(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2006-506108
(P2006-506108A)
(43)公表日　平成18年2月23日(2006.2.23)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61L 27/00	(2006.01)	A61L 27/00	E	4B033
A61F 2/24	(2006.01)	A61F 2/24		4C081
C12N 11/08	(2006.01)	C12N 11/08	H	4C097

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 21 頁）

(21)出願番号　特願2004-529950 (P2004-529950)
(86)(22)出願日　平成14年9月4日(2002.9.4)
(85)翻訳文提出日　平成17年2月1日(2005.2.1)
(86)国際出願番号　PCT/EP2002/009906
(87)国際公開番号　WO2004/018008
(87)国際公開日　平成16年3月4日(2004.3.4)
(31)優先権主張番号　10235237.2
(32)優先日　平成14年8月1日(2002.8.1)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

(71)出願人　505040280
シメティス　アクチェンゲゼルシャフト
スイス　ツェーハー８００５　チューリッヒ　テクノパークシュトラーセ　１
(74)代理人　100082005
弁理士　熊倉　禎男
(74)代理人　100084009
弁理士　小川　信夫
(74)代理人　100084663
弁理士　箱田　篤
(74)代理人　100093300
弁理士　浅井　賢治
(74)代理人　100114007
弁理士　平山　孝二

最終頁に続く

(54)【発明の名称】同種ステンテッド組織工学的心臓弁の生体外製造方法

(57)【要約】
本発明は、同種ステンテッド組織工学的心臓弁の生体外製造方法に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
同種心臓弁の生体外製造方法であって、以下の工程、
－生分解性支持体（骨格）の供給、
－結合組織マトリックスを形成するための、前記支持体と同種線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞とのコロニー形成、
－任意に、前記結合組織マトリックスと内皮細胞とのコロニー形成、
－前記マトリックスの非分解性又は不十分に分解性のフレーム構成（ステント）への固定化、
を含み、前記フレーム構成への固定化の前及び／又は後に、任意に前記内皮細胞と共にコロニー形成した前記結合組織マトリックスを、増加する流速にさらすことができる脈動流チャンバー中に導入し、かつ該流速を連続的又は不連続的に増加させることを特徴とする方法。
【請求項２】
同種心臓弁の生体外製造方法であって、以下の工程、
－非分解性又は不十分に分解性のフレーム構成（ステント）に堅く結合している生分解性支持体（骨格）の供給、
－結合組織マトリックスを形成するための、前記支持体と同種線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞とのコロニー形成、
－任意に、前記結合組織マトリックスと内皮細胞とのコロニー形成、
－前記結合組織マトリックスが結合している前記フレーム構成の、増加する流速にさらすことができる脈動流チャンバー中への導入、
－前記流速の連続的又は不連続的増加、
を含む、前記方法。
【請求項３】
前記生分解性支持体が、生分解性ポリマーマトリックス又は無細胞生体マトリックスである請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記支持体が、ポリグリコール酸（ＰＧＡ）、ポリ乳酸（ＰＬＡ）、ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）、ポリ-4-ヒドロキシブチレート（Ｐ４ＨＢ）又はこれらポリマーの２種以上の混合物である請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記支持体が、40～120mg/cm^3、好ましくは50～80mg/cm^{3}のポリマー密度を有する請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記支持体が、80～240μmの孔サイズを有する多孔性ポリマーである請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記支持体の繊維が、６～20μm、好ましくは10～18μmの直径を有する請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記支持体が、動物又はヒトの心臓弁の結合組織フレームワークである請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞とのコロニー形成工程を３～14回、好ましくは５～10回繰り返す請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
支持体／マトリックス１平方センチメートル及びコロニー形成工程について約10^5～６×10^8個の線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞を利用する請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１】
前記内皮細胞とのコロニー形成工程を３～14回、好ましくは５～10回繰り返すことを特徴とする請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
支持体／マトリックス１平方センチメートル及びコロニー形成工程について約10^5～５×10^8個の内皮細胞を利用する請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞及び／又は内皮細胞が、ヒト細胞である請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞及び／又は内皮細胞が、自己細胞である請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記フレーム構成が、生体適合性の非分解性材料製である請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記フレーム構成が、生体適合性の不十分に分解性の材料製である請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記支持体を、通常の縫合法及び／又はフィブリン接着剤を用いて前記フレーム構成に固定させる請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
前記脈動流チャンバー内で、５ml/分～8,000ml/分、好ましくは50～2,000ml/分の流速を確立する請求項１～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
前記流速を、１～12週間の期間にわたって増加させる請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
初期流速が、50～100ml/分である請求項１～１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１】
初期脈拍数が、５～10脈拍/分である請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
前記流速を、5,000ml/分に増加させる請求項１～２１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
前記脈拍数を、180脈拍/分に増加させる請求項１～２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
前記脈動流チャンバー内で、10～240mmHgの系圧力を確立する請求項１～２３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
請求項１～２４のいずれか１項に記載の方法で製造したことを特徴とする自己心臓弁。
【請求項２６】
内皮細胞層で取り囲まれた結合組織内部構造を有する自己心臓弁であって、非分解性又は緩徐分解性のフレーム構成（ステント）に固定されていることを特徴とする前記自己心臓弁。
【請求項２７】
前記結合組織中心部内に、20～60%のコラーゲン密度が存在する請求項２６に記載の自己心臓弁。
【請求項２８】
ヒトの心臓内の流れ条件に耐える請求項２７に記載の自己心臓弁。
【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】
【０００１】
毎年、米国だけで約20,000人の患者が心臓弁機能障害で死亡し、60,000人を超える患者が既に検出された機能障害のため外科的に１つ以上の心臓弁の置換をせざるをえない。患者自身の心臓弁について可能な置換は機械的又は生物学的な弁プロステーシス（異種移植片）であり、低温保存又はグルタルアルデヒド固定化同種移植片はあまり使用されない。
しかし、機械的な弁プロステーシスは、血栓塞栓性合併症を伴う異物反応をもたらすことが多く、人工心臓弁によって変わる心臓内の流れ条件によって促進される。従って、出血の永久危険亢進につながるので、発症した患者には終生の抗凝血治療が必要である。感染は、患者にとってさらに頻繁に生命を脅かす合併症である。
【０００２】
異種移植片は、通常グルタルアルデヒドで処理したブタの弁である。ブタの弁プロステーシスを高齢患者に利用すると良い結果をもたらすが、たった約12～15年後に変性する傾向があるので、原則として若い人には適さない。さらに健康な心臓に比べてブタの弁プロステーシスでは感染の危険が高い。さらに、ブタの弁は石灰化する傾向があり、このため高いカルシウム代謝を有する子供や若い人には適さない。最後に、それらはさらに外因性組織であり、内因性免疫系によって外来性として認識される特定の確率があるので、有害な免疫プロセスを引き起こしうる。
【０００３】
第３の可能性として、同種移植片、すなわち、ヒトドナーから単離した固定化心臓弁を利用できる。同種移植片は、確かに感染に対して比較的耐性であるが、同様に特定の確率で免疫反応を引き起こす外因性組織である。さらに、ブタの弁プロステーシスと等しく石灰化する傾向があるので、かなり変性しやすく、原則として７～12年後に再手術の必要がある。さらに、同種移植片の利用能は極端に制限されている。
これら欠点に加え、これまでに置換弁として使用されている弁プロステーシスについては、免疫反応の誘発、感染の危険亢進、血栓塞栓プロセスの危険及び変性する傾向について既に述べられており、これまでに知られているすべての弁は無機材料又は固定化有機材料製なので、それらは生きているマトリックスの重要な特性、例えば修復プロセス、再構成又は成長の能力を欠くという一般的特徴を有する。このことから、とりわけ子供の弁患者では、これまでは定期的に再手術を受けなければならなかった。しかし、いずれの心臓手術も本来備わっている危険に加え、先行する手術のため胸郭内で相当な癒合が起こるので、再手術のたびに罹患率及び死亡率リスクが上昇する。
【０００４】
従って、上記欠点を回避する置換心臓弁に対する差し迫った要望がある。この目的のため、組織工学による人工心臓弁の製造は既に提案されている。組織工学は、体内の組織上又は全臓器系上にでさえ成長する“バイオハイブリッド”移植片の発生に関係がある。個々の弁小葉の形態のバイオハイブリッド心臓弁の製造についても既に記載されているが、これまでに組織工学で製造された心臓弁小葉は、不適切で不十分な結合組織構造を有するので、生分解性支持体構造が分解した後、心臓内で広く行きわたる流れ条件に耐えられないという欠点があった。
DE 19919625は、同種心臓弁の生体外製造方法について述べている。そこで記述されている心臓弁は、生分解性支持体上に構築され、同種線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞と共にインキュベートして結合組織様マトリックスを形成してから内皮細胞と共にコロニー形成される。そして、結合組織様マトリックスを組織の成熟のためバイオリアクター中に移す。この心臓弁は、人体内の流れ条件に最もよく適応する。DE 19919625に記載されている心臓弁は、その移植の時、ほぼ全体的に自己細胞物質を含んで、受け側の心臓中に縫い付けられる。特定の環境下では、この心臓弁の１つの欠点は、外科的移植術を行うのが技術的に困難なことである。縫い付ける予定の自己の組織工学的組織に縫合糸を通さなければならい場合、さらに問題があるだろう。極端に高い負荷のため、引き続き人体内にさらされる心臓弁は、縫合糸の部分に引裂きが生じるだろう。

