

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成16年10月28日(2004.10.28)

【公表番号】特表2002-515731(P2002-515731A)

【公表日】平成14年5月28日(2002.5.28)

【出願番号】特願平9-517704

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 5/06

A 6 1 K 35/32

A 6 1 P 19/02

C 1 2 Q 1/02

// C 1 2 N 15/09

【F I】

C 1 2 N 5/00 E

A 6 1 K 35/32

A 6 1 P 19/02

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成15年10月28日(2003.10.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

手続補正書

平成15年10月28日

特許庁長官殿



1. 事件の表示

平成09年特許願第517704号

2. 補正をする者

氏名(名称) マウント・サイナイ・ホスピタル・
コーポレーション

3. 代理人

住所 〒540-0001
大阪府大阪府中央区城見1丁目3番7号 IMPビル
青山特許事務所
電話 06-6949-1261 FAX 06-6949-0361

氏名 弁理士 (6214) 青山 稔



4. 補正により増加する請求項の数 21



5. 補正対象書類名 請求の範囲

6. 補正対象項目名 請求の範囲

7. 補正の内容
別紙のとおり。

方 式 査



(別紙)

請 求 の 範 囲

1. イン・ビボで動物において見いだされる関節軟骨の深部および隣接部石灰化軟骨域と実質的に同様な生化学的組成と、生理学的構成とを有するイン・ビトロで再形成された関節性組織の連続層からなる鈣質化生物材料。

2. さらに、I I、XおよびI型コラーゲン、大硫酸化プロテオグリカンおよびアルカリ性ホスファターゼ活性を有することにより特徴付けられる請求項1記載の鈣質化生物材料。

3. マトリックス小胞を有する細胞外マトリックスと鈣物デポジットとによってさらに特徴付けられ、細胞外マトリックスおよび鈣物デポジットの両方が軟骨細胞およびマトリックス小胞に隣接している、請求項2記載の鈣質化生物材料。

4. 鈣物デポジットがカルシウム・ヒドロキシアパタイトからなる請求項3記載の生物材料。

5. 鈣質化生物材料中の軟骨細胞が、遺伝的欠陥を矯正または補償する生物的に活性な蛋白質をコードする外因性遺伝子を含む組換えベクターで形質転換されている請求項1記載の鈣質化生物材料。

6. 請求項1記載の鈣質化生物材料と、イン・ビボで動物に見いだされる関節軟骨の中間および表面域と実質的に同様な中間および表面非鈣質化層とからなる再形成鈣質化軟骨性組織。

7. マトリックス小胞、X型コラーゲンおよびアルカリ性ホスファターゼ活性を含む、イン・ビトロで再形成された軟骨性組織の連続層からなる生物材料。

8. (a) 関節軟骨組織の深部域から軟骨細胞を単離し；(b) 基材上に該軟骨細胞の層を形成し；(c) (i) 該軟骨細胞を適当な条件下で増殖培地で培養し、マトリックスを蓄積させ、軟骨の鈣質化に関連する成分を含む軟骨性組織を形成させ、ついで、鈣質化剤の存在下で該軟骨性組織を培養して、イン・ビボで動物において見いだされる関節軟骨の深部および隣接部石灰化軟骨域と実質的に同様な生化学的組成と、生理学的構成とを有する鈣質化関節性組織の連続層を形

成させるか、または (i i) 該軟骨細胞を適当な条件下、鉍質化剤の存在下で増殖培地で培養し、イン・ビボで動物において見いだされる関節軟骨の深部および隣接部石灰化軟骨域と実質的に同様な生化学的組成と、生理学的構成とを有する鉍質化関節性組織の連続層を形成させることを特徴とする請求項 1 記載の鉍質化生物材料の製造法。

9. 軟骨細胞を、逐次酵素消化技術により単離する請求項 8 記載の製造法。

10. 関節軟骨組織の深部から単離された軟骨細胞が、少なくとも、 $2 \mu\text{M}$ PNP/ μg DNA のアルカリ性ホスファターゼ活性を有する請求項 8 記載の製造法。

11. 基材が骨、操作された生体適合材料または多孔質組織培養インサートである請求項 8 記載の製造法。

12. 基材が、組織培養インサートである請求項 8 記載の製造法。

13. 軟骨細胞を、基材上に、約 $1 \times 10^5 \sim 8 \times 10^6$ 細胞/ cm^2 の細胞濃度で撒く請求項 8 記載の製造法。

