

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-230184

(P2004-230184A)

(43) 公開日 平成16年8月19日(2004.8.19)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 L 27/00

A 6 1 K 38/22

A 6 1 P 19/02

F I

A 6 1 L 27/00

A 6 1 P 19/02

A 6 1 K 37/24

テーマコード (参考)

4 C 0 8 1

4 C 0 8 4

審査請求 有 請求項の数 30 O L (全 55 頁)

(21) 出願番号 特願2004-113680 (P2004-113680)
 (22) 出願日 平成16年4月7日 (2004.4.7)
 (62) 分割の表示 特願平4-505748の分割
 原出願日 平成4年1月30日 (1992.1.30)
 (31) 優先権主張番号 648,274
 (32) 優先日 平成3年1月31日 (1991.1.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504138470
 ロバート フランシス ショウ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1
 3 3 サンフランシスコ, ペントハウス2
 4 0 1, テイラー ストリート 1 7 5 0
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (72) 発明者 エルンスト ベー. フンチカー
 スイス国 シーエイチ-3 0 1 0 ベルン
 ムルテンシュトラッセ 3 5, ポストフ
 ァッハ 3 0, ユニベルジテート ベルン
 , エム. エー. ミュラー-インスティテュ
 ート フェア ビオメヒヤニーク
 Fターム(参考) 4C081 AB04 AB05 BA12 BA16 CD111
 CD121 CD151 CD28 DA01 DA02
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨損傷の治療のための成長因子含有マトリックス

(57) 【要約】

【課題】 安定した軟骨の修復および再生を誘導し、かつ表在性軟骨欠損あるいは損傷が重症の変形性関節症へ進行することを防止する、信頼性の高い軟骨結損治療法を提供すること。

【解決手段】 軟骨の欠損あるいは損傷の領域を覆うために使用される、生分解性マトリックスあるいはマトリックス形成物質を包含する、軟骨の欠損あるいは損傷を、治療あるいは修復するための組成物であって、該マトリックスあるいはマトリックス形成物質が：該マトリックス中および該欠損あるいは損傷の領域中の修復細胞の増殖を刺激するのに適切な濃度の増殖因子；および送達システムと組み合わせられ、そして、引き続き該マトリックスおよび欠損中の増殖した修復細胞に該トランスフォーミング因子が送達された時に、該修復細胞を、軟骨組織を生産する軟骨細胞に形質転換するために適切な濃度である、トランスフォーミング因子；を含有する、組成物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軟骨の欠損あるいは損傷の領域を覆うために使用される、生分解性マトリックスあるいはマトリックス形成物質を包含する、軟骨の欠損あるいは損傷を、治療あるいは修復するための組成物であって、

該マトリックスあるいはマトリックス形成物質が：

該マトリックス中および該欠損あるいは損傷の領域中の修復細胞の増殖を刺激するのに適切な濃度の増殖因子；および

送達システムと組合わされ、そして、引き続き該マトリックスおよび欠損中の増殖した修復細胞に該トランスフォーミング因子が送達された時に、該修復細胞を、軟骨組織を生産する軟骨細胞に形質転換するために適切な濃度である、トランスフォーミング因子；

を含有する、組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

【数 1 - 1】

発明の技術分野

本発明は、軟骨中の欠損あるいは損傷の治療および修復に関する。より詳細には、本発明は、軟骨中の欠損あるいは損傷（本明細書中では互換可能な用語として使用している）を治療する方法、および、新しい安定した軟骨組織を形成するために修復細胞の増殖を促進する1種類あるいはそれ以上の増殖因子を含む生分解性マトリックスを含有する組成物に関する。本発明の組成物および方法は特に、変形性関節症、並びに軟骨傷害を引き起こす他の疾患および外傷の治療に有用である。

20

30

【背景技術】

【0002】

【数 1 - 2】

背景技術

関節は、骨格中の複数の骨を連結する一般的な手段の一つである。正常な関節を有する骨の末端は、関節軟骨組織で覆われており、これによって、複数の骨が互いに他に対して実質的な摩擦無しに動くことができる [L. Weiss編、Cell and Tissue Biology (Munche: Urban and Schwarzenburg, 1988) p. 247]。

10

関節軟骨は、独特の構造組織で特徴付けられる。関節軟骨は、細胞間物質(文献では、しばしば「軟骨マトリックス」とも呼ばれている)の内部に存在する特殊化細胞(軟骨細胞)により構成される。細胞間物質は、プロテオグリカン、II型が主

20

【数 2】

体のコラーゲン原線維、他のタンパク質および水を多く含有する[Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues (Park Ridge, Ill.: American Academy of Orthopaedic Surgeons Symposium, 1987)中の、p. 465、Buckwalterらの"Articular Cartilage: Injury and Repair"]。軟骨組織には、
10
神経分布が無く、しかも血管系およびリンパ系も通っていない。しかし、成人の成熟関節では、その下に存在する軟骨下の骨組織が、骨組織と軟骨との間に狭い連続したプレートを形成し、この肋軟骨下骨組織には、神経および血管が分布している。この骨プレートの下で、骨組織が、骨髓を包含する
20
複数の小柱を形成している。未成熟関節では、関節軟骨の下には、一次骨小柱のみが存在する。関節中の半月組織の一部もまた、関節軟骨に類似した構造を有する軟骨により構成されている[Beaupre, A.ら、Clin. Orthop. Rel. Res., pp. 72-76 (1986)]。

軟骨組織には、2つの種類の欠損あるいは損傷が存在することが認められている。即ち、全層性欠損および表層性欠損である。これらの欠損は、軟骨に対する物理的な傷害の程度のみでなく、各種類の損傷が誘起し得る修復反応の性質も異なる。
30

全層性欠損は、軟骨下の骨にまで到達し、ひどい痛みを引き起こし得る。骨プレートが知覚神経末端を含んでいるため
40
である。このような欠損は一般に、ひどい外傷によって発生するか、あるいは、変形性関節症などの変性性関節疾患の後

【数3】

期に発生する。全層性欠損は、場合によっては、出血および軟骨下の骨からの修復反応を誘起し得る[Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy (New York: Raven Press, 1990)中の、pp. 19-56、Buckwalterらの、"Articular Cartilage: Composition, Structure, Response to Injury, and Methods of Facilitating Repair"]。形成された修復組織は、不十分な生体力学特性を有する血管の分布した線維性タイプの軟骨であり、長期間存続するものではない[Buckwalterら、(1990)、前出]。

10

関節軟骨組織中の表層性欠損は、軟骨組織自体内に限定されている。このような欠損は、治癒することがなく、しかも修復反応を誘起する性質も示さないため、たちが悪い。

20

これらの表層性欠損は軟骨表面に、裂け目、穴あるいは裂溝として出現し得るか、あるいは傷害を受けた組織中で「カニ肉(crab-meat)」様の外観を有し得る。これらの表層性欠損は、全層性欠損で見られるような出血する血管(血斑)を含有しない。表層性欠損は、原因不明の場合もあるが、多くの場合、軟骨組織の摩滅をもたらす機械的障害から生じる。機械的障害は、関節への外傷、例えば、剥離した半月組織の関節への変位、半月切除、剥離した靱帯による関節の弛緩、関節の不整合、あるいは骨折によって、または、遺伝性疾患によって生じ得る。表層性欠損はまた、変形性関節症などの変性関節疾患の初期の特性である。軟骨組織には神経分布が無く[Ham's Histology (第9版)(Philadelphia: J.B. Lippincott

30

40

【数 4】

Co. 1987) pp. 266-272]、しかも血管分布も無いために、表層性欠損は痛みを伴わない。しかし、無痛ではあっても、表層性欠損は治癒せず、そして多くの場合、変性して全層性欠損となる。

関節軟骨は血管系を持たないので、傷害を受けた軟骨組織は、修復反応を誘起するのに十分なあるいは適切な刺激を受けないと一般に考えられている[Webberら、"Intrinsic Repair Capabilities of Rabbit Meniscal Fibrocartilage: A Cell Culture Model" (30th Ann. Orthop. Res. Soc., Atlanta、1984年2月); Webberら、J. Orthop. Res., 3, pp. 36-42 (1985)]。軟骨組織中の軟骨細胞は、傷害を受けた血管分布組織中に典型的に存在する増殖因子およびフィブリンクロット等の十分な量の修復刺激因子に、通常は曝されていないと理論付けて説明されている。

傷害を受けた軟骨組織を修復刺激に曝すために使用されてきた一つのアプローチは、軟骨から軟骨下の骨の中まで穴を開けるかまたは削り、出血させる工程を含む[Buckwalterら、(1990)、前出]。残念ながら、このような外科的処置による外傷に対する組織の修復反応は通常、出血を引き起こす全層性欠損で自然に起こるのが観察される修復反応と同等の反応である。即ち、不十分な生体力学特性を示し、かつ長期間存続しない線維性タイプの軟骨が形成される[Buckwalterら、(1990)、前出]。

種々の増殖因子が単離され、研究および生物医学用に現在

【数5】

入手可能である[例えば、Rizzino, A., Dev. Biol., 130, p. 411-22 (1988)を参照]。これらの成長因子のうちの幾つかは、例えばトランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β)の様な、インビトロのラット胚間葉細胞中で、II型コラーゲンおよび軟骨特有のプロテオグリカンなどの軟骨特有の分子の形成を促進すると報告されている[例えば、Seyedinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, pp. 2267-71 (1985); Seyedinら、J. Biol. Chem., 261, pp. 5693-95 (1986); Seyedinら、J. Biol. Chem., 262, pp. 1946-1949 (1987)]。

10

何百万人もの患者が、変形性関節症、即ち関節軟骨中に変性欠損あるいは損傷を有していると診断されている。しかし、傷害を受けた軟骨中に修復反応を誘起するための種々の方法が主張されてたが、これらの治療法は何れも実質的には利用されていない[Buckwalterら(1990)、前出; Knutsonら、J. Bone and Joint Surg., 68-B, p. 795 (1986); Knutsonら、J. Bone and Joint Surg., 67-B, p. 47 (1985); Knutsonら、Clin. Orthop., 191, p. 202 (1984); Marquet、Clin. Orthop., 146, p. 102 (1980)]。そして、このような治療法は、一般に、一時的な軽減をのみ提供していた。「軟骨保護剤」の全身投与もまた、変形性関節症の進行を阻止し、痛みの軽減を誘起すると主張されている。しかし、このような薬剤が軟骨組織中の損傷あるいは欠損の修復を促進することは示されていない。