【０００５】
従って、本発明の目的は、改良された同種心臓弁及びその製造方法を提供することである。
この目的は、本発明により、以下の工程、
－生分解性支持体（骨格）の供給、
－結合組織マトリックスを形成するための、前記支持体と同種線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞とのコロニー形成、
－任意に、前記結合組織マトリックスと内皮細胞とのコロニー形成、
－前記結合組織マトリックスの非分解性又は不十分に分解性のフレーム構成（ステント）への固定化、
を含み、フレーム構成への固定化の前又は後に、任意に内皮細胞と共にコロニー形成した前記結合組織マトリックスを、増加する流速にさらすことができる脈動流チャンバー中に導入し、かつ該流速を連続的又は不連続的に増加させる、同種心臓弁の生体外製造方法によって達成される。
【０００６】
代替法では、以下の工程によって同種心臓弁を製造する。
－非分解性フレーム構成（ステント）に堅く結合している生分解性支持体（骨格）の供給、
－結合組織マトリックスを形成するための、前記支持体と同種線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞とのコロニー形成、
－任意に、前記結合組織マトリックスと内皮細胞とのコロニー形成、
－前記結合組織マトリックスが結合している前記フレーム構成の、増加する流速にさらすことができる脈動流チャンバー中への導入、
－前記流速の連続的又は不連続的増加。
【０００７】
本発明の方法により、DE19919625から分かる心臓弁のすべての利点を有し、かつさらに心臓弁の移植時に、縫合糸を心臓弁の結合組織構造に通す必要性を回避する同種心臓弁を製造することができる。この同種心臓弁は、体内に広く行きわたっている流れ条件に耐え、かつ外科的移植が容易である。
以下、本発明の心臓弁の製造方法は及びその方法で製造される心臓弁についてさらに詳細に説明する。
以下の説明で、用語“支持体”は、さらに詳細に後述するように、合成繊維又は無細胞結合組織フレームワークから形成される無細胞構造を意味する。用語“マトリックス”は、線維芽細胞及び筋線維芽細胞に加え、細胞外マトリックスの典型的構成要素、すなわちコラーゲン、エラスチン及びグリコサミノグリカンを含む結合組織構造を表す。マトリックスと呼ばれる構造は、典型的に、分解を受ける支持体構成要素を含み、或いはもはやいずれの支持体構成要素をも含まない。
【０００８】
本発明の方法を実施するため、まず生分解性支持体を供給する。支持体材料は、一方で線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞との十分なコロニー形成又は浸透を可能にし、かつ結合組織マトリックスの形成を達成できるように特定の時間この文脈内で安定でなければならず、かつ他方で許容しうる時間、理想的には同種弁プロステーシスの形成にかかる時間より短い時間内で全体的に分解できなければならない。約８日後に分解が始まるのが好ましく；原則として３カ月未満、好ましくは４～６週間後既に完了すべきである。
固体結合組織マトリックス構造の形成後、該マトリックス構造の分解性支持体はまだ分解する必要がなく、任意に内皮細胞と共にコロニー形成させる。コロニー形成が起こった後、非分解性又は不十分に分解性のフレーム構成に結合組織マトリックスを適用する。しかし、代わりに、フレーム構成に既に堅く結合している支持体をコロニー形成工程に供することができる。可能な代替変形方法について以下にさらに詳述する。
【０００９】