14. 鉍質化剤が、 β -グリセロホスフェート、ATP またはホスホエタノールアミンである請求項 8 記載の製造法。

15. さらに、鉍質化生物材料を、遺伝的欠陥を矯正または補償する生物学的に活性な蛋白質をコードする外因性遺伝子を含む組換えベクターで形質転換することからなる請求項 8 記載の製造法。

16. (a) 関節軟骨組織の深部域から軟骨細胞を単離し、(b) 基材上に、該軟骨細胞の層を形成し、(c) 該軟骨細胞を、適当な条件下、増殖培地中で培養してマトリックスを蓄積させ、軟骨鉍質化に関連する成分を含む軟骨性組織を形成させ、(d) 鉍質化剤の存在下、該軟骨性組織上で、動物の関節軟骨組織の中間および表面域から単離した軟骨細胞を培養して、(i) イン・ビボで動物において見いだされる関節軟骨の深部および隣接部石灰化軟骨域と実質的に同様な生化学的組成と、生理学的構成とを有する関節性組織の連続層からなる鉍質化生物材料、および (i i) 該鉍質化生物材料と隣接し、かつ連続する中間および表面非鉍質化層によって特徴付けられ、該中間および表面非鉍質化層が、イ

ン・ビボで動物において見いだされる関節軟骨の深部および隣接部石灰化軟骨域と実質的に同様な生化学的組成と、生理学的構成とを有する、再形成鈣質化軟骨性組織を形成させる請求項6記載の再形成鈣質化軟骨性組織の製造法。

17. 請求項1記載の鈣質化生物材料を、石灰化に影響する疑いのある物質の存在下に培養し、培養物中に生じた該鈣質化生物材料の生化学的組成および/または生理学的構成を、該物質の不存在下で培養した該鈣質化生物材料の生化学的組成および/または生理学的構成と共に測定することからなる関節軟骨組織の石灰化に影響する物質のテスト方法。

18. 該物質を培養物に添加するか、または鈣質化生物材料中の軟骨細胞を遺伝的に操作して該物質を発現させる請求項17記載の方法。

19. 該物質が関節の治療に有用でありうると考えられる医薬製剤である請求項17記載の方法。

20. 患者の関節に請求項1記載の鈣質化生物材料を移植することからなる患者の関節の損傷または欠失軟骨の置換または修復方法。

21. 骨折箇所に請求項1記載の鈣質化生物材料を挿入することからなる患者の骨折治癒促進方法。

22. アルカリ性ホスファターゼ活性を有し、I、IIおよびX型コラーゲン、大きな流動力学的サイズを有する硫酸化プロテオグリカン、マトリックス小胞、ならびにカルシウムヒドロキシアパタイト結晶デポジットにより囲まれている軟骨細胞により特徴づけられる、連続した鈣質化層を含む単離鈣質化生物材料。

23. アルカリ性ホスファターゼ活性を有し、I、IIおよびX型コラーゲン、大きな流動力学的サイズを有する硫酸化プロテオグリカン、マトリックス小胞、ならびにカルシウムヒドロキシアパタイト結晶デポジットにより囲まれている軟骨細胞により特徴づけられる、連続した鈣質化層からなる、あるいは必須としてなる単離鈣質化生物材料。

24. 軟骨細胞が、遺伝学的欠陥を矯正または補償する生物学的に活性のある蛋白をコードする外因性遺伝子を含む組換えベクターで形質転換されている、請求項22または23に記載の単離され精製された鈣質化生物材料。

25. ヒドロキシアパタイト結晶デポジットが軟骨細胞に隣接しており、かつ軟骨細胞から離れたマトリックス中に存在する、前記請求項のいずれか1項に記載の単離鈣質化生物材料。

26. 基材上でイン・ビトロにおいて調製される前記請求項のいずれか1項に記載の単離鈣質化生物材料。

27. 鈣質化層に隣接し、かつこれに連続している動物関節軟骨組織の中間および表面非鈣質化層をさらに含む、前記請求項のいずれか1項に記載の単離鈣質化生物材料。

28. イン・ビボにおいて動物中に見出される深部および隣接部石灰化軟骨と、関節軟骨の中間および表面ゾーンとに実質的に類似している、前記請求項のいずれか1項に記載の単離鈣質化生物材料。

