

(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2017-531495

(P2017-531495A)

(43) 公表日 平成29年10月26日(2017.10.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 F 2/08 (2006.01)</b>	A 6 1 F 2/08	4 C 0 8 1
<b>A 6 1 L 27/24 (2006.01)</b>	A 6 1 L 27/24	4 C 0 9 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2017-519246 (P2017-519246)	(71) 出願人	514316178 オーソセル・リミテッド
(86) (22) 出願日	平成27年10月12日 (2015.10.12)		オーストラリア国、6150 マードック
(85) 翻訳文提出日	平成29年6月8日 (2017.6.8)		・ダブリュ、エー、サウス・ストリート
(86) 国際出願番号	PCT/AU2015/000612		、マードック・ユニバーシティー、ビルデ
(87) 国際公開番号	W02016/054687		ィング 191
(87) 国際公開日	平成28年4月14日 (2016.4.14)	(74) 代理人	100108855
(31) 優先権主張番号	2014904054		弁理士 蔵田 昌俊
(32) 優先日	平成26年10月10日 (2014.10.10)	(74) 代理人	100103034
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 野河 信久
		(74) 代理人	100153051
			弁理士 河野 直樹
		(74) 代理人	100179062
			弁理士 井上 正

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟組織の無縫合修復

(57) 【要約】

本発明は、前十字靭帯 (ACL) などの靭帯を含む軟組織における軟組織欠損を修復する無縫合方法に関する。特に、本発明は、軟組織欠損を修復する無縫合方法であって、(i) 前記軟組織欠損の少なくとも一部を包囲するように構成されたコラーゲン含有パッチを用意すること；(ii) 前記軟組織欠損および/またはコラーゲン含有パッチを感作物質と接触させること；(iii) 前記軟組織欠損を前記コラーゲン含有パッチで包囲して生体活性チャンバを生成すること；および(iv) 前記コラーゲン含有パッチを前記軟組織欠損に縫合せずに付着させることを含む方法に関する。

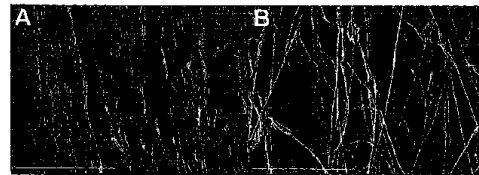


Figure 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

軟組織欠損を修復する無縫合方法であって、

( i ) 前記軟組織欠損の少なくとも一部を包囲するように構成されたコラーゲン含有パッチを用意すること；

( i i ) 前記軟組織欠損および/またはコラーゲン含有パッチを感作物質と接触させること；

( i i i ) 前記軟組織欠損を前記コラーゲン含有パッチで包囲して生体活性チャンバを生成すること；および

( i v ) 前記コラーゲン含有パッチを前記軟組織欠損に縫合せずに付着させることを含む、方法。 10

## 【請求項 2】

靱帯欠損を修復する無縫合方法であって、

( i ) 前記靱帯欠損の少なくとも一部を包囲するように構成されたコラーゲン含有パッチであって、25 μmと200 μmの間の厚さであるパッチを用意すること；

( i i ) 前記靱帯欠損および/またはコラーゲン含有パッチをローズベンガルと接触させること；

( i i i ) 前記靱帯欠損を前記コラーゲン含有パッチで包囲して生体活性チャンバを生成すること；および

( i v ) 前記コラーゲン含有パッチにレーザーまたは光源からの光を当てて前記靱帯欠損に付着させることを含む、方法。 20

## 【請求項 3】

前記コラーゲン含有パッチは、

( i ) コラーゲン含有組織を単離し、エタノール溶液中でインキュベートすること；

( i i ) 工程 ( i ) からの前記コラーゲン含有組織を、その中に含有される非コラーゲン性タンパク質を変性させるために無機塩と陰イオン界面活性剤とを含む第 1 の溶液中でインキュベートすること；

( i i i ) 工程 ( i i ) において生成された前記コラーゲン含有組織を、材料中のコラーゲンが変性するまで無機酸を含む第 2 の溶液中でインキュベートすること；および 30

( i v ) 工程 ( i i i ) において生成された前記コラーゲン含有組織を、無機酸を含む第 3 の溶液中で、同時に機械的刺激を加えながら前記コラーゲン含有組織中のコラーゲン束を整列させるのに十分な時間インキュベートすることを含む方法により生成され、

前記機械的刺激が前記コラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む、請求項 1 または 2 に記載の無縫合方法。

## 【請求項 4】

前記軟組織欠損は、靱帯組織、腱組織、静脈組織、動脈組織、および神経管組織からなる群から選択される軟組織に存在する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記靱帯欠損は、前十字靱帯 ( A C L ) に存在する、請求項 2 から 4 のいずれか一項に記載の方法。 40

## 【請求項 6】

前記感作物質は、アセトフェノン、ベンゾフェノン、ナフタレン、ピアセチル、エオシン、ローズベンガル、ピレン、アントラセン、およびフェノチアジンからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記感作物質はローズベンガルである、請求項 1、3 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記コラーゲン含有パッチは、80%を超えるI型コラーゲンを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記コラーゲン含有パッチは、90%を超えるI型コラーゲンを含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記コラーゲン含有パッチの最大引張荷重強度が25Nを超える、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記コラーゲン含有パッチの弾性率が100MPaを超える、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項12】

前記コラーゲン含有パッチの最大荷重時伸びが元の長さの85%未満である、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記コラーゲン含有パッチは、25 $\mu$ mと200 $\mu$ mの間の厚さである、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記コラーゲン含有パッチは、約50 $\mu$ mの厚さである、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項15】

軟組織欠損の無縫合修復に使用するコラーゲン含有パッチであって、25 $\mu$ mと200 $\mu$ mの間の厚さであり、90%を超えるI型コラーゲンを含み、最大引張荷重強度が100Nを超え、弾性率が200MPaを超え、前記軟組織を包囲して生体活性チャンバを生成することができるコラーゲン含有パッチ。

【請求項16】

前記パッチは、

(i)コラーゲン含有組織を単離し、エタノール溶液中でインキュベートすること；

(ii)工程(i)からの前記コラーゲン含有組織を、その中に含有される非コラーゲン性タンパク質を変性させるために無機塩と陰イオン界面活性剤とを含む第1の溶液中でインキュベートすること；

30

(iii)工程(ii)において生成された前記コラーゲン含有組織を、材料中のコラーゲンが変性するまで無機酸を含む第2の溶液中でインキュベートすること；および

(iv)工程(iii)において生成された前記コラーゲン含有組織を、無機酸を含む第3の溶液中で、同時に機械的刺激を加えながら前記コラーゲン含有組織中のコラーゲン束を整列させるのに十分な時間インキュベートすること

を含む方法により生成され、

前記機械的刺激が前記コラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む、請求項15に記載のコラーゲン含有パッチ。