本発明の１つの変形方法では、まず生分解性支持体（骨格）を同種線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞と共にコロニー形成させて結合組織マトリックスを形成する。このマトリックスは、任意に内皮細胞とコロニー形成させる。本発明により、組織を成熟させ、かつ血行動態機能を最適化するためのさらなる方法工程で、心臓弁類似の該プレフォームド構造を、増加する流速にさらすことができる脈動流チャンバー中に導入することができる。流速の連続的又は不連続的増加によって、ここで人体内の流れ条件にそれを適応させる。さらなる安定化のため、心臓弁に類似の該構造を非分解性又は不十分に分解性の材料の生体適応性フレーム構成に固定させ、任意に再び脈動流チャンバー中に導入する。フレーム構成への固定化後、脈動流チャンバー内でヒトの心臓内の流れ条件に適応させる場合、脈動流チャンバー内での最初のインキュベーションを省くことができる。これら方法によって、人体内の流れ条件に耐える活気のある心臓弁プロステーシスが得られる。

【００１０】

本発明の方法の代替変形法では、コロニー形成前、非分解性又は不十分に分解性のフレーム構成（ステント）に生分解性支持体（骨格）を予め堅く結合させることができる。さらなる工程で、フレーム構成に結合している支持体を同種線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞とコロニー形成させてから、任意に内皮細胞とコロニー形成させて結合組織マトリックスを形成する。組織を成熟させ、かつ血行動態機能を最適化するため、心臓弁に類似の該プレフォームド構造を、増加する流速にさらすことができる脈動流チャンバー中に導入する。この手順により、流速の連続的又は不連続的増加によって、同様に人体内の流れ条件に耐える活気のある心臓弁プロステーシスが得られる。

【００１１】

全体的に、以下の変形方法に帰する。

変形１：　－フレーム構成のない支持体の供給
－コロニー形成
－脈動流チャンバー内での適応
－非分解性又は不十分に分解性のフレーム構成（ステント）への固定化
－妥当な場合、“ステンテッド”心臓弁の再適応

変形２：　－フレーム構成のない支持体の供給
－コロニー形成
－非分解性又は不十分に分解性のフレーム構成（ステント）への固定化
－“ステンテッド”心臓弁の適応

変形３：　－非分解性又は不十分に分解性のフレーム構成上の支持体の供給
－コロニー形成
－適応

【００１２】

支持体は、好ましくは多孔性ポリマー構造に基づくポリマー繊維又は無細胞生体組織から構築される構造である。この用途に好適な合成ポリマーには、ポリグリコール酸（ＰＧＡ）、ポリ乳酸（ＰＬＡ）、ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）及びポリ-4-ヒドロキシブチレート（Ｐ４ＨＢ）、ポリカプロラクトン、（ＰＬＧＡ）、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリ無水物、ポリアミノ酸、ポリオルトエステル、ポリアセテート、ポリシアノアクリレート及び分解性ポリウレタンのような生物浸食性ポリマー、及びポリアクリレート、エチレン／酢酸ビニルポリマー及び他の置換酢酸セルロースアセテートのような非浸食性ポリマー、並びにそれらの誘導体が包含される。ここではポリエステルが好ましい。

好ましい生分解性ポリマーとしては、以下の群：ヒドロキシカルボキシ酸のポリエステル、ジカルボキシエステルのポリ無水物及びヒドロキシカルボキシ酸とジカルボキシエステルのコポリマー；から選択されるポリマーが挙げられる。

さらなる実施形態では、支持体は、以下のモノマー：グルコリド、ラクチド、p-ジオキサノン、カプロラクトン、トリメチレンカーボネート及びブチロラクトン；の少なくとも１種の合成ポリマー製である。特定の実施形態では、該材料は、グリコール酸、乳酸及び

セバシン酸のポリマー又はコポリマーから成る群より選択される。ここではポリグリコール酸ポリマーが好ましい。

これらポリマーは、純粋な形態で、或いは述べた物質の２種以上の混合物又はこれら物質とさらなる生分解性ポリマーとの混合物の形態で使用することができる。好ましい実施形態では、85％のＰＧＡと15％のＰＬＡのコポリマーを使用する。

【００１３】

さらに好ましい実施形態では、ポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）から支持体を製造する。この文脈のＰＨＡは、さらに非分解性ポリマーで被覆することができる。この用途で好ましいポリヒドロキシアルカノエートは、９カ月以内、さらに好ましくは６カ月未満でさえ、最も好ましくは３カ月未満で生体内で分解する。ポリヒドロキシアルカノエートの好ましい組成物は、2-、3-、4-又は5-ヒドロキシ酸、例えばポリ-4-ヒドロキシブチレートを含む。本組成物は、さらにポリ-4-ヒドロキシブチレート-co-3-ヒドロキシブチレート及びその組合せを含む。この文脈ではポリ-4-ヒドロキシブチレートが最も好ましい。

