に脱塩海綿骨片を使用し、残りの 11 匹に鈹化海綿骨片を使用した。3 種類の複合型移植片は、高濃度基質のみ、骨髄クロットを含む濃度を高めていない基質、および骨髄クロットを含む高濃度基質であった。濃縮は、上述のように、基質材料にそれよりも多い量の吸引液を合わせるにより行った。

【0043】

結果を示す主要なパラメータとして癒合点を使用し、固定を比較した。また、CT スキャンの定量分析を使用して各位置の骨容積を評価し、各位置において機械的実験を行った。表 1 および表 2 に、それぞれ鈹化基質および脱塩基質について、各個体の移植位置における各複合型移植片の癒合点をまとめた。

【表 1】

個体および部位別鈹化海綿骨基質の各複合型移植片の癒合点

固体番号	高濃度基質のみ			ABMCのみ			高濃度基質+ABMC		
	L1-2	L3-4	L5-6	L1-2	L3-4	L5-6	L1-2	L3-4	L5-6
1			0		1.5		2.0		
2	0				0				0.5
3			4.0	4.0				4.0	
4		1.0				3.5	2.0		
5		0		1.0					4.0
6	0					0.5		3.0	
7		0				0	0		
8			1.0		2.5		1.5		
9			0	0				0	
10	0					0.5		1.0	
11		1.0		0					3.0
小計	0	2.0	5.0	5.0	4.0	4.5	5.5	8.0	7.5
合計	7.0			13.5			21.0		
ミーン	0.6			1.2			1.9		
メジアン	0			0.5			2.0		

【表 2】

個体および部位別脱塩海綿骨基質の各複合型移植片の癒合点

固体番号	高濃度基質のみ			ABMCのみ			高濃度基質+ABMC		
	L1-2	L3-4	L5-6	L1-2	L3-4	L5-6	L1-2	L3-4	L5-6
1		3.0				4.0	4.0		
2			0		4.0		0.5		
3	0					1.5		4.0	
4	0				3.0				1.0
5		3.0		1.0					4.0
6			1.5	2.5				4.0	
7			1.0	0				0	
8	0				0				0
9		0				0	0		
10			0		0		0		
11	0.5				0				3.0
小計	0.5	6.0	2.5	3.5	7.0	5.5	4.5	8.0	8.0
合計	9.0			16.0			20.5		
ミーン	0.8			1.5			1.9		
メジアン	0			1.0			1.0		

10

20

【0044】

上記のデータは、骨髄クロット材料を骨移植基質に加えることにより、複合型移植片の効力が大きく促進されることを示す。鈣化海綿骨材料を使用したとき、高濃度基質+ABMCのグループで癒合点が最も高かった(ミーン値=1.9)。さらに、高濃度基質+ABMCのグループの癒合点は、高濃度基質のみのグループの値(ミーン値=0.6、 $p=0.008$)より有意に高かった。高濃度基質+ABMCのグループはまた、ABMCのみのグループ(ミーン値1.2、 $p=0.04$)よりも統計的に優れていた。この優れた効能の度合いは予期せぬものであり、驚くほど大きかった。3種類の複合型移植材料、すなわち、高濃度基質+ABMC、ABMCのみ、高濃度基質のみの全体癒合率はそれぞれ、11例のうち9(81%)、11例のうち7(63%)および11例のうち4(36%)であった。高い癒合率を有する固定位置は、高濃度基質+ABMCグループに集まっていた。高濃度基質+ABMCグループでは、固定位置11のうち4(36%)が3.0以上の評価を受けた。対照的に、高濃度基質のみのグループでは11のうちわずかに1(8.3%)、ABMCのみのグループでは11例のうち2(18%)の固定位置が同様の評価を受けただけであった。

30

【0045】

脱塩海綿骨基質を使用したときも、癒合点は高濃度基質+ABMCグループで最も高かった。3種類の複合型移植材料、すなわち、高濃度基質+ABMC、ABMCのみ、高濃度基質のみの全体癒合率はそれぞれ、11例のうち7(63%)、11例のうち6(54%)および11例のうち5(45%)であった。ここでも、高い癒合点を有する固定位置は高濃度基質+ABMCグループに集中していた。高濃度基質+ABMCグループでは、11のうち5つの固定位置(45%)が3.0以上の評価を受けた。対照的に、高濃度基質のみのグループでは11のうちわずかに2(18%)、ABMCのみのグループでは11例のうち3(27%)の固定位置が同様の評価を受けただけであった。ABMCと高濃度骨基質を組み合わせることにより、高濃度骨基質のみの場合と比較して、驚異的で意外な程優れた効能を示す骨移植片が得られた。

40

【0046】

全ての標本に対して機械的実験も行った。骨癒合が明確な降伏点を示した標本についての

50

み、最大荷重、欠損に至る変形、および欠損に至るエネルギーのデータを計算した。脱塩および鈷化試料それぞれについての機械的実験データを以下の表3および4にまとめる。

【0047】

各移植片の剛性を測定し、脱塩および鈷化骨基質両方について、3種類の移植片それぞれのミーン値および標準偏差値を示すデータを表にした。鈷化骨基質では、高濃度基質のみ、ABMCのみ、および高濃度基質+ABMCの移植片はそれぞれ、 6.9 ± 2.4 、 7.9 ± 2.3 、および 8.2 ± 4.2 を示した。脱塩骨基質では、高濃度基質のみ、ABMCのみ、および高濃度基質+ABMCの移植片はそれぞれ、 9.1 ± 6.0 、 9.4 ± 6.2 、および 9.6 ± 4.8 を示した。

【0048】

癒合容積、癒合面積および癒合塊中の平均骨密度に関し、各複合型移植片についてCT画像分析データを取得した。鈷化および脱塩海綿骨基質それぞれについて、表3および表4に該データをまとめる。表3および4から明らかであるように、癒合容積と癒合面積の両方が、高濃度基質+ABMCグループで最も大きかった。

【表3】

鈷化海綿骨基質を使用した各細胞基質複合型移植片のCTデータ

	高濃度基質のみ (n=11)	ABMCのみ (n=11)	高濃度基質+ABMC (n=11)
癒合容積 (mm ³)	869±196	961±115	1006±185
癒合面積 (mm ²)	81±17	91±14	95±27
骨密度	1848±62	1840±43	1824±66

【表4】

脱塩海綿骨基質を使用した各細胞基質複合型移植片のCTデータ

	高濃度基質のみ (n=11)	ABMCのみ (n=11)	高濃度基質+ABMC (n=11)
癒合容積 (mm ³)	872±288	1010±268	1115±406
癒合面積 (mm ²)	85±31	95±27	98±31
骨密度	1901±35	1858±29	1854±77

【0049】

上記に説明した本発明の実施例は好適な実施形態を構成するものであるが、添付の請求の範囲に規定される本発明の範囲から逸脱することなく、変形が可能であることは自明である。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】エンドキャップを取り付けた移植片基質を含む基質容器の斜視図である。

【図2】図2は充填用シリンジを取り付けた図1の基質容器の斜視図である。図2Aは始原細胞および骨髄由来有核細胞を示す骨髄吸引液の拡大図である。

【図3】図3は始原細胞が不均一に分布した移植片基質を含む基質容器の斜視図である。図3Aは骨髄吸引液が通過した後の移植片基質の中央領域の拡大図であり、図3Bは同移植片基質の端部領域の拡大図である。

【図4】凝固材および高濃度基質材料を含む混合ボウルの斜視図である。

【図5】混合ボウル、漏斗およびアプリケーションシリンジを備えるアセンブリの斜視図である。

【図6】本発明の好適な実施例を行うために上下を反転させた図5のアセンブリの斜視図

10

20

30

40

50

である。

【図7】本発明の第2の好適な実施例を行うための、混合ボウル、漏斗、基質用容器、および排水シリンジを備えるアセンブリの斜視図である。

【図8】本発明によるキットの斜視図である。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 September 2002 (06.09.2002)