【請求項17】

40

前十字靭帯(ACL)の部分的または完全な断裂を修復する方法であって、

(i)前記ACLの少なくとも一部を包囲するように構成されたコラーゲン含有パッチを用意すること；

(ii)前記ACLおよび/またはコラーゲン含有パッチを感作物質と接触させること；

(iii)前記ACLを前記コラーゲン含有パッチで包囲して生体活性チャンバを生成すること；および

(iv)前記コラーゲン含有パッチを前記ACLに縫合せずに付着させることを含む方法。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、前十字靭帯（ACL）などの靭帯を含む軟組織における軟組織欠損を修復する無縫合方法に関する。修復は、部分的または完全な断裂の修復を含む。特に、本発明は、感作物質を使用して軟組織欠損の部位にコラーゲン含有パッチを付着させることを含み、軟組織欠損の周囲に組織の修復を促進する微細環境を提供する生体活性チャンバが形成される、軟組織欠損を修復する無縫合方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

腱組織、靭帯組織、脈管組織、皮膚組織などは、集合的に軟組織と呼ばれることが多い。靭帯は、異なる器官または組織を接続し、骨と骨とをつなぐ特殊化した結合軟組織である。後者の場合、靭帯は、骨の自然な動きを可能とするだけの柔軟性があることで関節に安定性をもたらすと共に、加えられた力に対する抵抗を防ぐために強靭であって、伸張しない。腱は、筋肉を骨に接続し、張力に耐えることができる。加えて、腱は、移動運動中に力を受動的に調節し、能動的な活動を伴わずに更なる安定性をもたらす。腱の弾性特性は、腱がエネルギーを高効率で貯蔵し回収することを可能とする。腱および靭帯においては、コラーゲン繊維の束がプロテオグリカン成分でできた連結マトリックスに包埋されている。これらのコラーゲン繊維の束は、荷重支持要素を提供する。腱においては、コラーゲン繊維はほぼ平行な形態に配列されているため、単一方向の高荷重に耐えることができる。靭帯においては、コラーゲン繊維は平行度がそれよりも低い形態に配列されていることにより、一方向の優勢な引張応力には耐えられるが、他の方向の応力にはそれほど耐えることができない。

10

20

## 【0003】

毎年、何十万もの人々が特に膝、肩、および足首の靭帯を捻挫、断裂、または破断したり、上下肢、特に肩、膝、足、および足首の腱の傷害に苦しんだりしている。この種の傷害に見舞われることの多い靭帯の一つが膝の前十字靭帯（ACL）である。ACLは、第1に前脛骨の並進を安定させるものとして、第2に膝の内外反屈曲角形成を安定させるものとして機能し、スポーツ傷害および交通事故に伴う屈曲・回転・外反力に起因する破断または断裂を負いやすい。破断または断裂は多くの場合、重度の可動性低下；疼痛および不快感；ならびにスポーツや運動への参加不能という結果をもたらす。米国だけでも毎年200,000を超える人々がACLを断裂または破断し、ACL再建手術と長期のリハビリにおよそ30億ドルの費用が発生している。ACLの治療力が低いことは広く知られている。ACLが著しい断裂または破断を負って関節が不安定になった場合には、外科的な全置換および再建が必要となる。最も一般的な方法は、断裂した靭帯を自家移植片としても知られる患者自身の組織で置き換えることにより断裂したACLを再建することである。代用靭帯の他の選択肢としては、同種移植片としても知られる別の生物に由来するドナー組織、および人工移植片がある。

30

## 【0004】

タンパク質、ヒドロゲル、またはコラーゲンでできた三次元の足場に加えて、コラーゲン繊維、生分解性ポリマー、および複合材料を使用した軟組織分断の再建が用いられてきた。しかし、一般的には、これらの処置はいずれも、何らかの形の縫合を必要とする。

40

## 【0005】

縫合の必要性を排除し、随伴する組織損傷を回避する外科的技法は、靭帯、腱、血管、および神経の顕微鏡下修復にとって、達成されていない目標である。靭帯や腱のような繊細な構造体に縫合系を配置すれば、継続的な問題を生じることは避けられない。例えば、永続的な縫合系の存在は、修復部位において炎症および瘢痕化を含む免疫反応を生じさせる。縫合系の材料もまた、結果的に血栓形成促進効果を伴う内皮の不規則化をもたらす。加えて、縫合系が存在すると、他のシーラント技術と比較して比較的低い漏出時圧で示されるように、瞬間的な水密シールが実現できない。

## 【0006】

50

靱帯、腱、血管、神経などの縫合修復の限界の幾つかを克服しようとする試みにおいて、過去の研究者達は、リング、クリップ、接着剤、およびレーザー溶着を使用してきた。これらの方法論の一部は、Zeebregtsら(2003)、Br J Surg; 90:261-271において論じられている。しかし、これらの代替法はいずれも、実質的な異物反応または組織傷害に関連する重大な欠点を有し、それが広汎な臨床導入を妨げている。

#### 【0007】

レーザーを利用した修復は、25年間以上の研究の対象であり、修復部位を加熱して「溶着」を形成するためのレーザーエネルギーの送達を伴う(Wolf-de Jongeら(2004)、Eur J Vasc Endovasc Surg.、27:466-476)。1970年代後半から、アルゴン、CO<sub>2</sub>、近赤外ダイオード、およびNd:YAGレーザーを使用した組織の溶着に関する多数の報告がある(例えば、Gelliら(1997)、J. Reconstr. Microsurg.、13:199-205; Jain & Gorisch(1979)、Surgery、85:684-688; Lewis & Uribe(1993)、Laryngoscope、103:850-853; Neblettら(1986)、Neurosurgery、19:914-934; Samonte & Fried(1991)、Lasers Surg Med.、11:511-516; Serureら(1983)、Surg. Forum、34:634-636; Tangら(1994)、Lasers Surg Med.、14:229-237; Valeら(1986)、Plast. Reconstr. Surg.、77:759-766参照)。これらの報告および多くの他の報告では、レーザーエネルギーを熱に変換し、局所的な組織温度を上昇させて細胞外マトリックスタンパク質を変性させ、その結果、組織の溶着および修復がなされる。

#### 【0008】

レーザー溶着の多くの理論的利点にもかかわらず、この技法は臨床導入されていない。その理由は様々であるが、組織の加熱はどうしても傷害を生じ、そのため、レーザー溶着の分野におけるあらゆる前臨床研究にもかかわらず、臨床領域への適用は未だ実現していない。

#### 【0009】

従って、足場および縫合糸を使用して同定された問題を軽減する、または少なくとも克服する方向に働く、腱組織、靱帯組織、脈管組織、皮膚組織などの欠損を含む軟組織欠損を修復する方法に対する必要性が依然として存在する。

#### 【発明の概要】

#### 【0010】

第1の態様において、本発明は、軟組織欠損を修復する無縫合方法であって、

(i) 前記軟組織欠損の少なくとも一部を包囲するように構成されたコラーゲン含有パッチを用意すること;

(ii) 前記軟組織欠損および/またはコラーゲン含有パッチを感作物質と接触させること;

(iii) 前記軟組織欠損を前記コラーゲン含有パッチで包囲して生体活性チャンバを生成すること;および

(iv) 前記コラーゲン含有パッチを前記軟組織欠損に縫合せずに付着させることを含む方法を提供する。

#### 【0011】

一部の実施形態において、軟組織欠損は、靱帯組織、腱組織、静脈組織、動脈組織、および神経管組織からなる群から選択される軟組織に存在する。一部の実施形態において、軟組織欠損は前十字靱帯(ACL)などの靱帯に存在する。

