

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6116484号
(P6116484)

(45) 発行日 平成29年4月19日(2017.4.19)

(24) 登録日 平成29年3月31日(2017.3.31)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 L 27/12	(2006.01)	A 6 1 L 27/12
A 6 1 L 27/22	(2006.01)	A 6 1 L 27/22
A 6 1 L 27/24	(2006.01)	A 6 1 L 27/24

請求項の数 17 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2013-544705 (P2013-544705)
(86) (22) 出願日	平成23年12月13日 (2011.12.13)
(65) 公表番号	特表2013-545584 (P2013-545584A)
(43) 公表日	平成25年12月26日 (2013.12.26)
(86) 國際出願番号	PCT/US2011/064698
(87) 國際公開番号	W02012/082773
(87) 國際公開日	平成24年6月21日 (2012.6.21)
審査請求日	平成26年12月10日 (2014.12.10)
(31) 優先権主張番号	61/422,649
(32) 優先日	平成22年12月13日 (2010.12.13)
(33) 優先権主張国	米国(US)

前置審査

(73) 特許権者	513149654 バイオミメティック セラピューティクス , リミテッド ライアビリティ カンパニー — アメリカ合衆国 テネシー 37067 フランクリン ニコル ミル レーン 3 89
(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(74) 代理人	100126505 弁理士 佐貫 伸一
(74) 代理人	100131392 弁理士 丹羽 武司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】脊椎固定術用の組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脊椎固定術のための、生体適合性マトリックスと血小板由来増殖因子(PDGF)を含む溶液とを含む組成物であって、前記PDGFが前記溶液中に0.1mg/mL~1.0mg/mLの濃度で存在し、該溶液が該生体適合性マトリックスに組み込まれ、該生体適合性マトリックスが骨スキャフォールディング材料を含み、該骨スキャフォールディング材料が50ミクロン~500ミクロンの範囲の大きさの多孔性リン酸カルシウムの粒子を含み、該脊椎固定術が該組成物を骨癒合が速まるように所望の脊椎固定部位に投与することを含む組成物。

【請求項 2】

前記骨スキャフォールディング材料が
リン酸三カルシウムを含む、請求項1に記載の組成物。

10

【請求項 3】

前記PDGFが、前記溶液中に0.3mg/mLの濃度で存在する、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項 4】

前記PDGFが、PDGF AA、PDGF BB、PDGF AB、PDGF CC、PDGF DD、またはその混合物を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

20

前記 P D G F が P D G F B B を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 P D G F B B が、少なくとも 65 % の完全な P D G F B B を含む、請求項 4 または 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 P D G F B B が、組換えヒト (r h) P D G F B B である、請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記骨スキャフォールディング材料が、25 % を超える多孔率を有する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の組成物。 10

【請求項 9】

前記骨スキャフォールディング材料が、マクロ多孔性を有する及び / 又は前記マトリックスへの細胞遊走を促す多孔性を有する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記骨スキャフォールディング材料が相互に連結した細孔を含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記骨スキャフォールディング材料が再吸収可能である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 12】

少なくとも 80 % の前記骨スキャフォールディング材料が移植した 1 年以内に再吸収されるように、前記骨スキャフォールディング材料が再吸収可能 (r e s o e r b a b l e) である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記骨スキャフォールディング材料が、前記骨スキャフォールディングの自重の少なくとも 25 % に等しい前記溶液の量を吸収することができる、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記生体適合性マトリックスが、生体適合性結合剤をさらに含む、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の組成物。 30

【請求項 15】

前記生体適合性結合剤がコラーゲンを含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

骨スキャフォールディング材料およびコラーゲンが、80 : 20 の比率で存在する、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記脊椎固定術が椎体間固定術又は腰椎固定術である、請求項 1 から 16 のいずれか一項の組成物。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) のもとで、2010 年 12 月 13 日に提出した米国特許仮出願第 61 / 442,649 号の利益を主張し、該仮出願は、参照によりその全体が本明細書に取り込まれる。

【0002】

本発明は、脊椎固定術に有用な組成物および方法に関する。

【背景技術】

50

【0003】

脊椎固定術は、脊髄奇形を矯正するため、および脊椎骨折、脊椎不安定、または慢性背痛の治療に使用される。米国整形外科学会 (American Academy of Orthopaedic Surgeons)によれば、325,000を超える脊椎固定術が2003年に行われ、そのうちの約162,000が腰椎であった (Spinal Fusion. Your Orthopaedic Connection September 2007年9月 (2009年1月20日引用) ; <http://orthoinfo.aaos.org/topic.cfm?topic=A00348>より参照可能)。脊椎固定術の1つのタイプは、椎体間固定であり、すべてまたは一部の椎間板を除去し、支持スペーサーを挿入して支持して、椎体間の骨の成長を促す。さらに、骨の成長はスペーサー内に埋植された移植材料で高められる。自家移植の骨移植片は、通常腸骨稜から取られ、脊椎固定術を促すのに一般的に使用されている。入手可能性、ドナー部位の病的状態、痛み、感染症、神経損傷、および出血を含む、その使用に関連する制限があるが、自家移植片が、その骨伝導性および骨誘導性のため、「最も信頼できる確実な基準 (gold standard)」と考えられている (Fowler, B.L., B.E. Dall, and D.E. Rowe, Complications associated with harvesting autogenousiliac bone graft. American Journal of Orthopedics, 1995. 24: p. 895-903; Goulet, J., et al., Autogenousiliac crest bone graft: complications and functional assessment. Clinical Orthopedics and Related Research, 1997.339: p. 76-81 ; Vaccaro, A, The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. Orthopedics, 2002. 25(5 Suppl): p.s571-s578)。同種移植片は、自家移植片に代わるものであり、ドナー部位の病的状態に関連する合併症を除外するが、同種移植片の加工および滅菌は、自家移植片と比較して、生物学的活性の減少をもたらしうる (Khan, S.F., et al., The biology of bone grafting. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2005. 13: p.77-86)。

【0004】

自己および同種骨移植片に関連する困難を考えると、代替的な造骨再生系を提供することが望ましいであろう。

【0005】

【非特許文献1】Sandhu, H.S., et al., Distractive Properties of a Threaded Interbody Fusion Device: An In Vivo Model. Spine, 1996.21(10): p.1201-1210.

【非特許文献2】Sandhu, H.S., et al., Animal models of spinal instability and spinal fusion, in Animal Models in Orthopaedic Research, Y.H. An and R.J. Friedman, Editors. 1999, CRC Press: Boca Raton.

【非特許文献3】Toth, J.M., et al., Direct current electrical stimulation increases the fusion rate of spinal fusion cages. Spine, 2000. 25(20): p.2580-2587.

【非特許文献4】Wilke, H., A Kettler, and L. Claes, Are sheep spines a valid biomechanical model for huma spines? Spine, 1997.22(20): p.2365-2374.

【非特許文献5】Wilke, H.-J., et al., Anatomy of the sheep spine and its comparison to the huma spine. TheAnatomical Record, 1997.247(4): p.542-555.

【発明の概要】**【0006】**

本発明は、脊椎固定術に用いる組成物および方法を提供する。これらの組成物および方法は、脊椎骨の融合を促進する。本組成物および方法は、例えば、固定部位で骨癒合を促すことによって、脊椎固定術における治癒反応を促しうる。

【0007】

本発明の1つの態様は、脊椎固定術における骨癒合を促進する方法であって、所望の脊椎固定部位に、生体適合性マトリックスおよび血小板由来増殖因子 (PDGF) を含む溶液を含む組成物を投与することを含み、該溶液が該生体適合性マトリックスに組み込まれ、該生体適合性マトリックスが骨スキャフォールディング材料を含み、該骨スキャフォールディング材料が多孔性リン酸カルシウムまたは同種移植片を含む方法である。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料はリン酸カルシウムを含む。幾つかの実施

10

20

30

40

50

形態では、リン酸カルシウムは
骨スキャフォールディング材料は同種移植片を含む。幾つかの実施形態では、
P D G F は、溶液中に約 0 . 0 1 m g / m L ~ 約 1 0 . 0 m g / m L の濃度で存在する。幾つかの実
施形態では、P D G F は、溶液中に約 0 . 0 5 m g / m L ~ 約 5 . 0 m g / m L の濃度で存
在する。幾つかの実施形態では、P D G F は、溶液中に約 0 . 1 m g / m L ~ 約 1 . 0
m g / m L の濃度で存在する。幾つかの実施形態では、P D G F は、溶液中に約 0 . 2 m
g / m L ~ 約 0 . 4 m g / m L の濃度で存在する。幾つかの実施形態では、P D G F は、P
D G F A A 、 P D G F B B 、 P D G F A B 、 P D G F C C 、 P D G F D D 、ま
たはその混合物もしくは誘導体を含む。幾つかの実施形態では、P D G F は P D G F B
B を含む。幾つかの実施形態では、P D G F は P D G F B B からなる。幾つかの実施形
態では、P D G F B B は、少なくとも 6 5 % の完全な P D G F B B ホモ二量体を含む。
幾つかの実施形態では、P D G F B B は、組換えヒト (r h) P D G F B B である。
幾つかの実施形態では、溶液は、バッファー中の P D G F を含む。幾つかの実施形態
では、溶液は、バッファー中の P D G F からなる。幾つかの実施形態では、バッファーは酢
酸ナトリウムである。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、約 5 0
ミクロン ~ 約 5 0 0 0 ミクロンの範囲の大きさの粒子を含む。幾つかの実施形態では、骨
スキャフォールディング材料は、約 5 0 ミクロン ~ 約 5 0 0 0 ミクロンの範囲の大きさの
粒子をからなる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、約 1 0 0 ミ
クロン ~ 約 5 0 0 0 ミクロンの範囲の大きさの粒子を含む。幾つかの実施形態では、骨ス
キャフォールディング材料は、約 1 0 0 ミクロン ~ 約 5 0 0 0 ミクロンの範囲の大きさの
粒子をからなる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、約 1 0 0 ミ
クロン ~ 約 3 0 0 ミクロンの範囲の大きさの粒子を含む。幾つかの実施形態では、骨ス
キヤフォールディング材料は、約 1 0 0 ミクロン ~ 約 3 0 0 ミクロンの範囲の大きさの
粒子をからなる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、約 1 0 0 0 ミク
ロン ~ 約 2 0 0 0 ミクロンの範囲の大きさの粒子を含む。幾つかの実施形態では、骨ス
キヤフォールディング材料は、約 1 0 0 0 ミクロン ~ 約 2 0 0 0 ミクロンの範囲の大きさの
粒子をからなる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、約 2 5 0 ミ
クロン ~ 約 1 0 0 0 ミクロンの範囲の大きさの粒子を含む。幾つかの実施形態では、骨ス
キヤフォールディング材料は、約 2 5 0 ミクロン ~ 約 1 0 0 0 ミクロンの範囲の大きさの
粒子をからなる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、約 1 0 0 0
ミクロン ~ 約 3 0 0 0 ミクロンの範囲の大きさの粒子を含む。幾つかの実施形態では、骨
スキャフォールディング材料は、約 1 0 0 0 ミクロン ~ 約 3 0 0 0 ミクロンの範囲の大きさの
粒子をからなる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、約 2 5
% を超える多孔率を含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、約
4 0 % を超える多孔率を含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は
、約 5 0 % を超える多孔率を含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材
料は、約 8 0 % を超える多孔率を含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールdin
ging材料は、約 9 0 % を超える多孔率を含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールde
ining材料はマクロ多孔性を含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールдин
g材料は、マトリックスへの細胞遊走を促す多孔性を有する。幾つかの実施形態では、骨ス
キヤフォールディング材料は相互に連結した細孔を含む。幾つかの実施形態では、少
なくとも 8 0 % の骨スキャフォールディング材料がインプラントした 1 年以内に再吸収される
ように、骨スキャフォールディング材料が再吸収可能である。幾つかの実施形態では、溶液
は、骨スキャフォールディング材料に吸収または吸着される。幾つかの実施形態では、骨
スキャフォールディング材料は、骨スキャフォールディングの自重の少なくとも約 2 5 %
に等しい溶液の量を吸収することができる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールde
ining材料は、骨スキャフォールディングの自重の少なくとも約 5 0 % に等しい溶液の量
を吸収することができる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールдин
g材料は、骨スキャフォールディングの自重の少なくとも約 1 0 0 % に等しい溶液の量を吸
収すること 10
20
30
40
50

ができる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、骨スキャフォールディングの自重の少なくとも約200%に等しい溶液の量を吸収することができる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、骨スキャフォールディングの自重の少なくとも約300%に等しい溶液の量を吸収することができる。幾つかの実施形態では、生体適合性マトリックスは、生体適合性結合剤をさらに含む。幾つかの実施形態では、生体適合性結合剤はコラーゲンを含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料およびコラーゲンは、約80:20の比率で存在する。幾つかの実施形態では、生体適合性マトリックスはリン酸カルシウムからなる。幾つかの実施形態では、生体適合性マトリックスはリン酸カルシウムおよびコラーゲンからなる。幾つかの実施形態では、生体適合性マトリックスは同種移植片からなる。幾つかの実施形態では、生体適合性マトリックスは同種移植片およびコラーゲンからなる。幾つかの実施形態では、方法は、脊椎固定術を患者に行うこと；組成物を所望の脊椎固定部位に適用すること；および、部位で骨癒合が起こることを可能にすることを含む。幾つかの実施形態では、脊椎固定術は椎体間固定術である。幾つかの実施形態では、脊椎固定術は腰椎固定術である。幾つかの実施形態では、脊椎固定術は頸椎固定である。幾つかの実施形態では、脊椎固定術は骨癒合を速めることを含む。
10

【0008】

別の態様では、特に断りのない限り、または特定の文脈から明白であるように、本明細書において記載されている方法に関連して、本明細書において記載されている組成物の使用が、本明細書において提供される。また、本明細書において記載されている組成物は、本明細書において記載されている方法に用いる薬剤の調製にも使用されうる。
20