PCT

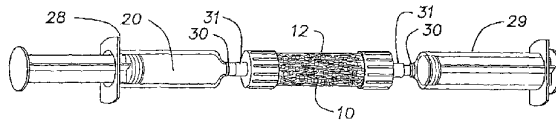
(10) International Publication Number
WO 02/068010 A1

- (51) International Patent Classification: A61L 27/42, 27/38, A61F 2/28
 - (21) International Application Number: PCT/US02/05583
 - (22) International Filing Date: 26 February 2002 (26.02.2002)
 - (25) Filing Language: English
 - (26) Publication Language: English
 - (30) Priority Data: 09/795,254 28 February 2001 (28.02.2001) US
 - (71) Applicant: THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION [US/US]; 9500 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44195 (US).
 - (72) Inventor: MUSCHLER, George, F.; 2270 Chatfield Drive, Cleveland Heights, OH 44106 (US).
 - (74) Agents: MURTAUGH, John, P. et al.; Pearne & Gordon LLP, Suite 1200, 526 Superior Avenue East, Cleveland, OH 44114-1484 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



(54) Title: COMPOSITE BONE MARROW GRAFT MATERIAL, WITH METHOD AND KIT

WO 02/068010 A1



(57) Abstract: A composite bone marrow graft material is provided having an enriched population of uniformly distributed progenitor cells. The graft material includes clot material preferably derived from non-anticoagulated bone marrow aspirate, which significantly improves the efficacy of the graft. A method for preparing such bone graft material is also provided. A kit is also provided containing sterilized implements useful in preparing enriched composite bone marrow graft material.

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 COMPOSITE BONE MARROW GRAFT MATERIAL WITH METHOD AND KIT

2 BACKGROUND OF THE INVENTION

3 Bone grafting is widely used to treat fractures, non-
4 unions and to induce arthrodeses. Autogenous cancellous bone,
5 which is taken from one site in the graftee and implanted in
6 another site in the graftee, is currently the most effective
7 bone graft. Autogenous cancellous bone provides the
8 scaffolding to support the distribution of the bone healing
9 response, and progenitor cells which form new cartilage or
10 bone. However, harvesting autogenous bone results in
11 significant cost and morbidity, including scars, blood loss,
12 pain, prolonged operative and rehabilitation time and risk of
13 infection. Furthermore, the volume of the graft site can
14 exceed the volume of available autograft.

15 Accordingly, alternatives to autografts have been
16 developed. Several purified or synthetic materials, including
17 ceramics, biopolymers, processed allograft bone and collagen-
18 based matrices have been investigated or developed to serve as
19 substitutes for autografts. The FDA has approved a porous
20 coral-derived synthetic hydroxyapatite ceramic for use in
21 contained bone defects. A purified collagen/ceramic composite
22 material is also approved for use in acute long bone
23 fractures. Although these materials avoid the morbidity
24 involved in harvesting autografts and eliminate problems
25 associated with a limited amount of available autograft, the
26 clinical effectiveness of the synthetic materials remains
27 generally inferior to autografts. The synthetic graft
28 materials have also been used as carriers for bone marrow
29 cells. When the above composite materials are implanted into
30 skeletal defects, progenitor cells differentiate into skeletal
31 tissue.

32 In some instances, composite implants are made by
33 combining a synthetic graft material in a cell suspension with

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 a similar or lesser volume obtained from a bone marrow
2 aspirate. However, the progenitor cells, which have the
3 capacity to differentiate into cartilage, bone, muscle,
4 fibrous tissue, and other connective tissue, are present in
5 the bone marrow in very miniscule amounts. The numbers
6 of progenitor cells present in 1 ml of bone marrow varies
7 widely between patients from about 100 cells to 20,000 cells.
8 This represents a mean of about one in 20,000 to one in 40,000
9 of the nucleated cells in a bone marrow aspirate. Thus, a
10 composite implant made by combining a given volume of
11 synthetic graft material in a comparable volume of fresh bone
12 marrow contains relatively few progenitor cells.

13 Accordingly, a technique has been previously developed to
14 increase the relative concentration of progenitor cells in
15 composite implants. This technique involves plating a
16 suspension of bone marrow cells onto tissue culture
17 dishes, culturing the cells in a select medium for one or more
18 days to achieve an enhanced population of progenitor cells,
19 and then detaching the cells from the tissue culture dishes to
20 provide a cell suspension containing an increased population
21 of progenitor cells. Composite implants are then made by
22 soaking synthetic ceramic carriers in this progenitor cell
23 enriched suspension. Unfortunately, this method of preparing
24 composite implants is very time consuming. Moreover, if the
25 original progenitor culture cells are derived from bone marrow
26 aspirates obtained from the graftee, the graftee must undergo
27 multiple invasive procedures; one procedure to remove his or
28 her bone marrow, and another procedure on a later date to
29 implant the composite graft. Consequently, the graftee may be
30 exposed to anesthesia more than once.

31 Another technique has also been developed to produce a
32 composite bone graft matrix having the benefits of the culture
33 method, but is not so time consuming and does not require
34 multiple invasive procedures. In this technique, a composite

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 matrix having an enriched population of progenitor cells is
2 produced by contacting a particular volume of matrix material
3 with an excess volume of bone marrow aspirate (see U.S. Pat.
4 Nos. 5,824,084 and 6,049,026). In that technique, bone marrow
5 aspirate containing progenitor cells is passed through a
6 porous matrix material having a surface which selectively
7 bonds to progenitor cells, thus retaining the progenitor cells
8 within the matrix and allowing excesses of other cells (such
9 as blood cells and other nucleated marrow-derived cells) to
10 pass through. The now progenitor cell-enriched graft matrix
11 is implanted in a patient.

12 However, because progenitor cells are so strongly and
13 selectively bonded to some matrix surfaces (e.g. allograft
14 bone matrix), they are nonuniformly distributed throughout the
15 matrix, with dense pockets of progenitor cells discretely
16 concentrated in the vicinity of initial contact between the
17 marrow aspirate and the matrix material. Consequently, a bone
18 graft prepared by this technique suffers from the limitation
19 that bone healing subsequent to implantation does not occur
20 uniformly due to the nonuniform distribution of progenitor
21 cells within the implanted matrix. Additionally, bone healing
22 subsequent to implantation of the matrix occurs relatively
23 slowly.

24 It is therefore desirable to have a new method of
25 preparing composite bone marrow graft material having an
26 enriched population of progenitor cells which can be performed
27 intraoperatively, i.e. at the same time bone marrow is being
28 taken from the graftee, that results in uniform distribution
29 of progenitor cells throughout the graft material, and that
30 facilitates accelerated healing upon implantation.

31 SUMMARY OF THE INVENTION

32 A composite bone marrow graft material is provided
33 comprising a porous biocompatible implantable matrix and clot

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 material. The composite bone marrow graft material has an
2 enriched population of progenitor cells. A method of
3 preparing composite bone marrow graft material is also
4 provided. The method includes the steps of providing a bone
5 marrow aspirate, providing a porous biocompatible implantable
6 matrix, contacting the bone marrow aspirate and the matrix to
7 provide an enriched matrix, and mechanically mixing the
8 enriched matrix to yield a composite bone marrow graft
9 material having progenitor cells distributed substantially
10 uniformly throughout the composite bone marrow graft material.

11 A kit for the preparation of composite bone marrow graft
12 material is also provided. The kit includes a matrix
13 container, a first endcap, and a first loading syringe. The
14 first loading syringe is adapted to mate to the first endcap
15 to provide fluid communication between the first loading
16 syringe and the matrix container. The first endcap is
17 releasably attachable to the matrix container.

18 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

19 Fig. 1 is a perspective view of a matrix container fitted
20 with endcaps and containing a graft matrix.

21 Fig. 2 is a perspective view of the matrix container of
22 Fig. 1 fitted with loading syringes.

23 Fig. 2A is an exploded view of bone marrow aspirate
24 showing progenitor cells and marrow-derived nucleated cells.

25 Fig. 3 is a perspective view of a matrix container
26 containing a graft matrix having a nonuniform distribution of
27 progenitor cells.