#### 【0012】

明細書全体を読んだ当業者には当然のことであるが、感作物質は、放射線または光線からエネルギーを吸収し、そのエネルギーをコラーゲン含有パッチおよび/または軟組織に

伝達して治療している軟組織にコラーゲン含有パッチを付着または「溶着」させる効果を有する。

【0013】

本発明において使用可能な感作物質の非網羅的例としては、アセトフェノン、ベンゾフェノン、ナフタレン、ピアセチル、エオシン、ローズベンガル、ピレン、アントラセン、フェノチアジンなどが挙げられる。一部の実施形態において、感作物質はローズベンガルである。

【0014】

コラーゲン含有パッチは、好ましくは以下の特性を有する。

【0015】

- a) 組織集積および血管新生に有利に働くような形で相互接続する細孔；
- b) 通常の組織が最終的には足場を置き換えるような生分解性および/または生体再吸収性；
- c) 細胞の接着、増殖、および分化を促進する表面化学作用；
- d) 強度および柔軟性；ならびに
- e) 低抗原性。

【0016】

コラーゲン含有パッチは、80%を超えるI型コラーゲンを含む。他の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、少なくとも85%のI型コラーゲンを含む。更に別の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、90%を超えるI型コラーゲンを含む。

【0017】

コラーゲン含有パッチ内のコラーゲン繊維または束は、編み構造を含むものとなる。本明細書において使用した場合、「編み構造」という用語は、繊維または束の第1および第2の群を含む構造を意味する。ここで、第1の群の繊維または束は主として第1の方向に延び、第2の群の繊維または束は主として第2の方向に延び、第1と第2の方向は互いに異なり、第1の群の繊維または束は、第2の群の繊維または束と交互配置になっている、ないしは混ざりあって存在している。方向の違いは約90°であってもよい。

【0018】

一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチの最大引張荷重強度は20Nを超える。一部の実施形態において、本発明のコラーゲン含有パッチの最大引張荷重強度は、25N、40N、60N、80N、100N、120Nまたは140Nを超える。

【0019】

一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチの弾性率は、100MPaを超える。他の実施形態において、コラーゲン含有組織の弾性率は、200MPa、300MPa、400MPaまたは500MPaを超える。

【0020】

一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチの最大荷重時伸びは、元の長さの85%未満である。

【0021】

最も重要なのは、本発明のコラーゲン含有パッチは、修復中の軟組織を支持できるだけの十分な厚さがなければならないことである。しかし、厚すぎてコラーゲン含有パッチを軟組織に付着させる能力が損なわれてはならない。従って、一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、25 $\mu$ mと200 $\mu$ mの間の厚さである。一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、30 $\mu$ mと180 $\mu$ mの間の厚さである。他の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、35 $\mu$ mと170 $\mu$ mの間の厚さである。更に別の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、40 $\mu$ mと160 $\mu$ mの間の厚さである。更に別の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、45 $\mu$ mと150 $\mu$ mの間の厚さである。更に別の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、50 $\mu$ mと140 $\mu$ mの間の厚さである。更に別の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、50 $\mu$ mと100 $\mu$ mの間の厚さである。最後に、一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、約

10

20

30

40

50

50  $\mu\text{m}$ の厚さである。

【0022】

一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、パッチを成形することで、もとの位置でのより良好な処置手段を提供するように構成される。一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、図3に示すコラーゲン含有パッチに対応する。

【0023】

当業者には当然のことであるが、コラーゲン含有パッチは、数多くの技法を使用して製造することができる。一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、

(i) コラーゲン含有組織を単離し、エタノール溶液中でインキュベートすること；

(ii) 工程(i)からのコラーゲン含有組織を、その中に含有される非コラーゲン性タンパク質を変性させるために無機塩と陰イオン界面活性剤とを含む第1の溶液中でインキュベートすること；

(iii) 工程(ii)において生成されたコラーゲン含有組織を、前記材料中のコラーゲンが変性するまで無機酸を含む第2の溶液中でインキュベートすること；および

(iv) 工程(iii)において生成されたコラーゲン含有組織を、無機酸を含む第3の溶液中で、同時機械的刺激を加えながら前記コラーゲン含有組織中のコラーゲン束を整列させるのに十分な時間インキュベートすることにより製造され、

機械的刺激がコラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む。

【0024】

第2の態様において、本発明は、軟組織の無縫合修復に使用するコラーゲン含有パッチであって、25  $\mu\text{m}$ と200  $\mu\text{m}$ の間の厚さであり、90%を超えるI型コラーゲンを含み、最大引張荷重強度が100Nを超え、弾性率が200MPaを超え、前記軟組織を包囲して生体活性チャンバを生成することができるパッチを提供する。

【0025】

一部の実施形態において、軟組織の無縫合修復に使用するコラーゲン含有パッチは、

(i) コラーゲン含有組織を単離し、エタノール溶液中でインキュベートすること；

(ii) 工程(i)からのコラーゲン含有組織を、その中に含有される非コラーゲン性タンパク質を変性させるために無機塩と陰イオン界面活性剤とを含む第1の溶液中でインキュベートすること；

(iii) 工程(ii)において生成されたコラーゲン含有組織を、前記材料中のコラーゲンが変性するまで無機酸を含む第2の溶液中でインキュベートすること；および

(iv) 工程(iii)において生成されたコラーゲン含有組織を、無機酸を含む第3の溶液中で、同時機械的刺激を加えながら前記コラーゲン含有組織中のコラーゲン束を整列させるのに十分な時間インキュベートすることにより生成され、

機械的刺激がコラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む。

【0026】

第3の態様において、本発明は、前十字靭帯(ACL)の部分的または完全な断裂を修復する方法であって、

(i) 前記ACLの少なくとも一部を包囲するように構成されたコラーゲン含有パッチを用意すること；

(ii) 前記ACLおよび/またはコラーゲン含有パッチを感作物質と接触させること；

(iii) 前記ACLを前記コラーゲン含有パッチで包囲して生体活性チャンバを生成すること；および

(iv) 前記コラーゲン含有パッチを前記ACLに縫合せずに付着させることを含む方法を提供する。

【0027】

当業者には当然のことであるが、本発明のコラーゲン含有パッチを軟組織に付着させる工程は、組織を「溶着」するためにレーザー放出光エネルギーまたは無線周波数(「RF」)エネルギーを使用する組織溶着を含む、当技術分野で公知の任意の方法とすることが

できる。フィブリン接着剤またはPLA/PLGポリマーなどの生体適合性接着剤といった他の非縫合付着手段を使用してもよい。

【0028】

一部の実施形態において、レーザーを使用した組織溶着によりコラーゲン含有パッチを軟組織に付着させる。レーザーの最適なパルス長は当業者により決定されるが、一例として、100 $\mu$ mの厚さであるコラーゲン含有パッチは、1～6分にわたり33～600msのパルスを使用して付着させることができる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】図1は、例1の方法により調製したコラーゲン含有パッチの表面形態を示す走査電子顕微鏡画像を含む。パッチが、緻密なコラーゲン束を特徴とする平滑な表面(A)と、粗目のコラーゲン繊維の粗い多孔質な表面(B)との2つの異なる表面を有することがわかる。スケールバー：500 $\mu$ m。