20

30

40

現在まで、変形性関節症を患う患者の治療は、鎮痛薬およ

【数 6 - 1】

び抗炎症薬の使用によって症状を軽減することに主眼が置かれている。関節軟骨の表層性欠損の修復を誘起する治療を行わなければ、多くの場合、軟骨が、軟骨下の骨プレートまで摩滅してしまう。この疾患のこの段階、即ち、重症の変形性関節症では、痛みは軽減しない性質であり、そして顕著な機能低下によって、多くの場合関節全体を切除し、金属および/またはプラスチックの人工関節に交換しなければならない。関節を切除して人工関節に交換する処置は、膝および股関節部に関して現在年間約50万件行われている[例えばGraves, E. J.、「1988 Summary; National Hospital Discharge Survey」、Advanced Data From Vital and Health Statistics, 185, pp. 1-12 (1990年6月19日)参照]。

10

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

【数 6 - 2】

したがって、安定した軟骨の修復および再生を誘導し、かつ表在性軟骨欠損あるいは損傷が重症の変形性関節症へ進行することを防止する、信頼性の高い軟骨欠損治療法が必要とされている。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

【数 4 1】

1. 軟骨の欠損あるいは損傷を、治療あるいは修復するための組成物であって：

該軟骨の欠損あるいは損傷の領域を覆うために使用される、生分解性マトリックスあるいはマトリックス形成物質；および

10

該マトリックス中および該欠損あるいは損傷の領域中の修復細胞の増殖を刺激するのに適切な濃度の増殖因子；

を含有する、組成物。

2. 送達システムと組合わされたトランスフォーミング因子をさらに含有し、そして、該トランスフォーミング因子の濃度が、前記マトリックスおよび欠損中の修復細胞に該トランスフォーミング因子が送達された時に、該修復細胞を、軟骨組織を生産する軟骨細胞に形質転換するために適切な濃度である、請求項 1 に記載の組成物。

20

3. 前記マトリックスおよび欠損領域に修復細胞を誘引するために、適切な濃度で化学遊走因子をさらに含有する、請求項 1 あるいは 2 に記載の組成物。

30

4. 前記化学遊走因子が、TGF- β 類、FGF類、PDGF、TNF- α 、TNF- β およびプロテオグリカン分解産物からなる群より選択される、請求項 3 に記載の組成物。

5. 前記増殖因子が、TGF- β 類、FGF類、IGF I、PDGF、EGF、TGF- α 類、ヒト成長ホルモンおよび造血性増殖因子からな

40

【数 4 2】

る群より選択される、請求項 1 あるいは 2 に記載の組成物。

6. 前記トランスフォーミング因子が、TGF- β 類、TGF- α 類および FGF 類からなる群より選択される、請求項 2 に記載の組成物。

7. 前記欠損領域に充填するために使用される前記生分解性マトリックスが、フィブリン、コラーゲン、ゼラチン、セファロース、あるいはこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 あるいは 2 に記載の組成物。

10

8. 前記増殖因子、前記化学遊走因子および前記トランスフォーミング因子が、TGF- β 類からなる群より選択される、請求項 3 に記載の組成物。

20

9. 前記トランスフォーミング因子が、1 種類あるいはそれ以上のトランスフォーミング因子の混合物である、請求項 2 に記載の組成物。

10. 前記増殖因子および化学遊走因子が、マトリックス中で 2-50 ng/ml の濃度の TGF- β である；そして

30

前記トランスフォーミング因子が、適切な送達システムに組込まれた TGF- β であり、該送達システムが、マトリックス中で 200 ng/ml を超える濃度の TGF- β を提供する；

請求項 8 に記載の組成物。

11. 前記送達システムが、リポソーム、生物腐食性ポリマー、ヘパリン硫酸プロテオグリカン類に化学的に結合したコラーゲン線維、および炭水化物ベースの小体からなる群より選択される、請求項 2 に記載の組成物。

40

【数 4 3】

1 2. 軟骨の欠損あるいは損傷の、治療あるいは修復のための組成物であって：

トロンビンをフィブリノーゲン溶液に添加することで形成したフィブリンマトリックス；

該フィブリノーゲン溶液 1 ml 当り 2-10 ng の濃度で存在する TGF- β ； および

10

リポソーム中にカプセル化され、そして、該フィブリノーゲン溶液 1 ml 当り 200 ng を超える濃度で存在する TGF- β ；

を含有する組成物。

1 3. 動物の軟骨組織の選択された部位に、軟骨形成を誘起する方法であって、請求項 2 に記載の組成物で該部位を覆う工程、を包含する方法。

20

1 4. 動物の軟骨組織の選択された部位に、軟骨形成を誘起する方法であって、請求項 1 2 に記載の組成物で該部位を覆う工程、を包含する方法。

1 5. 動物の軟骨の欠損あるいは損傷を治療する方法であって：

30

修復細胞の増殖を刺激するために有効な量の増殖因子；

マトリックスおよび欠損へ、修復細胞を誘引するために有効な量の化学遊走因子； および

修復細胞を軟骨細胞に形質転換するために有効な量の、送達システムに組込まれたトランスフォーミング因子；

40

を含有する生物分解性マトリックスを、欠損へ充填する工程、を包含する方法。

【数 4 4】

16. 動物の軟骨中の選択された部位の欠損あるいは損傷を治療する方法であって：

マトリックスおよび欠損あるいは損傷へ修復細胞を誘引するために有効な量の化学遊走因子、および修復細胞の増殖を刺激するために有効な量の増殖因子、を含有する生物分解性マトリックスを、欠損あるいは損傷へ充填する工程；および

10

該欠損に該マトリックスを充填してから約1-2週間後に、修復細胞を軟骨細胞に形質転換するために十分な濃度でトランスフォーミング因子を該マトリックス中に送達する工程；

を包含する方法。

17. 前記欠損へ生分解性マトリックスを充填する前に、該欠損の表面をフィブリン接着剤あるいはトランスグルタミナーゼで覆う工程をさらに包含する、請求項15あるいは16に記載の方法。

20

18. 動物の軟骨の欠損あるいは損傷を治療する方法であって：

30

該欠損の表面からプロテオグリカンを除去する薬剤を、欠損に充填する工程；

該薬剤を除去する工程；および

修復細胞の増殖を刺激するために有効な量の増殖因子を含有し、そして、修復細胞を軟骨細胞に形質転換するために十分な濃度でトランスフォーミング因子を放出する送達システムと組合わせたトランスフォーミング因子とを含有する、生物分解性マトリックスで、該欠損を覆う工程；

40

【数 4 5】

を包含する方法。

19. 動物の軟骨の欠損あるいは損傷を治療する方法であって：

該欠損の表面からプロテオグリカンを除去する薬剤を、欠損に充填する工程；

10

該薬剤を除去する工程；

修復細胞の増殖を刺激するために有効な量の増殖因子を含有する生分解性マトリックスで該欠損を覆う工程；および

該欠損を充填してから約1-2週間後に、修復細胞を軟骨細胞に形質転換するために十分な濃度でトランスフォーミング因子を該マトリックス中に送達する工程；

20

を包含する方法。

20. 欠損あるいは損傷を前記生分解性マトリックスで覆う前に、該欠損あるいは損傷の表面をフィブリン接着剤あるいはトランスグルタミナーゼで覆う工程をさらに包含する、請求項18あるいは19に記載の方法。

30

21. 前記生分解性マトリックスがさらに、該マトリックスおよび軟骨の欠損あるいは損傷の領域へ修復細胞を誘引するために十分な濃度で化学遊走因子を含有する、請求項18あるいは19に記載の方法。

22. 欠損の表面からプロテオグリカンを除去する前記薬剤が、コンドロイチナーゼABC、コンドロイチナーゼAC、ヒアルロニダーゼ、ペプシン、パパイン、トリプシン、キモトリプシン、プロナーゼ、ストロメリシンおよびスタフV8プロテ

40

【数 4 6】

アーゼからなる群より選択される、請求項 1 8 あるいは 1 9 に記載の方法。

2 3. 前記増殖因子、前記化学遊走因子および前記トランスフォーミング因子が、TGF- β である、請求項 2 1 に記載の方法。

10

2 4. トランスフォーミング因子を送達するための前記送達システムが、リポソーム、生物腐食性ポリマー、ヘパリン硫酸プロテオグリカンに化学的に結合したコラーゲン線維、および炭水化物ベースの小体からなる群より選択される、請求項 1 8 に記載の方法。

2 5. 前記生分解性マトリックスが、フィブリン、コラーゲン、ゼラチン、セファロース、あるいはこれらの組合わせからなる群より選択される、請求項 1 5、1 6、1 8 あるいは 1 9 に記載の方法。

20

2 6. 前記生分解性マトリックスが、フィブリンノーゲン溶液で前記欠損あるいは損傷を充填する直前に、フィブリンノーゲン溶液にトロンビンを添加することによって形成された、フィブリンである、請求項 1 5、1 6、1 8 あるいは 1 9 に記載の方法。

30

2 7. 前記増殖因子および前記化学遊走因子が、1 mlのマトリックス当り2-10 ngの濃度のTGF- β であり、そして、前記トランスフォーミング因子が、リポソーム中にカプセル化され、1 mlのマトリックス当り200 ngを超える濃度で存在するTGF- β である、請求項 2 1 に記載の方法。

40

【数 47】

28. 欠損の表面からプロテオグリカンを除去する前記薬剤が、コンドロイチナーゼABCであり、そして、1単位/mlの濃度のコンドロイチナーゼABCを含有する溶液を4分間、該欠損に充填する、請求項18あるいは19に記載の方法。

29. 前記生分解性マトリックスがさらに、トリペプチド Arg-Gly-Aspを含む細胞接着促進因子を含有する、請求項15、16、18あるいは19に記載の方法。

30. 動物の軟骨の欠損あるいは損傷を治療する方法であって：

1単位/mlの濃度のコンドロイチナーゼABCの無菌溶液を4分間、該欠損あるいは損傷領域に充填する工程；

該コンドロイチナーゼABCの溶液を除去する工程；

無菌生理食塩水で該欠損領域を洗浄する工程；

該欠損領域を乾燥する工程；

1 mg/mlのフィブリノーゲンを含有し、そして2-10 ng/mlの濃度のTGF- β と、200 ng/mlを超える濃度のリポソーム中のTGF- β とを含む、マトリックス形成溶液の1 ml当たり2単位のトロンビンを追加する工程；および

該トロンビンを添加した直後に、該マトリックス形成溶液を該欠損に充填する工程；

を包含する方法。

31. マトリックス形成溶液を前記欠損に充填する前に、フィブリン接着剤あるいはトランスグルタミナーゼで該欠損の表面を覆う工程をさらに包含する、請求項30に記載の方