【0009】

別の態様では、本発明は、生体適合性マトリックス（または1つ以上の生体適合性マトリックスの構成要素）を第一のパッケージに、PDGFを含む溶液を第二のパッケージに含む、脊椎固定術に用いるキットを提供する。さらに、キットは脊椎固定術を行う方法に用いる取扱説明書を提供しうる。幾つかの実施形態では、溶液は、所定の濃度のPDGFを含む。PDGFの濃度は、行われる脊椎固定術の要件に応じてあらかじめ定めることができる。そのうえ、幾つかの実施形態では、生体適合性マトリックスは、キット中に所定の量で存在することができる。幾つかの実施形態では、キット中の生体適合性マトリックスは、骨スキャフォールディング材料、または骨スキャフォールディング材料および生体適合性結合剤を含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、TCPなどのリン酸カルシウムを含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は同種移植片を含む。幾つかの実施形態では、結合剤はコラーゲンを含む。キットによって提供される生体適合性マトリックスの量は、行われる脊椎固定術の要件に関連しうる。幾つかの実施形態では、PDGF溶液を含有する第二のパッケージは、バイアルを含む。幾つかの実施形態では、PDGF溶液を含有する第二のパッケージは、注射器を含む。注射器は、脊椎固定術における骨癒合の部位などの手術部位に適用する生体適合性マトリックス中または上にPDGF溶液を配置することを促すことができる。幾つかの実施形態では、PDGFは生体適合性マトリックスに組み込まれると、結果として生じる組成物は、所望の脊椎固定部位への送達用に注射器および／またはカニューレにセットされる。代替的に、組成物は、外科装置、スパチュラ、スプーン、ナイフ、または均等な装置などの別の適用手段を用いて、所望の部位に適用しうる。
30
40

【0010】

くわえて、本発明は、脊椎固定術に用いる組成物を製造する方法および脊椎固定術を行う方法を提供する。幾つかの実施形態では、組成物を製造する方法が、PDGFを含有する溶液を提供すること、生体適合性マトリックスを提供すること、およびPDGF溶液を生体適合性マトリックスに配置または組み込むことを含む。

【0011】

別の実施形態では、脊椎固定術を行う方法が、生体適合性マトリックスに配置されたPDGF溶液を含む組成物を提供すること、および組成物を所望の脊椎固定部位に適用する
50

ことを含む。幾つかの実施形態では、脊椎固定術を行う方法が、組成物を複数の脊椎骨における所望の骨癒合の少なくとも1つの部位に適用することを含む。幾つかの実施形態では、組成物を所望の骨癒合の部位に適用することが、組成物を所望の骨癒合の部位に注入することを含む。

【0012】

幾つかの実施形態では、脊椎固定術を行う方法が、所望の脊椎固定部位に外科的にアクセスすること、生体適合性マトリックスに配置されたPDGF溶液を含む組成物を組み込むこと、組成物を所望の骨癒合の部位に適用すること、軟組織を組成物の上から縫合すること、ならびに後の骨の形成に向けて、細胞遊走、内方成長、および組成物への浸潤を可能にすることを含む。

10

【0013】

幾つかの実施形態では、脊椎固定術が椎体間固定術を含む。幾つかの実施形態では、脊椎固定術が後側方固定術を含む。幾つかの実施形態では、脊椎固定術は腰椎固定術である。幾つかの実施形態では、脊椎固定術は頸椎固定である。幾つかの実施形態では、脊椎固定術は胸椎固定術である。幾つかの実施形態では、脊椎固定術は仙椎固定術である。

【0014】

すなわち、本発明の目的は、生体適合性マトリックスに組み込まれたPDGFを含む組成物を提供することであり、その組成物は脊椎固定術における骨の癒合を促すのに有用である。

【0015】

20

本発明の別の目的は、生体適合性マトリックス中にPDGFを含む組成物を使用する脊椎固定術を提供することである。

【0016】

本発明のさらなる目的は、脊椎固定術における骨癒合に関連する治癒を速めることである。

【0017】

本発明のこれらおよび他の実施形態を、以下の記載においてより詳細に説明する。開示されている実施形態および請求項の以下の詳細な記載を検討した後、本発明のこれらおよび他の目的、特徴および利点は、明白となるであろう。

【図面の簡単な説明】

30

【0018】

【図1A】図1Aは、処置によってグループ分けした各検査試料からの代表的なマイクロCT画像を示す。

【図1B】図1Bは、処置によってグループ分けした各検査試料からの代表的なマイクロCT画像を示す。

【図2A】図2Aは、新たに調製したABG、正常な骨、新たに調製したAIBGならびにABG、AIBGおよび自家移植片 処置群の検査試料からの代表的な示差密度(differential density)分析マイクロCT画像を示す。

【図2B】図2Bは、新たに調製したABG、正常な骨、新たに調製したAIBGならびにABG、AIBGおよび自家移植片 処置群の検査試料からの代表的な示差密度(differential density)分析マイクロCT画像を示す。

40

【図3A】図3Aは、各治療群からの代表的な組織学的所見の画像を示す。

【図3B】図3Bは、各治療群からの代表的な組織学的所見の画像を示す。

【図4】図4は、ABGおよびAIBG処置群からの代表的な組織学的所見の画像を示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

限定されないが、特許、特許出願および科学参考文献を含めた、本明細書において引用した参考文献のすべてが、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0020】

50

本発明は、生体適合性マトリックスに組み込まれた P D G F の溶液を含む組成物、および脊椎固定術における骨の固定を促進する方法を提供する。脊椎固定術は、脊椎固定術 (spondylodesis) または脊椎癒着 (spondylosyndesis) としても知られ、2つ以上の椎骨をつなぐのに使用される手術手技である。脊椎固定術の種類としては、椎体間固定術、後側方固定術、ならびに頸椎椎間板切除 (diskectomy) および固定術が挙げられるが、これらに限定されない。

【0021】

体間固定術は、骨移植片（例えば、本発明の組成物）を脊椎骨間の通常椎間板によって占められる領域に埋植する。脊椎固定術に備えて、椎間板は完全に除去されうる。装置が脊椎骨の間に埋植され、脊椎の整合および椎間板の高さを維持しうる。椎間装置は、例えば、スペーサーでありうる。椎間装置は、例えば、プラスチック製またはチタン製でありうる。次いで、固定が脊椎端板間で起こる。椎体間固定術の種類としては、前方椎体間固定術 (ALIF)、後方腰椎椎体間固定術 (PLIF)、および経椎間孔腰椎椎体固定術 (TLIF) が挙げられる。幾つかの実施形態では、固定は、金属のスクリュー（椎弓根スクリューはチタン製であることが多い）、ロッドもしくはプレート、スペーサー、またはケージを埋植することを意味する定着 (fixation) と呼ばれる過程によって補われ、椎骨を安定化して骨固定を促す。固定過程の間、外部ブレイス (external bracing)（矯正器具）が使用されうる。

【0022】

後側方固定術は、骨移植片を脊椎の後部の横突起の間に埋植する。次いで、これらの椎骨は、椎骨の各側面の金属ロッドについている各椎骨の椎弓根を通してスクリューおよび / またはワイヤーで適切な位置に固定されうる。

【0023】

定義

本明細書において使用する場合、脊椎固定を「促進する (promoting)」または「促す (facilitating)」は、脊椎固定術の臨床的進展に望ましく影響を及ぼすように設計された臨床的介入を指す。臨床的介入の望ましい効果としては、例えば、固定の部位における骨密度の程度および / または骨形成の増加の割合（例えば、骨密度の増加の割合）の増加、固定の部位における骨癒合または骨架橋の度合いおよび / または骨癒合または骨架橋の増加の割合の増加、骨固定部位における骨組成および / または構造の向上（例えば、骨固定部位における、よりそっくりな自然骨への類似）の1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。

【0024】

本明細書において使用する場合、「有効量」という用語は、必要な投与量および期間で、所望の治療結果を達成するのに少なくとも有効な量を指す。有効量は、1つまたは複数の投与で提供することができる。

【0025】

本明細書において「約」のついた値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態も包含（および記載）する。

【0026】

本明細書および添付の請求項で使用する場合、「a」、「an」および「the」といった単数形は、文章に明確に指示がない限り、複数対象も含む。例えば、「P D G F ホモ二量体」に言及する記述は、1つまたは複数の P D G F ホモ二量体への言及であり、当業者に公知のその同等物などを包含する。

【0027】

本明細書に記載される本発明の態様および実施形態は、態様および実施形態「を含む (comprising)」、「からなる (consisting)」、および「から本質的になる (consisting essentially of)」を包含し (incude) うることを理解すべきである。列挙された要素「から本質的になる」方法または組成物は、特定の工程または材料、ならびにそれら方法および組成物の基本的および新

10

20

30

40

50

規な特徴に実質的に影響を及ぼさないもののみを包含することを理解すべきである。

【0028】

「骨スキャフォールディング材料」および「骨代替物質」は、本明細書において互換可能に使用される。

P D G F 溶液

【0029】

1つの態様では、本発明によって提供される脊椎固定術用の組成物は、P D G F を含む溶液を生体適合性マトリックスに含み、ここでその溶液は、生体適合性マトリックスに配置または組み込まれる。幾つかの実施形態では、P D G F は、溶液中に約 0 . 0 1 m g / m L ~ 約 1 0 m g / m L 、約 0 . 0 5 m g / m L ~ 約 5 m g / m L 、または約 0 . 1 m g / m L ~ 約 1 . 0 m g / m L の範囲の濃度で存在する。¹⁰ P D G F は、溶液中に各範囲の上限値および下限値を含む、これらの定まった範囲内の任意の濃度で存在しうる。他の実施形態では、P D G F は、溶液中に次の濃度：約 0 . 0 5 m g / m L ; 約 0 . 1 m g / m L ; 約 0 . 1 5 m g / m L ; 約 0 . 2 m g / m L ; 約 0 . 2 5 m g / m L ; 約 0 . 3 m g / m L ; 約 0 . 3 5 m g / m L ; 約 0 . 4 m g / m L ; 約 0 . 4 5 m g / m L ; 約 0 . 5 m g / m L ; 約 0 . 5 5 m g / m L ; 約 0 . 6 m g / m L ; 約 0 . 6 5 m g / m L ; 約 0 . 7 m g / m L ; 約 0 . 7 5 m g / m L ; 約 0 . 8 m g / m L ; 約 0 . 8 5 m g / m L ; 約 0 . 9 m g / m L ; 約 0 . 9 5 m g / m L ; または約 1 . 0 m g / m L のいずれか 1 つで存在する。これらの濃度は、単に特定の実施形態の例であり、P D G F の濃度は、各範囲の上限値および下限値を含む、上述の濃度のいずれの範囲内でありうることを理解すべきである。²⁰

【0030】

さまざまな量のP D G F が、本発明の組成物中に使用されうる。使用されるP D G F の量としては、幾つかの実施形態では、次の範囲：約 1 n g ~ 約 5 0 m g 、約 1 0 μ g ~ 約 2 5 m g 、約 1 0 0 μ g ~ 約 1 0 m g 、または約 2 5 0 μ g ~ 約 5 m g が挙げられる。

【0031】

本発明の幾つかの実施形態におけるP D G F または他の成長因子の濃度は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 6 , 2 2 1 , 6 2 5 号、同第 5 , 7 4 7 , 2 7 3 号、および同第 5 , 2 9 0 , 7 0 8 号に記載の酵素結合免疫吸着法、またはP D G F 濃度を決定するのに当該技術分野において公知である他のアッセイによって決定することができる。³⁰ 本明細書において与えられる場合、P D G F のモル濃度は、P D G F 二量体の分子量 (M W) (例えば P D G F B B ; M W 約 2 5 k D a) に基づいて決定される。

【0032】

P D G F は、P D G F ホモ二量体および / またはヘテロ二量体、例えば、P D G F A A 、P D G F B B 、P D G F A B 、P D G F C C 、P D G F D D 、ならびにその混合物および誘導体を含みうる。幾つかの実施形態では、P D G F は P D G F B B を含む。別の実施形態では、P D G F は、r h P D G F B B などの組換えヒト (r h) P D G F を含む。

【0033】

P D G F は、幾つかの実施形態では、天然のソースから入手できる。他の実施形態では、P D G F は、組み換えD N A 技術によって作製される。他の実施形態では、P D G F またはその断片は、固相ペプチド合成品など、当業者に公知のペプチド合成技術を使用して作製されうる。天然のソースから入手する場合、P D G F は、生体液に由来することができる。生体液は、幾つかの実施形態によれば、血液を含む、任意の処理済みおよび未処理の生体に関連する液を含むことができる。⁴⁰

【0034】

また、生体液は、別の実施形態では、濃縮血小板 (P C) 、アフェレーシス血小板、多血小板血漿 (P R P) 、血漿、血清、新鮮凍結血漿 (F F P) 、およびバフィーコート (B C) を含む、血液成分を含むことができる。生体液、さらなる実施形態では、血漿から分離し、生理液再懸濁した血小板を含む。⁵⁰

【0035】

P D G F を組み換え D N A 技術によって作製する場合、幾つかの実施形態では、単一单量体（例えば、P D G F B 鎖またはA 鎖）をコードする D N A 配列を、発現のために培養原核細胞または培養真核細胞に挿入して、それに続いてホモ二量体（例えば、P D G F B B またはP D G F A A ）を作製することができる。他の実施形態では、P D G F ヘテロ二量体は、ヘテロ二量体の单量体の単位をコードする D N A 配列を培養原核細胞または培養真核細胞に挿入すること、および翻訳された单量体のユニットを細胞にプロセスさせてヘテロ二量体（例えば P D G F A B ）を作製することによって、作製できる。市販の G M P 組み換え P D G F B B は、カイロン社（Chirron Corporation）（Emeryville、カリフォルニア州）から入手できる。¹⁰ 研究用グレード r h P D G F B B は、多数の供給元、例えば、R & D システム社（ミネアポリス、ミネソタ州）、BDバイオサイエンス（BD Biosciences）（サンノゼ、カリフォルニア州）、およびケミコンインターナショナル（Chemicon International）（Temecula、カリフォルニア州）から入手できる。

【0036】

本発明の幾つかの実施形態では、P D G F は P D G F 断片を含む。幾つかの実施形態では、r h P D G F B は、次の断片：B 鎖全体のアミノ酸配列 1 ~ 3 1 、 1 ~ 3 2 、 3 3 ~ 1 0 8 、 3 3 ~ 1 0 9 、および / または 1 ~ 1 0 8 を含む。P D G F の B 鎖の完全なアミノ酸配列（1 ~ 1 0 9 ）は、米国特許第 5 , 5 1 6 , 8 9 6 号の図 1 5 に与えられており、該特許の開示は参照してその全体が本明細書に組み込まれる。²⁰ 本発明の r h P D G F

B B 組成物は、完全な r h P D G F B (1 ~ 1 0 9) およびその断片の混合物の組み合わせを含みうることを理解すべきである。米国特許第 5 , 5 1 6 , 8 9 6 号で開示されているようなものなど、P D G F の他の断片が用いられる。1つの実施形態においては、r h P D G F B B は、少なくとも 6 5 % の完全な r h P D G F B (1 ~ 1 0 9) を含む。別の実施形態では、r h P D G F B B は、少なくとも 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、または 9 9 % の完全な r h P D G F B (1 ~ 1 0 9) を含む。