10

【図2】図2は、本発明の方法により生成したコラーゲン膜の走査電子顕微鏡法(SEM)画像( $\times 100$ )を示す。

【図3】図3は、本発明のパッチの「蝶型」配置構成を示す。

【発明の好適な実施形態の詳細な説明】

【0030】

他様に定義しない限り、本明細書において使用する用語(技術的および科学的用語を含む)は全て、本発明が属する分野の当業者が一般に理解するものと同じ意味を有する。更に、当然ながら、一般に使用されている辞書において定義されているような用語は、本明細書および関連技術の文脈における意味と一致する意味を有するものと解釈すべきであり、本明細書において明確に定義しない限り、理想化された意味、または過度に形式的な意味に解釈すべきではない。周知の機能または構成は、簡潔化および/または明確化のために詳細に記載されないことがある。

20

【0031】

本明細書において使用される用語は、特定の実施形態を説明する目的のためだけのものであり、本発明を限定する意図はない。本明細書において使用する場合、単数形である「a」、「an」および「the」は、文脈上そうでないことが明らかである場合を除き、複数形も含むことが意図されている。更に、当然ながら、本明細書において使用する場合、「含む(comprises)」および/または「含む(comprising)」という用語は、記載した特徴、整数、工程、操作、要素、および/または成分の存在を明示するが、1つまたは複数の他の特徴、整数、工程、操作、要素、成分、および/またはこれらの群の存在または追加を排除するものではない。本明細書において使用する場合、「および/または」という用語は、掲載された関連項目の1つまたは複数のありとあらゆる組合せを含む。本明細書において使用する場合、「XとYの間」および「約XとYの間」などのフレーズは、XとYとを含むものと解釈すべきである。本明細書において使用する場合、「約XとYの間」などのフレーズは、「約Xと約Yの間」という意味である。本明細書において使用する場合、「約XからYまで」などのフレーズは、「約Xから約Yまで」という意味である。

30

40

【0032】

本明細書において数値範囲を列挙する場合、間に存在する数が同等の正確さで明示的に考慮される。例えば、6～9の範囲といった場合、6および9に加えて7および8の数字も考慮され、6.0～7.0の範囲といった場合、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、および7.0という数字が明示的に考慮される。

【0033】

本明細書において使用した場合、「約」という用語は、この用語に続く値の10%上または下の偏差を意味する。例えば、約50 $\mu$ mの厚さであるコラーゲン含有パッチと言及した場合、45 $\mu$ mと55 $\mu$ mの間の範囲、即ち、50 $\mu$ mの値の上下10%が含まれる

50

。これには、45 μm、46 μm、47 μm、48 μm、49 μm、50 μm、51 μm、52 μm、53 μm、54 μm、および55 μmが含まれる。

【0034】

当然ながら、本発明の方法において記載される一連の操作（または工程）は、特に断りのない限り請求項または図において提示される順序に限定されるものではないと理解されるものである。

【0035】

考えられる最も広い態様において、本発明は、コラーゲン含有パッチを使用した軟組織の修復に関する。

【0036】

本明細書において使用した場合、「コラーゲン」という用語は、処理されたもの、または他の方法で改質されたものを含むあらゆる形態のコラーゲンを意味する。好適なコラーゲンは、免疫原性テロペプチド領域（「アテロペプチドコラーゲン」）を除去するために処理されており、可溶性であって、繊維状に再構成されるものである。I型コラーゲンが、靭帯組織、腱組織、静脈組織または神経組織の修復を伴うほとんどの用途に最適である。しかし、I型コラーゲンと組合せた他の形態のコラーゲンも本発明の実施には有用であり、ここでの考察から排除するものではない。

【0037】

「パッチ」という用語は、本明細書において開示する方法により生成され、組織が修復されるように、軟組織欠損または軟組織欠損部位に配置および/または付着させることが可能なコラーゲン含有組織の小片または断片を意味する。パッチは、任意の幾何学的形状とすることができるが、典型的には実質的に平面的であり、配置された場合には上または下にある組織の形状にフィットし得るものである。

【0038】

コラーゲン含有パッチは、好ましくは以下の特性を有する。

【0039】

- a) 組織集積および血管新生に有利に働くような形で相互接続する細孔；
- b) 通常の組織が最終的には足場を置き換えるような生分解性および/または生体再吸収性；
- c) 細胞の接着、増殖、および分化を促進する表面化学作用；
- d) 強度および柔軟性；ならびに
- e) 低抗原性。

【0040】

コラーゲン含有パッチは、典型的には、どんな哺乳動物にもみられる密生結合組織を含む「コラーゲン含有組織」から調製または製造される。「コラーゲン含有組織」という用語は、コラーゲンを含有する哺乳類の身体から単離可能な、皮膚、筋肉などを意味する。「コラーゲン含有組織」という用語は、コラーゲンまたはコラーゲンを含有する物質が体外で構築または製造された「合成的に」生成された組織も包含する。

【0041】

一部の実施形態において、コラーゲン含有組織は、ヒツジ、ウシ、ブタ、またはヒトを含むがこれに限定されない哺乳類の動物から単離される。他の実施形態において、コラーゲン含有組織は、ヒトから単離される。

【0042】

一部の実施形態において、コラーゲン含有組織は、「自家移植性」、即ち、治療が必要な患者の身体から単離されたものである。

【0043】

一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、80%を超えるI型コラーゲンを含む。他の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、少なくとも85%のI型コラーゲンを含む。更に別の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、90%を超えるI型コラーゲンを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

コラーゲン含有パッチは、当技術分野で公知の任意の方法で製造してもよい。しかし、好適な一方法は、以下の工程

( i ) コラーゲン含有組織を単離し、組織をエタノール溶液中でインキュベートすること；

( i i ) 工程 ( i ) からのコラーゲン含有組織を、その中に含有される非コラーゲン性タンパク質を変性させるために無機塩と陰イオン界面活性剤とを含む第 1 の溶液中でインキュベートすること；

( i i i ) 工程 ( i i ) において生成されたコラーゲン含有組織を、前記材料中のコラーゲンが変性するまで無機酸を含む第 2 の溶液中でインキュベートすること；および

( i v ) 工程 ( i i i ) において生成されたコラーゲン含有組織を、無機酸を含む第 3 の溶液中で、同時機械的刺激を加えながら前記コラーゲン含有組織中のコラーゲン束を整列させるのに十分な時間インキュベートすること

を含み、

機械的刺激がコラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む。

## 【 0 0 4 5 】

ルイス酸と錯体を形成できる限り、第 1 の溶液にいかなる無機塩を使用してもよいことが理解される。一部の実施形態において、無機塩は、塩化トリメチルアンモニウム、塩化テトラメチルアンモニウム、塩化ナトリウム、塩化リチウム、過塩素酸塩、およびトリフルオロメタンスルホン酸塩からなる群から選択される。他の実施形態において、無機塩は塩化リチウム ( L i C l ) である。

## 【 0 0 4 6 】

任意の数の陰イオン界面活性剤を第 1 の溶液に使用してもよいが、一部の実施形態において、陰イオン界面活性剤は、アルキル硫酸塩、アルキルエーテル硫酸塩、アルキルスルホン酸塩、およびアルキルアリールスルホン酸塩からなる群から選択される。特に有用な陰イオン界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム ( S D S ) などのアルキル硫酸塩が挙げられる。

## 【 0 0 4 7 】

一部の実施形態において、第 1 の溶液は、約 1 % ( v / v ) の S D S と約 0 . 2 % ( v / v ) の L i C l とを含む。