【数 4 8】

法。

3 2. リボソーム中の前記TGF- β が、500 ng/mlよりも高い濃度である、請求項30に記載の方法。

【0017】

【数 6 - 3】

発明の要旨

本発明は、ヒトおよび他の動物の軟骨の損傷の修復を誘起するために有効な治療方法および組成物を提供することによって、上記の問題を解決する。本発明の方法および組成物を使用することによって、さらに、外傷性の損傷および初期の形態の変形性関節症の進行が阻止される。これらは、その進行が阻止されない場合には、軽減されない痛みと有効な関節機能の喪失を伴う重症の変形性関節症をもたらし、これによ

10

20

【0018】

【数 7】

って、おそらくは関節の切除および交換を行うことになる。

一般的な概要として、軟骨欠損を修復する本発明の方法は、軟骨中の欠損に本発明の組成物を充填するか、あるいは軟骨中の欠損を本発明の組成物で覆うことを包含する。本発明の組成物は、(1)生分解性マトリックスあるいはマトリックス形成物質、(2)マトリックスおよび欠損領域中の修復細胞の増殖を促進する増殖因子、および、ある実施態様では、(3)修復細胞をマトリックスおよび欠損領域に誘引するための化学遊走因子、および(4)適切な送達システム中のトランスフォーミング因子を含有する。この送達システムによって、トランスフォーミング因子が適切な時点で放出され、これにより、マトリックスあるいは欠損領域中の修復細胞の、軟骨細胞への分化(即ち形質転換)が促進される。この軟骨細胞が、新しい安定した軟骨組織を生産する。あるいは、トランスフォーミング因子を、適切な時点で別個に欠損部位に添加し得る。

軟骨の治療は、本発明の方法を使用した単一の関節鏡検査手順あるいは外科手術手順で行われ得る。本発明の特定の方法によれば、欠損を確認した後に、(1)欠損領域に酵素を充填し、この酵素によって欠損表面に存在するプロテオグリカン分解する工程、(2)酵素を除去する工程、および(3)マトリックス、増殖因子および適切な送達システム中のトランスフォーミング因子を含有する組成物で欠損を覆う工程によって、欠損の治療を行う。

【数 8】

発明の詳細な説明

本発明に対してさらに十分な理解を得るために、以下に詳細な説明を行う。説明において、以下の用語を使用する。

関節鏡検査--本明細書では、関節鏡を用いて関節を検査するかまたは関節に対して外科的処置を施すことを指す。

10

軟骨--本明細書では、細胞間物質(「軟骨マトリックス」と称することが多い)中に存在する軟骨細胞を含有するあるタイプの結合組織を指す。この細胞間物質は、コラーゲン(主にI型コラーゲンであり、他の少数の型、例えばIX型およびXI型を伴う)原線維、種々のプロテオグリカン(例えば、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ケラタン硫酸プロテオグリカンおよびデルマタン硫酸プロテオグリカン)、他のタンパク質および水を含有する。本明細書中で使用する用語「軟骨」は、関節軟骨および半月軟骨を含む。関節軟骨は、骨の、関節内に存在する部分の表面を覆い、骨と骨とが直接接触することなく関節内で動くことを可能にし、そしてこれによって、対向する骨の表面の摩滅および傷害を防止する。大部分の正常かつ健康な関節軟骨はまた、「ヒアリン」、即ち、くもりガラスのような特徴的な外観を有していると説明される。半月軟骨は、通常、運動に加えて震動も受ける関節中に見られる。半月軟骨のこのような位置には、顎関節、胸鎖関節、肩鎖関節、橈骨手根関節および膝関節が含まれる[Gray's Anatomy (New York: Bounty Books, 1977)]。

20

30

40

細胞接着促進因子--本明細書では、フィブロネクチン、お

【0020】

【数9】

よび、トリペプチドArg-Gly-Aspを含有するテトラペプチドと同じ大きさの他のペプチドを含む任意の化合物あるいは組成物を指す。これは、細胞外物質に細胞を接着させるための媒介となる[Ruoslahtiら、Cell, 44, pp. 517-518 (1986)]。

化学遊走因子--本明細書では、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質およびグリコサミノグリカン鎖を含む任意の化合物あるいは組成物を指し、標準的なインビトロでの化学遊走アッセイで細胞を誘引することができる[例えば、Wahlら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, pp. 5788-92 (1987); Postlewaiteら、J. Exp. Med., 165, pp. 251-56 (1987); Mooreら、Int. J. Tiss. Reac., XI, pp. 301-07 (1989)]。

軟骨細胞--本明細書では、軟骨組織の成分、例えば、II型軟骨性原線維および線維およびプロテオグリカンを生産することができる細胞を指す。

線維芽細胞増殖因子(FGF)--天然、合成あるいは組換え起源により得られる、FGFポリペプチドのファミリーの任意のメンバー[Gimenez-Gallegoら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 135, pp. 541-548 (1986); Thomasら、Trends Biochem. Sci., 11, pp. 81-84 (1986)]あるいはその誘導体を指す。これは、種々の細胞のインビトロでのDNA合成および細胞分裂[アッセイに関しては、例えば、Gimenez-Gallegoら、1986、前出; Canalisら、J. Clin. Invest., 81, pp. 1572-1577 (1988)を参照]を刺激する能力を呈する。これらの種々の細胞には、一次線維芽細胞、軟骨細胞、血管および角膜内皮細胞、

【数 1 0】

骨芽細胞、筋芽細胞、平滑筋およびグリア細胞が含まれる[Thomasら、1986、前出]。FGFは、その等電点(pI)によって、酸性FGF(aFGF)あるいは塩基性FGF(bFGF)に分類され得る。

マトリックス--本明細書では、多孔性複合体、即ち、細胞がこのマトリックス中に集まるだけの十分な大きさの孔あるいは空間を持つ固体あるいは半固体の生物分離性物質を指す。用語マトリックスは、マトリックス形成物質、即ち、軟骨中の欠損部位内にマトリックスを形成することができる物質を包含する。マトリックス形成物質は、マトリックスを形成するために重合剤の添加を必要とし得る。例えば、フィブリンマトリックスを形成するために、フィブリノーゲンを含有する溶液にトロンピンを添加することなどが必要となり得る。

増殖(有糸分裂促進性)因子--本明細書では、インビトロで細胞の増殖を刺激することができる、ペプチド、タンパク質および糖タンパク質を含有する任意の化合物あるいは組成物を指す。ペプチド、ポリペプチドおよび他の化合物の増殖(有糸分裂促進)活性を決定するインビトロでのアッセイは、当該分野で周知のものである[例えば、Canalisら、J. Clin. Invest., pp. 1572-77 (1988); Gimenez-Gallegoら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 135, pp. 541-548 (1986); Methods Enzymol., 146A (New York: Academic Press, 1987)中の、pp. 341-52、Rizzinoの「Soft Agar Growth Assays for Transforming Growth Factors and Mitogenic Peptides」; Methods Enzymol., 146A (New York: Academic Press, 1987)

【数 1 1】

中の、pp. 329-40、Dicksonらの「Assay of Mitogen-Induced Effects on Cellular Incorporation of Precursors for Scavengers, de Novo, and Net DNA Synthesis」参照]。化合物あるいは組成物の増殖(有糸分裂促進性)活性を決定するための一つの標準的な方法は、軟寒天中の非形質転換細胞の足場非依存性増殖を誘起する能力を調べるアッセイをこの化合物あるいは組成物に対して行うことである[例えばRizzino、1987、前出]。他の有糸分裂促進活性アッセイシステムもまた知られている[例えば、Gimenez-Gallegoら、1986、前出；Canalisら、1988、前出；Dicksonら、1987、前出]。

10

修復細胞--本明細書では、適切な刺激を受けると、分化し、そして形質転換されて軟骨細胞となる細胞を指す。修復細胞には、間葉細胞、線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、マクロファージおよび脱分化軟骨細胞が含まれる。

20

トランスフォーミング因子--本明細書では、修復細胞の軟骨細胞への分化を誘導する、任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質または他の任意の化合物あるいは組成物を指す。細胞による軟骨特有のプロテオグリカンおよびII型コラーゲンの産生を誘起あるいは刺激する化合物あるいは組成物の能力は、当該分野で既知のインビトロでのアッセイによって決定され得る[Seyedinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, pp. 2267-71 (1985); Seyedinら、Path. Immunol. Res., 7, pp. 38-42 (1987)]。

30

40

トランスフォーミング成長因子 β (TGF- β)--天然、合成あ

【数 1 2】

るいは組換え起源により得られる、TGF- β ポリペプチドのファミリーの任意のメンバー[Derynck, R.ら、Nature, 316, p. 701-705 (1985); Peptide growth factors and their receptors I (Berlin: Springer Verlag, 1990)中の、p. 419、Robertsらの「The transforming growth factor- β 's」]あるいはその誘導体を指し、軟寒天アッセイで正常なラット腎臓(NRK)細胞を成長させてコロニーを形成する特有のTGF- β 能力を示し[Robertsら、1984、前出]、しかも、修復細胞の軟骨細胞への形質転換を誘導することができる。この形質転換の誘導は、インビトロで細胞による軟骨特有のプロテオグリカンおよびII型コラーゲンの生産を誘起あるいは刺激する能力によって証明されている通りである[Seyedinら、1985、前出]。

本発明は、軟骨の欠損あるいは損傷を治療するための組成物および方法に関する。本発明の組成物は、生分解性マトリックスを含有する。この生分解性マトリックスは、このマトリックス中に修復細胞が集まるだけの十分な大きさの孔を有する。マトリックスは、さらに、このマトリックス中の修復細胞の増殖を刺激する増殖因子を含有する。好ましくは、この増殖因子はまた、修復細胞をマトリックスに誘引する化学遊走因子としても作用する。あるいは、マトリックスは、増殖因子に加えて化学遊走因子を含有し得る。本発明の好ましい一実施態様において、マトリックスは、さらに、適切な濃度のトランスフォーミング因子を含有する。このトランスフォーミング因子は、送達システム内に、あるいはこの送達シ

【数 1 3】

システムに組込んで含有される。送達システムは、適切な時点でトランスフォーミング因子を放出し、これによって、マトリックス中の増殖した修復細胞を軟骨細胞に形質転換する。軟骨細胞は、安定した軟骨組織を生産する。マトリックスは、さらに、細胞接着促進因子を含有し得る。

10

軟骨中の欠損を満たすか、あるいはこれを覆うための本発明の方法および組成物に有用なマトリックス物質には、フィブリノーゲン(トロンビンにより活性化されることによって、欠損あるいは損傷中にフィブリンを形成する)、コラーゲン、セファロース、ゼラチン、および他の任意の生分解性物質が含まれる。但し、この任意の生分解性物質は、修復細胞がマトリックス中に集まって増殖し得るだけの十分な大きさの孔を有するマトリックスを形成し、かつ修復過程で分解されて軟骨と入れ代わることができるものである。