【0037】

本発明の幾つかの実施形態では、P D G F を精製することができる。精製された P D G F は、本明細書において使用する場合、本発明の溶液への組み込み前で約 9 5 重量 % を超える P D G F を有する組成物を含む。溶液は、任意の製剤として許容可能な溶液であつてよい。他の実施形態では、P D G F を実質的に精製することができる。実質的に精製された P D G F は、本明細書において使用する場合、本発明の溶液への組み込み前で、約 5 % ~ 約 9 5 重量 % の P D G F を有する組成物を含む。幾つかの実施形態では、実質的に精製された P D G F は、本発明の溶液への組み込み前で、約 6 5 % ~ 約 9 5 重量 % の P D G F を有する組成物を含む。他の実施形態では、実質的に精製された P D G F は、本発明の溶液への組み込み前で、約 7 0 % ~ 約 9 5 % 、約 7 5 % ~ 約 9 5 % 、約 8 0 % ~ 約 9 5 % 、約 8 5 % ~ 約 9 5 % 、または約 9 0 % ~ 約 9 5 重量 % を有する組成物を含む。精製された P D G F および実質的に精製された P D G F は、スキヤホールドおよび結合剤に組み込まれうる。³⁰

【0038】

さらなる実施形態では、P D G F を部分的に精製することができる。部分的に精製された P D G F は、本明細書において使用する場合、多血小板血漿（P R P ）、新鮮凍結血漿（F F P ）、または P D G F を作製するのに採集および分離を要する他の血液製剤に照らして、P D G F を有する組成物を含む。本発明の実施形態は、ホモ二量体およびヘテロ二量体を含む、本明細書において提供される P D G F アイソフォームのいずれも、精製または部分的に精製できることを想定している。P D G F 混合物を含有する本発明の組成物は、部分的に精製された部分に P D G F アイソフォームまたは P D G F 断片を含有しうる。部分的に精製されたおよび精製された P D G F は、幾つかの実施形態では、米国特許出願第 1 1 / 1 5 9 , 5 3 3 号（公開番号（Publication No.）：第 2 0 0 6 0 0 8 4 6 0 2 号）に記載のように調製することができる。⁴⁰⁵⁰

【0039】

幾つかの実施形態では、PDGFを含む溶液は、PDGFを水媒体または1つ以上のバッファーに可溶化することによって形成される。本発明のPDGF溶液での使用に適したバッファーは、限定はされないが、炭酸塩、リン酸塩（例えばリン酸緩衝食塩水）、ヒスチジン、酢酸塩（例えば酢酸ナトリウム）、酢酸およびHClなどの酸性緩衝液、ならびにリジン、トリスバッファー（例えばトリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン）、N₂ヒドロキシエチルピペラジンN'-2エタンスルホン酸（HEPES）、および3（Nモルホリノ）プロパンスルホン酸（MOPS）などの有機バッファーを含む。バッファーは、PDGFとの生体適合性および望ましくないタンパク質修飾を妨げるバッファーの能力に基づいて選択することができる。くわえて、バッファーは宿主組織との適合性に基づいて選択することができる。幾つかの実施形態では、酢酸ナトリウムバッファーが使用される。バッファーは異なるモル濃度、例えば、約0.1 mM～約100 mM、約1 mM～約50 mM、約5 mM～約40 mM、約10 mM～約30 mM、もしくは約15 mM～約25 mM、またはこれらの範囲内の任意のモル濃度で用いることができる。幾つかの実施形態では、酢酸緩衝液は、約20 mMのモル濃度で用いられる。

【0040】

別の実施形態では、PDGFを含む溶液は、凍結乾燥PDGFを水に可溶化することによって形成され、ここで、可溶化前にPDGFを適切な緩衝バッファーから凍結乾燥される。

【0041】

PDGFを含む溶液は、本発明の実施形態によれば、約3.0～約8.0の範囲のpHを有することができる。幾つかの実施形態では、PDGFを含む溶液は、約5.0～約8.0、約5.5～約7.0、もしくは約5.5～約6.5、またはこれらの範囲内の任意の値の範囲のpHを有する。PDGFを含む溶液のpHは、幾つかの実施形態では、PDGFまたは任意の他の望ましい生体活性物質の持続的な安定性および有効性に適合することができる。PDGFは、酸性の環境においてより安定でありうる。したがって、1つの実施形態においては、本発明はPDGF溶液の酸性保存剤を含む。この実施形態においては、PDGF溶液は、好ましくは、約3.0～約7.0または約4.0～約6.0のpHを有する。しかし、PDGFの生物学的活性は、中性のpH範囲を有する溶液において最適化することができる。したがって、さらなる実施形態では、本発明はPDGF溶液の中性pH製剤を含む。この実施形態においては、PDGF溶液は、約5.0～約8.0、約5.5～約7.0、または約5.5～約6.5のpHを有する。本発明の方法においては、酸性のPDGF溶液が中性pH組成物に改質される。本発明の好ましい実施形態においては、溶液を利用されたPDGFはr h PDGF BBである。さらなる実施形態では、PDGF含有溶液のpHを変えて、PDGFの生体適合性マトリックスに対する結合キネティクスを最適化することができる。

【0042】

PDGFを含む溶液のpHは、幾つかの実施形態では、本明細書において列挙されるバッファーによって制御することができる。さまざまなタンパク質が、それらが安定である異なるpH範囲を示す。タンパク質安定性は、主にタンパク質の等電点および電荷によって反映される。pH範囲は、タンパク質の立体配座構造、ならびにタンパク質分解、加水分解、酸化、およびタンパク質の構造および/または生物学的活性の変更をもたらすことができる他のプロセスに対するタンパク質の感受性に影響を及ぼすことができる。

【0043】

幾つかの実施形態では、PDGFを含む溶液は、他の生体活性物質などのさらなる成分をさらに含むことができる。他の実施形態では、PDGFを含む溶液は、細胞培養培地、アルブミンなどの他の安定化タンパク質、抗菌性剤、プロテアーゼ阻害剤（例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、エチレングリコールビス（ベータアミノエチルエーテル）N、N，N'，N'四酢酸（EGTA）、アプロチニン、アミノカプロン酸（EACA）など）ならびに/または線維芽細胞増殖因子（FGF）、上皮成長因子（

E G F)、トランスフォーミング増殖因子 (T G F)、ケラチノサイト成長因子 (K G F)、インスリン様成長因子 (I G F s)、骨形成タンパク質 (B M P)、または P D G F A A、P D G F B B、P D G F A B、P D G F C C および / もしくは P D G F D D の組成物を含む他の P D G F などの他の成長因子をさらに含むことができる。

【 0 0 4 4 】

生体適合性マトリックス

移植材料の生体適合性マトリックスは、1つ以上の骨代替物質であり、または付加的に1つ以上の骨代替物質を含む。マトリックスは、随意に生体適合性結合剤をさらに含む。

【 0 0 4 5 】

骨スキャフォールディング材料

10

生体適合性マトリックスは、本発明の幾つかの実施形態によれば、骨スキャフォールディング材料を含む。本特許出願において、骨スキャフォールディング材料および骨代替物質という用語は、互換可能に使用されることを理解すべきである。骨スキャフォールディング材料は、新しい骨および組織成長が起こるように骨格またはスキャホールドを提供する。骨代替物質は、恒久的または一時的に骨を置換するのに使用することができるものである。移植後、骨代替物質は体に保たれることができ、または、体に再吸収され、骨と置換ができる。例示的な骨代替物質としては、例えば、リン酸カルシウム（例えば、リン酸三カルシウム（例えば、T C P）、ヒドロキシアパタイト、結晶性に乏しいヒドロキシアパタイト、非晶質リン酸カルシウム、メタリン酸カルシウム、二水和リン酸二カルシウム、リン酸ヘプタカルシウム、ピロリン酸カルシウム二水和物、ピロリン酸カルシウム、およびリン酸オクタカルシウム）、硫酸カルシウム、および同種移植片（例えば、石灰化骨、石灰化脱タンパク質異種移植片、または脱石灰化骨（例えば、脱石灰化凍結乾燥皮質骨または海綿骨））が挙げられる。骨スキャフォールディング材料は、幾つかの実施形態では、リン酸カルシウムを含む。幾つかの実施形態では、リン酸カルシウムは T C P を含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は同種移植片を含む。幾つかの実施形態では、生体適合性マトリックスは、生体適合性結合剤含有もしくは非含有リン酸カルシウム粒子、または脱石灰化凍結乾燥骨同種移植片（D F D B A）もしくは粒子状脱石灰化骨マトリックス（D B M）などの骨同種移植片を含みうる。別の実施形態では、生体適合性マトリックスは、D F D B A または D B M などの骨同種移植片を含みうる。ある実施形態では、担体物質は生体再吸収可能である。骨スキャフォールディング材料は、幾つかの実施形態では、少なくとも1つのリン酸カルシウムを含む。他の実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、複数のリン酸カルシウムを含む。骨スキャフォールディング材料としての使用に適したリン酸カルシウムは、本発明の幾つかの実施形態では、0.5 ~ 2.0 の範囲のカルシウム対リンの原子比率を有する。幾つかの実施形態では、生体適合性マトリックスは、D F D B A または粒子状D B M 同種移植片を含む。

20

【 0 0 4 6 】

骨スキャフォールディング材料としての使用に適したリン酸カルシウムの非限定的な例としては、非晶質リン酸カルシウム、リン酸一カルシウム一水和物（M C P M）、無水リン酸一カルシウム（M C P A）、リン酸二カルシウム二水和物（D C P D）、無水リン酸ニカルシウム（D C P A）、リン酸八カルシウム（O C P）、リン酸三カルシウム、

30

T C P、ヒドロキシアパタイト（O H A p）、結晶性に乏しいヒドロキシアパタイト、リン酸四カルシウム（T T C P）、デカリニ酸七カルシウム、メタリン酸カルシウム、ピロリン酸カルシウム二水和物、ピロリン酸カルシウム、炭酸化されたリン酸カルシウム（carbonated calcium phosphate）、またはその混合物が挙げられる。

40

【 0 0 4 7 】

別の実施形態では、骨代替物質は多孔質組成物を有する。多孔性は移植材料への細胞遊走および浸潤を促し、浸潤細胞は細胞外骨マトリックスを分泌することができるので、多孔性は望ましい特徴である。多孔性はまた、血管新生へのアクセスも提供する。また、多

50

孔性は広い表面積を提供し、活性物質の再吸収および放出を高め、細胞マトリックス相互作用を増加する。組成物は、移植に適した形状（例えば、球形、円柱形、もしくはブロック）で提供することができる、または使用前に大きさおよび形を形成することができる。好ましい実施形態では、骨代替物質は、リン酸カルシウム（例えば、TCP）である。多孔質骨スキャフォールディング材料は、幾つかの実施形態によれば、約1μm～約1mmの範囲の直径を有する細孔を含むことができる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、約100μm～約1mmの範囲の直径を有するマクロ細孔を含む。別の実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、約10μm～約100μmの範囲の直径を有するメソ細孔を含む。さらなる実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、約10μm未満の直径を有するミクロ細孔を含む。本発明の実施形態は、マクロ細孔、メソ細孔、およびミクロ細孔またはその任意の組み合わせを含む骨スキャフォールディング材料を含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は相互に連結した細孔を含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は相互に連結しない細孔を含む。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、相互に連結する細孔および相互に連結しない細孔を含む。10

【0048】

多孔質骨スキャフォールディング材料は、幾つかの実施形態では、約25%を超えるまたは約40%を超える多孔率を有する。別の実施形態では、多孔質骨スキャフォールディング材料は、約50%を超える、約60%を超える、約65%を超える、約70%を超える、約80%を超える、または約85%を超える多孔率を有する。さらなる実施形態では、多孔質骨スキャフォールディング材料は、約90%を超える多孔率を有する。幾つかの実施形態では、多孔質骨スキャフォールディング材料は、スキャフォールディング材料への細胞遊走を促す多孔性を含む。20

【0049】

幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、複数の粒子を含む。骨スキャフォールディング材料は、例えば、複数のリン酸カルシウム粒子を含むことができる。骨スキャフォールディング材料の粒子は、幾つかの実施形態では、本明細書における骨スキャフォールディングの、いずれの細孔直径および多孔率を個々に示すことができる。他の実施形態では、骨スキャフォールディング材料の粒子はつながりを形成して、本明細書における骨スキャフォールディング材料の、いずれの細孔直径および多孔率を有するマトリックスを作製することができる。30

【0050】

骨スキャフォールディング粒子は、mm、μmまたはサブミクロン(nm)のサイズでありうる。骨スキャフォールディング粒子は、幾つかの実施形態では、約1μm～約5mmの範囲の平均直径を有する。他の実施形態では、粒子は、約1mm～約2mm、約1mm～約3mm、または約250μm～約750μmの範囲の平均直径を有する。骨スキャフォールディング粒子は、別の実施形態では、約100μm～約300μmの範囲の平均直径を有する。さらなる実施形態では、粒子は、約75μm～約300μmの範囲の平均直径を有する。さらなる実施形態では、骨スキャフォールディング粒子は、約25μm未満、約1μm未満および、場合によっては、約1mm未満の平均直径を有する。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング粒子は、約100μm～約5mmまたは約100μm～約3mmの範囲の平均直径を有する。他の実施形態では、骨スキャフォールディング粒子は、約250μm～約2mm、約250μm～約1mm、約200μm～約3mmの範囲の平均直径を有する。また、粒子は約1nm～約1000nm、約500nm未満または約250nm未満の範囲にありうる。40

【0051】

骨スキャフォールディング粒子は、幾つかの実施形態では、約1μm～約5mmの範囲の直径を有する。他の実施形態では、粒子は、約1mm～約2mm、約1mm～約3mm、または約250μm～約750μmの範囲の直径を有する。骨スキャフォールディング粒子は、別の実施形態では、約100μm～約300μmの範囲の直径を有する。さらな50

る実施形態では、粒子は、約 75 μm ~ 約 300 μm の範囲の直径を有する。さらなる実施形態では、骨スキャフォールディング粒子は、約 25 μm 未満、約 1 μm 未満および、場合によっては、約 1 mm 未満の直径を有する。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング粒子は、約 100 μm ~ 約 5 mm または約 100 μm ~ 約 3 mm の範囲の直径を有する。他の実施形態では、骨スキャフォールディング粒子は、約 250 μm ~ 約 2 mm、約 250 μm ~ 約 1 mm、約 200 μm ~ 約 3 mm の範囲の直径を有する。また、粒子は約 1 nm ~ 約 1000 nm、約 500 nm 未満または約 250 nm 未満の範囲にあります。