## 【 0 0 4 8 】

一部の実施形態において、第 2 の溶液中の無機酸は、約 0 . 5 % ( v / v ) の H C l を含み、一方、第 3 の溶液中の無機酸は、約 1 % ( v / v ) の H C l を含む。

## 【 0 0 4 9 】

当業者には当然のことであるが、3つの工程のそれぞれにおけるインキュベーション期間は、( i ) コラーゲン含有組織の種類；( i i ) 無機塩 / 酸および / または陰イオン界面活性剤の種類；( i i i ) 使用する各無機塩 / 酸および / または陰イオン界面活性剤の強度 ( 濃度 ) 、ならびに ( i v ) インキュベーション温度によって変化する。一部の実施形態において、工程 ( i ) におけるインキュベーション期間は少なくとも 8 時間である。他の実施形態において、工程 ( i i ) におけるインキュベーション期間は 6 0 分未満であり、一方、他の実施形態において、工程 ( i i i ) におけるインキュベーション期間は少なくとも 2 0 時間である。

## 【 0 0 5 0 】

一部の実施形態において、工程 ( i i ) におけるインキュベーションは、約 4 で行われる。他の実施形態において、工程 ( i i ) におけるインキュベーションは、少なくとも 1 2 時間行われる。

## 【 0 0 5 1 】

一部の実施形態において、第 2 の溶液は、約 0 . 5 % ( v / v ) の H C l を含む。

## 【 0 0 5 2 】

一部の実施形態において、工程 ( i i i ) におけるインキュベーションは、約 3 0 分間

10

20

30

40

50

行われる。他の実施形態において、工程 ( i i i ) におけるインキュベーションは、振とうしながら行われる。

【 0 0 5 3 】

一部の実施形態において、第 3 の溶液は、約 1 % ( v / v ) の H C l 溶液を含む。

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態において、工程 ( i v ) におけるインキュベーションは、約 1 2 ~ 3 6 時間行われ、好ましくは約 2 4 時間行われる。他の実施形態において、工程 ( i v ) におけるインキュベーションは、振とうしながら行われる。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態において、本発明の方法は、工程 ( i i i ) と工程 ( i v ) の間に、約 0 . 5 % ( v / v ) の N a O H を用いた前記コラーゲン含有組織のインキュベーションを含む中和工程を更に含む。

10

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態において、本発明の方法は、工程 ( i v ) からのコラーゲン含有組織をアセトンを用いてインキュベートし、次いでコラーゲン含有組織を乾燥させることを含む工程 ( v ) を更に含む。

【 0 0 5 7 】

一部の実施形態において、本発明の方法は、工程 ( i i ) と ( i i i ) の間および / または工程 ( i i i ) と ( i v ) の間に、可視化して脂肪および / または血管の除去を容易にするために、コラーゲン含有組織をグリセロールと接触させる工程を更に含む。

20

【 0 0 5 8 】

グリセロールは、コラーゲン含有組織と、脂肪および / または血管の除去を容易にする任意の時間にわたって接触させてもよい。一部の実施形態において、接触時間は少なくとも 1 0 分である。

【 0 0 5 9 】

一部の実施形態において、本発明の方法は、工程 ( i i ) と ( i i i ) の間および / または工程 ( i i i ) と ( i v ) の間に、コラーゲン含有組織を洗浄する工程を更に含む。工程 ( i i ) と ( i i i ) の間に用いられる洗浄する工程の目的は、変性したタンパク質を除去することである。従って、変性したタンパク質を除去することができる任意の洗浄液を使用することができる。一部の実施形態において、工程 ( i i ) と ( i i i ) の間で

30

【 0 0 6 0 】

アセトンでの洗浄に続き、コラーゲン含有組織を滅菌水で更に洗浄する。

【 0 0 6 1 】

一部の実施形態において、コラーゲン含有組織を N a O H : N a C l 溶液中で更に洗浄する。コラーゲン含有組織を N a O H : N a C l で洗浄する場合、好ましくは、コラーゲン含有組織を次いで滅菌水で洗浄する。

【 0 0 6 2 】

一部の実施形態において、工程 ( i v ) の後、コラーゲン含有組織を第 1 の溶液で更に洗浄する。

40

【 0 0 6 3 】

本明細書に記載する方法において使用される「同時機械的刺激」という用語は、コラーゲン含有組織の化学処理中にコラーゲン含有組織を引き伸ばすプロセスを意味する。コラーゲン含有組織は、静的および / または周期的引き伸ばしに付されてもよい。従って、一部の実施形態において、同時機械的刺激は、

( i ) 予め設定された期間にわたるコラーゲン含有組織の引き伸ばし ;

( i i ) 予め設定された期間にわたるコラーゲン含有組織の弛緩 ; および

( i i i ) 工程 ( i ) と ( i i ) の n 回の繰返し ( n は 1 以上の整数である )

を含んでもよい。

【 0 0 6 4 】

50

コラーゲン含有組織を引き伸ばすことにより機械的刺激が実施される場合、コラーゲン含有組織は、好ましくはその長軸方向に引き伸ばされる。

【0065】

一部の実施形態において、同時機械的刺激は、コラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む。ただし、張力の周期には、約10秒～約20秒の引き伸ばし期間と、約10秒の弛緩期間とが含まれ、それによって生じる歪みはおよそ10%であり、機械的刺激は、コラーゲン含有組織内のコラーゲン束が本明細書に記載されているように整列するまで続けられる。

【0066】

一旦生成されると、コラーゲン含有組織は、編み構造を有するコラーゲン繊維または束を含む。本明細書において使用した場合、「編み構造」という用語は、繊維または束の第1および第2の群を含む構造を意味する。ここで、第1の群の繊維または束は主として第1の方向に延び、第2の群の繊維または束は主として第2の方向に延び、第1と第2の方向は互いに異なり、第1の群の繊維または束は、第2の群の繊維または束と交互配置になっている、ないしは混ざりあって存在している。方向の違いは約90°であってもよい。

【0067】

好適な方法によって作られるコラーゲン含有組織の「最大引張荷重強度」は20Nを超える。一部の実施形態において、本発明のコラーゲン含有組織の最大引張荷重強度は、25N、40N、60N、80N、100N、120Nまたは140Nを超える。

【0068】

更に、コラーゲン含有組織の実施形態の編み構造が、コラーゲン含有パッチの最大荷重時伸びの低下を実現しつつ、弾性率の増大を実現すると考えられる。

【0069】

本明細書において使用した場合、「弾性率」という用語は、ヤング弾性率を意味し、応力と歪みの比として判定される。これは、コラーゲン含有組織および/またはパッチの剛性の指標となる。

【0070】

一部の実施形態において、コラーゲン含有組織の弾性率は、100MPaを超える。他の実施形態において、コラーゲン含有組織の弾性率は、200MPa、300MPa、400MPa、または500MPaを超える。

【0071】

本明細書において使用した場合、「最大荷重時伸び」という用語は、荷重をかけない条件下でのコラーゲン含有組織の元の長さを基準とした、最大引張荷重強度でのコラーゲン含有組織の伸びを意味する。これは、これよりも大きくなる最大伸びとは異なる。