さらに特定の実施形態では、支持体は、以下のモノマーのいすれかの所望の組合せのホモポリマー及びコポリマー製である：3-ヒドロキシブチレート、3-ヒドロキシバレレート、3-ヒドロキシプロピオネート、2-ヒドロキシブチレート、4-ヒドロキシブチレート、4-ヒドロキシバレレート、3-ヒドロキシヘキサノエート、3-ヒドロキシヘプタノエート、3-ヒドロキシオクタノエート、3-ヒドロキシノナノエート、3-ヒドロキシトリデカノエート、3-ヒドロキシテトラデカノエート、3-ヒドロキシペンタデカノエート、3-ヒドロキシヘキサデカノエート、3-ヒドロキシヘプタデカノエート及び3-ヒドロキシオクタデカノエート。

【００１４】

約40～120mg/cm^{3}のポリマー密度を有する生分解性支持体を使用することが妥当なことが分かった。40mg/cm^{3}未満では、ポリマー組織が不安定すぎ、かつ120mg/cm^{3}を超えると、ポリマー組織の密度が高すぎ、許容しうる時間内で線維芽細胞を浸透させられない。好ましい実施形態では、生分解性支持体の密度は、50～80mg/cm^3、特に好ましくは70mg/cm^{3}までである。本発明では、Albany International Reserch, Mensville, MA, USAの約70mg/cm^{3}の密度を有するポリマー支持体、及びTRANSOME INC., Palm Bay, FL. USAのポリマー支持体を用いて良い結果を得た。

支持体の繊維は、６～20μｍ、好ましくは10～18μｍの直径を有しうる。しかし、他の繊維厚を有する組織も考えられるが、一方でこれらは特定の安定性を支持体に与えなければならず、かつ他方でそれらは線維芽細胞又は筋線維芽細胞との支持体のコロニー形成及び浸透を可能にしなければならない。多孔性（スポンジ様）ポリマー形態では80～240μｍの孔サイズが好適であることが分かった。孔は、専門家に周知のいわゆる塩浸出法によって得ることできる。

【００１５】

上述したような合成支持体の代わりに、無細胞結合組織フレームワークの使用が考えられる。従って、例えば、ブタの弁を免疫学的に中性の組織に変換してから（Baderら, Eur. J. Cardiothorac. Surg. 14, 279, 1998）、同種細胞とコロニー形成させることができる。ヒトの心臓弁を、この場合もやはり中性化後コロニー形成させることもできる。

まず生分解性支持体を線維芽細胞集団と共にインキュベートする。同種線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞、すなわち必ずしも該患者でないヒト由来の線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞を使用する場合、ＨＬＡ型が同一であることを保証すべきである。線維芽細胞集団は、この文脈では、例えば末梢血管、動脈と静脈の両者から得られる。前腕の橈骨動脈は、腕の二重動脈供給のため、多くの場合無害な外移植に利用でき、このため特に好適である。代わりに、足の血管、例えば伏在静脈から血管細胞を得ることができる。さらに、骨髄前駆体細胞又は多分化能性幹細胞若しくは遺伝的に操作した細胞から筋線維芽細胞及び内皮細胞を得ることができる。

【００１６】

例えば、Zundら（Eur. J. Cardiothorac. Surg. 13, 160, 1998）に記載されているように、まず組織の破片を組織断片に切断し、約１～２週間正常の細胞培養条件下（37℃、５％のCO_2、95％の周囲湿度）で、培養皿の基剤上で細胞が集密的な細胞層を形成するまでインキュベートする手順によって、血管断片から細胞を得ることができる。そして、残存組織物質がない細胞培養を得るため、それら細胞を数回継代培養に供する。２～３回の継代培養後、混合細胞集団を、内皮細胞に特異的な蛍光マーカー（Dil-Ac-LDL, Medical Technologies Inc., Stoughton, MA）と共にインキュベートし、フローサイトメトリー（FACStar Plus, Becton, MA）を用いて分離する手順で精製することができる。蛍光で標識される細胞は内皮細胞であり、非標識化細胞は線維芽細胞及び筋線維芽細胞である。これらをさらに２～３週間インキュベートし、その後の支持体のコロニー形成に十分な数の細胞を得るため、この期間に２～４回の継代培養に供する。

【００１７】

上述したように精製した線維芽細胞／筋線維芽細胞培養又はいずれの他の純粋な線維芽細胞／筋線維芽細胞培養もポリマー支持体のコロニー形成に利用できる。このため、支持体の表面１平方センチメートル当たり約10^5～６×10^8個の維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞を用いる。この場合の“表面”は、ポリマーの実際の表面を意味せず、支持体を上から見た場合に平面内で検出できる領域を意味する。線維芽細胞は、好都合には、60～90分の時間与えて支持体に付着させる。そして、上清培養液を除去し、再び線維芽細胞懸濁液を加えることができる。しかし、理想的には、線維芽細胞懸濁液の第１及び第２添加間で２～36時間、好ましくは24時間経過させる。

本発明の方法の好ましい実施形態では、線維芽細胞の最初の添加後徐々に形成する支持体又はマトリックスに、線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞をさらに３～14回、特に好ましくは５～10回加える。

線維芽細胞の細胞成長で通常使用される条件下で（例えば、５％のCO_2、37℃の無菌培地でインキュベーション）、約１～３週間後に固体結合組織構造が発生する。好ましい実施形態では、この構造を純粋な内皮細胞懸濁液と共にインキュベートする。線維芽細胞と同様に、内皮細胞をＦＡＣＳで濃縮してから数継代培養（好ましくは３回）で拡張する。内皮細胞では、数回、例えば３～14回、各場合に約10^5～５×10^8個の内皮細胞と共にコロニー形成を繰り返すことも好ましい。好ましい実施形態では、内皮細胞とのコロニー形成を５～10回繰り返す。２回のコロニー形成工程間は少なくとも60分、好ましくは２～24時間とする。しかし、この内皮細胞コロニー形成工程は任意である。