28 Fig. 3A is an exploded view of the center region of a
29 graft matrix that has been flowed through with bone marrow
30 aspirate.

31 Fig. 3B is an exploded view of an end region of a graft
32 matrix that has been flowed through with bone marrow aspirate.

33 Fig. 4 is a perspective view of a mixing bowl containing

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 clot material and enriched matrix material.

2 Fig. 5 is a perspective view of an assembly comprising a
3 mixing bowl, funnel and applicator syringe.

4 Fig. 6 is a perspective view of the assembly of Fig. 5
5 which has been inverted to carry out a preferred embodiment of
6 the invention.

7 Fig. 7 is a perspective view of an assembly comprising a
8 mixing bowl, funnel, matrix container, and effluent syringe
9 for carrying out a second preferred embodiment of the
10 invention.

11 Fig. 8 is a perspective view of a kit according to the
12 present invention.

13 DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS OF THE
14 INVENTION

15 As used herein, when a range such as 5-25 or between 5
16 and 25 is given, this means preferably at least 5 and,
17 separately and independently, preferably not more than 25. As
18 used herein, the term "progenitor cell" or "progenitor cells"
19 means any progenitor cells, such as connective tissue
20 progenitor cells and/or stem cells. This population of cells
21 contains cells that are pluripotent and capable of
22 differentiating into a variety of tissues (e.g. bone,
23 cartilage, fat, tendon, ligament, muscle, nervous tissue,
24 hematopoietic tissues, endothelial and vascular tissues, and
25 liver).

26 A method of providing composite bone marrow graft
27 material having an enriched population of progenitor cells
28 according to the present invention generally comprises the
29 following steps: 1. obtaining a bone marrow aspirate; 2.
30 contacting the bone marrow aspirate with a porous
31 biocompatible implantable matrix (e.g. by flowing the aspirate
32 through the matrix) to provide a progenitor cell-enriched
33 matrix having an enriched population of progenitor cells; 3.

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 mechanically mixing the enriched matrix to provide
2 substantially uniform progenitor cell distribution throughout;
3 and 4. draining the matrix of excess liquid. Preferably, the
4 method also includes the step of adding clot material to the
5 enriched matrix. Composite bone marrow graft material thus
6 prepared is then implantable into a patient or graftee, and is
7 effective to induce bone healing and/or bone regeneration.

8 The steps of a method as outlined above comprise several
9 functional elements which will now be described. Such
10 functional elements include a bone marrow aspirate, a porous
11 biocompatible implantable matrix, and preferably clot
12 material. Following a description of these functional
13 elements is a description of the preferred methods and
14 apparatus for preparing a composite bone graft of the present
15 invention. It should be understood that the descriptions that
16 follow are by way of illustration only, and not limitation.

17 Bone Marrow Aspirate

18 Bone marrow aspirate contains plasma, nucleated
19 progenitor cells (progenitor cells), nucleated hematopoietic
20 cells, endothelial cells, and cells derived from peripheral
21 blood, including red cells and platelets. Because bone marrow
22 aspirate contains peripheral blood, it is preferred that the
23 aspirate be collected in a syringe containing an
24 anticoagulant. Suitable anticoagulants include heparin,
25 sodium citrate, and EDTA. Preferably, a bone marrow aspirate
26 for use in a method of the present invention is obtained from
27 the patient who will receive the graft (the graftee). Less
28 preferably, the bone marrow aspirate can be obtained from
29 another immunologically compatible donor.

30 Porous Biocompatible Implantable Matrix

31 The matrix comprises a porous, biocompatible, implantable
32 matrix. Preferably, the matrix has a bioactive
33 surface. Examples of porous biocompatible, implantable graft

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 matrix materials having a bioactive surface include ceramics
2 comprising calcium phosphate such as hydroxyapatite or tri-
3 calcium phosphate, as well as demineralized or
4 mineralized bone matrix. Other suitable matrix materials
5 include biopolymers such as polylactic acid, polyglycolic
6 acid, polygalactac acid, polycaprolactone, polyethylene oxide,
7 polypropylene oxide, polysulfone, polyethylene, and
8 polypropylene. Still other suitable matrix materials are
9 hyaluronic acid, which may be purified with or without
10 crosslinking, bioglass and collagen.

11 More preferably, cell adhesion molecules are bound to the
12 surface of the matrix substrate. The term "cell adhesion
13 molecules" includes laminins, fibronectin, vitronectin,
14 vascular cell adhesion molecules (V-CAM), intercellular
15 adhesion molecules (I-CAM), tenascin, thrombospondin,
16 osteonectin, osteopontin, bone sialoprotein, collagens, or any
17 other molecules or components effective to promote selective
18 adhesion of progenitor cells to the substrate surface.

19 Preferably, the matrix has sufficient porosity to yield
20 at least a 2-fold, preferably 3-fold, preferably 5-fold,
21 preferably 7-fold, preferably 10-fold, increase in total
22 matrix surface area available for progenitor cell-adhesion
23 relative to a nonporous solid having identical external
24 dimensions. Such an increase in total surface area can be
25 achieved by using a matrix substrate comprising powder,
26 granules, fibers, some combination thereof, or a single
27 highly porous substrate mass. Preferably, the size of the
28 pores in the matrix is greater than 20, more preferably 50,
29 more preferably 100, more preferably 500, most preferably 1000
30 μm , in order to facilitate penetration of progenitor cells
31 through the pore openings into the void volume of the matrix
32 material, thereby availing of the additional surface area
33 within the pores.

34 Particularly suitable matrix materials include isolated

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 mineralized cancellous bone sections, powders or granules
2 of mineralized bone, demineralized cancellous bone sections,
3 powders or granules of demineralized bone, guanidine-
4 HCl extracted demineralized bone matrix, sintered cortical or
5 cancellous bone, coralline hydroxyapatite sold by Interpore
6 under the trade name Interpore 500, or Interpore 200, granular
7 ceramics such as that incorporated into the bone graft
8 substitute Collagraft sold by Zimmer, granular or block
9 ceramics such as that incorporated into the graft
10 substitute Vitoss sold by Orthovita, and filamentous sponges
11 such as those made from collagen by Orquest.

12 A preferred matrix is prepared as a combination of
13 particulate bone material and fibrous bone material. The
14 particulate bone material is preferably derived from spongy
15 human bone, preferably cancellous bone, for example, from a
16 distal end of long human bones. The fibrous bone material is
17 preferably derived from cortical bone. Both the particulate
18 and the fibrous bone materials can be obtained from a bone
19 bank, or optionally from the grafter. When obtained from the
20 grafter, the bone material is manipulated intraoperatively in
21 the operating room to conform to the desired particulate and
22 fibrous characteristics via known bone manipulation means.

23 Most preferably, the particulate bone material is
24 provided as allograft cancellous bone particles in the form of
25 chunks, chips or fragments, having dimensions in the range of
26 1-15, preferably 2-8, mm in mean diameter. Most preferably,
27 the fibrous bone material is provided as allograft
28 demineralized cortical bone fibers of at least 5 mm, more
29 preferably at least 1 cm, more preferably at least 2 cm, more
30 preferably at least 3 cm, more preferably at least 4 cm, and
31 most preferably at least 5 cm, in length. Optionally the
32 fibrous bone material is provided as a mixture of fibers of
33 varying lengths in the range of 5 mm - 2 cm, 5 mm - 3 cm, 5 mm
34 - 4 cm, 5 mm - 5 cm, 5mm - 15 cm, or some other range.