20

本発明の組成物および方法に有用なマトリックスは、予め形成され得るか、あるいはin situで形成され得る。この形成は、例えば、フィブリノーゲンなどの化合物および組成物を重合してフィブリンマトリックスを形成することによって、行われる。予め形成され得るマトリックスには、コラーゲン(例えばコラーゲンスポンジおよびコラーゲンフリース)、化学的に改変されたコラーゲン、ゼラチンビーズあるいはゼラチンスポンジ、セファロースなどのゲル形成物質、生分解性マトリックス物質により構成される他の任意のゲル形成あるいは複合物質、またはこれらの混合物が含まれる。この生分

30

40

【0 0 2 5】

【数 1 4】

解性マトリックス物質は、欠損を満たし、そして修復細胞がこのマトリックス中に集まる。

本発明の好ましい実施態様では、マトリックス形成物質、好ましくはフィブリノーゲン溶液を用いてマトリックスを形成する。このフィブリノーゲン溶液には、これを使用する少し前に、重合を開始させるためにトロンピンを添加する。水性バッファー溶液に溶解した0.5-5 mg/mlのフィブリノーゲン溶液を用い得る。好ましくは、水性バッファー溶液に溶解した1 mg/mlのフィブリノーゲン溶液を用いる。このフィブリノーゲン溶液を欠損領域中で重合すると、十分な大きさ(例えば約50-200 μm)の孔を有するマトリックスが生産され、これによって、修復細胞が、自由にマトリックス中に集まり、そして、増殖してマトリックスが占める欠損体積を満たす。好ましくは、重合が完了する前に外科医が欠損領域中にこの物質を堆積するだけの十分な時間を与えるために、十分な量のトロンピンを使用の少し前にフィブリノーゲン溶液に添加する。典型的には、トロンピン濃度を、重合が2-3分から数分(2-4分)以内に完了するような濃度とするべきである。なぜならば、軟骨を長時間空気にさらすと、傷害が生じることが明らかになっているからである[Mitchellら、J. Bone Joint Surg., 71A, pp. 89-95 (1989)]。過剰な量のトロンピンは使用すべきではない。なぜならば、トロンピンは、成長因子の分子を開裂して、これらを不活性化する能力を有しているからである。フィブリノーゲン溶液に添加するために、水性バッファ

10

20

30

40

【数 1 5】

一溶液に溶解した10-500 ユニット/mlのトロンビン溶液、好ましくは水性バッファー溶液に溶解した100 ユニット/mlのトロンビン溶液を調製し得る。本発明の好ましい実施態様では、1 mlのフィブリノーゲン溶液(1 mg/ml)に対してトロンビン(100 U/ml)を約20 μ lの割合で、欠損に充填するより約200秒前に混合する。より低濃度のトロンビンを添加すると、生じる重合の速度はより遅くなる。2-4分以内でフィブリン重合を行うために必要なトロンビン溶液の量は、環境温度、トロンビン溶液の温度、フィブリノーゲン溶液の温度などに左右されるために、近似値的な概数としてのみ提示され得ることは理解されるであろう。欠損を満たしている、トロンビンにより活性化されたマトリックス溶液の重合は、フィブリノーゲン溶液の外部試料の、トロンビンにより誘導された重合を観察することによって、容易にモニターされ得る。本発明の組成物および方法では、フィブリンマトリックスを、オートロガスフィブリノーゲン分子、即ち、治療する種と同じ哺乳動物種の血液由来のフィブリノーゲン分子から形成するのが好ましい。同じ種の非免疫原性フィブリノーゲンもまた使用し得る。

コラーゲンをマトリックス物質として使用すると、十分に粘度の高い溶液を作ることができる。その際には、例えばCollagen-Vlies[®](「フリース」)あるいはゼラチンと血液との混合物を使用し、重合剤を使用する必要はない。コラーゲンマトリックスを、重合剤で活性化されたフィブリノーゲン溶

【0 0 2 7】

【数 1 6】

液と共に用いて混合マトリックスを得ることも可能である。

重合剤はまた、他の生分解性化合物を使用してマトリックスを形成する場合にも、不要となり得る。例えば、セファロース溶液を選択し得る。セファロース溶液は、39-42℃で液体マトリックス溶液となり、35-38℃で固体(例えばゲル状)になる。さらに、セファロースの濃度を、軟骨欠損を満たしているゲルが、修復細胞が自由にマトリックスおよび欠損領域中に集まり得るメッシュサイズを持つような濃度としなければならない。

10

本発明の組成物では、1種類あるいは複数種類の増殖(有糸分裂促進性)因子をマトリックス溶液に添加し得る。1種類あるいはそれ以上の増殖因子は、欠損を満たしているマトリックス中の修復細胞に増殖効果をもたらすような濃度範囲で存在していなければならない(実施例の項を参照)。好ましくは、この同じ因子が、(TGF- β の場合と同様に)細胞に対して化学遊走効果も与えなければならない。しかし、増殖効果のみを有する因子を使用してもよい。あるいは、化学遊走による細胞移入を生じさせて、次いで細胞増殖を誘導するためには、各々がこれらの特異的効果のうちの一つのみ(化学遊走あるいは増殖性)を持つ2種類の因子を使用し得る。

20

30

修復細胞の増殖を刺激するための本発明の組成物および方法に有用な増殖(有糸分裂促進性)因子には、TGF- α 類およびTGF- β 類などのトランスフォーミング増殖因子(「TGF類」)、インスリン様増殖因子(「IGF I」)、酸性あるいは塩基性線維

40

【数 17】

芽細胞増殖因子(「FGF類」)、血小板由来の増殖因子(「PDGF」)、表皮細胞成長因子(「EGF」)、およびインターロイキン3(「IL-3」)などの造血性増殖因子が含まれる[Rizzino、1987、前出; Canalisら、前出、1988; Growth factors in biology and medicine, Ciba Foundation Symposium, 116 (New York: John Wiley & Sons, 1985); Baserga, R. 編、Cell growth and division (Oxford: IRL Press, 1985); Sporn, M.A. および Roberts, A.B. 編、Peptide growth factors and their receptors、第I巻および第II巻(Berlin: Springer-Verlag, 1990)]。しかし、これらの特定の例は、限定を目的とするものではない。細胞増殖を調べるインビトロでのアッセイにより実証される、細胞の増殖を刺激することができる任意の化合物あるいは組成物が、本発明の増殖因子として有用である。このようなアッセイは、当該分野で既知のものである[例えば、Canalisら、1988、前出; Gimenez-Gallegoら、1986、前出; Dicksonら、1987、前出; Rizzino、1987、前出]。

修復細胞を誘引するための本発明の組成物および方法に有用な化学遊走因子には、例えば、TGF- β 、FGF(酸性あるいは塩基性)、PDGF、腫瘍壊死因子(例えば、TNF- α 、TNF- β)、およびグリコサミノグリカン鎖などのプロテオグリカン分解産物が含まれる[Robertsら、(1990)、前出; Growth factors in biology and medicine, Ciba Foundation Symposium, 116 (New York, John Wiley & Sons, 1985); R. Baserga 編、Cell growth and division (Oxford: IRL Press, 1985)]。ポリ

【数 18】

ペプチドおよび他の化合物の化学遊走を調べるアッセイは、当該分野で既知のものである[例えば、Postlewaiteら、1987、前出；Wahlら、1987、前出；Mooreら、1989、前出]。

本発明の好ましい実施態様では、マトリックスは、増殖因子および化学遊走因子としてTGF- β を含有する。特に、TGF- β IあるいはTGF- β IIを、増殖因子および化学遊走因子として使用し得る。他のTGF- β の形態(例えば、TGF- β III、TGF- β IV、TGF- β Vなど)あるいはTGF- β 活性を有するポリペプチド[前出のRoberts、1990、を参照]もまた、将来検出されるであろうこの物質の他の型、および他の増殖因子と共に、この目的に対して有用であり得る。増殖因子および化学遊走因子として使用するために、TGF- β 分子をマトリックス中に溶解するかあるいは懸濁させる。その際には、TGF- β 濃度を、好ましくはマトリックス溶液に対して2-50 ng/ml、そして最も好ましくはマトリックス溶液に対して2-10 ng/mlとなるようにする。修復細胞の増殖を刺激するTGF- β の好ましい濃度は、治療する特定の動物によって変化し得ることは、理解されるであろう。

1種類あるいは複数種類のトランスフォーミング因子もまたマトリックス溶液中に存在し得る。これによって、修復細胞がマトリックス中に集まった後に、トランスフォーミング因子が、修復細胞の軟骨細胞への分化(即ち形質転換)を促進するために十分な濃度で欠損部位中に放出される。この軟骨細胞は、新しい安定した軟骨組織を形成する。トランスフォー

【数 1 9】

ミング因子の放出の適切なタイミングは、このトランスフォーミング因子が増殖因子の効果を阻害あるいは妨害し得る場合には、特に重要となる[前出のRobertsら、(1990)を参照]。

本発明の組成物および方法に有用なトランスフォーミング因子には、任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または、修復細胞の軟骨細胞への分化を誘導する他の任意の化合物あるいは組成物が含まれる。この軟骨細胞は、軟骨特異的プロテオグリカンおよびII型コラーゲンを生産する。細胞中での軟骨特異的プロテオグリカンおよびII型コラーゲンの生産を誘導あるいは刺激する化合物あるいは組成物の能力は、当該分野で既知のアッセイを使用して決定され得る[例えば、Seyedinら、1985、前出；Seyedinら、1987、前出]。本発明の組成物および方法に有用なトランスフォーミング因子には、例えば、TGF- β 類、TGF- α 類およびFGF類(酸性あるいは塩基性)が含まれる。これらのトランスフォーミング因子は、単独で、または組み合わせて使用され得る。さらに、TGF- β はEGFとの組み合わせで使用され得る。

適切な時点でのトランスフォーミング因子の放出は、適切な送達システム中に、あるいはこれと共に、トランスフォーミング因子をパッケージングすることによって行われ得る。本発明の組成物および方法に有用な送達システムには、リボソーム、生物腐食性ポリマー、炭水化物ベースの小体、トランスフォーミング因子が自動的に結合するヘパリン硫酸プロテオグリカンあるいは他のこのような分子に化学的に結合し

【数 2 0】

たコラーゲンなどの線維、および浸透圧ポンプが含まれる。

リポソーム、生物腐食性ポリマー、トランスフォーミング因子が結合した線維、およびトランスフォーミング因子を含有する炭水化物ベースの小体などの送達システムは、欠損に充填するために使用されるマトリックス溶液と混合され得る。