29. (a) 少なくとも $2 \mu\text{M}$ PNP/時/ μg DNAのアルカリ性ホスファターゼ活性を有する動物関節軟骨組織の15%未満から軟骨細胞を単離し；
(b) 基材上に軟骨細胞の層を形成し、ここに基材は骨、加工された生物材料または多孔質組織培養インサートであり；(c) 軟骨細胞がマトリックスを蓄積し、軟骨鈣質化に関連する成分を含む軟骨性組織を形成するに適した条件化において、増殖培地中で軟骨細胞を培養し；ついで(d) β -グリセロリン酸、ATPおよびホスホエタノールアミンからなる群より選択される鈣質化剤の存在下で該軟骨性組織を培養して鈣質化生物材料を得ることを特徴とする、前記請求項のいずれか1項に記載の単離鈣質化生物材料の製造方法。

30. 工程(c)の後に、鈣質化剤の存在下において軟骨性組織上において、動物関節軟骨組織の中間および表面ゾーンから単離された軟骨細胞を培養して、I、IIおよびX型コラーゲン、大きな流動力学的サイズを有する硫酸化プロテオグリカン、マトリックス小胞およびカルシウムヒドロキシアパタイト結晶デポジット、ならびにイン・ビボにおいて関節軟骨の中間および表面層に対応する鈣質化生物材料に隣接しこれに連続している中間および表面非鈣質化層を含有するマトリックスにより囲まれた軟骨細胞により特徴づけられる鈣質化連続層を含む鈣質化生物材料を含有する材料を得ることをさらに特徴とする、請求項29に記載

載の単離鈷質化生物材料の製造方法。

3.1. アルカリ性ホスファターゼ活性を有し、I、IIおよびX型コラーゲン、大きな流動力学的サイズを有する硫酸化プロテオグリカン、マトリックス小胞およびカルシウムヒドロキシアパタイト結晶デポジット、ならびに鈷質化層に隣接しこれに連続した中間および表面非鈷質化層を含むマトリックスにより囲まれた軟骨細胞を含む鈷質化連続層を含む単離生物材料の製造方法であって、

(a) 少なくとも $2 \mu\text{M}$ PNP/時/ μg DNAのアルカリ性ホスファターゼ活性を有する動物関節軟骨組織の15%未満から軟骨細胞を単離し；

(b) 基材上に軟骨細胞の層を形成し、ここに基材は骨、加工された生物材料または多孔質組織培養インサートであり；

(c) 軟骨細胞がマトリックスを蓄積し、軟骨鈷質化に関連する成分を含む軟骨性組織を形成するに適した条件化で、増殖培地中にて軟骨細胞を培養し；ついで

(d) 動物関節軟骨の中間および表面ゾーンから単離された軟骨細胞を、 β -グリセロリン酸、ATPおよびホスホエタノールアミンからなる群より選択される鈷質化剤の存在下において軟骨性組織上で培養して生物材料を得ることを特徴とする方法。

3.2. 逐次酵素消化法により軟骨細胞が単離されたものである前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

3.3. 0.5%プロテアーゼ、ついで、0.04%細菌コラゲナーゼを用いる処理により軟骨細胞が単離されたものである前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

3.4. 約 1×10^5 ないし 8×10^6 個/ cm^2 の細胞密度で軟骨細胞が基材上に撒かれる前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

3.5. 約 2×10^6 個/ cm^2 の細胞密度で軟骨細胞が基材上に撒かれる前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

3.6. 遺伝学的欠陥を矯正または補償する生物学的に活性のある蛋白をコードする外因性遺伝子を含む組換えベクターで鈷質化生物材料中の軟骨細胞を形質転

換することをさらに特徴とする、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

37. 基材が接着因子で被覆された多孔質組織培養インサートである前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

38. 石灰化に影響する疑いのある物質の存在下において前記請求項のいずれか1項に記載の単離鈣質化生物材料を同時培養し、ついで、同時培養にて生じた鈣質化生物材料の生化学的組成および/または生理学的構成を、該物質の不存在下において培養された鈣質化生物材料の生化学的組成および/または生理学的構成と比較し決定することを特徴とする、関節軟骨組織の石灰化に影響する物質の試験方法。

39. 該物質が同時培養物に添加されるか、あるいは単離され精製された鈣物質生物材料中の軟骨細胞が該物質を発現するように遺伝子操作されているものである請求項38記載の方法。

40. 該物質が関節の疾病の治療に有用である可能性のある医薬調合物である請求項39記載の方法。

41. 前記請求項のいずれか1項に記載の単離され精製された鈣質化生物材料を患者の関節に移植することを特徴とする、患者の関節におけるダメージを受けたあるいは欠損した軟骨を置換あるいは交換する方法。

42. 前記請求項のいずれか1項に記載の単離鈣質化生物材料を骨折部位中に挿入することを特徴とする、患者の骨折の治療を促進する方法。