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 Optionally, the fibrous bone material is supplied as a
2 flexible mat, e.g. Grafton Flex available from Osteotech, Inc.
3 The particulate and fibrous bone materials are combined
4 to form a preferred composite matrix in the following manner.
5 Bone fibers, preferably demineralized cortical bone fibers
6 having lengths as described above, are combined with
7 particulate bone particles in the following preferred
8 proportion: about 225, less preferably 200-300, less
9 preferably 150-375, less preferably 100-450, less preferably
10 75-500, less preferably 25-1000, mg dry weight of
11 demineralized cortical bone fibers, with about 10, less
12 preferably 8-12, less preferably 6-14, less preferably 4-16,
13 less preferably 2-10, less preferably 1-25, cc (bulk volume)
14 of particulate bone particles having a mean diameter of 1-15,
15 preferably 2-8, mm. Optionally, demineralized cortical bone
16 fibers can be obtained from a flexible mat comprising such
17 fibers. When such a mat is used, it is first washed free of
18 any toxic or hyperosmolar material that may be present, such
19 as glycerol, using an isotonic solution. The mat is then
20 suspended in saline, or other suitable isotonic solution, to
21 facilitate separation of the individual bone fibers. The
22 separated bone fibers are combined with particulate bone
23 material in the following proportion to form a preferred
24 composite matrix: the fibers from one mat having initial
25 dimensions of 2.5 cm x 5 cm x about 2.5 mm (initial volume of
26 about 3.1 cm³) with about 10 cc, less preferably 8-12 cc, less
27 preferably 6-14 cc, less preferably 4-16 cc, (bulk volume) of
28 particulate bone particles having a mean diameter of 1-15,
29 preferably 2-8, mm.

30 It should be noted that when grafts of differing size are
31 necessary, a composite matrix of different size can be
32 prepared to conform with the above-stated proportion of
33 fibrous to particulate bone according to the present
34 invention. For example, (assuming uniform bulk density) 20 cc

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 of particulate bone can be combined with 450 mg of bone fibers
2 to provide a preferred composite matrix.

3 Clot Material

4 The clot material can be a blood clot formed from blood
5 obtained from a vein or artery of the graftee (or an
6 immunologically compatible donor). More preferably, the clot
7 material is a bone marrow clot formed from non-anticoagulated
8 bone marrow aspirate which is most preferably obtained from
9 the graftee. Preferably, the bone marrow aspirate from which
10 the bone marrow clot is formed is obtained from the graftee
11 intraoperatively during the graft procedure. Less preferably,
12 the clot material can be platelet gel, platelet concentrate,
13 fibrin clot material, and/or fibrin glue as known in the art.

14 Addition of a bone marrow clot (obtained from non-
15 anticoagulated bone marrow aspirate) to a progenitor cell-
16 enriched graft matrix surprisingly significantly improves the
17 efficacy of the resulting composite bone marrow graft material
18 relative to composite grafts without clot material. It has
19 been observed that addition of a marrow clot to a similarly
20 enriched matrix delivering 50-70% more nucleated cells
21 (including more than twice the number of progenitor cells)
22 compared to a marrow clot alone resulted in a graft that was
23 superior to both an enriched matrix alone and to a non-
24 enriched matrix combined with a marrow clot. Hence, the
25 addition of a bone marrow clot to a progenitor cell-enriched
26 matrix provides improved graft performance.

27 Without wishing to be bound by any particular theory, it
28 is believed that inclusion of a bone marrow clot may improve
29 the efficacy of a composite bone graft for one or several of
30 the following reasons. First, it is possible that some cells
31 important to the process of successful bone healing do not
32 attach to the graft matrix and therefore are not sufficiently
33 concentrated in (or possibly are even excluded from) the graft

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 site, resulting in ineffective or inefficient healing at that
2 site. The polymerization of fibrinogen into fibrin resulting
3 from the clotting cascade (further explained below) may
4 provide a valuable supplemental matrix promoting the
5 attachment and migration of cells important to the healing
6 response at the graft site. Such cells include migratory
7 endothelial cells which proliferate to form tubular structures
8 that are important precursors to the formation of blood
9 vessels via angiogenesis.

10 A second possibility is that the physiologic process of
11 forming a clot at the graft site creates an improved
12 environment for transplanted osteogenic cells at that site.
13 Specifically, clotting of the non-anticoagulated bone marrow
14 aspirate results in the activation of platelets contained
15 therein, resulting in platelet degranulation. Platelet
16 degranulation in turn releases growth factors and osteotropic
17 cytokines which might otherwise be absent from the graft site.
18 Several important bioactive factors released during this
19 process include platelet derived growth factor (PDGF),
20 epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factors
21 (FGFs), and transforming growth factor beta (TGF-beta). In
22 addition, fibrin matrix formed from fibrinogen as a result of
23 the clotting cascade may provide important stability at the
24 graft site during the immediate post-operative period.
25 Furthermore, the process of fibrinolytic activity that occurs
26 over the first several days following graft implantation
27 provides an additional source for angiogenic factors (e.g.
28 fibrin split products as known in the art) during the early
29 stages of graft incorporation. It is believed that the
30 resulting angiogenesis at the graft site following
31 implantation may enhance the formation of new blood vessels in
32 the site providing a source of nourishment for the freshly
33 implanted progenitor cells and other cells responsible for
34 bone healing and growth, thus accelerating the healing

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 response.

2 Preferred Embodiments and Apparatus

3 The preferred embodiments of the invented method for
4 providing a composite bone graft will now be described. The
5 apparatus parts described herein are preferably made from
6 plastic, preferably transparent or translucent. According to a
7 first preferred embodiment of the invention, and referring
8 first to Fig. 1, a composite biocompatible implantable matrix
9 10 prepared as described above is placed into a matrix
10 container, which container is most preferably a column 12.
11 (Matrix 10 may be packed tightly or loosely, depending on the
12 material and it's structure). Column 12 can be provided
13 having a multitude of interior volumes suitable to accommodate
14 the necessary volume of matrix for a particular graft. As
15 used herein, a volume of matrix (or matrix volume) refers to
16 the excluded volume of a nonporous solid having external
17 dimensions identical to those of the particular matrix. For
18 example, a column having an internal volume of 5, 10, 15, 20,
19 25, or 30, cc, or some other internal volume, can be provided
20 to accommodate various matrix volumes. Preferably, column 12
21 has an interior diameter of 0.5-3.0, more preferably 1-2,
22 more preferably 1-1.5 cm. Preferably column 12 has a length
23 at least 1.5, more preferably at least 2, most preferably at
24 least 3, times greater than its interior diameter. Endcaps 14
25 are removably attached to column 12 via threaded connections,
26 snap connections, or any other known connecting means.

27 Optionally, endcaps 14 can be provided with a screen or
28 membrane 15 (see Fig. 8) effective to allow aspirate 20 to
29 pass therethrough, while retaining particles of matrix 10.
30 Preferably, such a membrane has openings of at least 20,
31 preferably at least 30, preferably at least 40, μm in
32 diameter.

33 A bone marrow aspirate 20 (preferably containing an

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 anticoagulant) is obtained via known means, preferably from
2 the grafter. Aspirate 20 is then loaded into a first loading
3 syringe 28. Initially, aspirate 20 contains progenitor cells
4 32 and other nucleated cells 33 in a ratio between 1:20,000
5 and 1:40,000 (see Fig. 2A). The aspirate also contains
6 platelets, red blood cells and serum (including molecules
7 which are soluble or suspended in serum. Loading syringe 28
8 is provided with a syringe connector 30 adapted to mate with
9 endcap connector 31, to provide fluid communication between
10 the respective interior volumes of loading syringe 28 and
11 column 12. A second loading syringe 29 is similarly provided
12 with a syringe connector 30 adapted to mate with endcap
13 connector 31. As seen in Fig. 2 first and second loading
14 syringes 28 and 29 are then attached at opposite ends of
15 column 12 to endcaps 14 via the above-described connectors,
16 thus providing fluid communication between the interior
17 volumes of first loading syringe 28, column 12, and second
18 loading syringe 29.