10

これらのシステムは、当該分野で知られており、入手可能である[P. JohnsonおよびJ.G. Lloyd-Jones編、Drug Delivery Systems (Chichester, England: Ellis Horwood Ltd., 1987)参照]。リポソームは、KimらのBiochem. Biophys. Acta,

728, pp. 339-348 (1983)に記載の手順に従って調製され得る。

他のリポソーム調製手順もまた使用され得る。軟骨細胞を刺激して軟骨組織成分を合成するための追加因子を、送達システム中にトランスフォーミング因子と共に含有させてもよい。

20

本発明の好ましい実施態様では、マトリックスは、TGF- β を増殖および化学遊走因子として含有し、そして送達システム中にパッケージングされたTGF- β をトランスフォーミング因子として含有する。特に、TGF- β IあるいはTGF- β IIは、増殖および化学遊走因子、およびトランスフォーミング因子として使用され得る。他のTGF- β の形態(例えば、TGF- β III、TGF- β IV、TGF- β Vなど)あるいはTGF- β 活性を有するポリペプチド[前出のRoberts、1990、を参照]もまた、将来検出されるであろうこの物質の他の型、および他の成長因子と共に、この目的に対して有用であり得る。

30

40

好ましい実施態様では、マトリックス溶液に対して好まし

【0032】

【数 2 1】

くは2-50 ng/mlの濃度のTGF- β 、そして最も好ましくはマトリックス溶液に対して2-10 ng/mlの濃度のTGF- β を、増殖因子および化学遊走因子として使用する。これよりもかなり高い濃度のTGF- β もまた、この後に放出可能な形態でマトリックス組成物中にトランスフォーミング因子として存在する。
好ましくは、後で放出されるTGF- β の濃度は、マトリックスに対して200 ng/mlよりも高く、そして最も好ましくは、マトリックスに対して500 ng/mlよりも高い。修復細胞の分化を誘導するための好ましいTGF- β 濃度は、治療する特定の動物によって変化し得ることは理解されるであろう。

10

これらの二つの濃度範囲のTGF- β に修復細胞を接触させる際には、その時間をずらすことが必要である。その理由は次の通りである。比較的高い濃度(例えばマトリックス溶液に対して200 ng/mlを超える濃度)のTGF- β は、修復細胞を軟骨細胞に形質転換し得るだけでなく、化学遊走による修復細胞の誘引を阻害する。これに対して、比較的低い濃度(例えば2-10 ng/ml)では、TGF- β は、修復細胞を誘引して、その増殖を刺激するが、しかし、軟骨組織を生産する軟骨細胞への修復細胞の形質転換を誘導することはない。

20

30

本発明の好ましい実施態様では、化学遊走および増殖の次に形質転換が生じるという順序となるように、TGF- β は、遊離した、カプセル化していない形態と、カプセル化あるいは隔離された形態との両方の形態で、マトリックス中に存在する。好ましくは、マトリックスおよび欠損領域中で修復細胞

40

【数 2 2】

を誘引して、その増殖を誘導するために、TGF- β 分子をマトリックス中に、マトリックス溶液に対して2-10 ng/mlの濃度で溶解するかあるいは懸濁させる。マトリックス中の修復細胞の、軟骨細胞への形質転換を促進するために、TGF- β 分子はまた、前出のKimら(1983)の方法に従って多胞性リボソーム中に隔離された状態でマトリックス中に存在する。この場合のTGF- β 分子の濃度は、マトリックス溶液に対して200 ng/mlよりも高く、そして好ましくは500 ng/mlよりも高い。誘引された修復細胞がマトリックス中に集まり、マトリックスを分解し始めると、TGF- β を包み込んだリボソームが破裂する。マトリックスの分解中に、修復細胞はリボソームを摂取し、そして/あるいは分解する。その結果、TGF- β が、修復細胞の軟骨細胞への形質転換を誘導するために十分な濃度で放出される。

10

20

化学遊走および増殖のための濃度のTGF- β と、形質転換のための濃度のTGF- β との、必要な二段階の送達は、形質転換のための濃度のTGF- β を生物腐食性ポリマーと組み合わせることによっても達成され得る。あるいは、ポンプ、好ましくは移植された浸透圧ポンプが、欠損およびマトリックス中のTGF- β 濃度を調節するために使用され得る。本発明の実施態様では、ポンプがマトリックス中のTGF- β の濃度を調節する。即ち、ポンプは、最初に化学遊走および増殖促進のための濃度でTGF- β を放出し、そしてその次に形質転換のための濃度でTGF- β を放出し得る。好ましくは、形質転換のための濃度

30

40

【数 2 3】

のTGF- β は、術後約1-2週間目にポンプによって送達される。
欠損体積中へのトランスフォーミング因子の送達は、好ましくは欠損部位中のマトリックスに限定される。

本発明の組成物中の増殖因子、および使用されている場合には、トランスフォーミング因子は、生分解性マトリックス内の欠損部位中に付与される。したがって、これらの因子の存在は、非常に局所的な部位に限定される。これは、関節腔中へのこれらの因子の自由な注入あるいは流入を防止するために行われる。このような自由な流入が発生すると、滑膜細胞を刺激して関節滲出を引き起こすという好ましくない結果が生じ得る。

フィブロネクチン、あるいは、アミノ酸配列Arg-Gly-Aspを含有するテトラペプチドと同じ大きさのペプチドを含む化合物は、細胞接着促進因子として使用され得る[Ruoslahtiら、1986、前出]。これは、欠損部位中に堆積されたマトリックスに対する修復細胞の初期の接着性を向上させるために行われる。フィブリンおよびある種のコラーゲンマトリックスは、既にこの配列を含有している[Ruoslahtiら、1986、前出]。他の生分解性マトリックスを使用する場合には、マトリックスを使用して欠損を覆う前に、このような細胞接着促進因子をマトリックス物質と混合し得る。Arg-Gly-Aspを含有するペプチドはまた、マトリックス物質(例えばその線維あるいはメッシュ)に、またはアルブミンなどの、マトリックスに添加された化合物に化学的に結合され得る。

【数 2 4】

以上説明した組成物は、動物の軟骨組織中の欠損あるいは損傷の選択された部位に軟骨形成を誘導する方法に有用である。

本発明の方法は、ヒトを含む動物の軟骨欠損の治療を可能にする。この治療では、その投与形態が簡単であり、そして、傷害を受けた関節領域にその治療位置が限定される。この治療全体は、単独の関節鏡検査手順あるいは切開手術手順で行われ得る。

10

本発明による、軟骨中の欠損あるいは損傷を治療する方法を実施するために、欠損あるいは損傷を確認し、調製し、そして本発明の生分解性マトリックス組成物でこれを覆う。マトリックス組成物中には、増殖(有糸分裂促進性)因子が、このマトリックスおよび欠損あるいは損傷中の修復細胞の増殖を刺激するために適切な濃度で存在する。この同じ因子はまた、この濃度で、修復細胞を誘引する化学遊走因子としても作用する。ただし、これは、使用される因子が、(マトリックスに対して2-10 ng/mlの濃度のTGF- β と同様に)細胞増殖と化学遊走とを組み合わせた効果を持つ場合である。あるいは、二つの異なる因子、即ち、特異的増殖効果を持つ因子および特異的化学遊走効果を持つ因子が、マトリックス中に存在し得る。別の実施態様では、欠損を生分解性マトリックスで覆った後に、増殖因子、および所望の場合には化学遊走因子が、マトリックスを充填した欠損領域中に直接注入され得る。

20

30

40

次の工程では、マトリックス中の修復細胞を、適切な時点

【数 2 5】

でトランスフォーミング因子に接触させる。その際には、トランスフォーミング因子の濃度を、修復細胞を、安定した軟骨組織を生産する軟骨細胞に形質転換するために十分な濃度とする。この工程は、上記のようにマトリックス組成物中に、トランスフォーミング因子を含む適切な送達システムを含有させることによって、達成され得る。あるいは、トランスフォーミング因子を、マトリックスを充填した欠損領域中に適切な時点で直接注入することによって送達し得る。生分解性マトリックスを欠損領域中に最初に移植してから約1-2週間後に、形質転換のための濃度を、細胞に対して提供可能となるようにしなければならない。この時点で、軟骨マトリックス成分の合成をさらに促進するために、追加因子を、送達システムに添加し得るか、あるいは直接注入し得る。

10

20

(以下余白)

【0 0 3 7】

【数 2 6】

動物の軟骨欠損あるいは損傷は、関節の関節鏡検査時に、または、切開手術中の損傷あるいは欠損の簡単な検査時に、視認により容易に確認される。軟骨欠損はまた、計算機援用断層撮影(CATスキニング)、X線検査、核磁気共鳴画像造影(MRI)、滑液あるいは血清マーカーの分析を使用することによって、または当該分野で既知の他の任意の手順によって、推論的に確認され得る。

10

一旦欠損を確認すると、外科医は、その欠損を外科的処置により改変することによって、本明細書に記載の治療方法で添加する溶液およびマトリックス物質を物理的に保持する欠損の能力を向上させることを選択し得る。好ましくは、本明細書に記載の治療方法で添加される溶液およびマトリックス物質をより良く保持するために、欠損は、平坦な、あるいは浅い凹状の外形を有する代わりに、その末端部が垂直になっているかあるいは垂直となる様に成形されるか、または、その底部が切り取られる。

20

30

欠損領域に対するマトリックスの接着性を向上させる上記の物理的な手段に加えて、化学的手段もまた、マトリックスの接着性を向上させ得る。このような手段には、欠損表面上の軟骨プロテオグリカンの表在層を分解することにより軟骨のコラーゲン原線維を露出し、これによって、このコラーゲン原線維を、マトリックスのコラーゲン原線維(コラーゲンのマトリックスを使用の場合)あるいはマトリックスのフィブリン原線維(フィブリンマトリックスを使用の場合)と、相互に

40

【数 27】

作用させる手段が含まれる。軟骨表面上のプロテオグリカン
は、軟骨に対するフィブリンあるいは他の生分解性マトリッ
クスの接着を妨害するだけではなく、局所的にトロンビン活
性をも阻害する。有利なことには、プロテオグリカン分解産
物はまた、修復細胞に対して化学遊走効果を与え得る [Moor
e, A.R.ら、Int. J. Tiss. Reac., XI(6), pp. 301-307 (19
89)]。