【 0052 】

骨スキャフォールディング材料は、幾つかの実施形態によれば、移植に適した形状（例えば、球形、円柱形、またはブロック）で提供されることができる。他の実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、成形可能、押出成形可能、および／または注射可能である。成形可能、押出成形可能、および／または注射可能な骨スキャフォールディング材料は、脊椎固定術の間、骨癒合したい骨および骨の間の標的部位およびそのまわりにおける本発明の組成物の効率的な埋植を促す。幾つかの実施形態では、成形可能な骨スキャフォールディング材料は、スパチュラまたは均等な装置を用いて、骨癒合の部位に適用することができる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は流動可能である。流動可能な骨スキャフォールディング材料は、幾つかの実施形態では、注射器および針またはカニューレを通して骨癒合の部位に適用することができる。幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、生体内で固まる。

10

【 0053 】

幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は生体再吸収可能である。骨スキャフォールディング材料は、幾つかの実施形態では、少なくとも 30%、40%、50%、60%、70%、75% または 90% が生体内移植後 1 年以内に再吸収されることがある。別の実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、少なくとも 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75% または 90% が生体内移植後の 1、3、6、9、12、または 18 ヶ月以内に再吸収されることがある。生体再吸収可能性は、(1) マトリックス材料の性質（すなわち、その化学的組成、物理的構造およびサイズ）；(2) マトリックスが埋植される体内的位置；(3) 使用されるマトリックス材料の量；(4) 患者の代謝の状態（糖尿病／非糖尿病、骨粗しょう症、喫煙者、高齢、ステロイド使用など）；(5) 治療される傷害の範囲および／またはタイプ；ならびに(6) 他の骨同化作用、異化作用および抗異化作用因子などの、マトリックス以外の他の材料の使用に依存することになる。

20

30

【 0054 】

骨スキャフォールディング材料および生体適合性結合剤

別の実施形態では、生体適合性マトリックスは、骨スキャフォールディング材料および生体適合性結合剤を含む。生体適合性結合剤をさらに含む生体適合性マトリックスの幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、上記に提供されたものと一致する。

30

【 0055 】

生体適合性結合剤は、幾つかの実施形態によれば、合わせた物質間の凝集を促進する働きをする材料を含むことができる。生体適合性結合剤は、例えば、生体適合性マトリックスの形成における骨スキャフォールディング材料の粒子間の接着を促進する。ある幾つかの実施形態では、同一の材料が、合わせた物質間の凝集を促進し、新しい骨の成長が起こるように骨格を提供するように作用する場合、そのような材料は、スキャフォールディング材料および結合剤の両方としての機能を果たしうる。

40

【 0056 】

生体適合性結合剤は、幾つかの実施形態では、コラーゲン、多糖類、核酸、炭水化物、タンパク質、ポリペプチド、合成ポリマー、ポリ(ヒドロキシ酸)、ポリ(ラクトン)、ポリ(アミノ酸)、ポリ(無水物)、ポリウレタン、ポリ(オルトエステル)、ポリ

50

(無水物 co イミド)、ポリ(オルトカーボネート)、ポリ(ヒドロキシアルカノエート)、ポリ(ジオキサン)、ポリ(ホスホエステル)、ポリ乳酸、ポリ(L-ラクチド)(PLLA)、ポリ(D,L-ラクチド)(PDLA)、ポリグリコリド(PGA)、ポリ(ラクチド co グリコリド)(PLGA)、ポリ(L-ラクチド co D,L-ラクチド)、ポリ(D,L-ラクチド co 炭酸トリメチレン)、ポリグリコール酸、ポリヒドロキシ酪酸(PHB)、ポリ(カプロラクトン)、ポリ(バレロラクトン)、ポリ(ブチロラクトン)、ポリ(カプロラクトン)、ポリ(アクリル酸)、ポリカルボン酸、ポリ(アリルアミン塩酸塩)、ポリ(ジアリルジメチルアンモニウムクロリド)、ポリ(エチレンイミン)、ポリプロピレンフマレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレン、ポリメタクリル酸メチル、炭素繊維、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(エチルオキサンine)、ポリ(エチレンオキシド) co ポリ(プロピレンオキシド)ブロック共重合体、ポリ(エチレンテレフタレート)ポリアミド、ならびにこれらの共重合体および混合物を含むことができる。
10

【0057】

生体適合性結合剤は、他の実施形態では、アルギン酸、アラビアゴム、グーガム、キサンタン(xantham)ガム、ゼラチン、キチン、キトサン、キトサンアセテート、キトサンラクテート、コンドロイチン硫酸、レシチン、N,Oカルボキシメチルキトサン、ホスファチジルコリン誘導体、デキストラン(例えば、シクロデキストリン、サイクロデキストリン、サイクロデキストリン、またはデキストラン硫酸ナトリウム)、フィブリン接着剤、レシチン、グリセロール、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、セルロース(例えば、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはヒドロキシエチルセルロース)、グルコサミン、プロテオグリカン、デンプン(例えば、ヒドロキシエチルデンプンまたは可溶性デンプン)、乳酸、フルロン酸、グリセロリン酸ナトリウム、グリコーゲン、ケラチン、絹、ならびにこれらの誘導体および混合物を含むことができる。
20

【0058】

幾つかの実施形態では、結合剤はコラーゲンを含む。幾つかの実施形態では、コラーゲンはI型コラーゲンを含む。幾つかの実施形態では、コラーゲンはウシI型コラーゲンを含む。幾つかの実施形態では、生体適合性結合剤はヒアルロン酸を含む。
30

【0059】

幾つかの実施形態では、生体適合性結合剤は水溶性である。水溶性結合剤は、移植後間もなく、生体適合性マトリックスから溶け出しができるので、マクロ多孔性を生体適合性マトリックスに取り入れができる。マクロ多孔性は、本明細書において述べるように、移植部位での、破骨細胞および骨芽細胞のアクセス、およびその結果として再形成活性を高めることによって、移植材料の骨伝導性を増加することができる。

【0060】

幾つかの実施形態では、生体適合性結合剤は、生体適合性マトリックス中に、生体適合性マトリックスの約1重量%～約70重量%、約5重量%～約50重量%、約10重量%～約40重量%、約15重量%～約35重量%、または約15重量%～約25重量%の範囲の量で存在することができる。さらなる実施形態では、生体適合性結合剤は、生体適合性マトリックスの約20重量%の量で存在することができる。
40

【0061】

骨スキャフォールディング材料および生体適合性結合剤を含む生体適合性マトリックスは、幾つかの実施形態によれば、流動可能、成形可能および/または押出成形可能であることができる。そのような実施形態では、生体適合性マトリックスは、ペーストまたはパテの形態であることができる。ペーストまたはパテの形態の生体適合性マトリックスは、幾つかの実施形態では、生体適合性結合剤によって互いに接着した、骨スキャフォールディング材料の粒子を含むことができる。

【0062】

50

ペーストまたはパテ形態の生体適合性マトリックスは、所望の移植形状に成形でき、または移植部位の外形に成形できる。幾つかの実施形態では、ペーストまたはパテ形態の生体適合性マトリックスは、注射器またはカニューレを用いて移植部位に注射することができる。

【0063】

幾つかの実施形態では、ペーストまたはパテ形態の生体適合性マトリックスは、移植後、固まらずに流動可能および成形可能な形態を保持する。他の実施形態では、ペーストまたはパテは、移植後に固まる能够があるので、マトリックスの流動性および成形性を減じることができる。

【0064】

骨スキャフォールディング材料および生体適合性結合剤を含む生体適合性マトリックスは、幾つかの実施形態では、ブロック、球、円柱形または例えれば型または適用部位によって決められる所望の形を含む決まった形で提供されることもできる。

【0065】

骨スキャフォールディング材料および生体適合性結合剤を含む生体適合性マトリックスは、幾つかの実施形態では、上記のように生体再吸収可能である。そのような実施形態では、生体適合性マトリックスは、生体内移植の1年以内に再吸収されることが可能である。別の実施形態では、骨スキャフォールディング材料および生体適合性結合剤を含む生体適合性マトリックスは、生体内移植の1、3、6、または9ヶ月以内に再吸収されることが可能である。生体再吸収可能性は、(1)マトリックス材料の性質(すなわち、その化学的組成、物理的構造およびサイズ)；(2)マトリックスが埋植される体内的位置；(3)使用されるマトリックス材料の量；(4)患者の代謝の状態(糖尿病/非糖尿病、骨粗しょう症、喫煙者、高齢、ステロイド使用など)；(5)治療される傷害の範囲および/またはタイプ；ならびに(6)他の骨同化作用、異化作用および抗異化作用因子などの、マトリックス以外の他の材料の使用に依存することになる。

10

【0066】

以下に、TCPを含む骨スキャフォールディング材料および/またはコラーゲンを含む生体適合性結合剤を参照して特定の実施形態を説明するが、TCPの代わりに他の骨スキャフォールディング材料(例えれば、別のリン酸カルシウム、硫酸カルシウム、または同種移植片)を用いること、および/またはコラーゲンの代わりに他の結合剤を用いることによって、本発明の他の実施形態を作りうることを理解すべきである。

20

【0067】

リン酸三カルシウムを含む骨スキャフォールディング

幾つかの実施形態では、生体適合性マトリックスとして用いる骨スキャフォールディング材料は、TCPを含むことができる。TCPは、幾つかの実施形態によれば、種々の直径の、多方向の相互に連結した細孔を有する多孔質構造を含むことができる。幾つかの実施形態では、TCPは、相互に連結した細孔にくわえて、種々の直径のポケットおよび相互に連結しない細孔を複数含む。TCPの多孔質構造は、幾つかの実施形態では、約100μm～約1mmの範囲の直径を有するマクロ細孔、約10μm～約100μmの範囲の直径を有するメソ細孔、および約10μm未満の直径を有するミクロ細孔を含む。TCPのマクロ細孔およびミクロ細孔は、骨誘導および骨伝導を促すことができる一方で、マクロ細孔、メソ細孔、およびミクロ細孔はTCP生体適合性マトリックスにわたって、流体連通(fluid communication)および栄養素輸送を可能にし、骨の再生を助けることができる。

30

【0068】

多孔質構造を含む場合、TCPは、幾つかの実施形態では、25%を超えるまたは約40%を超える多孔率を有することができる。他の実施形態では、TCPは、約50%を超える、約60%を超える、約65%を超える、約70%を超える、約75%を超える、約80%を超える、または約85%を超える多孔率を有することができる。さらなる実施形態では、TCPは、約90%を超える多孔率を有することができる。幾つか

40

50

の実施形態では、TCPは、TCPへの細胞遊走を促す多孔性を有することができる。

【0069】

幾つかの実施形態では、骨スキャフォールディング材料は、TCP粒子を含む。

TCP粒子は、幾つかの実施形態では、本明細書においてTCPに提供される、いずれの細孔直径および多孔率を個々に示すことができる。他の実施形態では、骨スキャフォールディング材料のTCP粒子はつながりを形成して、本明細書において骨スキャフォールディング材料に提供される、いずれの細孔直径および多孔率を有するマトリックスを作製することができる。多孔性は、その後の骨形成に向かってマトリックスへの細胞遊走および浸潤を促しうる。

10

【0070】

TCP粒子は、幾つかの実施形態では、約1μm～約5mmの範囲の平均直径を有する。他の実施形態では、TCP粒子は、約1mm～約2mm、約1mm～約3mm、約250μm～約750μm、約250μm～約1mm、約250μm～約2mm、または約200μm～約3mmの範囲の平均直径を有する。別の実施形態では、TCP粒子は、約100μm～約300μmの範囲の平均直径を有する。さらなる実施形態では、TCP粒子は、約75μm～約300μmの範囲の平均直径を有する。さらなる実施形態では、TCP粒子は、約25μm未満の平均直径、約1μm未満および、または約1mm未満の平均直径を有する。幾つかの実施形態では、TCP粒子は、約100μm～約5mmまたは約100μm～約3mmの範囲の平均直径を有する。

20

【0071】

TCP粒子を含む生体適合性マトリックスは、幾つかの実施形態では、移植に適した形状（例えば、球形、円柱形、またはブロック）で提供することができる。他の実施形態では、TCP骨スキャフォールディング材料は、成形可能、押出成形可能、および/または注射可能であるので、脊椎固定術の間の所望の骨癒合の標的部位およびそのまわりへの、マトリックスの効率的な埋植を促すことができる。流動可能なマトリックスは、注射器、チューブ、もしくはスパチュラまたは均等な装置を通して適用しうる。流動可能なTCP骨スキャフォールディング材料は、幾つかの実施形態では、注射器および針またはカニューレを通して骨癒合の部位に適用することができる。幾つかの実施形態では、TCP骨スキャフォールディング材料は、生体内で固まる。

30

【0072】

TCP骨スキャフォールディング材料は、幾つかの実施形態によれば、生体再吸収可能である。幾つかの実施形態では、TCP骨スキャフォールディング材料は、少なくとも30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%または85%が生体内移植後1年で再吸収されることができる。別の実施形態では、TCP骨スキャフォールディング材料は、約90%を超えて、生体内移植後1年で再吸収されることができる。

【0073】

TCPおよびコラーゲンを含む生体適合性マトリックス

幾つかの実施形態では、生体適合性マトリックスは、TCP骨スキャフォールディング材料および生体適合性コラーゲン結合剤を含むことができる。コラーゲン結合剤との組み合わせに適したTCP骨スキャフォールディング材料は、上記に提供されたものと一致する。

40

【0074】

コラーゲン結合剤は、幾つかの実施形態では、いずれのタイプのコラーゲン、例えば、I型、II型、およびIII型コラーゲンを含むことができる。幾つかの実施形態では、コラーゲン結合剤は、I型およびII型コラーゲンの混合物などのコラーゲンの混合物を含む。他の実施形態では、コラーゲン結合剤は、生理学的条件下で可溶である。骨または筋骨格系組織に存在する他の型のコラーゲンを用いてもよい。コラーゲンの組み換え、合成、および天然形態が本発明において使用されうる。