19 First loading syringe 28 is then plunged, delivering
20 aspirate 20 into column 12 where aspirate 20 flows through or
21 contacts matrix 10 prior to being collected at the opposite
22 end of column 12 in second loading syringe 29. Contacting the
23 bone marrow aspirate and the matrix to provide an enriched
24 matrix can be done by flowing the aspirate through the matrix,
25 incubating the matrix in the aspirate, or by other means known
26 in the art. Alternatively, aspirate 20 is contacted with
27 matrix 10 by any known means to provide an enriched matrix.
28 Progenitor cells advantageously and selectively adhere to the
29 surface of matrix 10, and hence are retained within the matrix
30 while excesses of other cells, such as blood cells and other
31 marrow-derived nucleated cells, flow relatively freely through
32 the matrix and are collected in second loading syringe 29. To
33 achieve an enriched progenitor cell population in matrix 10,
34 the volume of aspirate 20 flowed through matrix 10 preferably

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 exceeds the matrix volume. In this manner, the progenitor
2 cells present in the aspirate volume are preferably
3 concentrated in the matrix volume, providing an enriched
4 matrix. As used herein, "enriched" means that the ratio of
5 progenitor cells to all nucleated bone marrow cells is greater
6 in the matrix than in the original bone marrow aspirate.
7 Preferably the ratio of progenitor cells to all marrow-derived
8 nucleated cells in an enriched matrix is at least 1:20,000,
9 more preferably at least 1:10,000, more preferably at least
10 1:5,000, representing at least a 2-fold, preferably at least a
11 4-fold increase in progenitor cell prevalence or
12 concentration. More preferably, an enriched matrix comprises
13 at least a 5-fold, more preferably at least a 6-fold, more
14 preferably at least an 8-fold, increase in progenitor cell
15 concentration in the enriched matrix above that of a non-
16 enriched matrix with a marrow clot. Preferably, the ratio of
17 aspirate volume to matrix volume is at least 2:1, more
18 preferably at least 3:1, more preferably at least 4:1. For
19 example, when a matrix having a matrix volume of 15 cc is
20 used, the total volume of aspirate passed through the matrix
21 is preferably at least 30 cc, more preferably at least 45 cc,
22 more preferably at least 60 cc. Optionally, the initial
23 effluent from column 12 delivered to second loading syringe 29
24 can be discarded prior to continuing the method.

25 Optionally, aspirate 20 is caused to flow back and forth
26 through matrix 10 in column 12 by alternately plunging first
27 and second loading syringes 28 and 29. Depending upon the
28 rate of binding of cells and progenitors to a particular
29 matrix, this procedure of flowing aspirate 20 through matrix
30 10 is repeated at least 1 time, but may be repeated preferably
31 at least 2, preferably at least 3, preferably at least 4,
32 times. Optionally, a wash solution is passed through matrix
33 10 after the original bone marrow aspirate suspension and any
34 effluents have been passed through matrix 10. Preferably, the

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 wash solution comprises a sterile, isotonic, buffered solution
2 having a pH range of 7.3 to 7.5. Suitable wash solutions
3 include, phosphate-buffered saline, Hank's balanced salt
4 solution, human serum, and minimal essential medium.

5 Following the above procedure, loading syringes 28 and 29
6 are detached from endcaps 14. As can be seen in Fig. 3, the
7 progenitor cells 32 retained in matrix 10 are distributed
8 nonuniformly within the matrix 10. Specifically, a progenitor
9 cell concentration gradient exists within matrix 10 whereby
10 progenitor cells 32 are concentrated in the regions near the
11 ends of column 12 (see Fig. 3A), where bone marrow aspirate 20
12 first contacts the matrix material upon entering column 12.
13 Consequently, the central region of matrix 10 has a much lower
14 population of progenitor cells 32 (see Fig. 3B). This effect
15 is due to rapid adherence of progenitor cells and other cells
16 to the matrix surface upon entering column 12. Thus, a
17 mechanical mixing step is effective to produce an enriched
18 matrix having a more uniform progenitor cell distribution.

19 Referring to Fig. 4, the endcaps are removed from column
20 12, and column 12 is fitted with a syringe adaptor 13 to form
21 an applicator syringe 50. Syringe adaptor 13 comprises a
22 plunger which is adapted to plunge column 12, and expel matrix
23 material therefrom. The progenitor cell-enriched matrix
24 material 11 is thus expelled from column 12, and delivered
25 into mixing bowl 40 together with a volume of clot material
26 18. Clot material 18 is preferably non-anticoagulated bone
27 marrow aspirate obtained from the grafter that has been
28 allowed to clot as above-described. Optionally the non-
29 anticoagulated bone marrow aspirate can be combined with the
30 enriched matrix prior to clotting, allowing the clot to form
31 during and after the mixing process. The ratio of clot
32 material volume to progenitor cell-enriched matrix material
33 volume is preferably about 1:1, less preferably about or at
34 least 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 2:1, 3:1, 4:1, or 5:1. Once

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 combined in mixing bowl 40, the enriched matrix material 11
2 and clot material 18 are mechanically mixed together to
3 provide a heterogeneous implantable composite bone graft
4 mixture 8 (see Fig. 5) of substantially uniform composition.
5 By substantially uniform composition, it is meant that the
6 composite bone graft mixture 8 comprises the fibrous and
7 particulate bone material of the composite matrix, an enriched
8 population of progenitor cells, and clot material, all
9 substantially uniformly distributed throughout the entire
10 mixture, thus exhibiting substantially no bulk concentration
11 gradient for any single component. Such mechanical mixing can
12 be performed, for example, with a spatula tool 38 in mixing
13 bowl 40, or via any other known mechanical mixing means.

14 Referring to Fig. 5, funnel 41 is fitted to mixing bowl
15 40 (still containing composite bone marrow graft material 8),
16 and applicator syringe 50 is fitted to funnel 41 as shown.
17 The entire apparatus as shown in Fig. 5 is subsequently
18 inverted as shown in Fig. 6, and base cover 42 of mixing bowl
19 40 is removed. Optionally, the bowl contents may be poured or
20 scooped into the funnel 41 affixed to applicator syringe 50.
21 Implantable composite bone marrow graft material 8 is then
22 packed into applicator syringe 50. Spatula tool 38 can be
23 used to aid packing. Optionally, spatula tool 38 is equipped
24 at one end with a plunger adapted to pack the material into
25 the applicator syringe as shown. Once packed, applicator
26 syringe 50 is removed from funnel 41, and can be used to apply
27 the implantable composite bone marrow graft material 8 to the
28 patient. Graft material 8 is effective to induce bone healing
29 or bone regeneration at the graft site. Optionally, the
30 composite bone marrow graft material may be transferred
31 directly from the mixing bowl to the patient by other
32 mechanical means known in the art.

33 Composite bone marrow graft material according to the
34 invention can also be prepared according to a second preferred

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 embodiment as follows. Composite matrix 10 and bone marrow
2 aspirate 20 (preferably containing an anticoagulant) are
3 separately obtained and prepared as above-described, and are
4 separately placed in mixing bowl 40 in similar proportion as
5 described with respect to the first preferred embodiment
6 above. The matrix and aspirate are then mechanically mixed
7 together using spatula tool 38, or some other known mechanical
8 mixing means to provide an enriched matrix. The liquid
9 aspirate 20 is then drained from the enriched matrix 11 as
10 follows. Referring to Fig. 7, funnel 41 is attached to mixing
11 bowl 40, and column 12 is attached to funnel 41 as shown, with
12 a single endcap 14 connected at the opposite end of column 12.
13 Endcap 14 is also fitted with a membrane or screen (not shown)
14 having openings adapted to allow aspirate to pass through
15 while retaining the enriched matrix 11. The openings are
16 preferably at least 20, more preferably 30, more preferably
17 40, μm in diameter. An effluent syringe 45 is attached to
18 endcap 14 via known connecting means, thus providing fluid
19 communication between the respective interior volumes of
20 effluent syringe 45 and column 12. The entire apparatus thus
21 described is inverted as shown in Fig. 7, and base cover 42 is
22 removed if necessary. The liquid within mixing bowl 40 is
23 drawn or drained through column 12 and into effluent syringe
24 45. The liquid may be plunged back through column 12. This
25 back and forth procedure may be repeated several times as
26 described previously. The depleted liquid is then discarded.
27 Alternatively, liquid aspirate 20 can be drained from the
28 enriched matrix by compressing the enriched matrix between a
29 wall of a container (e.g. the base of mixing bowl 40) and a
30 porous screen or membrane (not shown) with openings adapted to
31 allow aspirate to pass therethrough, but to retain the
32 enriched matrix compressed against the container wall. Liquid
33 aspirate which has permeated the membrane is then decanted,
34 leaving the enriched matrix compressed in the container

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 between the container wall and the porous membrane.
2 Preferably, the container is a syringe which is fitted with a
3 porous membrane upstream of its outlet, and the container wall
4 is a syringe plunger. In this preferred embodiment,
5 compression of the enriched matrix is achieved by plunging the
6 matrix toward the porous membrane within the syringe, thereby
7 expelling aspirate through the outlet while retaining the
8 enriched matrix within the syringe.