【００１８】

支持体のコロニー形成に使用する細胞は、好ましくはヒト細胞である。しかし、自己の線維芽細胞及び／又は筋線維芽細胞及び任意に内皮細胞の使用が特に好ましい。このため、患者、例えば心臓弁を置換する予定の患者の血管の１つから組織を取る。既に上述したように、この場合橈骨動脈及び伏在静脈又は骨髄が好適である。心臓弁の構築のために自己細胞を使用すると、患者に移植後、該弁は外因性組織でなく、人工心臓弁に対する免疫反応は妨げられたも同然と思われる実質的利点がある。

内皮細胞の任意の添加後約14日で、組織学的及び免疫組織化学的に、内皮細胞の表在性単細胞層を有する組織と結合組織基本構造を検出することができる。

好ましい実施形態では、結合組織マトリックスは心臓弁の形態を有し、かつ円形のフレーム構成上に固定されている幅の広い結合組織縁、いわゆる縫合環を備える。このような縫合環を有する心臓弁の例を図１に示す。

【００１９】

さらに好ましい実施形態では、結合組織マトリックスはテープ又は環の形態を有する。この実施形態は、フレーム構成として、３ピーク型支持体構造を備える縫合環を必要とする。そして、テープ又は環をこの３ピーク型構造の周りに通す。この実施形態の例を図３に示す。この文脈内では、フレーム構成の直径は個々別々に選択することができ、患者の解剖学的必要条件によって決まる。

本発明のフレーム構成（ステント）は、種々の材料から構築することができる。新しく

生成する組織に可能な最長寿命と長さを与えるため、この材料は非分解性の生体適合性材料から、或いは代わりに不十分に分解性の生体適合性材料、例えば、炭素、ＰＴＦＥ、ダクロン(Dacron)、金属又はＰＨＡ、好ましくはポリ-3-ヒドロキシブチレート（Ｐ３ＨＢ）から構成されるべきである。この文脈で“不十分に分解性”は１年以上の分解所要時間を意味する。

通常の縫合法で結合組織マトリックスをフレーム構成に固定させうる。一実施形態では、フィブリン接着剤を用いてマトリックスをフレーム構成に固定させる。特に好ましくは通常の縫合法とフィブリン接着剤を併用して結合組織マトリックスを固定させる。同様に、円の中心の方向にピークを取り囲む縁を縫合し或いは張り付ける手順で、縫合糸によって或いはフィブリン接着剤で張り付けることによって個々の心臓弁小葉の形状を安定化することができる。

【００２０】

本発明により、さらなる方法工程で、心臓弁に類似の該プレフォームド構造を、増加する流速にさらすことができる脈動流チャンバー中に導入することができる。流れに耐える結合組織マトリックスの形成は、流速の緩徐な適応によって達成できることが分かった。

例えば、DE19919625に記載されているバイオリアクターは、本発明の方法を実施するのに好適である。

本発明の一実施形態では、５ml/分～8,000ml/分、好ましくは30ml/分～5,000ml/分、特に好ましくは50ml/分～2,000ml/分の流速を用いる。このデータは、弁プロステーシスを通る流れに関係する。50～100ml/分の流速が初期流速として適することが分かった。心臓弁は、これら流速、例えば５～10脈拍/分の脈拍数でチャージされる。そして、流速を連続的又は不連続的に5,000ml/分まで増やす。同時に、脈拍数が180脈拍/分まで上昇する。示したデータは、普通は超えない限界値である。

【００２１】

好ましい実施形態では、流速を2,000ml/分まで増やし、同時に脈拍数が70～100、好ましくは80脈拍/分に上昇する。このようにして心臓弁の安定化に基づく負荷が生理的条件に実質的に適応する。必ずではないが、約24～48時間後ごとに流速と脈拍数を増やすと好ましいことが分かった。従って、例えば、脈動流チャンバー内の滞在持続時間１の日に50～100ml/分の流速と５～10脈拍/分の脈拍数で開始すると、３の日には300ml/分と20～25の脈拍/分、５の日には700ml/分と35～45の脈拍/分、７の日には1,000ml/分と50～60の脈拍/分、９の日には1,300ml/分と70～80の脈拍/分、11の日には1,500ml/分と約100の脈拍/分、13の日には1,750ml/分と約120の脈拍/分及び15の日には2,000ml/分と140の脈拍/分に増加すると予想できる。しかし、流速と脈拍数のもっとずっと緩徐な増加又はより高い流速と脈拍数への増加が妥当なこともあり、利用できる時間、弁のサイズ、患者のサイズと年齢などによって決まる。

本発明の一実施形態では、脈動流チャンバー内に広く行きわたる系圧力を10～240mmHgに調整する。60～140mmHgの系圧力が好ましく、80～120mmHgの系圧力が特に好ましい。

【００２２】

本発明の方法を用いて製造される同種又は自己心臓弁は、従来の機械的及び生物学的心臓弁に比べて実質的な利点を有する。従って、その好ましい実施形態では、本発明の心臓弁は、自己組織、すなわち心臓弁手術を予定している患者の組織と、それをさらに安定化する、フレーム構成として用いられる生体適合性物質とを含む。その結果、弁レシピエントの、移植片に対する異物反応を回避する。従って、本発明の心臓弁のレシピエントに対する感染の危険がかなり減少する。そのため出血性合併症の危険が排除され、抗凝血療法は必要ない。しかし、本発明の心臓弁の抜群に良いと確信する利点は、それが生きている組織であり、それゆえに移植後永久に再生及び修復できるという事実である。その好ましい実施形態では、本発明の心臓弁は、さらに、完全に自己の心臓弁プロステーシスと、合成心臓弁プロステーシスの非常に良い血行動態機能という利点を併せ持つ。最後に、本発明の心臓弁によって、生体適合性フレーム構成を使用することによって、かなり長い使用の間でさえ、有意に少ない退行性の変化及び／又は機能障害が期待され、心臓弁の寿命を