【0072】

一部の実施形態において、コラーゲン含有組織の最大荷重時伸びは、元の長さの85%未満である。

【0073】

生成後、次いでコラーゲン含有組織は、使用するためのコラーゲン含有パッチに成形してもよい。一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、パッチを成形することで、もとの位置でのより良好な処置手段を提供するように構成される。一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、図3に示すコラーゲン含有パッチに対応する。

【0074】

最も重要なのは、本発明のコラーゲン含有パッチは、修復中の軟組織を支持できるだけの十分な厚さがなければならないことである。しかし、厚すぎてコラーゲン含有パッチを軟組織に付着させる能力が損なわれてはならない。従って、一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、25 $\mu$ mと200 $\mu$ mの間の厚さである。一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、30 $\mu$ mと180 $\mu$ mの間の厚さである。他の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、35 $\mu$ mと170 $\mu$ mの間の厚さである。更に別の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、40 $\mu$ mと160 $\mu$ mの間の厚さである。更

10

20

30

40

50

に別の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、45 μmと150 μmの間の厚さである。更に別の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、50 μmと140 μmの間の厚さである。更に別の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、50 μmと100 μmの間の厚さである。最後に、一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチは、約50 μmの厚さである。

【0075】

概説すると、本発明の実施形態は、哺乳類の動物またはヒト患者の軟組織欠損の修復に特に適するコラーゲン含有パッチを対象とする。ヒト以外にも、患者は霊長類、ウマ、イヌ、またはネコ科の動物とすることができる。従って、使用時、コラーゲン含有パッチは、治療すべき患者の軟組織欠損または欠損部位に、欠損を包囲するように施用される。「組織欠損」または「組織欠損部位」という用語は、腱、靭帯、静脈/動脈、または神経管の上皮または組織の分断を意味する。組織欠損は、組織を最適以下のレベルで機能させるか、最適以下の状態とする。例えば、組織欠損は、腱または靭帯の部分層または全層の断裂であってもよい。組織欠損は、上皮または組織の構造的完全性における例えば空隙、空洞、穴、または他の実質的分断などの三次元欠損を意味すると理解される「空隙」の構成をとることもある。ある種の実施形態において、組織欠損は、内性的または自然的修復が不可能なものである。組織欠損は、事故、疾患、および/または外科的処置の結果であることもある。

10

【0076】

「包囲する」という用語は、パッチの下側および組織欠損の上側に生体活性チャンバが形成されるように、コラーゲン含有パッチが組織欠損部位を実質的に包むことを意味する。「生体活性チャンバ」という用語は、コラーゲン含有パッチと組織欠損の表面との間の空間を意味する。この空間内において、内性細胞、または、一部の実施形態においては、導入された細胞、薬理活性剤などが組織欠損の位置に含有され、これにより細胞および組織の修復が可能となる。

20

【0077】

「修復する」もしくは「修復」という用語、またはその文法的同等語は、本明細書においては哺乳類の動物、好ましくはヒトにおける組織欠損の修復を網羅するために使用される。「修復」は、組織欠損部位の空隙または構造的不連続を少なくとも部分的に満たすのに十分な新しい組織の形成を意味する。しかし、修復は、組織欠損を欠損前の生理学的/構造的/機械的状态までの回復に100%有効である完全な治癒または治療のプロセスを意味するものでも、必要とするものでもない。

30

【0078】

一部の実施形態において、コラーゲン含有パッチを組織欠損に施用する前または後に、コラーゲン含有パッチおよび/または組織欠損または欠損部位を感作物質と接触させる。感作物質は、放射線または光線からエネルギーを吸収し、そのエネルギーをコラーゲン含有パッチおよび/または軟組織に伝達して治療している軟組織にコラーゲン含有パッチを付着または「溶着」させる効果を有する。

【0079】

本発明において使用可能な感作物質の非網羅的例としては、アセトフェノン、ベンゾフェノン、ナフタレン、ピアセチル、エオシン、ローズベンガル、ピレン、アントラセン、フェノチアジンなどが挙げられる。一部の実施形態において、感作物質はローズベンガル(4,5,6,7-テトラクロロ-2',4',5',7'-テトラヨードフルオレイン)である。

40

【0080】

コラーゲン含有パッチが組織欠損に施用された後、整形外科医などの当業者は、パッチを軟組織欠損に付着させることにより患者の欠損部位にパッチを固定する。このようなコラーゲン含有パッチの欠損部位への付着は、細胞成長および治療中の組織の治癒を促進しようとする本明細書に記載の生体活性チャンバを実現する。付着させる手段の例としては、生体適合性の接着剤、組織溶着、およびこれらの組合せが挙げられるが、これに限らな

50

い。

【0081】

生体適合性接着剤は、ゼラチン、アルギン酸、アガロース、デンプン、フィブリン、コラーゲン、ラミニン、エラスチン、フィブロネチン (fibronectin)、プロテオグリカン、および/またはグルコサミノグリカン (glycosaminoglycans)、例えば、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸および/またはケラタン硫酸、カゼイン、デキストラン、カラメルロス (caramellose)、ペクチン、カラギーン、ならびにキサンタンを含むがこれに限定されない群から選択されてもよい。本教示と共に使用し得る生体適合性の接着剤の非制限的例は、オーストリア ウィーンの Oesterreichisches Institut fuer Haemoderivate G.M.B.H. が製造し、カリフォルニア州 グレンデールの Baxter Healthcare Corporation がブランド名 TISSEEL (商標) で販売しているフィブリンシーラントである。生体適合性の接着剤に代えて、または生体適合性の接着剤に加えて使用し得る他の付着手段の非制限的例としては、Helmsworth、T.F.ら、Laser Surgery Medicine 10:576-583、1990に記載されているような、組織溶着が挙げられる。更に、PLA/PLGポリマーなどの生体適合性または生体吸収性材料も含まれるが、これに限らない。

10

【0082】

コラーゲン含有パッチを軟組織欠損に付着させ得る1つの方法は、光誘起法に代わる光化学組織結合 (PTB: photochemical tissue bonding) によるものであり、これは、組織をシールするのに熱エネルギーではなく化学エネルギーに依存する (Chanら (2005)、J Surg Res; 124:274-279; Chanら (2002) J Surg Res; 108:77-84; Kamegayaら (2005) Lasers Surg Med; 37:264-270; Mulroyら (2000) Invest Ophthalmol Vis Sci; 41:3335-3340; Proanoら (2004) J Cataract Refract Surg; 30:2420-2424; Proanoら (2004) Invest Ophthalmol Vis Sci; 45:2177-2181)。PTBは、可視光と光反応染料との組合せを使用して組織表面同士の即時結合と密封を実現する。他の添加剤は必要としない。染料による光の吸収によって反応性の中間体が生成され、これが接合した組織表面の分子間の架橋反応を誘発する (Lambert & Kochevar (1997) Photochem Photobiol、66:15-25)。作用の正確な機序は不明であるが、光化学プロセスを使用してI型コラーゲンを化学的に架橋できることが実証されている。PTBは、光化学的機序によって発生し、典型的にはレーザー溶着よりも遙かに低い出力で実施される。組織の加熱を伴わず、従って、熱傷の続発症を回避しつつレーザー修復の持つ全ての利点を提供し得る。