9 Now-enriched matrix 11 is then combined with a volume of
10 clot material 18 as shown in Fig. 4, and the method proceeds
11 similarly as above-described with respect to the first
12 preferred embodiment to produce an implantable composite bone
13 marrow graft material 8 which is effective to induce bone
14 healing or bone regeneration in the graftee.

15 Optionally, an additional step can be added to each of
16 the preferred embodiments as described above. Prior to
17 implantation of implantable bone graft material 8, a quantity
18 of non-anticoagulated bone marrow aspirate can be delivered
19 (such as via draining) to the graft material 8 prior to
20 clotting, for example while graft material 8 is in applicator
21 syringe 50. In this manner, liquid aspirate will permeate the
22 void volume of graft material 8, ultimately coagulating
23 therein. The aspirate must be delivered to graft material 8
24 immediately following aspiration to ensure it remains liquid
25 long enough to effectively permeate the material. This step
26 provides additional marrow-derived nucleated cells (including
27 additional progenitor cells) to implantable graft material 8.

28 The invented method of preparing composite bone marrow
29 graft material typically requires less than sixty minutes to
30 complete. Thus, the invented method can be performed while
31 the bone marrow donor/graftee is in the operating room.
32 Accordingly, the number of occasions the graftee must undergo
33 invasive procedures to receive a composite bone graft can be
34 reduced using the invented method.

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 A kit according to the invention is also provided to
2 assist surgeons in performing the invented method. Referring
3 to Fig. 8, such a kit would preferably enable performance of
4 the method according to either of the preferred embodiments
5 described above, and preferably comprises at least the
6 following sterilized implements, preferably made of plastic,
7 preferably transparent or translucent: a matrix container
8 (e.g. matrix column 12), at least one endcap 14 releasably
9 attachable to the matrix container via known attachment means,
10 endcap connector 31 on endcap 14 for fluid connection with
11 loading syringes, at least one loading syringe 28 having a
12 syringe connector 30 for fluid connection with endcap 14, a
13 mixing bowl 40 with removable base cover 42, a funnel 41
14 adapted at one end to mate with an open end of mixing bowl 40
15 and at the other end to mate with column 12, a syringe adaptor
16 13 for converting column 12 into an applicator syringe, and a
17 spatula tool 38. Most preferably, the kit further comprises a
18 second loading syringe 29 and a second endcap 14, similarly
19 constituted as described above. Optionally, the kit is
20 provided with a porous biocompatible implanted substrate for
21 use as a bone graft matrix, and porous membranes 15 to retain
22 a matrix within the matrix container. Optionally, the
23 invented kit can additionally comprise heparinized bone marrow
24 aspiration syringes, aspiration needles, additional loading
25 syringes, or other implements useful in the bone grafting art.

26 The following Example further illustrates various aspects
27 of the invention.

28 EXAMPLE 1

29 It has already been shown that bone graft material having
30 an enriched matrix exhibits improved performance over non-
31 enriched grafts (See U.S. Pat. Nos. 5,824,084 and 6,049,026).
32 The following experiment demonstrated the further efficacy of
33 graft material that combined an enriched matrix with an
34 aspirated bone marrow clot (ABMC).

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 Posterior spinal fusion was performed in 22 beagle dogs.
 2 Localized fusions were performed at three separate spinal
 3 fusion sites in each animal (L1-2, L3-4, and L5-6). Three
 4 types of composite bone grafts were prepared using cancellous
 5 bone chips as the matrix material. In 11 of the dogs,
 6 demineralized cancellous bone chips were used, while
 7 mineralized cancellous bone chips were used in the remaining
 8 11 dogs. The three composite grafts were enriched matrix
 9 alone, non-enriched matrix including a bone marrow clot, and
 10 enriched matrix including a bone marrow clot. Enrichment is
 11 achieved as described above by combining the matrix material
 12 with an excess volume of aspirate.

13 Fusions were compared using union score as the primary
 14 outcome parameter. Bone volume at each site was also assessed
 15 using quantitative analysis of CT scans and mechanical testing
 16 was performed at each site. Tables 1 and 2 summarize the
 17 union score for each composite in each animal and graft site
 18 for mineralized and demineralized matrix respectively.

19 Table 1: Union score for each composite by animal and graft
 20 site for mineralized cancellous bone matrix cubes

Animal	Enriched Alone			ABMC Alone			Enriched + ABMC		
	L1-2	L3-4	L5-6	L1-2	L3-4	L5-6	L1-2	L3-4	L5-6
1			0		1.5		2.0		
2	0				0				0.5
3			4.0	4.0				4.0	
4		1.0				3.5	2.0		
5		0		1.0					4.0
6	0					0.5		3.0	
7		0				0	0		
8			1.0		2.5		1.5		
9			0	0				0	
10	0					0.5		1.0	
11		1.0		0					3.0
SUBTOTAL	0	2.0	5.0	5.0	4.0	4.5	5.5	8.0	7.5
TOTAL		7.0			13.5			21.0	
Mean		0.6			1.2			1.9	
Median		0			0.5			2.0	

22

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 Table 2: Union score for each composite by animal and graft
 2 site for demineralized cancellous bone matrix cubes

Animal	Enriched Alone			ABMC Alone			Enriched + ABMC		
	L1-2	L3-4	L5-6	L1-2	L3-4	L5-6	L1-2	L3-4	L5-6
1		3.0				4.0	4.0		
2			0		4.0		0.5		
3	0					1.5		4.0	
4	0				3.0				1.0
5		3.0		1.0					4.0
6			1.5	2.5				4.0	
7			1.0	0				0	
8	0				0				0
9		0				0	0		
10			0		0		0		
11	0.5				0				3.0
SUBTOTAL	0.5	6.0	2.5	3.5	7.0	5.5	4.5	8.0	8.0
TOTAL		9.0			16.0			20.5	
Mean		0.8			1.5			1.9	
Median		0			1.0			1.0	

3 The above data indicate that addition of bone marrow clot
 4 material to a bone graft matrix significantly enhances the
 5 efficacy of the composite graft. When mineralized cancellous
 6 bone matrix was used, the union score was greatest for the
 7 Enriched + ABMC group (mean = 1.9). Furthermore, the union
 8 scores of the Enriched + ABMC group were significantly greater
 9 than those for Enriched Alone (mean = 0.6, $p=0.008$). The
 10 Enriched + ABMC group was also statistically superior to the
 11 ABMC Alone group (mean 1.2, $p=0.04$). This degree of superior
 12 performance was surprising and unexpected. The overall union
 13 rates for the three composites, Enriched + ABMC, ABMC Alone,
 14 and Enriched Alone were 9 of 11 (81%), 7 of 11 (63%) and 4 of
 15 11 (36%) respectively. Fusion sites with higher fusion scores
 16 were clustered in the Enriched + ABMC group. In the Enriched
 17 + ABMC group, 4 of 11 fusion sites (36%) were graded 3.0 or
 18 higher. In contrast, only 1 of 11 (8.3%) sites in the
 19 Enriched Alone group and 2 of 11 sites (18%) in the ABMC Alone
 20 group were similarly graded.