10

さらに、欠損軟骨に対するマトリックスの接着性は、フィ
ブリン接着剤(即ち、血液因子XIIIあるいはフィブリン安定化
因子)を用いることによって向上され得る。これによって、
欠損表面上の軟骨コラーゲン原線維に対するマトリックスの
原線維の化学結合(架橋)が促進される[Gibbleら、Transfusi
on, 30(8), pp. 741-47 (1990)参照]。酵素トランスグルタミ
ナーゼもまた、同じ効果を得るために使用され得る[例えば、
Ichinoseら、J. Biol. Chem., 265(23), pP. 13411-14 (199
0); "Transglutaminase," V.A. NajjarおよびL. Lorand編、
Martinus Nijhoff Publishers (Boston, 1984)参照]。細胞外
物質の接着性を促進し得る他の化合物もまた使用され得る。

20

30

本発明の方法の一実施態様では、無菌吸収紙を用いて欠損
領域の水分を吸い取ることによって、欠損の表面を乾燥し、
そして、欠損体積中に無菌酵素溶液を2-10分間充填すること
により、軟骨表面上および局所的には欠損表面から深さ約1-
2 μm 以内に存在するプロテオグリカンを分解する。種々の酵
素を、単独であるいは組合わせて、プロテオグリカンを分解

40

【数 2 8】

するために無菌バッファー水溶液中で使用し得る。溶液のpHを、酵素活性を最適化するために調整しなければならない。

本発明の方法でプロテオグリカンを分解するために有用な酵素には、コンドロイチナーゼABC、コンドロイチナーゼAC、ヒアルロニダーゼ、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、プロナーゼ、ストロメリシンおよびスタフV8プロテアーゼが含まれる。特定の酵素あるいは複数の酵素の組合わせの適切な濃度は、酵素溶液の活性に依存する。

本発明の好ましい実施態様では、1 U/mlの濃度のコンドロイチナーゼABCの無菌溶液を欠損に充填し、そして、消化を4分間進行させる。コンドロイチナーゼABCの好ましい濃度は、実施例1に記載のように、種々の濃度の酵素で処理時間を種々に変えて処理したウサギの関節軟骨組織を電子顕微鏡で検査することによって、決定された。用いられる他の任意の酵素は、深さ約1-2 μm 以内に存在する表在のプロテオグリカンのみが分解されるような濃度で、かつそのような時間だけ使用されなければならない。

酵素溶液を塗布する時間は、主に修復領域中のプロテオグリカン分解のために、最小にしなければならない。1 U/mlの濃度のコンドロイチナーゼABCの場合は、消化時間が10分を超えると、不必要でありかつ潜在的に有害な欠損領域外のプロテオグリカンの分解が生じ得る。さらに、消化時間が10分を超えると、全処置時間に過大な影響を与える。全処置時間は、特に関節切開手術中には、最小に抑えられなければならない。

【数 2 9】

らない。なぜならば、軟骨が空気にさらされて障害を受け得るからである[Mitchellら、(1989)、前出]。これらの理由により、酵素による消化によってプロテオグリカンを分解する工程を包含する本発明の方法の実施態様では、10分未満の消化時間が好ましく、そして5分未満の消化時間が最も好ましい。

10

本発明の方法によれば、酵素が欠損表面のプロテオグリカンを分解した後に、酵素溶液を欠損領域から除去しなければならない。酵素溶液の除去は、細い吸引端を備えたアスピレータを使用し、次いで綿質のもので吸い取ることによって、行われる。あるいは、綿質のものだけを用いて吸い取ることによって、酵素溶液を除去し得る。

20

酵素溶液を除去した後に、欠損を、無菌生理食塩水(例えば、0.15 MのNaCl)で入念に、好ましくは3回、洗浄しなければならない。次に、洗浄された欠損部位を乾燥させなければならない。無菌ガーゼあるいは綿質のものを使用して欠損部位を乾燥させ得る。

30

これに代わるものとして、あるいはこの酵素処理工程に加えて、欠損部位を、フィブリン接着剤あるいはトランスグルタミナーゼなどの化合物で覆い、これによって、欠損部位に対するマトリックスの接着性を向上させ得る。好ましい実施態様では、酵素処理に続いて欠損部位を洗浄し、乾燥した後に、フィブリン接着剤あるいはトランスグルタミナーゼを欠損部位に塗布する。

40

本発明の方法によれば、次いで、欠損部位を、本明細書中

【数 3 0】

に記載の本発明の組成物で覆うことにより、欠損中にマトリックス組成物を、好ましくはその末端部まで充填し、これによって、平坦な面を形成する。組成物は、マトリックス物質および増殖因子、さらに所望の場合には、化学遊走因子を含有する。この工程で使用する組成物は、さらに、適切な送達システム中にパッケージングされたトランスフォーミング因子を含有する。本発明の最も好ましい方法では、マトリックスは、増殖因子、化学遊走因子(増殖因子と同じものであり得る)およびトランスフォーミング因子を含有する。トランスフォーミング因子は、送達システム中に、あるいは送達システムに組込んでパッケージングされている。送達システムは、マトリックス中に集まった修復細胞が細胞間物質の再造形を行い始めた時点で、しかも修復細胞を軟骨細胞に形質転換するような濃度で、トランスフォーミング因子を放出する。

10

20

マトリックスが増殖および化学遊走因子を含有していない場合には、この(これらの)因子を、修復細胞の化学遊走および増殖を促進する好ましい濃度となるように、マトリックスが充填された欠損領域中に直接注入する。好ましくは、本発明の実施態様では、欠損をマトリックスで覆った後に、TGF- β をマトリックス中に、マトリックスに対して2-10 ng/mlの濃度となるように局所的に注入する。この注入は、マトリックスが充填された欠損領域に限定されなければならない。これは、滑膜の細胞が、細胞増殖および関節滲出をもたらす恐れのある増殖因子に接触することを回避するためである。

30

40

【0 0 4 2】

【数 3 1】

欠損部位をマトリックス組成物で覆った後に(そして、フィブリンマトリックスの場合には、一旦マトリックスが凝固すると)、そして、必要に応じて、マトリックスを充填した欠損部位中に増殖因子を注入した後に、関節包および皮膚切開部を縫合し、関節鏡検査あるいは切開手術を終了し得る。

10

トランスフォーミング因子がマトリックス中で適切な送達システム中に存在していない場合には、トランスフォーミング因子を、術後約1-2週間目に直接マトリックス中に添加し得る。その際には、例えば注射あるいは浸透圧ポンプによって、修復細胞を軟骨細胞に形質転換するために十分な濃度で添加する。好ましくは、本発明の実施態様では、術後約1週間目にTGF- β を直接マトリックス中に添加して、これにより、マトリックスに対するTGF- β 濃度を200 ng/mlより高くなるように、そして最も好ましくは500 ng/mlより高くなるようにする。

20

関節軟骨中の欠損を修復するための本明細書中に記載の方法は、欠損が軟骨下の骨まで達していない場合に最も有効である。本明細書中に記載の方法はまた、半月軟骨組織中の欠損を修復するためにも使用され得る。

30

本明細書中に記載の本発明に対してさらに十分な理解を得るために、以下の実施例を開示する。これらの実施例は、説明を目的とするものであり、如何なる意味でも本発明を限定するとは解釈されないことは、理解されるであろう。

40

【実施例】

【0043】

50

【数 3 2】

実施例1プロテオグリカンの除去を調べる酵素試験

関節軟骨組織の表層性欠損の表面に対するマトリックスの接着性を促進し、向上させるために、表層の軟骨マトリックス中のプロテオグリカン分子を酵素によって除去し得る。この除去は、コラーゲン原線維網を、外部から塗布されるマトリックスおよび移動して来る修復細胞に接触させるために、行われる。種々のプロテアーゼおよびグリコサミノグリカン分解酵素が、この目的のための使用に適切であるが、しかし、各酵素に最大の活性を提供するために、pH条件を調節しなければならない。

10

本実施例では、発明者らは、コンドロイチナーゼABC(0.5-5 U/ml)およびトリプシン(0.5-4%)を試験して、これらのプロテオグリカン除去能力を調べた。地元の屠殺業者から入手した、新たに屠殺された複数のウサギの膝関節を使用した。物理的に生じさせた表層性の軟骨欠損を、酵素溶液に4分間接触させた。次いで溶液を吸収紙で除去し、そして、欠損部位を入念に生理食塩水で洗浄した。この処置の後に、即座に軟骨組織を、組織学的検査のために、0.7%(w/v)のルテニウムヘキサミントリクロライド(RHT)を含有する2%(v/v)のグルタルアルデヒド溶液(0.05 Mのカコジル酸ナトリウムで緩衝処理したもの、pH 7.4)中で固定した。固定後の培養液は、1%のRHT-四酸化オスミウム溶液(0.1 Mのカコジル酸ナトリウムで緩衝処理したもの)により構成されていた。組織を、段階的に連続してエタノールを用いて脱水し、そしてエポン812中に包埋した。

20

30

40

【数 3 3】

複数の薄片を切断し、これらを酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛を用いて染色し、そして電子顕微鏡で検査した。これらの薄片中で、RHTによって固定した(即ち沈澱した)プロテオグリカンは、暗く染色された細粒として出現した。厚さ僅か1-2 μm のプロテオグリカン表在層を除去した酵素濃度を、最適であると定義した(これよりも深く酵素が浸透すると、その下の軟骨細胞に影響を与えることになり得る)。コンドロイチナーゼABCは、約1 U/mlの濃度で最適な活性を呈することが判明した。トリプシンは、約2.5%の濃度で最適な活性を呈することが判明した。他のグリコサミノグリカナーゼあるいはプロテアーゼの最適活性範囲は、類似の方法で決定され得る。任意のバッファーを酵素と共に使用し得る。ただし、バッファーに毒性が無く、かつその最大緩衝能力が、最大酵素活性に必要なpH値に近いpH値で得られる場合に限る。

10

20

実施例 2表層性欠損に対するマトリックスの接着性

30

表層の軟骨プロテオグリカンに対して、制御した酵素消化を行うことで欠損表面へのマトリックス接着を促進する可能性を検討した。3体の成熟ウサギの膝関節中に、平削りナイフを用いて傷つけることにより、欠損を生じさせた。これらの欠損に対しては、酵素処理を行わなかった。欠損にフィブリンマトリックスを充填した。欠損に充填する約200秒前に、このフィブリンマトリックスを、1 mlのフィブリンノーゲン溶液(1 mg/mlの濃度で水性バッファーに溶解したもの)に対して、