20

30

【0083】

露光に使用し得る放射線の例としては、水銀灯の輝線スペクトル (波長: 254 nm)、KrFエキシマレーザー (波長: 248 nm)、ArFエキシマレーザー (波長: 193 nm)、F2エキシマレーザー (波長: 157 nm)、およびEUV (波長: 13 nm など) などの遠紫外線; シンクロトロン放射線などのX線; 電子ビームなどの荷電粒子線などが挙げられる。放射線は、好ましくは遠紫外線および荷電粒子線である。より好ましくは、放射線はKrFエキシマレーザー (波長: 248 nm)、ArFエキシマレーザー (波長: 193 nm)、F2エキシマレーザー (波長: 157 nm)、および電子ビームである。

40

【0084】

コラーゲン含有パッチに均一な照射を行うためには、レーザー光が使用される。レーザー光は、付近の軟組織の熱損傷の領域が最小となるよう、好ましくはパルス状とされる。レーザー波長は、光が感作物質に吸収されるように選択される。エネルギーがパッチ上の薄層と隣接する軟組織表面とを加熱し、それによりパッチが軟組織表面に結合または「溶

50

着」する。パッチは、組織を接合する手段として機能する。パッチ上の感作物質の薄層は、パッチと軟組織との界面のこの層が優先的にレーザーエネルギーを吸収して加熱されるため、損傷領域を最小に留める。従って、感作物質を浸潤させたパッチよりも感作物質の薄層が好ましい。

【0085】

結合を容易にする、または強固にするために、生体適合性接着剤の層がパッチ上に更に存在してもよく、軟組織表面への機械的結合を形成するためにレーザー光を当てると重合する化学物質を使用することもできる。感作物質または生体適合性接着剤またはポリマーの層は、パッチを化学物質の層でコーティングする方が容易な場合もあるが、コーティングされたパッチに加え、またはそれに代えて、軟組織表面に直接施用することもできる。

10

【0086】

パッチまたは軟組織の表面は、典型的には感作物質の層または生体適合性接着剤を有し、パッチは、パッチがレーザー光を透過または吸収すると軟組織欠損に溶着される。

【0087】

パッチ溶着に使用されるレーザー光のパルス構造は、溶着されている軟組織の損傷を最小限に留めるため、または防止するために、慎重に選択する必要がある。血管内パッチ溶着に対する温度フィードバックを伴うパルス状レーザー照射の効果が、コンピュータシミュレーションを使用して研究されてきた。Glinskyら、「Computer modeling of endovascular patch welding using temperature feedback」、Proceedings of Medical Applications of Lasers III、Vol. 2 623、pp. 349 - 358 (1995)、およびGlinskyら、「Modeling of endovascular patch welding using the computer program LATIS」、Proceedings of Laser-Tissue Interaction IV、Vol. 2391、pp. 262 - 272 (1995)参照。これらの研究は、本願に引用して援用するが、パルス状レーザー照射を使用して損傷領域を制御することが可能であることを示している。

20

【0088】

最適なパルス長は、損傷組織の厚さを100 μm未満に保ちつつ、パッチを軟組織欠損に溶着するのに必要な総治療時間を最小にする。

30

【0089】

本発明の様々な実施形態において、コラーゲン含有パッチと軟組織欠損との付着により創出される生体活性チャンバは、1つまたは複数の薬理活性剤を含んでもよい。本明細書において使用する場合、「薬理活性剤」は一般に、受給者への導入と同時に直接または間接的に有益な治療効果を発揮する薬理活性剤を意味する。本発明での使用に適する薬理活性剤の代表例としては、以下のものが挙げられる。

【0090】

抗高血圧薬、例えばヒドララジン、ミノキシジル、カプトプリル、エナラプリル、クロニジン、プラソシン、デブリソキン、ジアゾキシド、グアネチジン、メチルドパ、レセルピン、トリメタファン；

40

カルシウムチャンネル遮断薬、例えばジルチアゼム、フェロジピン、アムロジピン、ニトレンジピン、ニフェジピン、およびベラパミル；

抗不整脈薬、例えばアミオダロン、フレカイニド、ジソピラミド、プロカインアミド、メキシレテン、およびキニジン；

抗狭心症剤、例えばニトログリセリン、四硝酸エリトリル、四硝酸ペンタエリスリトール、六硝酸マンニトール、ペルヘキシレン、硝酸イソソルビド、およびニコランジル；

- アドレナリン遮断剤、例えばアルプレノロール、アテノロール、ブプラノロール、カルテオロール、ラベタロール、メトプロロール、ナドロール、ナドキシロール (nadoxolol)、オクスプレノロール、ピンドロール、プロプラノロール、ソタロール、チモロール、およびチモロールマレイン酸塩；

50

アドレナリン刺激薬、例えばアドレナリン、エフェドリン、フェノテロール、イソプレナリン、オルシブレナリン、リメテロール (rimeterol)、サルブタモール、サルメテロール、テルブタリン、ドブタミン、フェニレフリン、フェニルプロパノールアミン、プソイドエフェドリン、およびドパミン；

血管拡張薬、例えばシクランデラート、イソクスブリン、ババベリン、ジピリマドール (dipyrimadole)、硝酸イソソルビド、フェントラミン、ニコチルアルコール、コデルゴクリン、ニコチン酸、ニトログリセリン、四硝酸ペンタエリスリトール、およびキサントロール；

抗増殖剤、例えばパクリタキセル、アクチノマイシン D、シロリムス、タクロリムス、エベロリムス、およびデキサメタゾン；

抗凝血薬および血栓溶解剤、例えばワルファリン、ジクマロール、エノキサパリンなどの低分子量ヘパリン、ストレプトキナーゼおよびその活性誘導体；

止血剤、例えばアプロチニン、トラネキサム酸、およびプロタミン；

鎮痛薬および解熱薬、例えばブプレノルフィン、デキストロモラミド、デキストロプロポキシフェン、フェンタニル、アルフェンタニル、スフェンタニル、ヒドロモルホン、メタドン、モルヒネ、オキシコドン、パパベレタム、ペンタゾシン、ペチジン、フェノペイジン (phenopetidine)、コデインジヒドロコデインなどのオピオイド鎮痛薬；アセチルサリチル酸 (アスピリン)、パラセタモール、およびフェナゾン；

免疫抑制薬、抗増殖薬および細胞増殖抑制剤、例えばラボマイシン (rapomycin) (シロリムス) およびその類似体 (エベロリムス、およびタクロリムス)；

適用可能な場合にはラセミ混合物または個々のエナンチオマーを含む非ステロイド抗炎症剤、好ましくは皮膚および/または粘膜浸透促進剤と組合せて調合可能なもの、例えばイブプロフェン、フルルビプロフェン、ケトプロフェン、アクロフェナク (aclofenac)、ジクロフェナク、アロキシピリン、アプロキセン (aproxen)、アスピリン、ジフルニサル、フェノプロフェン、インドメタシン、メフェナム酸、ナプロキセン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、サリチルアミド、サリチル酸、スリンダク、デソキシスリンダク (desoxysulindac)、テノキシカム、トラマドール、ケトララク (ketoralac)、フルフェニサル、サルサラート、トリエタノールアミンサリチル酸、アミノピリン、アンチピリン、オキシフェンブタゾン、アパゾン、シンタゾン、フルフェナム酸、クロニキセル (clonixerl)、クロニキシン、メクロフェナム酸、フルニキシン、コイヒチン (coichicine)、デメコルシン、アロプリノール、オキシプリノール、塩酸ベンジダミン、ジメファダン、インドキソール、イントラゾール、ミンバン塩酸塩、パラニレン (paranylene) 塩酸塩、テトリダミン、ベンジンドピリン塩酸塩、フルプロフェン、イブフェナック、ナプロキソール、フェンブフェン、シンコフェン、ジフルミドンナトリウム、フェナモール、フルチアジン、メタザミド、レチミド塩酸塩、ネキセリジン塩酸塩、オクタザミド、モリナゾール (molinazole)、ネオシンコフェン、ニマゾール (nimazole)、クエン酸プロキサゾール、テシカム、テシミド、トルメチン、およびトリフルミダート；