21 When demineralized cancellous bone matrix was used, the
 22 union score was also greatest for the Enriched + ABMC group.

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 The overall union rates for the three materials, Enriched +
2 ABMC, ABMC Alone, and Enriched Alone were 7 of 11 (63%), 6 of
3 11 (54%) and 5 of 11 (45%) respectively. Again, fusion sites
4 with higher fusion scores were clustered in the Enriched +
5 ABMC group. In the Enriched + ABMC group, 5 of 11 fusion
6 sites (45%) were graded 3.0 or higher. In contrast, only 2 of
7 11 fusion sites (18%) in the Enriched Alone group and 3 of 11
8 (27%) fusion sites in the ABMC Only group were graded at this
9 level. The combination of ABMC with enriched bone matrix
10 provided a bone graft exhibiting surprisingly and unexpectedly
11 superior performance compared to an enriched bone matrix.

12 Mechanical testing was also conducted for all specimens.
13 Data for maximum load, deformation to failure and energy to
14 failure were calculated only for those specimens in which a
15 bony union provided a defined yield point. Mechanical test
16 data is summarized below in tables 3 and 4 for demineralized
17 and mineralized samples respectively.

18 Stiffness was measured for each graft site, and the data
19 tabulated to yield mean and standard deviation values for each
20 of the three graft types for both mineralized and
21 demineralized bone matrices. For mineralized bone matrix, the
22 Enriched Alone, ABMC Alone and Enriched + ABMC grafts
23 exhibited stiffness of 6.9 ± 2.4 , 7.9 ± 2.3 , and 8.2 ± 4.2 ,
24 respectively. For demineralized bone matrix, the Enriched
25 Alone, ABMC Alone and Enriched + ABMC grafts exhibited
26 stiffness of 9.1 ± 6.0 , 9.4 ± 6.2 , and 9.6 ± 4.8 , respectively.

27 CT image analysis data was obtained for each composite
28 graft regarding fusion volume, fusion area and mean bone
29 density within the fusion mass. The data is summarized for
30 mineralized and demineralized cancellous bone matrix in tables
31 3 and 4 respectively. As is evident from tables 3 and 4, both
32 fusion volume and fusion area were greatest for the Enriched +
33 ABMC group.

WO 02/068010

PCT/US02/05583

1 Table 3: CT data for each cell-matrix composite using
 2 mineralized cancellous bone matrix

	Enriched Alone (n=11)	ABMC Alone (n=11)	Enriched + ABMC (n=11)
Fusion Volume (mm ³)	869 ±196	961 ±115	1006 ±185
Fusion Area (mm ²)	81 ±17	91 ±14	95 ±27
Bone Density	1848 ±62	1840 ±43	1824 ±66

3 Table 4: CT data for each cell-matrix composite using
 4 demineralized cancellous bone matrix

	Enriched Alone (n=11)	ABMC Alone (n=11)	Enriched + ABMC (n=11)
Fusion Volume (mm ³)	872 ±288	1010 ±268	1115 ±406
Fusion Area (mm ²)	85 ±31	95 ±27	98 ±31
Bone Density	1901 ±35	1858 ±29	1854 ±77

5 Although the hereinabove described embodiments of the
 6 invention constitute the preferred embodiments, it should be
 7 understood that modifications can be made thereto without
 8 departing from the scope of the invention as set forth in the
 9 appended claims.

WO 02/068010

PCT/US02/05583

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. A composite bone marrow graft material comprising a
2 porous biocompatible implantable matrix and clot material,
3 said composite bone marrow graft material having an enriched
4 population of progenitor cells.
- 1 2. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, said progenitor cells comprising connective tissue
3 progenitor cells.
- 1 3. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, said progenitor cells comprising stem cells.
- 1 4. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 3, said stem cells comprising pluripotent stem cells.
- 1 5. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, wherein said implantable matrix comprises particulate
3 bone material and fibrous bone material.
- 1 6. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 5, wherein said particulate bone material comprises
3 allograft cancellous bone particles.
- 1 7. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 5, wherein said fibrous bone material comprises
3 allograft demineralized cortical bone fibers.
- 1 8. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, wherein said matrix comprises a matrix material
3 selected from the group consisting of ceramic material,
4 bioglass, collagen, mineralized bone, demineralized bone,
5 hyaluronic acid, and synthetic biopolymer material.
- 1 9. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, wherein said clot material is a bone marrow clot

WO 02/068010

PCT/US02/05583

3 derived from bone marrow aspirate.

1 10. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, wherein said clot material is a blood clot.

1 11. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, wherein said clot material is a material selected
3 from the group consisting of platelet gel, platelet
4 concentrate, fibrin clot material, and fibrin glue.

1 12. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, wherein the ratio of progenitor cells to all marrow-
3 derived nucleated cells is at least 1:20,000.

1 13. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, said implantable matrix and said clot material being
3 present in said graft material in a volume ratio of 5:1 to
4 1:5.

1 14. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, said progenitor cells, said clot material, and said
3 matrix all being substantially uniformly distributed
4 throughout said composite bone marrow graft material.

1 15. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, wherein cell adhesion molecules are bound to the
3 surface of said implantable matrix.

1 16. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, said graft material being effective to induce bone
3 healing in a graftee.

1 17. A composite bone marrow graft material according to
2 claim 1, said graft material being effective to induce bone
3 regeneration in a graftee.

1 18. A method of preparing composite bone marrow graft

WO 02/068010

PCT/US02/05583

2 material comprising the steps of:

- 3 a) providing a bone marrow aspirate;
4 b) providing a porous biocompatible implantable matrix;
5 c) contacting said bone marrow aspirate and said matrix
6 to provide an enriched matrix; and
7 d) mechanically mixing said enriched matrix to yield a
8 composite bone marrow graft material having progenitor cells
9 distributed substantially uniformly throughout said composite
10 bone marrow graft material.

1 19. A method according to claim 18, further comprising
2 the step of mixing clot material with said enriched matrix.

1 20. A method according to claim 18, wherein said
2 implantable matrix comprises particulate bone material and
3 fibrous bone material.

1 21. A method according to claim 20 wherein said
2 particulate bone material comprises allograft cancellous bone
3 particles, and said fibrous bone material comprises
4 demineralized cortical bone fibers.

1 22. A method according to claim 21, wherein said
2 implantable matrix comprises about 1-25 cc bulk volume of
3 particulate bone particles and about 25-1000 mg dry weight of
4 bone fibers.

1 23. A method according to claim 22, said bone fibers
2 having lengths of 5mm - 15 cm.

1 24. A method according to claim 18, further comprising
2 the step of adding non-anticoagulated bone marrow aspirate to
3 said enriched matrix.

1 25. A kit for the preparation of composite bone marrow
2 graft material, said kit comprising a matrix container, a
3 first endcap, and a first loading syringe, said first endcap

WO 02/068010

PCT/US02/05583

4 being releasably attachable to said matrix container, said
5 first endcap and said first loading syringe being adapted to
6 connect to each other to provide fluid communication between
7 said first loading syringe and said matrix container.

1 26. A kit according to claim 25, said kit further
2 comprising a porous biocompatible implantable matrix.

1 27. A kit according to claim 25, said kit further
2 comprising heparinized aspiration syringes and aspiration
3 needles.

1 28. A kit according to claim 25, said kit further
2 comprising a syringe adaptor adapted to mate with said matrix
3 container to form an applicator syringe therewith.

1 29. A kit according to claim 28, said kit further
2 comprising a mixing bowl with a removable base cover and a
3 funnel, said funnel adapted to mate with an open end of said
4 mixing bowl at one end thereof, and with said applicator
5 syringe at a second end thereof.