50

【0075】

生体適合性マトリックス、幾つかの実施形態によれば、コラーゲン結合剤で互いに接着した、複数のTCP粒子を含むことができる。コラーゲン結合剤との使用に適したTCP粒子は、本明細書において記載されているいずれのTCP粒子を含むことができる。幾つかの実施形態では、コラーゲン結合剤との組み合わせに適したTCP粒子は、約1μm～約5mmの範囲の平均直径を有する。別の実施形態では、コラーゲン結合剤との組み合わせに適したTCP粒子は、約1μm～約1mm、約1mm～約2mm、約1mm～約3mm、約250μm～約750μm、約250μm～約1mm、約250μm～約2mm、約200μm～約1mm、または約200μm～約3mmの範囲の平均直径を有する。TCP粒子は、他の実施形態では、約100μm～約300μmの範囲の平均直径を有する。さらなる実施形態では、コラーゲン結合剤との組み合わせに適したTCP粒子は、約75μm～約300μmの範囲の平均直径を有する。さらなる実施形態では、コラーゲン結合剤との組み合わせに適したTCP粒子は、約25μm未満、および約1mm未満または約1μm未満の平均直径を有する。幾つかの実施形態では、コラーゲン結合剤との組み合わせに適したTCP粒子は、約100μm～約5mmまたは約100μm～約3mmの範囲の平均直径を有する。10

【0076】

TCP粒子は、幾つかの実施形態では、多孔質構造を有する生体適合性マトリックスを作るよう、コラーゲン結合剤によって互いに接着することができる。幾つかの実施形態では、TCP粒子およびコラーゲン結合剤を含む生体適合性マトリックスは、約1μm～約1mmの範囲の直径を有する細孔を含むことができる。TCP粒子およびコラーゲン結合剤を含む生体適合性マトリックスは、約100μm～約1mmの範囲の直径を有するマクロ細孔、約10μm～100μmの範囲の直径を有するメソ細孔、および約10μm未満の直径を有するミクロ細孔を含むことができる。20

【0077】

TCP粒子およびコラーゲン結合剤を含む生体適合性マトリックスは、25%を超えるまたは約40%を超える多孔率を有することができる。別の実施形態では、その生体適合性マトリックスは、約50%を超える、約60%を超える、約65%を超える、約70%を超える、約80%を超える、または約85%を超える多孔率を有することができる。さらなる実施形態では、その生体適合性マトリックスは、約90%を超える多孔率を有することができる。多孔性は、その後の骨形成に向かってマトリックスへの細胞遊走および浸潤を促す。30

【0078】

TCP粒子を含む生体適合性マトリックスは、幾つかの実施形態では、コラーゲン結合剤を、生体適合性マトリックスの約1重量%～約70重量%、約5重量%～約50重量%、約10重量%～約40重量%、約15重量%～約35重量%、または約15重量%～約25重量%の範囲の量で含むことができる。さらなる実施形態では、コラーゲン結合剤は、生体適合性マトリックスの約20重量%の量で存在することができる。

【0079】

TCP粒子およびコラーゲン結合剤を含む生体適合性マトリックスは、幾つかの実施形態によれば、流動可能、成形可能および/または押出成形可能であることができる。そのような実施形態では、その生体適合性マトリックスは、ペーストまたはパテの形態であることができる。ペーストまたはパテは、所望の移植形状に成形でき、または移植部位の外形に成形できる。幾つかの実施形態では、TCP粒子およびコラーゲン結合剤を含むペーストまたはパテ形態の生体適合性マトリックスは、注射器またはカニューレを用いて移植部位に注射することができる。40

【0080】

幾つかの実施形態では、TCP粒子およびコラーゲン結合剤を含むペーストまたはパテ形態の生体適合性マトリックスは、移植した際、流動可能および成形可能形態を保つことができる。他の実施形態では、そのペーストまたはパテは、移植後に固まることができる50

きるので、マトリックスの流動性および成形性を減じることができる。

【0081】

T C P 粒子およびコラーゲン結合剤を含む生体適合性マトリックスは、幾つかの実施形態では、ブロック、球形、または円柱形などの所定の形状で提供することができる。

【0082】

T C P 粒子およびコラーゲン結合剤を含む生体適合性マトリックスは、再吸収可能であることができる。幾つかの実施形態では、T C P 粒子およびコラーゲン結合剤を含む生体適合性マトリックスは、少なくとも 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、75 %、または 90 % が生体内移植後 1 年で再吸収されることがある。別の実施形態では、このマトリックスは、少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、75 % または 90 % が生体内移植後の 1、3、6、9、12、または 18 ヶ月以内に再吸収されることがある。10

【0083】

P D G F を含む溶液は、生体適合性マトリックスに配置され、本発明の実施形態による脊椎固定術における骨固定を促進する組成物を作製することができる。

【0084】

生体適合性マトリックスへの P D G F 溶液の組み込み

本発明は、脊椎固定術に用いる組成物を作製する方法を提供する。幾つかの実施形態では、骨の固定を促進する組成物を作製する方法は、P D G F を含む溶液を提供すること、生体適合性マトリックスを提供すること、およびその溶液を生体適合性マトリックスに組み込むことを含む。組み合わせに適した P D G F 溶液および生体適合性マトリックスは、上記に記載されたものと一致する。20

【0085】

幾つかの実施形態では、P D G F 溶液は、生体適合性マトリックスを P D G F 溶液に浸すことによって、生体適合性マトリックスに組み込むことができる。P D G F 溶液は、別の実施形態では、生体適合性マトリックスを P D G F 溶液とともに注射することによって、生体適合性マトリックスに組み込むことができる。幾つかの実施形態では、P D G F 溶液を注射することは、注射器に P D G F 溶液を組み込むこと、および P D G F 溶液を生体適合性マトリックスに放出して生体適合性マトリックスを飽和することを含むことができる。30

【0086】

生体適合性マトリックス、幾つかの実施形態によれば、P D G F 溶液を与えられる前、れんが形または円柱形などの所定の形状であることができる。P D G F 溶液を与えられた後、生体適合性マトリックスは、流動可能、押出成形可能、および / または注射可能であるペーストまたはパテ形態を有することができる。他の実施形態では、生体適合性マトリックスは、P D G F 溶液を与えられる前に、すでに流動可能なペーストまたはパテ形態を示すことができる。

【0087】

生体活性物質をさらに含む組成物

本明細書において記載されている、脊椎固定術における骨固定を促進および / または容易にする組成物は、幾つかの実施形態によれば、P D G F にくわえて、1 つ以上の生体活性薬品をさらに含むことができる。P D G F にくわえて本発明の組成物に組み込まれることができる生体活性物質は、有機分子、無機材料、タンパク質、ペプチド、核酸（例えば、遺伝子、遺伝子断片、小挿入（small insert）リボ核酸（s i R N A）、遺伝子調節配列、核内転写因子、およびアンチセンス分子）、核タンパク質、多糖類（例えば、ヘパリン）、糖タンパク質、ならびにリポタンパク質を含むことができる。例えば、抗がん剤、抗生物質、鎮痛薬、抗炎症剤、免疫抑制剤、酵素阻害剤、抗ヒスタミン剤、ホルモン、筋弛緩薬、プロスタグラジン、栄養素、骨誘導タンパク質、成長因子、およびワクチンを含む、本発明の組成物に組み込まれることができる生体活性化合物の非限定的な例は、米国特許出願第 11 / 159,533 号（公開番号（P u b l i c a t i o n

10

20

30

40

50

n N o) : 第 2 0 0 6 0 0 8 4 6 0 2 号) に開示されている。幾つかの実施形態では、本発明の組成物に組み込まれることができる生体活性化合物としては、インスリン様成長因子、線維芽細胞増殖因子、または他の P D G F などの骨誘導因子が挙げられる。他の実施形態においては、本発明の組成物に組み込まれることができる生体活性化合物としては、好ましくは、骨形成タンパク質 (B M P) 、 B M P 模倣剤、カルシトニン、カルシトニン模倣剤、スタチン、スタチン誘導体、または副甲状腺ホルモンなどの、骨誘導および骨刺激 (o s t e o s t i m u l a t o r y) 因子が挙げられる。また、好ましい因子としては、プロテアーゼ阻害剤、ビスホスホネート含む骨再吸収を減じる骨粗しょう症治療薬、および N F - k B 活性化受容体リガンド (R A N K) に対する抗体リガンドが挙げられる。

10

【 0 0 8 8 】

さらなる生体活性物質を送達するための標準的なプロトコルおよびレジメンは、当該技術分野において公知である。さらなる生体活性物質は、移植部位への適切な投与量の物質の送達を可能にする量で本発明の組成物に導入することができる。ほとんどの場合、投与量は、専門家に公知であり、問題になっている特定の物質に適用可能なガイドラインを使用して決定される。本発明の組成物に含まれるべき、さらなる生体活性物質の量は、病態の型および程度、特定の患者の総合的な健康状態、生体活性物質の組成、放出動態、および生体適合性マトリックスの生体再吸収性などの変数に依存しうる。標準的な治療を使用して、任意の特定のさらなる生体活性物質に関する投与量および投与頻度を最適化しうる。

20

【 0 0 8 9 】

脊椎固定術における骨固定を促進する組成物は、幾つかの実施形態によれば、例えば、自家骨髓、自家血小板抽出物、および合成骨マトリックス材料を含めた他の骨移植材料を P D G F とともに加えることをさらに含むことができる。

【 0 0 9 0 】

脊椎固定術を行う方法

本発明はまた、脊椎固定術を行う方法を提供する。幾つかの実施形態では、脊椎固定術を行う方法が、生体適合性マトリックスに組み込まれた P D G F 溶液を含む組成物を提供すること、および組成物を所望の脊椎固定部位に適用することを含む。生体適合性マトリックスに組み込まれた P D G F 溶液を含む組成物は、例えば、所望の脊椎固定部位に充てんされることができる。幾つかの実施形態では、その組成物が骨固定部位における骨の表面領域全体に接触するように、組成物が充てんされうる。くわえて、その組成物は、骨固定部位の近くに適用されて、固定された骨をさらに強化しうる。

30

【 0 0 9 1 】

頸部、胸部、腰部、および仙骨部を含めた、脊椎の任意の部分における椎骨は、本発明の組成物および方法を使用して固定されうる。

【 0 0 9 2 】

別の実施形態では、本発明の方法は、脊椎固定術における骨固定を速めることを含み、ここで、骨固定を速めることは、生体適合性マトリックスに配置された P D G F 溶液を含む組成物を提供すること、および組成物を少なくとも 1 つの脊椎固定の部位に適用することを含む。

40

【 0 0 9 3 】

以下の例は、本発明をさらに説明する働きをするが、同時に、本発明のいかなる制限も構成しない。それどころか、当業者には本明細書における説明を読んだ後に本発明の趣旨から逸脱することなくそれ自体が示唆されうる、さまざまな実施形態、変更およびその同等物に頼らなければならない場合があることを明確に理解すべきである。

【 実施例 】

【 0 0 9 4 】

< 実施例 1 >

P D G F の溶液および生体適合性マトリックスを含む組成物の調製

50

P D G F の溶液および T C P の生体適合性マトリックスを含む組成物を、以下の手順に従って調製した。 T C P は、約 1 0 0 0 μm ~ 約 2 0 0 0 μm の範囲の平均直径を有する T C P 粒子を含んでいた。

【 0 0 9 5 】

r h P D G F B B を含む溶液を入手した。r h P D G F B B は、ナトリウム酢酸バッファー中に 1 0 mg / mL (すなわち、Lot # Q A 2 2 1 7) のストック濃度でカイロン社 (Chiron Corporation) より市販されている。r h P D G F B B は、カイロン社 (Chiron Corporation) によって酵母発現系で製造され、アメリカ食品医薬品局によってヒトへの使用が認可されている、R E G R A N E X (ジョンソン・エンド・ジョンソン (Johnson & Johnson)) および G E M 2 1 S (Bi o M i m e t i c T h e r a p e u t i c s) 製品中で利用されている r h P D G F B B と同じ製造施設に由来する。また、この r h P D G F B B は、10 欧州連合およびカナダでもヒトへの使用が認可されている。r h P D G F B B 溶液を、酢酸バッファーで 0 . 3 mg / mL に希釈した。r h P D G F B B 溶液を、本発明の実施形態に従って 1 . 0 mg / mL を含む任意の所望の濃度に希釈することができる。

【 0 0 9 6 】

約 3 mL の r h P D G F B B 溶液に対して、約 1 g 乾燥重量の比率で T C P 生体適合性マトリックスを使用して組成物を製造した。r h P D G F B B 溶液を、注射器を用いて生体適合性マトリックスの T C P 粒子上に放出し、結果として生じた組成物を混合、成型した。20

【 0 0 9 7 】

< 実施例 2 >

P D G F の溶液、生体適合性マトリックスおよび生体適合性結合剤を含む組成物の調製

P D G F の溶液および生体適合性結合剤、コラーゲンを含有する生体適合性マトリックスを含む組成物を、以下の手順に従って調製した。

【 0 0 9 8 】

予め重量を量った、T C P およびコラーゲンを含有する生体適合性マトリックスの塊を入手した。T C P は、約 1 0 0 μm ~ 約 3 0 0 μm の範囲の平均直径を有する T C P 粒子を含んだ。T C P 粒子は、約 2 0 重量パーセントの可溶性ウシコラーゲン結合剤を配合した。T C P / コラーゲンマトリックスは、K e n s e y N a s h (E x t o n 、ペンシルベニア州) より商業的に入手することができる。30

【 0 0 9 9 】

r h P D G F B B を含む溶液を得た。r h P D G F B B は、ナトリウム酢酸バッファー中に 1 0 mg / mL (すなわち、Lot # Q A 2 2 1 7) のストック濃度でカイロン社 (Chiron Corporation) より市販されている。r h P D G F B B は、カイロン社 (Chiron Corporation) によって酵母発現系で製造され、アメリカ食品医薬品局によってヒトへの使用が認可されている、R E G R A N E X (ジョンソン・エンド・ジョンソン (Johnson & Johnson)) および G E M 2 1 S (Bi o M i m e t i c T h e r a p e u t i c s) 製品中で利用されている r h P D G F B B と同じ製造施設に由来する。また、この r h P D G F B B は、40 欧州連合およびカナダでもヒトへの使用が認可されている。r h P D G F B B 溶液を、酢酸バッファーで 0 . 3 mg / mL に希釈した。r h P D G F B B 溶液を、本発明の実施形態に従って 1 . 0 mg / mL を含む任意の所望の濃度に希釈することができる。

【 0 1 0 0 】

約 3 mL の r h P D G F B B 溶液に対して、約 1 g 乾燥重量の比率で T C P / コラーゲンマトリックスを使用して組成物を製造した。r h P D G F B B 溶液を、注射器を用いて T C P / コラーゲンマトリックス上に放出し、結果として生じた組成物を混合、成型した。