有意に延ばし、ひいては再手術の危険をかなり減らす。

【００２３】

本発明の心臓弁は、線維芽細胞及び筋線維芽細胞に加え、正常な細胞外マトリックスの実質的構成要素、すなわちコラーゲン、エラスチン及びグリコサミノグリカンを含有する結合組織内部構造を含む。本発明の心臓弁は、天然弁又は天然弁小葉に相当するコラーゲン（26～60％）、エラスチン（２～15％）及びグリコサミノグリカンの含量を有する。生分解性支持体（骨格）上に構築され、かつ内皮細胞と共にコロニー形成したこの結合組織内部構造を生体適合性フレーム構成によってさらに安定化する。上述したように、結合組織構造を生体適合性フレーム構成に固定させる。このような心臓弁プロステーシスは、自己心臓弁プロステーシスの利点と、合成心臓弁プロステーシスの非常に良い外科的移植可能性及び機能を併せ持つ。

本発明の心臓弁は成人の心臓内で広く行きわたっている流れ条件に相当する2,000ml/分を超える流速に耐えることを実証できた。従って、本発明により、子供と大人の患者への移植に無条件に適する自己心臓弁を提供することができる。

以下の図面及び実施例は本発明を説明する。

【００２４】

実施例１：弁-輸送導管（チューブ）支持体の製造

不織布ポリグリコール酸ポリマー（繊維直径：12～15p.m、ポリマー密度：70mg/ml、Albany International Reserch, Mansfield MA, USA）を用いて弁-輸送導管支持体を製造する。ポリマーが19mm径のチューブを形成するようにポリマーを切断する。３つの三角形の小葉をこの導管中に挿入する。この支持体は、３-小葉弁、すなわち肺動脈、大動脈及び三尖弁の製造に使用できる。僧帽弁では、２つの小葉を挿入する。

【００２５】

実施例２：フレーム構成で安定化した３-小葉心臓弁プロステーシスの製造

３-小葉の弁-輸送導管支持体を滅菌し、24時間培養液内（DM EM, GIBCO BRL-Life Technologies）に置いてポリマー表面を浸す。その後、弁形状の支持体を、全部で６回90分毎に表面１平方センチメートル当たり400万個の線維芽細胞と共にコロニー形成させる。コロニー形成した支持体をさらに２週間インキュベートする（５％のCO_2、37℃、95％の周囲湿度）。４日毎に無菌条件下で培養液を変える。コロニー形成した弁形状の支持体に内皮細胞を適用する（表面１平方センチメートル当たり300～400万個の内皮細胞、90分毎に６回のコロニー形成）。さらに２週間後、形成された組織を、準備した生体適合性フレーム構成上で裏返し、縫合糸でフレーム構成に堅く結合させる。全構成を無菌条件下でバイオリアクターの流動チャンバー中に導入し、ここでフロー-スルー位置内に設置する。バイオリアクターを培養液で充填し、細胞インキュベーター内に置く。外部のポンプに接続後、圧縮空気ホースを介してインキュベーターを設置し、最小脈動流（50ml/分）を流し始める。流速と脈拍数を２日工程で100ml/分（脈拍10）、全部でさらに４日間で300ml（脈拍25）、700ml（脈拍35）及び1,000ml（脈拍60）に増やす。引き続き（14日後）、形成された組織を無菌条件下で取り出し、生化学、組織学及び機械的分析用に保存する。

【００２６】

実施例３：多ピーク型フレーム構成で安定化した３-小葉の心臓弁形状支持体の製造

ポリグリコール酸（ＰＧＡ）とポリヒドロキシアルカノエート（ＰＨＡ）の１～２mm厚の不織布コポリマー（繊維径12～15μm、ポリマー密度70mg/ml）を用いて心臓弁形状支持体を製造し、3.5cm幅と8.0cm長さのテープが形成されるように切断する。このテープを吸収性縫合材を用いて終点で接続し、さらに熱を加えて（60～70℃）重なりゾーンで接合させる。形成された環を、３ピーク型フレーム構成（Dacron）上で裏返し、これに縫合糸とフィブリン接着剤を用いて結合させる。引き続き再び熱を加えて、フレーム構成上の心臓弁の典型的な膨隆した３-小葉形態に成形した。

【００２７】

実施例４：３ピーク型フレーム構成で固定化した３-小葉心臓弁プロステーシスの製造

３ピーク型フレーム構成で固定化した３小葉支持体を滅菌し、24時間培養液内（DM EM,

GIBCO BRL-Life Technologies）に置いてポリマー表面を浸す。その後、弁形状の支持体を、全部で６回90分毎に表面１平方センチメートル当たり400万個の線維芽細胞と共にコロニー形成させる。コロニー形成した支持体をさらに２週間インキュベートする（５％のCO_2、37℃、95％の周囲湿度）。４日毎に無菌条件下で培養液を変える。コロニー形成した弁形状の支持体に内皮細胞を適用する（表面１平方センチメートル当たり300～400万個の内皮細胞、＆90分毎にコロニー形成）。全構成を無菌条件下でバイオリアクターの流動チャンバー中に導入し、ここでフロー-スルー位置内に設置する。バイオリアクターを培養液で充填し、細胞インキュベーター内に置く。外部のポンプに接続後、圧縮空気ホースを介してインキュベーターを設置し、最小脈動流（50ml/分）を流し始める。流速と脈拍数を２日工程で100ml/分（脈拍10）、全部でさらに４日間で300ml（脈拍25）、700ml（脈拍35）及び1,000ml（脈拍60）に増やす。引き続き（14日後）、形成された組織を無菌条件下で取り出し、生化学、組織学及び機械的分析用に保存する。