40

【数 3 4】

20 μ l の割合のトロンビン溶液 (100 U/ml の濃度で水性バッファーに溶解したもの) を混合することによって、形成した。これらのウサギを1ヶ月後に屠殺して、その膝関節を検査することにより、欠損部位に対するフィブリンマトリックスの接着程度を決定した。これらの結果を、欠損にフィブリンマトリックスを充填する前にコンドロイチナーゼABC (1 U/ml で4分間) で欠損を処理したウサギによって得た結果 (実施例 3、4 および 5 参照) と比較した。

10

酵素で処理しない欠損領域中に堆積したフィブリンマトリックスでは、欠損表面に接着するための親和力は低いものであった。酵素処理の後には、フィブリンマトリックスの固着能力 (接着するための機械的強度を測定すること、即ち、手を使って鉗子の先でマトリックスを押して除去できる容易さを試験することによって、そして、実験を通じてマトリックスが良好に固着し続けていた欠損の数を確認することによって、間接的に決定した) は、かなり増加した。酵素処理を行わない場合の欠損表面に対するマトリックスの低い親和力は、おそらくは、プロテオグリカン分子によるマトリックス接着の局所的阻害、および、フィブリン重合の阻害に起因する。これらの両方の影響は、欠損表面領域の表在のプロテオグリカン

20

30

実施例 3

40

欠損部位への増殖因子の塗布による、欠損領域中への修復細胞移動のための化学遊走刺激および修復細胞増殖の誘導の提

【数 3 5】
供

種々の増殖因子を試験して、欠損の治癒のために欠損領域への修復細胞の化学遊走移動を刺激する際のこれらの増殖因子の有用性を調べた。

使用した増殖因子は、a)表皮細胞成長因子(EGF)、b)塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、c)インスリン様増殖因子I(IGF I)、d)ヒト成長ホルモン(hGH)、およびe)トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)を、5-10 ng/mlの間の濃度で含有していた。

これらの各因子を、膝中に生じさせた欠損に局所的に塗布した。この各因子の塗布は、実施例2に記載のようにコンドロイチナーゼABCによる処理および洗浄を行った後に、行った。合計10体の動物(各増殖因子に対して2体)を使用した。各増殖因子は、欠損表面を完全に覆う程十分に、修復細胞を化学遊走により欠損表面に誘引するか、あるいは欠損表面での修復細胞の増殖を局所的に刺激することができた。しかし、これらの細胞は、欠損の表面にのみ存在しており、欠損の体積を充たす程十分な修復細胞の増殖は一例も見られなかった。

(プロテオグリカン分解産物自体によって、即ち、他の何れの因子を添加することなく、欠損に修復細胞を誘引するだけの十分な化学遊走効果が得られると考えられている。Moore, A. R.ら[Int. J. Tiss. Reac., XI(b), pp. 301-107、1989]は、プロテオグリカン分解産物自体が化学遊走効果を有することを明らかにしている。)

【数 3 6】

実施例 4

生分解性マトリックス中に閉じ込めた増殖因子を欠損部位に塗布することによる、欠損領域への修復細胞移動のための化学遊走刺激および修復細胞増殖の誘導の提供

実施例 3 の条件下で増殖因子を局所的に塗布した場合には、
欠損体積を充たすだけの十分な修復細胞増殖が誘導されるこ
とは決して無い。したがって、同じ増殖因子を用いて実験を
行ったが、ただし、今回は、増殖因子を生物分解性マトリッ
クス中に閉じ込めた。使用した生分解性マトリックスは、フ
ィブリン、コラーゲンおよびセファロースであった。増殖因
子を含む十分な量のマトリックスを、欠損体積中に完全
に充填するように塗布した。

1 ml のフィブリンノーゲン溶液 (1 mg/ml の濃度で水性バッ
ファー溶液に溶解したもの：水性バッファー溶液として、0.05
M のトリス、pH 7.4、0.1 M の NaCl) に対して、20 μ l の割合
のトロンビン溶液 (100 U/ml の濃度で水性バッファー溶液に溶
解したもの：水性バッファー溶液として、ベロナールアセテ
ートバッファー、pH 7.0) を混合することによって、フィブリ
ンマトリックスを形成した。この形成は、欠損に充填する約
200 秒前に行われた。コラーゲンマトリックスの場合には、十
分に粘性を有する溶液を、Colagen-Vliess®あるいはゼラチン
と血液との混合物を用いて作った。セファロースマトリック
スの場合には、欠損にセファロース溶液を 39-42℃ にて充填し
た。これを冷却 (35-38℃) すると、セファロースマトリックス

【数 3 7】

が欠損中に形成された。

30体のウサギ(各タイプのマトリックスおよび増殖因子に対して2体)を実験に使用した。堆積されたマトリックスが欠損に接着し続けた全ての場合において、線維芽細胞様修復細胞がマトリックス全体に集まった。この状態は、術後8-10日目という早い時期に生じることが見いだされた。術後4週間目までに、修復組織の組織構造にはこれ以上の変化は生じなかったが、ただし、生物分解性マトリックスは修復細胞によって再造形されて、これに代わって目の粗い結合組織タイプの細胞外マトリックスが形成された。

10

この組織の軟骨組織への形質転換は、生じなかった。

20

実施例 5

生分解性マトリックス中に閉じ込めた増殖因子を欠損部位に塗布することによる、欠損領域への修復細胞移動のための化学遊走刺激および修復細胞増殖の誘導の提供、ならびにこれに続いて第2段階で所定時間後にトランスフォーミング因子を局所的に放出することによる、欠損部位のヒアリン様軟骨への形質転換の提供

30

増殖因子を塗布した後に、欠損体積中のマトリックスが完全に修復細胞によって満たされたこと、および、これらの細胞が、堆積されたマトリックスを再造形できたことを観察した(実施例 4 参照)ことに着想を得て、トランスフォーミング因子(TGF- β など)を、カプセル化形態(例えばリボソーム中)で導入した場合の効果を検討した。マトリックス全体に修復

40

【 0 0 4 9 】

【数 3 8】

細胞が集まり、これらの細胞が細胞間構造の再造形を行い始めた時に、このカプセル化形態から、トランスフォーミング因子が放出されるのである。

TGF- β をフィブリノーゲン溶液 (1 mg/ml) 中に低濃度で (例えば 2-10 ng/ml) 混合した。これは、初期の化学遊走および増殖効果を促進するためである。さらに、TGF- β を、前出の Kim ら (1983) の方法に従って、リポソーム中にカプセル化した。これらの TGF- β 含有リポソームを、同じフィブリノーゲン溶液に添加した。その際には、TGF- β 含有リポソームの濃度を、リポソームが破裂して TGF- β が放出された時に、1 ml のフィブリノーゲンに対して 100-1000 ng の割合の TGF- β という、より高い TGF- β 濃度が得られるような十分な濃度とした。これは、フィブリンマトリックス中に集まった修復細胞が細胞間物質の再造形を行い始めた第 2 段階中に、修復細胞の軟骨細胞への形質転換、およびマトリックスを充填した欠損の軟骨への形質転換を促進するためである。

10 体の成熟ウサギに対して、実施例 2 の場合と同様に、膝関節軟骨の表層性欠損を生じさせて、そして、遊離した TGF- β およびリポソーム中にカプセル化した TGF- β を含有するフィブリノーゲンの混合物を欠損部位に塗布することによって、これらのウサギを治療した。この一連の実験中の種々の実験では、遊離 TGF- β の濃度を、フィブリノーゲンに対して 2-10 ng/ml の範囲で維持した。一方、カプセル化した TGF- β の濃度を変化させて、(TGF- β がリポソームから放出された時に)

【数 3 9】

フィブリノーゲンに対するTGF- β の濃度が100 ng/mlと1000 ng/mlとの間で100 ng/mlずつ段階的に異なる濃度となるようにした。全ての場合に、ヒアリン様軟骨組織が治療部位に形成された。最も高い再現性を示す結果は、フィブリノーゲン溶液に対するカプセル化したTGF- β 濃度が200 ng/mlより高い場合に得られ、好ましくはフィブリノーゲン溶液に対するTGF- β 濃度が500 ng/mlよりも高い場合に得られた。

10

実施例 6組織形質転換が生じる時点の決定

本実験では、6体の成熟ウサギのグループに対して、実施例 2 の場合と同様に、これらの膝に手術を施すことにより、表層性欠損を生じさせた。表層性欠損修復のための完全治療計画を提供した。即ち、コンドロイチナーゼABCで処理(1 U/mlで4分間)した後に、遊離TGF- β ($^{-2-10}$ ng/ml)およびリポソームに包み込まれたTGF- β ($^{-800}$ ng/ml)を含有するフィブリンマトリックス(1 mg/mlのフィブリノーゲン溶液、1 mlのフィブリノーゲン溶液に対して20 μ lの割合の100 U/mlのトロンビン溶液)を欠損部位に充填した。3体のウサギを、術後8日目、10日目および12日目に屠殺し、残りの3体を、20日目、24日目および28日目に屠殺した。原始的な線維芽細胞様修復細胞組織のヒアリン様軟骨組織への形質転換は、この動物モデルでは、12日目と20日目との間に生じた。これは、組織学的検査に基づいて決定された。8日目から12日目までは、目の粗い線維性修復組織が依然として存在していた(塗布されたフィブリ

20

30

40

【数 4 0】

ンマトリックスは、部分的あるいは完全に再造形されていた)。これに対して、20日目以降は、欠損空間は部分的あるいは完全にヒアリン様軟骨組織で満たされていた。

実施例 7ミニブタモデルでの軟骨修復手順の応用

ウサギモデルに使用した前出の実験手順を、より大きい動物モデル、即ちミニブタに使用した。表層性欠損(幅0.6 mm、深さ0.6 mm、および長さ約10-15 mm)を、4体の成熟ミニブタ(2-4歳、80-110 lb)中に生じさせた。これは、膝蓋骨溝中および内側顆上に平削りナイフで傷つけることによって、行った。次いで、これらの欠損をコンドロイチナーゼABCで(前出のウサギに使用したように、1 U/mlで4分間)処理した。酵素溶液を除去し、欠損を乾燥し、生理食塩水で洗浄し、そして再度乾燥した。次に、欠損部位にフィブリノーゲンマトリックス溶液を充填した。本実験で使用したフィブリノーゲンマトリックス溶液は、1 mlのフィブリノーゲン溶液に対して2-6 ngの割合で遊離TGF- β を含有し、かつ1 mlのフィブリノーゲン溶液に対して1500-2000 ngの割合で、リポソームにカプセル化したTGF- β を含有していた。ウサギを用いた実験で上述したように、欠損に充填する前に、マトリックス溶液にトロンピンを添加した。