【 0 1 0 1 】

< 実施例 3 >

50

20

30

40

50

Augment骨移植片の調製および投与

Augment(商標)骨移植片(rhPDGF BB/pTCP)は、組換えヒト血小板由来成長因子BB(20mM 酢酸ナトリウムバッファー中に0.3mg/mL)およびベータ-リン酸三カルシウム顆粒から構成される完全合成骨移植片代用品である。ベータ-リン酸三カルシウムの粒径は、約1000~2000ミクロンの範囲の直径である(Cam Bioceramics(Leiden、オランダ)から購入)。

【0102】

Augment(商標)骨移植片の構成要素を2つの滅菌したトレイに準備した：大トレイには、rhPDGF BB溶液を無菌充てんしたバイアル(3mL、0.3mg/mL)、使い捨て注射器および使い捨て針を入れた。大トレイを酸化エチレンによって滅菌した。小トレイには、乾燥TCP顆粒を充てんした密閉カップを入れた。小トレイをガンマ放射線によって滅菌した。

【0103】

組成物を次のように調製した：

【0104】

1) 無菌操作を使用して、(TCP顆粒の入った)カップおよび(rhPDGF BB溶液の入った)バイアルを無菌野に移した。

【0105】

2) カップを開け、TCP顆粒を滅菌外科用ボウルに移した。

【0106】

3) 注射器および針を使用して、バイアルの中身をすべて吸い上げ、全液をTCP顆粒の入った外科用ボウルに移した。多数のキットを使用し(9ccを超えない)、中身を合わせた。

【0107】

4) 2つの構成要素を、スパチュラ、キュレットまたは同様の道具を使用してゆっくりと約30秒間攪拌した。

【0108】

5) TCP粒子の最適な飽和を確実にするのに、移植する前に混合物を10分間そのままにしておいた。

【0109】

6) 生成物を、2つの構成要素を混合した後1時間以内に移植した。

【0110】

組成物を次のように投与する：

【0111】

使用時に、2つの主要構成要素をすべて合わせ、上記のように混合し、術部に適用する。

【0112】

- ・関節表面を、創面切除および剥皮して生骨見えるようにする。

【0113】

- ・差し支えなければ、移植材料を移植前に移植部位の外科的処置を完了する。

【0114】

- ・手術部位を洗浄する。

【0115】

- ・Augment(商標)骨移植片を、間節全体にわたって、すべての軟骨下空隙および表面の凹凸に手作業で充てんする。材料の十分な固定、閉鎖、および封じ込めを達成するために骨欠損の過剰充てんは避ける。

【0116】

- ・関節を整復し、強固な固定を適用する。

【0117】

- ・残りのAugment(商標)骨移植片全部を関節周囲に充てんする。

10

20

30

40

50

【0118】

・残りの r h P D G F B B 溶液すべてを手術部位に適用して、確実に移植片が水和されたままにする。

【0119】

・骨膜の軟組織および付加的な (overlying) 軟組織を注意深く層状にして、移植材料を入れて、封じ込める。移植部位は、A u g m e n t (商標) 骨移植片の移植後、洗浄しない。

【0120】

<実施例4>

A u g m e n t 注射用骨移植片の調製および投与

10

A u g m e n t (商標) 注射用骨移植片 (r h P D G F B B / p T C P ウシI型コラーゲン) は、組換えヒト血小板由来成長因子B B、ベータ リン酸三カルシウム顆粒および可溶性ウシI型コラーゲンから構成される合成骨移植片代用品である。ベータ リン酸三カルシウムの粒径は、約 100 ~ 300 ミクロンの範囲の直径である。ベータ リン酸三カルシウムおよびコラーゲンは、K e n s e y N a s h から購入した。ベータ リン酸三カルシウムのコラーゲンに対する比率は、80 : 20 (w/w) であった。ウシI型コラーゲン成分を加えて生成物の取扱適性を高めた。コラーゲン成分は、生成物が 0.3 mg / mL r h P D G F B B (20 mM 酢酸ナトリウムバッファー中) 溶液と配合可能にし、流動可能なペーストを得る。

【0121】

20

A u g m e n t (商標) 注射用骨移植片の成分は、2つの滅菌容器からなる「キット」中に提供された：(1) r h P D G F B B 溶液 (3 mL、0.3 mg / mL) が無菌充てんされたバイアルの入ったトレイ。トレイを酸化エチレンによって滅菌した。(2) 1 グラムの T C P / ウシI型コラーゲンマトリックスの入った二層箔 / 透明ポーチ。ポーチをガンマ放射線によって滅菌した。

【0122】

組成物を次のように調製した：

【0123】

1. 無菌操作のもとで、滅菌外科用ボウル中、r h P D G F B B 溶液で T C P / コラーゲンマトリックスを完全に飽和することによって調製した。多数のキットが必要な場合は（キットは合わせて3つを超えない）、中身を合わせた。

30

【0124】

2. T C P / コラーゲンマトリックスを完全に飽和した後、混合物を約2分間静置した。次に、滑らかなペーストが形成されるまで、混合物をガラス製でないスパチュラで3分間混ぜた。適切に混ぜた材料は、固体材料の大きな塊やかけらがなく、均一な稠度を有した。

【0125】

組成物を次のように投与する：

【0126】

使用時に、2つの主要構成要素をすべて合わせ、上記のように混合し、術部に適用する。骨欠損を見るようにした後、標準的な骨移植術に従って、骨空洞を適切に創面切除し準備する。

40

【0127】

1. 飽和マトリックスを注意深く骨移植部位に適用する。より正確な埋植のために、A u g m e n t 注射用骨移植片をカニューレまたは大口径針 (16 ゲージもしくはそれより太いサイズ) を使用して滅菌注射器に充てんし、標的領域に注入する / 押し出す。

【0128】

2. 新しい骨の形成を高めるために、A u g m e n t 注射用骨移植片を血管に富んだ骨に直接接触して埋植する。A u g m e n t 注射用骨移植片材を埋植する前に、皮質骨に穴を開ける。

50

【0129】

3. 移植材料が骨表面全体に接触して結合するように、材料を骨欠損に手作業で埋植する。

【0130】

4. 成長因子が骨膜の骨形成を高めうるように、固定した後、Augment注射用骨移植片を固定部位の周りにも埋植する。

【0131】

5. Augment(商標)注射用骨移植片材料を確実に結合空隙内に封じ込むように注意する。

【0132】

6. Augment注射用骨移植片材料を欠損部位に充填された、骨膜の軟組織および付加的な(overlying)軟組織を注意深く層状にし、移植材料を入れて、封じ込める。これにより、手術部位での流出、骨膜下再吸収、外骨腫症、および潰瘍形成が最小限になる。Augment(商標)注射用骨移植片材料の移植後に、移植部位に水がかからないように注意する。

【0133】

7. 標準的な手術手技を用いて、処置を完了する。

【0134】

<実施例5>

Augment注射用骨移植片の調製および投与

Augment注射用骨移植片(rhPDGF BB / 流動可能なTCP)は、組換えヒト血小板由来成長因子BB、ベータリソ酸三カルシウム顆粒および可溶性ウシI型コラーゲンから構成される合成骨移植片代用品である。rhPDGF BBは、20 mM 酢酸ナトリウムバッファーの溶液に0.3mg/mLの濃度で提供される。ベータTCPの粒径は、約100~300ミクロンの範囲の直径である。細断ウシI型コラーゲンを加えて、生成物の取扱適性を高めた。rhPDGF BB溶液で水和すると、コラーゲンは、TCPとともに流動可能なペーストを生じる。コラーゲンおよびベータTCPは、Kensey Nashから購入する。

【0135】

Augment注射用骨移植片は、2つの主要な滅菌構成要素を包む：(1) rhPDGF BB溶液(3mL、0.3mg/mL)で無菌充てんしたバイアルの入っているトレイ。トレイを酸化エチレンによって滅菌する。(2) 10ccのポリプロピレン注射器中の1グラムのTCPウシI型コラーゲンマトリックス(80% / 20% w/w)、空のポリプロピレン注射器、1つの18ゲージ丸針、1つの14ゲージ丸針およびメスルアーコネクターの入った箔/透明ポーチ。ポーチをガンマ放射線によって滅菌する。

【0136】

組成物を次のように調製し投与する：

【0137】

使用時に、2つの主要構成要素をすべて合わせ、混合し、術部位に適用する。

【0138】

手術部位を見るようにした後、標準的な手術手技に従って、関節を適切に創面切除し準備する。残りの軟骨はすべて除去し、反対側の骨表面を適切に調製し、健常な、血管が新生された骨の付加を最適化する。これは、移植片の挿入の前に見えるようにした出血(bleeding)骨の表面積を最大にする手段として、キュレット、バー(burr)、ドリルビットまたは骨刀を標準的に用いて、残りの軟骨下板を細く削ることおよび/または穴を開けることによってなされる。

【0139】

次に、Augment注射用骨移植片を、以下の略図に示すように、TCP / コラーゲンマトリックスをrhPDGF BB溶液で完全に飽和することによって調製し、つ

10

20

30

40

50

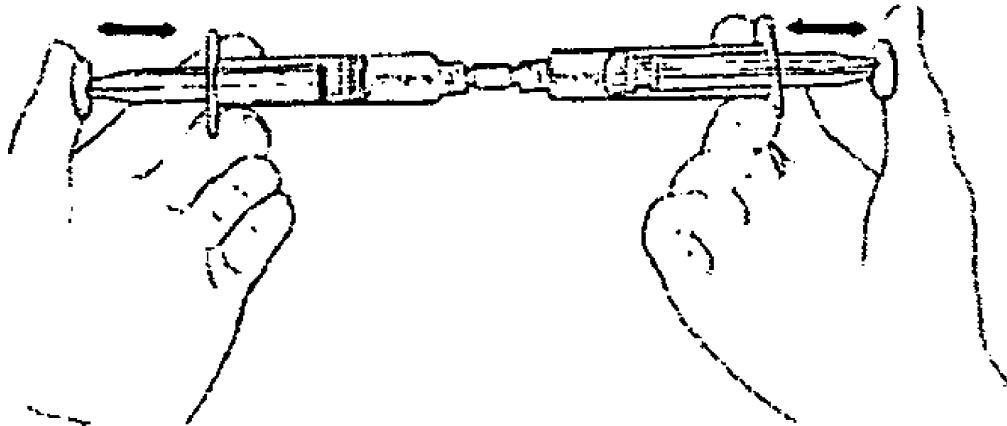
ぎのように投与する：

【0140】

【化1】

マトリックスは1つの注射器で運ばれる。

rhPDGF-BBおよびマトリックスを
第二の注射器に吸い込む。



10

【0141】

20

1. rhPDGF BB溶液の入っているバイアルの中身を、空の注射器および18ゲージ針を使用して、完全に吸引する。全液をバイアルから抽出した後、針を除去し、注射器中に残っている空気を除く。

【0142】

2. TCP / コラーゲンマトリックスの入っている注射器のキャップを取り。プランジャーを10mLの印(mark)まで引き、注射器を軽くたたいてマトリックスをほぐす。プランジャーを8mLの印(mark)まで戻す。

【0143】

3. メス メスルアーロックコネクターを使用して、rhPDGF BB溶液の入っている注射器をマトリックスの入っている注射器とつなげる。

30

【0144】

4. rhPDGF BB溶液をマトリックスの入っている注射器に移す。全rhPDGF BB溶液を移した後、水和したマトリックスの入っている注射器のプランジャーを10mLの印(mark)まで引く。

【0145】

5. 水和したマトリックスの入っている注射器のプランジャーを取り外す。注射器を最小90秒間そのままにする。

【0146】

6. マトリックスを水和した後、中身を20サイクル以上2つの注射器間を往復して移動する。1サイクルは、マトリックスを空の注射器に通して戻すことと定義される。完了すると、マトリックスは、均質なペーストを形成する。

40

【0147】

7. 全ペーストを注射器の1つに移し、マトリックスを含有するプランジャーをゆっくりと引くことによって、混合プロセス中に増大した圧力を取り除く。

【0148】

8. 空の注射器およびメス メスルアーロックコネクターをペーストの入っている注射器から外す。注射器内に残っている空気を除き、14ゲージ針をつなぐ。水和したマトリックスを空隙に注ぐ。必要ならば、最初に力をかけて、ペーストが14ゲージ針を流れるようにする。しかし、いったんペーストが流れ始めたら、流れを維持するのに必要な力を減らす。

50

【0149】

9. 関節整復および固定部位のスクリュー固定の直後に、水和したマトリックスを注意深く手術部位（すなわち、軟骨下空隙、および関節全体にわたって見られる表面の凹凸）に適用する。残りの（未使用の）Augment注射用骨移植片を、固定作成物（fusion construct）の外周まわりに充てんする。

【0150】

10. 新しい骨の形成を高めるために、Augment注射用骨移植片を血管に富んだ骨に直接接触して埋植する。Augment注射用骨移植片材を埋植する前に、皮質骨に穴を開ける。

【0151】

11. Augment注射用骨移植片材料を欠損部位に充填された、骨膜の軟組織および付加的な（overlying）軟組織を注意深く層状にし、移植材料を入れて、封じ込める。これにより、手術部位での流出、骨膜下再吸収、外骨腫症、および潰瘍形成が最小限になる。Augment注射用骨移植片材料の移植後に、移植部位に水がかからないように注意する。

【0152】

12. 標準的な手術手技を用いて、処置を完了する。

【0153】

13. 残りの移植材料を破棄する。

【0154】

<実施例6>
Augment骨移植片およびAugment（商標）注射用骨移植片での治療後の椎体間腰椎固定の決定

本試験の目的は、ヒツジ脊髄固定モデルにおける、自家移植片と比較した、rhPDGF BB（TCP、TCP / コラーゲン）を含有する異なるマトリックスの、L2 / L3 および L4 / L5 椎体の椎体間固定（骨架橋）を促進する能力を決定することであった。

【0155】

試験施設
手術、生存追跡調査、放射線画像および剖検などの本試験の生体内の部分は、Fort Collins、コロラド州にあるコロラド州立大学の臨床科学科の Small Ruminant Comparative Orthopedic Laboratory で行った。マイクロCT画像撮影ならびに組織学過程および評価は、Biomimetic Therapeutics, Inc. Franklin、テネシー州の施設の R & D Laboratory で行った。

【0156】

試験デザイン
22頭のヒツジが、脊椎スペーサーとしてポリエーテルエーテルケトン（PEEK）スペーサーを使用した、固定具を装着しない、2椎間、側方椎体間腰椎固定術を受ける予定であった。