【図面の簡単な説明】

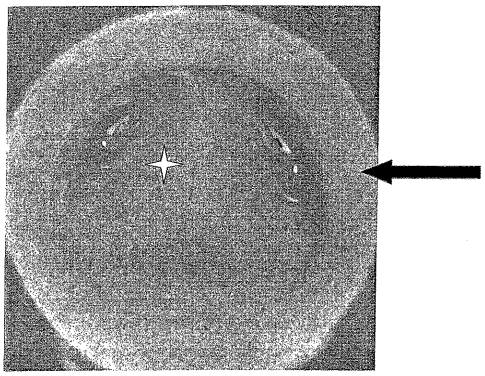
【００２８】

【図１】線維芽細胞／筋線維芽細胞及び内皮細胞とのコロニー形成後の、ポリマーから予め形成され、かつ縫合環（矢印参照）を有する支持体（星参照）を示す。

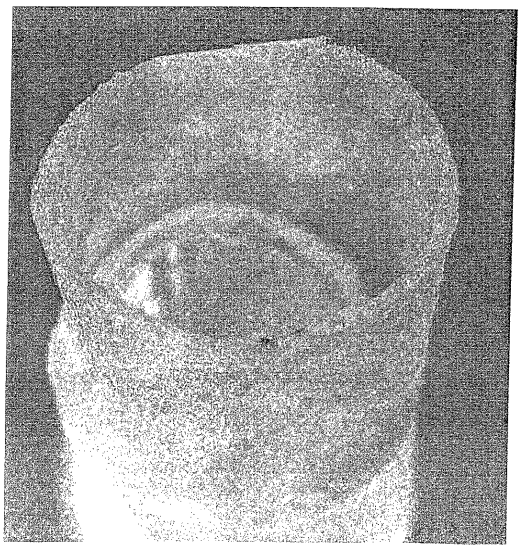
【図２】図３に示されるフレーム構成の周りに置かれうる、3.5cm幅の環を切断しうる管状コロニー形成マトリックスを示す。

【図３】３ピーク型支持体構造の周りに通されたコロニー形成マトリックスを有するフレーム構成の図解を示す。

【図１】
Abb. 1

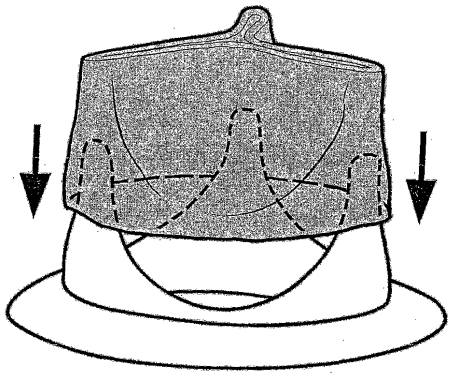


【図２】
Abb. 2



【図３】

Figur 3



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/09906

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61L27/38 A61L27/18 A61L31/00 A61F2/24

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 A61F

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)
CHEM ABS Data, MEDLINE, EPO-Internal, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SODIAN R ET AL: "Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences." THE ANNALS OF THORACIC SURGERY. UNITED STATES JUL 2000, vol. 70, no. 1, July 2000 (2000-07), pages 140-144, XP002244993 ISSN: 0003-4975 abstract	1-28
X	SODIAN R ET AL: "APPLICATION TO STEREOLITHOGRAPHY FOR SCAFFOLD FABRICATION FOR TISSUE ENGINEERED HEART VALVES" ASAIO JOURNAL, J.B.LIPPINCOTT CO.,HAGERSTOWN,MD, US, vol. 48, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 12-16, XP001112831 ISSN: 1058-2916 abstract	1-28

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 June 2003	10/07/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	ESPINOSA, M

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/09906

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HOERSTRUP S P ET AL: "TISSUE ENGINEERING OF A BIOPROSTHETIC HEART VALVE: STIMULATION OF EXTRACELLULAR MATRIX ASSESSED BY HYDROXYPROLINE ASSAY" ASAIO JOURNAL, J.B.LIPPINCOTT CO.,HAGERSTOWN,MD, US, vol. 45, no. 5, September 1999 (1999-09), pages 397-402, XP000880997 ISSN: 1058-2916 abstract	1-28
X	US 5 855 610 A (CHAIGNAUD BEVERLY E ET AL) 5 January 1999 (1999-01-05) column 5, line 35 - line 49; claims	1-28
X	DE 199 19 625 A (HOERSTRUP SIMON PHILIPP ;ZUEND GREGOR (CH)) 30 November 2000 (2000-11-30) cited in the application the whole document	1-28
X	HOERSTRUP S P ET AL: "NEW PULSATILE BIOREACTOR FOR IN VITRO FORMATION OF TISSUE ENGINEERED HEART VALVES" TISSUE ENGINEERING, LARCHMONT, NY, US, vol. 6, no. 1, February 2000 (2000-02), pages 75-79, XP000993059 ISSN: 1076-3279 abstract	1-28
Y	ZUEND G ET AL: "TISSUE ENGINEERING: A NEW APPROACH IN CARDIOVASCULAR SURGERY;SEEDING OF HUMAN FIBROBLASTS FOLLOWED BY HUMAN ENDOTHELIAL CELLS ONRESORBABLE MESH" EUROPEAN JOURNAL OF CARDIO-THORACIC SURGERY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 13, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 160-164, XP000993052 ISSN: 1010-7940 abstract	1-28
Y	WO 01 82840 A (GABBAY SHLOMO) 8 November 2001 (2001-11-08) claims	1-28
A	SODIAN R ET AL: "NEW PULSATILE BIORECTOR FOR FABRICATION OF TISSUE-ENGINEERED PATCHES" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, WILEY, NEW YORK, NY, US, vol. 58, no. 4, 2001, pages 401-405, XP001037742 ISSN: 0021-9304 abstract	1-28