術後6週間目にミニブタを屠殺し、マトリックスを充填した欠損部位を組織学的に検査した。全ての部位に治癒、即ち治療部位中のヒアリン様軟骨組織の形成が認められた。

【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】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軟骨の欠損あるいは損傷の領域を覆うために使用される、生分解性マトリックスあるいはマトリックス形成物質を含む、軟骨の欠損あるいは損傷を、治療あるいは修復するための組成物であって、

該マトリックスあるいはマトリックス形成物質が：

該マトリックス中および該欠損あるいは損傷の領域中の線維芽細胞修復細胞の増殖を刺激するのに適切な濃度の増殖因子；および

送達システムと組合わされ、そして、該マトリックスおよび欠損中の増殖した線維芽細胞修復細胞に該トランスフォーミング因子が引き続き送達された時に、該修復線維芽細胞細胞を、軟骨組織を生産する軟骨細胞に形質転換するために適切な濃度である、トランスフォーミング因子；

を含有し、ここで、該トランスフォーミング因子が、TGF- β スーパーファミリーのメンバー、FGFおよびEGFからなる群より選択される、組成物。

【請求項 2】

前記マトリックスおよび欠損領域に線維芽細胞修復細胞を誘引するために、適切な濃度で化学遊走因子をさらに含有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記化学遊走因子が、TGF- β 類、FGF類、PDGF、TNF- α 、TNF- β およびプロテオグリカン分解産物からなる群より選択される、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記増殖因子が、TGF- β 類、FGF類、IGF I、PDGF、EGF、TGF- α 類、ヒト成長ホルモンおよび造血性増殖因子からなる群より選択される、請求項 1 あるいは 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記欠損領域に充填するために使用される前記生分解性マトリックスが、フィブリン、コラーゲン、ゼラチン、セファロース、あるいはこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 あるいは 2 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記増殖因子、前記化学遊走因子および前記トランスフォーミング因子が、TGF- β 類からなる群より選択される、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記トランスフォーミング因子が、1 種類あるいはそれ以上のトランスフォーミング因子の混合物である、請求項 1 あるいは 2 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記増殖因子および化学遊走因子が、マトリックス中で 2 - 50 ng/ml の濃度の TGF- β である；そして

前記トランスフォーミング因子が、適切な送達システムに組み込まれた TGF- β であり、該送達システムが、マトリックス中で 200 ng/ml を超える濃度の TGF- β を提供する；

請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記送達システムが、リポソーム、生物腐食性ポリマー、ヘパリン硫酸プロテオグリカン類に化学的に結合したコラーゲン線維、および炭水化物ベースの小体からなる群より選択される、請求項 1 あるいは 2 に記載の組成物。

【請求項 10】

軟骨の欠損あるいは損傷の、治療あるいは修復のための組成物であって：

トロンピンをフィブリノーゲン溶液に添加することで形成したフィブリンマトリックス；

該マトリックスおよび欠損中の線維芽細胞修復細胞の、増殖の刺激および誘引を行う増殖因子および化学遊走因子としての、該フィブリノーゲン溶液 1 ml 当り 2 - 10 ng の濃度で存在する TGF- β ；および

増殖した該線維芽細胞修復細胞へ引続き送達され、該線維芽細胞修復細胞を軟骨組織を生産する軟骨細胞に形質転換する、トランスフォーミング因子としての、リポソーム中にカプセル化され、そして、該フィブリノーゲン溶液 1 ml 当り 200 ng を超える濃度で存在する TGF- β ；

を含有する組成物。

【請求項 11】

トリペプチド Arg - Gly - Asp を含む細胞接着促進因子をさらに含有する、請求項 1 あるいは 2 に記載の組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 に記載のいずれかの組成物を含む軟骨の表層性欠損の治療のための治療薬。

【請求項 13】

動物の軟骨組織の選択された部位に、軟骨形成を誘起する方法に適した請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の組成物であって、該方法は、該組成物で該部位を覆う工程を包含する、組成物。

【請求項 14】

動物の軟骨の欠損あるいは損傷を治療する方法において使用するためのキットであって、該キットは：

生分解性マトリックスあるいはマトリックス形成物質；

線維芽細胞修復細胞の増殖を刺激するために有効な量の増殖因子；および

線維芽細胞修復細胞を軟骨細胞に形質転換するために有効な量のトランスフォーミング因子；

を含み、ここで該方法は、該増殖因子を含有し、そして引き続く線維芽細胞修復細胞への送達のために隔離された該トランスフォーミング因子を含有する、該生分解性マトリックスあるいはマトリックス形成物質を、該欠損あるいは損傷へ充填する工程を包含し、該トランスフォーミング因子が、TGF- β スーパーファミリーのメンバー、FGF および EGF からなる群より選択される、キット。

【請求項 15】

動物の軟骨中の欠損あるいは損傷を治療する方法において使用するためのキットであって、該キットは：

生分解性マトリックスあるいはマトリックス形成物質；

線維芽細胞修復細胞の増殖を刺激するために有効な量の増殖因子；および

線維芽細胞修復細胞を軟骨細胞に形質転換するために有効な量のトランスフォーミング因子；

を含み、ここで該方法は、該増殖因子を含有する該生分解性マトリックスあるいはマトリックス形成物質を、該欠損あるいは損傷へ充填する工程、および該欠損に該マトリックスを充填してから約 1 - 2 週間後に、該トランスフォーミング因子を該マトリックス中に送達する工程を包含し、ここで、該トランスフォーミング因子が、TGF- β スーパーファミリーのメンバー、FGF および EGF からなる群より選択される、キット。

【請求項 16】

線維芽細胞修復細胞を誘引するために有効な量の化学遊走因子をさらに含む、請求項 14 あるいは 15 に記載のキットであって、ここで前記方法は、前記生分解性マトリックスあるいはマトリックス形成物質の中に、該化学遊走因子を含める工程をさらに包含する、

キット。

【請求項 17】

フィブリン接着剤あるいはトランスグルタミナーゼをさらに含む、請求項 14 あるいは 15 に記載のキットであって、ここで前記方法は、前記欠損へ前記生分解性マトリックスを充填する前に、該欠損の表面を該フィブリン接着剤あるいはトランスグルタミナーゼで覆う工程をさらに包含する、キット。

【請求項 18】

前記欠損の表面からプロテオグリカンを除去する薬剤をさらに含む、請求項 14 あるいは 15 に記載のキットであって、ここで前記方法は、前記欠損へ前記生分解性マトリックスを充填する前に、該薬剤を該欠損に充填する工程、および該薬剤を除去する工程をさらに包含する、キット。

【請求項 19】

請求項 16 に記載のキットであって、該キットは：

前記欠損の表面からプロテオグリカンを除去する薬剤；および

フィブリン接着剤あるいはトランスグルタミナーゼ；

をさらに含み、ここで前記方法は、該欠損を前記生分解性マトリックスで覆う前に、プロテオグリカンを除去する該薬剤を該欠損に充填する工程、該薬剤を除去する工程、および該欠損の表面を該フィブリン接着剤あるいはトランスグルタミナーゼで覆う工程をさらに包含する、キット。

【請求項 20】

欠損の表面からプロテオグリカンを除去する前記薬剤が、コンドロイチナーゼ A B C、コンドロイチナーゼ A C、ヒアルロニダーゼ、ペプシン、パパイン、トリプシン、キモトリプシン、プロナーゼ、ストロメリシンおよびスタフ V 8 プロテアーゼからなる群より選択される、請求項 18 あるいは 19 に記載のキット。

【請求項 21】

前記増殖因子、前記化学遊走因子および前記トランスフォーミング因子が、TGF- β である、請求項 16 あるいは 19 に記載のキット。

【請求項 22】

前記トランスフォーミング因子が、リポソーム、生物腐食性ポリマー、ヘパリン硫酸プロテオグリカンに化学的に結合したコラーゲン線維、および炭水化物ベースの小体からなる群より選択される送達システムと組み合わせられた、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 23】

前記生分解性マトリックスが、フィブリン、コラーゲン、ゼラチン、セファロース、あるいはこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 14 あるいは 15 に記載のキット。

【請求項 24】

前記生分解性マトリックスが、フィブリノーゲン溶液で前記欠損あるいは損傷を充填する直前に、フィブリノーゲン溶液にトロンピンを添加することによって形成される、フィブリンである、請求項 14 あるいは 15 に記載のキット。

【請求項 25】

前記増殖因子および前記化学遊走因子が、1 ml のマトリックス当たり 2 - 10 ng の濃度の TGF- β であり、そして、前記トランスフォーミング因子が、1 ml のマトリックス当たり 200 ng を超える濃度で存在する TGF- β である、請求項 16 あるいは 19 に記載のキット。

【請求項 26】

欠損の表面からプロテオグリカンを除去する前記薬剤が、コンドロイチナーゼ A B C であり、そして、1 単位 / ml の濃度のコンドロイチナーゼ A B C を含有する溶液を 4 分間、該欠損に充填する、請求項 18 あるいは 19 に記載のキット。

【請求項 27】

前記生分解性マトリックスあるいはマトリックス形成物質がさらに、トリペプチド Ar

g - G l y - A s p を含む細胞接着促進因子を含有する、請求項 1 4 あるいは 1 5 に記載のキット。

【請求項 2 8】

動物の軟骨の欠損あるいは損傷を治療する方法において使用するためのキットであって、該キットは：

コンドロイチナーゼ A B C の無菌溶液；

トロンビン；および

1 m g / m l のフィブリノーゲンを含有し、そして 2 - 1 0 n g / m l の濃度の T G F - β と、 2 0 0 n g / m l を超える濃度のリボソーム中の T G F - β とを含む、マトリックス形成溶液、

を含み、ここで該方法は：

1 単位 / m l の濃度の該コンドロイチナーゼ A B C の無菌溶液を 4 分間、該欠損あるいは損傷領域に充填する工程；

該コンドロイチナーゼ A B C の溶液を除去する工程；

無菌生理食塩水で該欠損領域を洗浄する工程；

該欠損領域を乾燥する工程；

マトリックス形成溶液の 1 m l 当り 2 単位の該トロンビンを添加する工程；および

該トロンビンを添加した直後に、該マトリックス形成溶液を該欠損に充填する工程；

を包含する、キット。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 に記載のキットであって、該キットはフィブリン接着剤あるいはトランスグルタミナーゼをさらに含み、ここで前記方法は、前記マトリックス形成溶液を前記欠損に充填する前に、該フィブリン接着剤あるいはトランスグルタミナーゼで該欠損の表面を覆う工程をさらに包含する、キット。

【請求項 3 0】

リボソーム中の前記 T G F - β が、 5 0 0 n g / m l よりも高い濃度である、請求項 2 8 に記載のキット。

フロントページの続き

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA02 CA18 DB60 MA34 MA67 NA12 NA14 ZA961 ZA962