【0157】

PEEK脊椎スペーサーを、次のマトリックスの1つで充てんした：群1 空（Empty）；群2 腸骨稜自家移植片；群3 Augment骨移植片（ABG；TCP + 0.3mg / mL rhPDGF BB）；群4 Augment注射用骨移植片（AIBG；TCP / コラーゲン + 0.3mg / mL rhPDGF BB）。群3および4が評価される被験物質であり；ならびに群2が陽性対照群および群1が陰性対照群であった。

【0158】

レベル間の拡散の可能性、または生体材料全身への影響を避けるために、各ヒツジで、同一の処置をL2 / L3 および L4 / L5 レベルの両方に使用した。群2 ~ 4では評価さ

10

20

30

40

50

れる 10 固定レベルに相当する 5 頭の動物が、群 1 では評価される 14 固定レベルに相当する 7 頭の動物が存在した。腰椎の L 1 ~ L 6 の放射線写真側面像および前後像を、術後 0, 12 および 24 週に撮った。動物は全頭、術後 24 週で犠牲にし、固定部位をひとまとめにして摘出した。固定をマイクロ CT および組織学的分析によって評価した。

【 0159 】

種

22 頭の成長した、雌のランブイエ (Rambouillet) × コロンビア (Colombia) ヒツジを本試験に使用した。ヒツジは全頭、単一の商業的供給源から入手し、試験に参加する前に最短 28 日の順応期間を有した。ヒツジには、個体各々の動物識別用に耳標をつけた。身体検査を行って、健康でない動物を特定し、入れ替えた。動物は全頭、駆虫され、手術の時間前後は大きな動物研究小屋 (barn) で飼い、その後は牧場で飼った。動物全頭には、順応および試験期間を通して、牧草 / アルファルファの干し草ミックスの餌を与えた。SRCOL 職員および CSU Laboratory Animal Resources のグループが、日々の動物の世話をした。10

【 0160 】

生きた動物の使用にかかる全手順は、コロラド州立大学 IACUC によって承認された。

【 0161 】

サンプルサイズ

計 22 頭の動物が、脊椎スペーサーとしてポリエーテルエーテルケトン (PEEK) スペーサーを使用した脊椎固定術を受けた。動物に、L 2 / L 3 および L 4 / L 5 レベルの両方に同じ処置で、次の 1 つを充てんした PEEK スペーサーを入れた：群 1 空 (Empty) (n = 7 頭の動物； 14 固定部位)；群 2 自家移植片 (n = 5 頭の動物； 10 固定部位)；群 3 ABG (n = 5 頭の動物； 10 固定部位)；群 4 AIBG (n = 5 頭の動物； 10 固定部位)。20

【 0162 】

外科手技

外科手術は研究施設の場所で行った。試験依頼者からの代表者が外科手術に立ち会った。術中記録データ記入用紙を手術時に完成させ、執刀医、処置割当群、切開から閉鎖までの時間、および手術時のいかなる異常な所見 / イベントを収録した。30

【 0163 】

手術当日、マレイン酸アセプロマジン (0.05 mg / kg 1M) およびブブレノルフィン (0.005 ~ 0.01 mg / kg 1M) を、麻酔導入前に投与した。全身麻酔の導入に、ジアゼパム (0.22 mg / kg) およびケタミン (10 mg / kg) からなる静脈注射をした。カフ付き気管内チューブを埋植し、再呼吸システムを通して 100 % 酸素 (2 L / 分) 中でハロタン (1.5 % ~ 3.0 %) を用いて、全身麻酔を維持した。動物を人工呼吸器につなぎ、呼吸を補助した。

【 0164 】

動物を右側臥位にして、腰左外側領域から羊毛を取り除いた。腰左外側領域および腸骨棱領域 (自家移植片群のみ) を覆う皮膚を、ポビドンヨウ素 (ベタジン) およびアルコールの消毒を交互に行って、無菌手術の準備をした。次いで、その領域に無菌手術用カバーをして、L 2 / L 3 および L 4 / L 5 の椎間板隙に対する側後腹膜法を施した。初めに、L 4 / L 5 の椎間板隙を特定し、アニュロトミー (anulotomy) を行った。ミダス・レックス (Midas Rex) バー (burr) を使用して、端板を脊椎スペーサー (Vertebral Spacer) CR スペーサーを受け入れる大きさに準備した。40

【 0165 】

脊椎スペーサーの挿入の前に、脊椎スプレッダー (vertebral spreader) を使用して、椎間板隙を開いた。スペーサー、さらにその中身 (0.4 mL) を所定の位置に押し込んだ。実験計画に基づいて、L 4 / L 5 レベルに使用したものと同一の50

被験物質を用いて、同一の手術を L 2 / L 3 に施した。定められた通り外筋膜 (e x t e r n a l m u s c u l a r f a s c i a) (0 P o l y s o r b 吸收性縫合糸、皮下組織 (2 / 0 P o l y s o r b) および皮膚 (2 / 0 モノフィラメント非吸收性縫合糸、F o r d 連結パターン (i n t e r l o c k i n g p a t t e r n) の閉鎖を行った。術前抗生物質 (セファゾリンナトリウム) を投与した。

【0166】

材料の調製

腸骨稜自家移植片採取

背面および側背面腰および腸骨稜領域を、ポビドン ヨウ素とイソプロピルアルコールとで交互に重複消毒して、無菌手術の準備をした。その領域を覆い、腸骨稜の上を 3 cm 切開した。臀部の筋肉の部分反射に続いて、キュレットを使用して、後に陽性対照ヒツジの L 2 / L 3 および L 4 / L 5 において脊椎スペーサー (V e r t e b r a l S p a c e r) C R スペーサーに挿入する自家海綿骨を約 1 c c 摘出した。腸骨稜切開を閉鎖する前に、病巣内 (I n t r a l e s i o n a l) に硫酸モルヒネ (1 . 5 m L (計 22 . 5 m g)) を投与した。腸骨稜上の切開を定められた通り、皮下組織には 2 / 0 P o l y s o r b および皮膚にはステンレス鋼ステープルを使用して閉鎖した。

【0167】

A B G . 移植前に、A B G 移植材料を実施例 3 に従って調製した。水和した A B G を室温で 5 ~ 15 分静置し、次に端を取り外した注射器に移した。注射器を使用して正確なボリュームを P E E K スペーサー (0 . 4 m L) の内部に分注した。

【0168】

A I B G . 移植前に、A I B G 移植材料を実施例 4 に従って調製した。水和した A I B G を室温で 5 ~ 15 分静置し、次に端を取り外した注射器に移した。注射器を使用して正確なボリュームを P E E K スペーサー (0 . 4 m L) の内部に分配した。

【0169】

アフターケア

手術後直ちに、ヒツジを、腰椎術後放射線写真のために手術台から放射線科に移し、適切な P E E K スペーサーインプラント埋植を確認し、固定評価用のベースライン放射線画像を得た。次に、胸臥位にさせ、アルミニウムの家畜用トレーラー (s t o c k t r a i l e r) に載せた。その日の終わりには、手術したヒツジの全頭を獣医学病院 (V e t e r i n a r y M e d i c a l C e n t e r) の研究小屋 (r e s e a r c h b a r n) に移した。ヒツジは全頭、手術および麻酔から何事もなく回復した。ヒツジを試験の初めの 2 週間屋内で飼って、切開部位の治癒をモニターした。術後鎮痛には、フェンタニルパッチおよび 3 日間の経口フェニルブタゾンを与えた。24 週間の試験期間中、動物は普通に歩き回ることができた。

【0170】

生存中観察およびイメージング

臨床的観察

ヒツジは全頭、手術および麻酔から何事もなく回復した。術後試験期間を通して、一般的態度、食欲、手術部位の状況外観、神経的兆候および呼吸窮迫 (r e s p i r a t o r y s t r e s s) について、動物を 1 日 2 回観察した。S R C O L スタッフは、日々の観察およびいかなる有害事象をもエクセルスプレッドシートに記録した。動物は全頭、24 週間の試験期間生存し、本試験中に予定外の動物死亡はなかった。

【0171】

放射線写真

術後直ちに、腰椎の側方および前後放射線写真を撮り、ベースライン測定として 2 つの手術部位 (L 2 / L 3 および L 4 / L 4) を収録し、インプラント埋植を評価した。また、放射線写真を、術後 12 週目に (生体内) および 24 週目に (移植脊椎) で撮った。撮影後、動物は全頭、飼育ユニットに戻した。

【0172】

10

20

30

40

50

剖検ならびの標本採取および取り扱い

術後24週に、AVMA 2007ガイドラインに準拠してペントバルビトンナトリウムの静脈内過剰投与によって、動物全頭を安楽死させた。安楽死の後、腰椎を外植し、軟組織を摘出した。上記のように各脊椎ユニットを放射線撮影した。

【0173】

マイクロCT分析

マイクロCTスキャンおよび分析を、製造元の分析ソフトウェアを使用して μ CT80システム(SCANCO USA, Southeastern, ペンシルベニア州)上で行った。マイクロCT分析の評価項目には、脊椎スペーサーの中心腔全域の骨架橋の評価、および中心腔の骨ボリューム/総ボリューム(BV/TV)が含まれる。

10

【0174】

くわえて、示差密度(differential density)分析を、群2(自家移植片)、群3(ABG)、および群4(AIBG)で行って、修復組織における残留TCPを突き止めた。

【0175】

組織学的分析

採取して、切り取って整えた標本を10%中性緩衝ホルマリン(NBF)に一晩入れ、新しい10%NBFに交換し、次いで、Biometics Therapeutic(BMTI)に翌日配達で発送して、完全に固定し非脱灰組織学(undecalcified histology)に備えた。

20

【0176】

BMTIに到着したら、標本を目録に載せ、必要な場合は再度切り取って整えられ、新しい10%NBFに交換して、真空下で約1週間そのままにした。標本を、段階的なEtOH溶液を数回交換して乾燥し、キシレンおよびメタクリル酸メチル(MMA)できれいにした。次いで、標本を、MMAおよびフタル酸ジブチル(DBP)を含有する3つの溶液(浸潤溶液I、II、およびIII)を使用して、真空下で浸潤した。完了したら、標本をMMA+DBPの新しい溶液およびペルカドックス(Perkadox)16に埋め込み、重合させた。

【0177】

EXACT Cutting/Grindingシステム(EXAKT Technologies, Inc.、オクラホマシティ、オ克拉ホマ州)を使用して各レベルから、脊椎スペーサーの中央部全体にわたる代表的な組織切片(主要評価項目)を得た。さらなる切片を、脊椎スペーサーを取り囲んでいる領域から採った(副次的評価項目)。次に、全切片を適切な厚さに「細かくし」、異染性染色(Sanderson's Rapid Bone Stain)のみ、および/または対比染色(Van Giesonピクロフクシン(picrofuschin))と組み合わせを使用して染色して、骨形態の評価に使用する従来型の三重染色を得た。

30

【0178】

加工、切片化、および染色に続いて、(固有の識別番号で)個々にラベルした切片を以下のスコア化法に基づいて採点した(Toth, J., et al., Evaluation of 70/30 poly(L-lactide-co-D,L-lactide) for use as a resorbable interbody fusion cage. Journal of Neurosurgery: Spine, 2002. 97(4 Suppl): p.423-432; Sandhu, H.S., et al., Histologic evaluation of the efficacy of rhBMP-2 compared with autograft bone in sheep spinal anterior interbodyfusion. Spine, 2002. 27(6): p.567575; Toth, J.M., Wang, M., Estes, B.T., Scifert, J.L., Seim, H.B., Turner, A.S., Polyetheretherketone as a biomaterial for spinal applications. Biomaterials, 2006. 27(3 (Special Issue)): p.324-334.):

40

【0179】

総固定: 50%を超えるスライドが連続した骨架橋を示した。

【0180】

50

部分固定：50%未満のスライドが連続した骨架橋を示した。

【0181】

無固定：連続した骨架橋無し。

【0182】

統計的手法

ノンパラメトリックデータ（マイクロCTおよび組織学的癒合スコア）については、順位での分散分析（ANOVA on ranks）とポストホックダン検定（Dunn's test）で、パラメトリックデータ（総ボリューム分の骨ボリュームおよびミネラルの密度）については、一元配置分散分析（one way ANOVA）とホルム・シダック（Holm-Sidak）ポストホックテストを使用して、処置群の比較を実施して、群間の差を決定した。 10

【0183】

結果

マイクロCT

統計的分析により、群間で差があることが明らかになり（順位での分散分析（ANOVA on ranks）； $p = 0.021$ ）、空（Empty）対照と比べて、ABGは有意に高い固定率を有した（ポストホックダン検定（Dunn's test））。自家移植片、ABGまたはAIBGの癒合スコアの間には、有意差は見られなかった。

【0184】

治療群は、少なくとも1つの固定成功標本を有した（2.00のスコア）。ABG処置群およびAIBG処置群ではともに、完全に固定されたとしてスコアを得た標本が6つあった一方で（表2）、空（Empty）群および自家移植片群ではそれぞれ2および3標本であった。 20

【0185】

各処置群についてのマイクロCT癒合スコアのまとめを表1に示し、個々のマイクロCT癒合スコアを表2に示す。各標本からの代表的なマイクロC画像を図1Aおよび1Bに示す。

【0186】

【表1】

表1. 各処置群のマイクロCT癒合スコア

群	平均値	標準偏差	中央値	最大値	最小値
空(Empty)	0.72	0.62	0.61	2.00	0.00
自家移植片	1.63	0.48	1.81	2.00	0.67
ABG*	1.58	0.78	2.00	2.00	0.00
AIBG	1.44	0.74	2.00	2.00	0.22

*: 空(Empty)と差がある; $p=0.021$

【0187】

30

40

【表2】

表2. 個々の標本各々のマイクロCT癒合スコア

空(Empty)		自家移植片		ABG		AIBG	
ID	スコア	ID	スコア	ID	スコア	ID	スコア
02A	0.00	28A	1.78	48A	1.72	54A	0.22
02B	1.00	28B	0.89	48B	2.00	54B	0.83
08A	0.89	34A	2.00	49A	2.00	55A	2.00
08B	0.61	34B	1.67	49B	0.00	55B	2.00
15A	0.61	41A	0.67	50A	2.00	56A	0.94
15B	0.11	41B	1.94	50B	2.00	56B	0.44
18A	0.50	47A	1.83	51A	2.00	57A	2.00
18B	0.39	47B	1.50	51B	2.00	57B	2.00
22A	2.00	53A	2.00	52A	1.89	58A	2.00
22B	2.00	53B	2.00	52B	0.22	58B	2.00
23A	0.89						
23B	0.61						
25A	0.39						
25B	0.06						