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/09906

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 198 28 726 A (BADER AUGUSTINUS DR ;HAVERICH AXEL PROF DR (DE); STEINHOFF GUSTAV) 7 January 1999 (1999-01-07) claims	1-28

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/09906

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5855610 A	05-01-1999	US 6348069 B1	19-02-2002
DE 19919625 A	30-11-2000	DE 19919625 A1	30-11-2000
		EP 1077072 A2	21-02-2001
WO 0182840 A	08-11-2001	EP 1294316 A1	26-03-2003
		WO 0182840 A1	08-11-2001
		US 2001049555 A1	06-12-2001
DE 19828726 A	07-01-1999	DE 19828726 A1	07-01-1999
		WO 9900152 A2	07-01-1999
		DE 59803925 D1	29-05-2002
		EP 0989867 A2	05-04-2000
		ES 2175753 T3	16-11-2002
		JP 2002507907 T	12-03-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/09906

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61L27/38 A61L27/18 A61L31/00 A61F2/24

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61L A61F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
CHEM ABS Data, MEDLINE, EPO-Internal, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SODIAN R ET AL: "Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences." THE ANNALS OF THORACIC SURGERY. UNITED STATES JUL 2000, Bd. 70, Nr. 1, Juli 2000 (2000-07), Seiten 140-144, XP002244993 ISSN: 0003-4975 Zusammenfassung ---	1-28
X	SODIAN R ET AL: "APPLICATION TO STEREOLITHOGRAPHY FOR SCAFFOLD FABRICATION FOR TISSUE ENGINEERED HEART VALVES" ASAIO JOURNAL, J.B.LIPPINCOTT CO.,HAGERSTOWN,MD, US, Bd. 48, Nr. 1, Januar 2002 (2002-01), Seiten 12-16, XP001112831 ISSN: 1058-2916 Zusammenfassung ---	1-28

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
20. Juni 2003	10/07/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	ESPINOSA, M

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/09906

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HOERSTRUP S P ET AL: "TISSUE ENGINEERING OF A BIOPROSTHETIC HEART VALVE: STIMULATION OF EXTRACELLULAR MATRIX ASSESSED BY HYDROXYPROLINE ASSAY" ASAIO JOURNAL, J.B.LIPPINCOTT CO.,HAGERSTOWN,MD, US, Bd. 45, Nr. 5, September 1999 (1999-09), Seiten 397-402, XP000880997 ISSN: 1058-2916 Zusammenfassung	1-28
X	US 5 855 610 A (CHAIGNAUD BEVERLY E ET AL) 5. Januar 1999 (1999-01-05) Spalte 5, Zeile 35 - Zeile 49; Ansprüche	1-28
X	DE 199 19 625 A (HOERSTRUP SIMON PHILIPP ;ZUEND GREGOR (CH)) 30. November 2000 (2000-11-30) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-28
X	HOERSTRUP S P ET AL: "NEW PULSATILE BIOREACTOR FOR IN VITRO FORMATION OF TISSUE ENGINEERED HEART VALVES" TISSUE ENGINEERING, LARCHMONT, NY, US, Bd. 6, Nr. 1, Februar 2000 (2000-02), Seiten 75-79, XP000993059 ISSN: 1076-3279 Zusammenfassung	1-28
Y	ZUEND G ET AL: "TISSUE ENGINEERING: A NEW APPROACH IN CARDIOVASCULAR SURGERY;SEEDING OF HUMAN FIBROBLASTS FOLLOWED BY HUMAN ENDOTHELIAL CELLS ONRESORBABLE MESH" EUROPEAN JOURNAL OF CARDIO-THORACIC SURGERY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, Bd. 13, Nr. 2, Februar 1998 (1998-02), Seiten 160-164, XP000993052 ISSN: 1010-7940 Zusammenfassung	1-28
Y	WO 01 82840 A (GABBAY SHLOMO) 8. November 2001 (2001-11-08) Ansprüche	1-28
A	SODIAN R ET AL: "NEW PULSATILE BIORECTOR FOR FABRICATION OF TISSUE-ENGINEERED PATCHES" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, WILEY, NEW YORK, NY, US, Bd. 58, Nr. 4, 2001, Seiten 401-405, XP001037742 ISSN: 0021-9304 Zusammenfassung	1-28

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/09906

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 198 28 726 A (BADER AUGUSTINUS DR ;HAVERICH AXEL PROF DR (DE); STEINHOFF GUSTAV) 7. Januar 1999 (1999-01-07) Ansprüche	1-28

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/09906

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5855610	A	05-01-1999	US	6348069 B1	19-02-2002
DE 19919625	A	30-11-2000	DE	19919625 A1	30-11-2000
			EP	1077072 A2	21-02-2001
WO 0182840	A	08-11-2001	EP	1294316 A1	26-03-2003
			WO	0182840 A1	08-11-2001
			US	2001049555 A1	06-12-2001
DE 19828726	A	07-01-1999	DE	19828726 A1	07-01-1999
			WO	9900152 A2	07-01-1999
			DE	59803925 D1	29-05-2002
			EP	0989867 A2	05-04-2000
			ES	2175753 T3	16-11-2002
			JP	2002507907 T	12-03-2002

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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,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,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 コヴェーリ ブルーノ
スイス ５０３４ スール マグレテンヴェーク ３

Ｆターム(参考) 4B033 NA16 NB34 NB68 NB70 NC02 ND12
4C081 AB17 CA171 CA191 CC01 CD34 DA02 EA02
4C097 AA27 BB01 BB10 DD01 DD15 EE01 EE19 FF03 FF05 MM02
MM04 SB03