1 30. A kit according to claim 25, said kit further
2 comprising a spatula tool, said spatula tool having a plunger
3 at an end thereof, said plunger adapted to pack graft material
4 into said matrix container.

1 31. A kit according to claim 25, said kit further
2 comprising a porous membrane effective to retain matrix
3 material within said container.

1 32. A kit according to claim 25, wherein said matrix
2 container is a matrix column.

1 33. A kit according to claim 25, said kit further
2 comprising a second loading syringe and a second endcap, said
3 second endcap being releasably attachable to said matrix

WO 02/068010

PCT/US02/05583

4 container, said second endcap and said second loading syringe
5 being adapted to connect to each other to provide fluid
6 communication between said second loading syringe and said
7 matrix container.

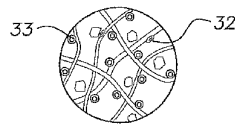
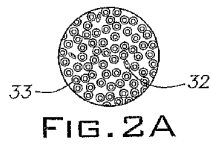
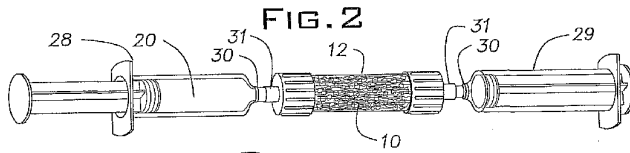
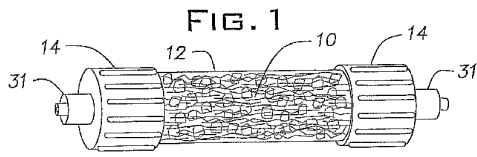


FIG. 3

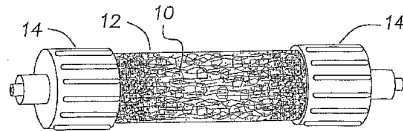


FIG. 3A

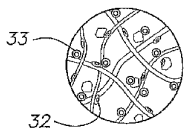


FIG. 3B

FIG. 4

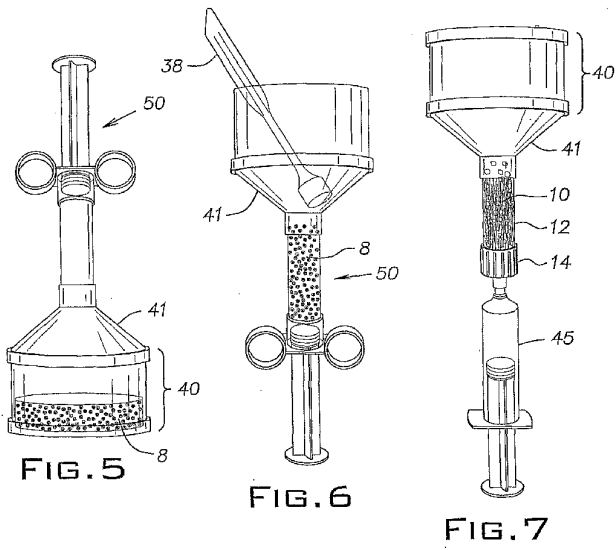
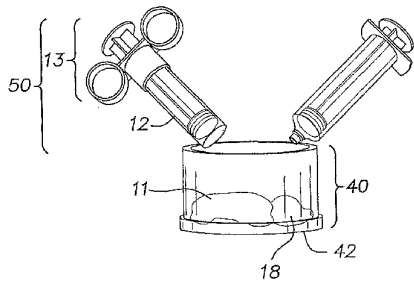
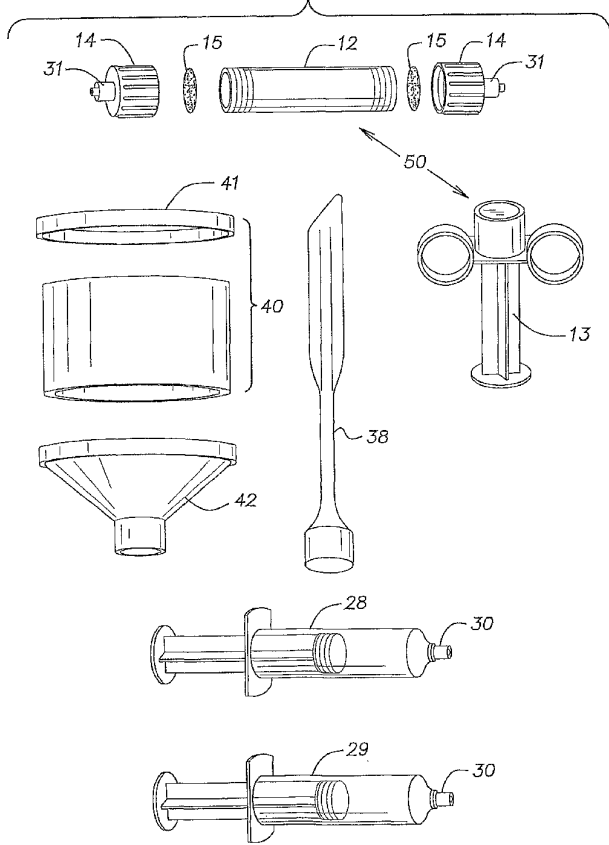


FIG. 8



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/05583
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61L27/42 A61L27/38 A61F2/28		
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		
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, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 40137 A (MUSCHLER GEORGE F ; OSIRIS THERAPEUTICS INC (US); BRUDER SCOTT P (U) 30 October 1997 (1997-10-30) page 3, paragraph 3 - paragraph 4 page 22, paragraph 2 page 32, paragraph 2 page 6, paragraph 1 - page 7, paragraph 3	1-6, 8-20, 23
X	US 6 049 026 A (MUSCHLER GEORGE FREDERICK) 11 April 2000 (2000-04-11) column 3, line 23 - column 5, line 3; claims; figure 1 example 2	1, 2, 5-8, 11-21, 23-27, 29, 32
<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 claims or which is cited to establish the publication date of another claim 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 ** 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 24 June 2002		Date of mailing of the international search report 02/07/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5910 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Escolar Blasco, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/US 02/05583

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 99 59500 A (CLEVELAND CLINIC FOUNDATION) 25 November 1999 (1999-11-25) page 3, line 28 -page 4, line 33; claims; figure 1 -----	1, 2, 5-8, 11-21, 23-27, 29, 32
X	US 5 914 121 A (BIANCO PAOLO ET AL) 22 June 1999 (1999-06-22) column 1, line 6 - line 14 column 3, line 34 - line 67 column 2, line 49 - line 62 column 1, line 58 - line 60 -----	1-4, 8, 11, 16, 17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International Application No
 PCT/US 02/05583

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9740137	A	30-10-1997	AU 731468 B2 29-03-2001
			AU 2462297 A 12-11-1997
			CA 2251983 A1 30-10-1997
			EP 0906415 A1 07-04-1999
			JP 2000508911 T 18-07-2000
			WO 9740137 A1 30-10-1997
US 6049026	A	11-04-2000	US 5824084 A 20-10-1998
			AU 4199499 A 06-12-1999
			EP 1085842 A2 28-03-2001
			JP 2002515288 T 28-05-2002
			WO 9959500 A2 25-11-1999
			AU 714547 B2 06-01-2000
			AU 4271297 A 21-01-1998
			EP 0912205 A2 06-05-1999
			JP 2001502561 T 27-02-2001
			WO 9800174 A2 08-01-1998
WO 9959500	A	25-11-1999	US 6049026 A 11-04-2000
			AU 4199499 A 06-12-1999
			EP 1085842 A2 28-03-2001
			JP 2002515288 T 28-05-2002
			WO 9959500 A2 25-11-1999
US 5914121	A	22-06-1999	NONE

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,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,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4C081 AB02 BA00 BA12 CD00 CD08 CD12 CD34 CF00 CF02 CF03
4C097 AA01 DD05 DD06 DD15