P E E K スペーサー内の総ボリューム分の骨ボリューム (B V / T V ; %) の分析により、処置群の間に差がないことが明らかになった (一元配置分散分析 (o n e w a y A N O V A) 、 $p = 0.308$)。各処置群についての値のまとめを表3に示し、個々の B V / T V 値を表4に示す。

【0188】

【表3】

表3. 各治療群の総ボリューム分の骨ボリューム(%)

群	平均値	標準偏差
空(Empty)	64.46%	11.69%
自家移植片	67.22%	14.77%
ABG	75.82%	15.39%
AIBG	63.59%	22.68%

【0189】

10

20

30

40

【表4】

表4. 個々の標本各々の総ボリューム分の骨ボリューム(%)

空(Empty)		自家移植片		ABG		AIBG	
ID	BV/TV	ID	BV/TV	ID	BV/TV	ID	BV/TV
02A	53.60%	28A	82.14%	48A	68.33%	54A	27.53%
028	69.42%	288	79.18%	488	76.94%	548	39.69%
08A	64.53%	34A	63.36%	49A	77.41%	55A	60.92%
088	64.14%	348	70.81%	498	47.70%	558	83.14%
15A	56.97%	41A	35.87%	50A	77.15%	56A	42.26%
158	60.24%	418	65.14%	508	95.22%	568	47.88%
18A	52.34%	47A	73.74%	51A	90.59%	57A	84.98%
188	69.05%	478	76.83%	518	93.12%	578	87.84%
22A	80.48%	53A	48.33%	52A	75.59%	58A	84.59%
228	93.96%	538	76.80%	528	56.18%	588	77.08%
23A	58.91%						
23B	64.07%						
25A	56.43%						
25B	49.23%						

【0190】

スペーサー内の骨の密度の分析により、処置群の間に差があることが明らかになった（一元配置分散分析（one way ANOVA、 $p < 0.001$ ）。ABG群での密度は、他の群（ポストホックホルム シダック（Holm-Sidak）テスト）とくらべて高く、AIBGおよび自家移植片では、密度は空（Empty）より低く、相互には差はなかった。個々の骨密度値（mg HA / cm³）を表5に示し、各群についての値のまとめを表6に示す。

【0191】

10

20

30

【表5】

表5. 個々の標本各々の骨密度値(mgHA/cm³)

空(Empty)		自家移植片		ABG		AIBG	
ID	密度	ID	密度	ID	密度	ID	密度
02A	637.77	28A	621.59	48A	647.25	54A	626.59
028	648.86	288	646.98	488	671.65	548	632.76
08A	645.28	34A	628.83	49A	670.67	55A	613.63
088	649.03	348	672.10	498	712.87	558	662.62
15A	686.85	41A	591.72	50A	712.07	56A	624.98
158	663.97	418	604.24	508	701.96	568	624.72
18A	634.10	47A	619.71	51A	680.15	57A	609.43
188	652.43	478	638.57	518	675.05	578	629.01
22A	657.35	53A	617.83	52A	684.98	58A	636.52
22B	671.03	538	614.70	528	649.75	588	595.84
23A	269.63						
23B	655.11						
25A	696.69						
25B	678.90						

【0192】

【表6】

表6. 各処置群の骨密度値(mgHA/cm³)

群	平均値	標準偏差
空(Empty)	657.64	19.85
自家移植片	625.63	22.69
ABG*#	680.64	23.05
AIBG	625.61	17.78

: 空(Empty)と差がある; p < 0.001

: AIBGおよび自家移植片と差がある; p < 0.001

【0193】

P E E K スペーサー内の骨のミネラルの密度の詳細な分析(表7ならびに図2Aおよび2B)より、ABG 処置標本が、恐らく残留 T C P に相当すると思われる、高いミネラルの密度(> 900 mg HA / cm³)の領域を示すことが明らかとなった。これらの領域は、A I B G 処置標本では顕著ではなく、自家移植片処置標本にも空(Empty)標本にも存在しなかった。ABG 処置標本の物質密度は、正常な骨の物質密度の最もよく似たものである。表7は、自家移植片、ABG、およびA I B G 処置群、ならびに新たに調製したABGおよびA I B Gにおける密度の比較を示す。

【0194】

10

20

30

40

【表7】

表7. 各処置群の骨密度(mgHA/cm³)分布

群	450 – 600	600 – 750	750 – 900	900 – 1,200	> 1,200
自家移植片	61%	37%	2%	0%	0%
ABG	39%	47%	10%	4%	0%
AIBG	64%	34%	2%	0%	0%
正常な骨	47%	50%	10%	4%	0%
新たに調製した ABG	15%	14%	14%	28%	28%
新たに調製した AIBG	47%	26%	10%	4%	0%

【0195】

組織学

統計的分析により、群間で差があることが明らかになり（順位での分散分析（A N O V A on ranks）； $p = 0.008$ ）、空（Empty）対照の癒合スコアと比べて、ABG処置群の癒合スコアは有意に高かった（ポストホックダン検定（Dunn's test））。

【0196】

治療群は、少なくとも1つの固定成功標本を有した（2.00のスコア）。ABG処置群では、完全に固定されたとしてスコアを得た標本が7つあり（表9）、AIBG処置群および自家移植片処置群では、この標本が5つあり、空（Empty）群では、14標本中1つであった。また、空（Empty）群は、零点を付けられた標本があった唯一の群であった。各処置群からの代表的な組織画像を図3Aおよび3Bに示す。ABG処置群およびAIBG処置群では、残留TCP粒子を目で見ることができた。これらの粒子は、修復組織の特定の領域に選択的に位置しているではなく、ランダムに位置しているように見えた。粒子は、線維性被包の兆候なしに、骨に取り囲まれていた（図4）。幾つかのケースでは、TCP粒子は、固定が不成功であった領域で見られた。これは、ABG処置群で2つの標本にあったケースであり、この領域で見られた粒子は、非常に大きいサイズであるように思われた。AIBG処置標本において固定しなかった領域の幾つかでは、軟骨組織が見つかり、そのうち1つの標本では、この組織は、TCP粒子のまわりに見られた。

【0197】

各処置群についての組織学的癒合スコアのまとめを表8に示し、個々の組織学的癒合スコアを表9に示す。

【0198】

10

20

30

40

【表8】

表8. 各処置群の組織学的癒合スコア

群	平均値	標準偏差	中央値	最大値	最小値
空(Empty)	0.61	0.51	0.58	2.00	0.00
自家移植片	1.45	0.64	1.67	2.00	0.33
ABG*	1.62	0.73	2.00	2.00	0.17
AIBG	1.43	0.70	1.92	2.00	0.50

10

【0199】

【表9】

表9. 個々の標本各々の組織学的癒合スコア

3名の独立した観察者によって各々評価された2切片の平均スコアの平均値

空(Empty)	自家移植片	ABG		AIBG	
ID	スコア	ID	スコア	ID	スコア
02A	0.17	28A	1.17	48A	1.67
02B	0.67	28B	0.33	48B	2.00
08A	1.00	34A	2.00	49A	2.00
08B	0.33	34B	1.33	49B	0.17
15A	0.00	41A	1.00	50A	2.00
15B	0.00	41B	2.00	50B	2.00
18A	0.33	47A	2.00	51A	2.00
18B	0.67	47B	0.67	51B	2.00
22A	1.00	53A	2.00	52A	2.00
22B	2.00	53B	2.00	52B	0.33
23A	0.67				
23B	0.67				
25A	0.50				
25B	0.50				

20

30

【0200】

結論

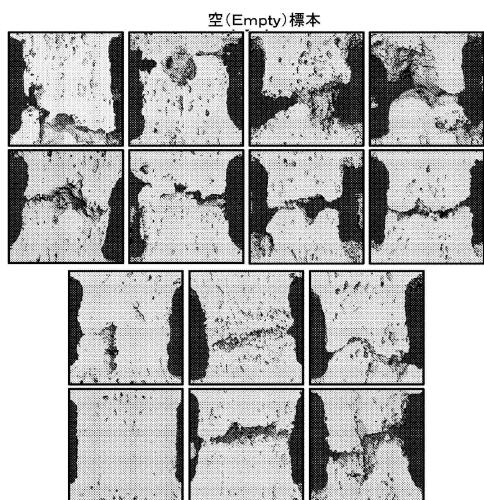
ABG 処置標本は、評価された全群の中で、癒合スコアが最も高かった。ABG は、空のPEEKスペーサーに比較して、有意に椎体間脊椎固定を促進する。

【0201】

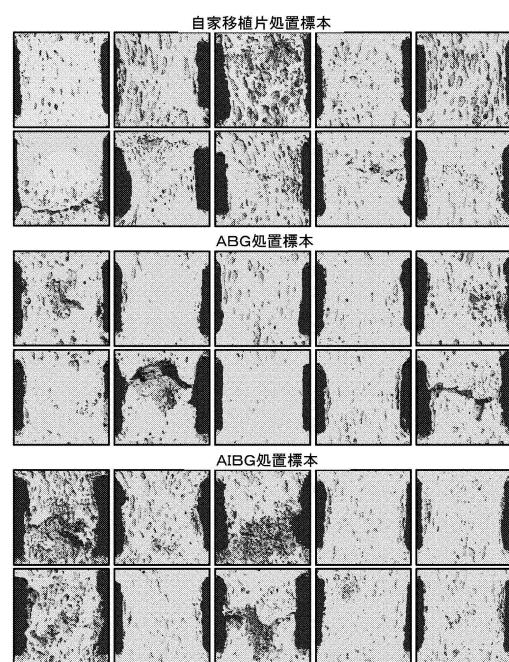
上に引用されたすべての特許、文献および要約は、参照によりそれら全体が本明細書に取り込まれる。前述の内容は本発明の好ましい実施形態にのみ関連し、数多くの変更および修正形態が、以下の特許請求の範囲に規定される本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく本発明中でなされうることを理解すべきである。

40

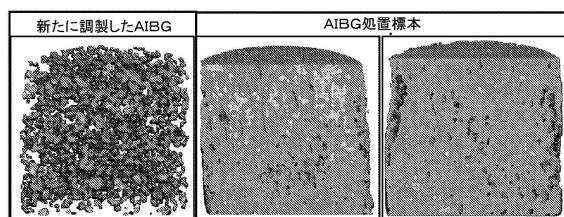
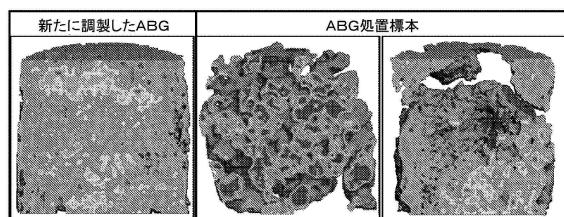
【図1A】



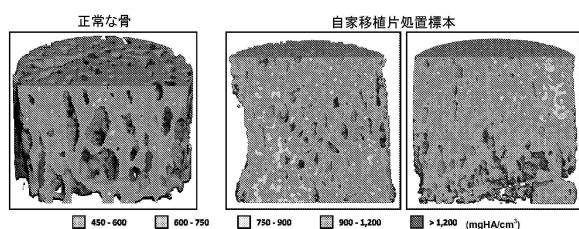
【図1B】



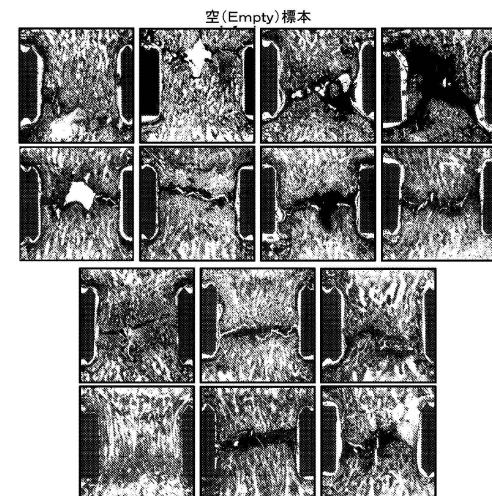
【図2A】



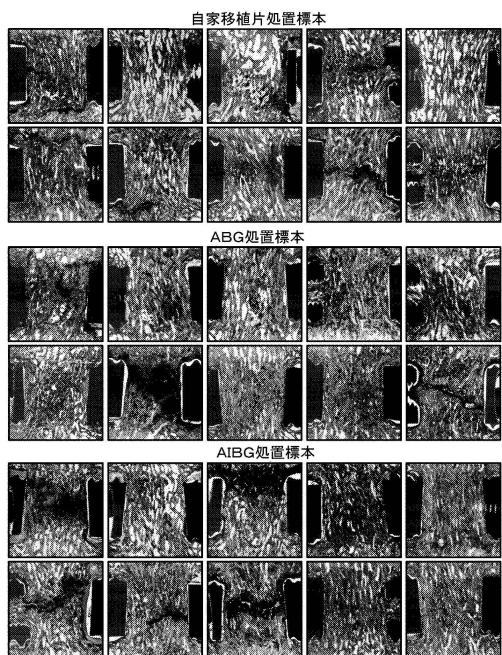
【図2B】



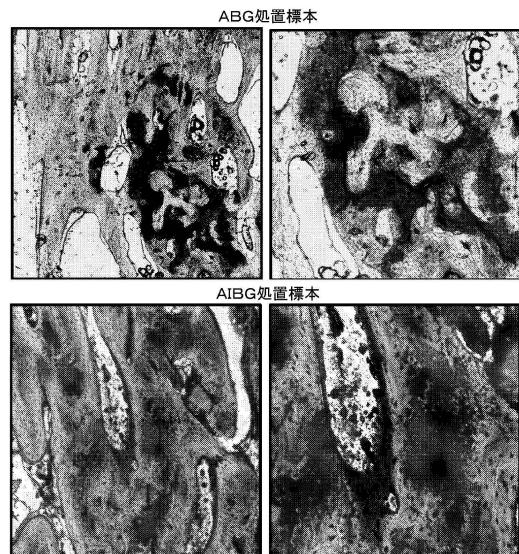
【図3A】



【図3B】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 リンチ , サミュエル イー .

アメリカ合衆国 テネシー 37064 フランクリン サウスオール ロード 3340

(72)発明者 スネル , レオ ビー .

アメリカ合衆国 テネシー 37069 フランクリン テンブル クレスト ドライブ 121

8

(72)発明者 ヒー , クリストファー ケー .

アメリカ合衆国 テネシー 37174 スプリング ヒル クレストウッド レーン 137

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 国際公開第2008/151193 (WO , A1)

米国特許出願公開第2006/0292200 (US , A1)

米国特許出願公開第2010/0183515 (US , A1)

J. Control. Release., 2009, Vol.140, No.3, pp.250-255

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 61 L 15 / 00 - 33 / 18

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)