抗菌薬、例えばセファレキシン、セフォキシチン (cefoxytin)、およびセファロチンなどのセファロスポリン；

ペニシリン類、例えばアモキシシリン、クラブラン酸を含むアモキシシリン、アンピシリン、パカンピシリン、ベンザチンペニシリン、ベンジルペニシリン、カルペニシリン、クロキサシリン、メチシリン、フェネチシリン、フェノキシメチルペニシリン、フルクロキサシリン、メジオシリン (meziocillin)、ピペラシリン、チカルシリン、およびアズロシリン；

テトラサイクリン類、例えばミノサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、メタサイクリン、およびオキシテトラサイクリン、ならびに他のテトラサイクリン型抗生物質；

アミノグリコシド類、例えばアミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、およびトブラマイシン；

抗真菌薬、例えばアモロルフィン、イソコナゾール、クロトリマゾール、エコナゾール

10

20

30

40

50

、ミコナゾール、ナイスチン、テルビナフィン、ビホナゾール、アンフォテリシン、グリセオフルビン、ケトコナゾール、フルコナゾールおよびフルシトシン、サリチル酸、フェザチオン、チクラトン、トルナフタート、トリアセチン、亜鉛、ピリチオン、ならびにピリチオンナトリウム；

キノロン類、例えばナリジクス酸、シノキサシン、シプロフロキサシン、エノキサシン、およびノルフロキサシン；

スルホンアミド類、例えばフタリスルフチアゾール (phthalysulphthiazole)、スルファドキシム、スルファジアジン、スルファメチゾール、およびスルファメトキサゾール；スルホン類、例えばダブソン；

その他の多種多様な抗生物質、例えばクロラムフェニコール、クリンダマイシン、エリスロマイシン、エリスロマイシンエチルカルボナート、エリスロマイシンエストレート、エリスロマイシングルセパート (erythromycin gluceptate)、エリスロマイシンエチルコハク酸エステル、エリスロマイシンラクトビオン酸塩、ロキシスロマイシン、リンコマイシン、ナタマイシン、ニトロフラントイン、スペクチノマイシン、バンコマイシン、アズトレオナム、コリスチンIV、メトロニダゾール、チニダゾール、フシジン酸、トリメトプリム、および2-チオピリジンN-オキシド；ハロゲン化合物、特にヨウ素、ならびにヨウ素-PVP複合体およびジヨードヒドロキシキンなどのヨウ素化合物、ヘキサクロロフェン；クロルヘキシジン；クロロアミン化合物；およびベンゾイルペルオキシド。

【0091】

前述の薬理活性剤（複数可）の有効量は、例えば選択した個別の薬理活性剤、患者の体格および体重、所望の治療効果、選択した薬理活性剤の薬物動態などのパラメータを考慮すると共に、Physicians' Desk Reference（商標）：PDR - 52ed (1998) - Medical Economics 1974などの周知の情報源を参照して当業者が容易に決定することができる。

【0092】

上記の本発明の好適な実施形態の記載は、例示および説明のために提示したものであり、網羅的であること、または本発明を開示した正確な形態に制限することを意図したものではない。上記の教示を考慮して、多くの変形および変更が可能である。

【0093】

本明細書において言及または引用された特許、特許出願、仮出願、および出版物は全て、図および表を含むその全体が、本明細書の明示的な教示と矛盾しない程度に、参照することにより組み込まれる。

【0094】

以下は本発明を実施する手順を例示する実施例である。これらの実施例は、限定的なものとして解釈すべきではない。

【0095】

#### 例1

#### コラーゲン膜の製造方法

ブタの内臓内膜からコラーゲン断片を慎重に分離し、約70%のエタノールを含む溶液に入れて室温にて短時間インキュベートした。次いで、コラーゲン含有組織を、脂肪側を上にして作業面上に引き伸ばし、脂肪組織および血管をできる限り除去した。

【0096】

存在する脂肪組織を可視化するために、コラーゲン含有組織をグリセロールで約10分間コーティングした。この時点でコラーゲンは透明であったが、脂肪組織は白色であった。鉗子を用いて解剖顕微鏡下でコラーゲンから白色の脂肪組織を分離した。

【0097】

完了後、コラーゲン含有組織を慎重に密閉容器に移し、非コラーゲン性タンパク質を変性させるために約1% (v/v) のSDSと0.2% (v/v) のLiClを含む溶液中でインキュベートした。インキュベーション液を4 にて一晩放置した。

【0098】

10

20

30

40

50

次いでコラーゲン含有組織を100%アセトン中で2回慎重に洗浄し、変性した非コラーゲン性タンパク質を除去した。次いで、組織を200mlの容器中、100RPMにて遠心分離にかけ、残存溶液、非コラーゲン性タンパク質、および核酸をコラーゲン含有組織から穏やかに沈降させた。

【0099】

コラーゲン含有組織を慎重に取り出し、再度Steripure(商標)水中で3回洗浄した。

【0100】

場合により、コラーゲン含有組織をNaOH:NaClを含む溶液中で更に洗浄し、その後組織を100RPMで90分間遠心分離にかけた。

10

【0101】

次いでコラーゲン含有組織を0.5%(v/v)HClに浸漬し、振とう機上に30分間置いてコラーゲンを変性させた。得られる組織の機械的構造の損傷を回避するには、HClの濃度とインキュベーション時間が重要であることを見出した。

【0102】

次いでコラーゲン含有組織を取り出し、再度Steripure(商標)水中で3回洗浄した。

【0103】

次いで、0.5%(v/v)NaOHを用いてコラーゲン含有組織を中和した。この段階で、得られるコラーゲン含有組織の機械的性質の予備試験を行うこともできる。

20

【0104】

次いで、ステンレス鋼フレームを用い、機械力(圧縮および伸展)を使用してコラーゲン含有組織を処理した。コラーゲン含有組織が適切な大きさ、厚さなどに引き伸ばされたら、組織をもとの位置で、即ち、フレーム内でHClを1%(v/v)含む溶液に浸漬して変性させた。典型的には、コラーゲン繊維束が整列するまで、組織を100RPMで振とうしながら22~25時間インキュベートした。

【0105】

次いで、コラーゲン含有組織を水で洗浄し、1%(v/v)のSDSと0.2%(v/v)のLiClの混合物ですすいだ。

【0106】

最終用途に応じ、次いで、残存する脂肪組織を全て可視化するためにコラーゲン含有組織をグリセロールで10分間再コーティングした。上記と同様、鉗子を用いて解剖顕微鏡下で残りの白色脂肪組織をコラーゲンから分離した。コラーゲン含有組織の厚さを制御するために、余分なコラーゲン束も全てこの段階で除去した。

30

【0107】

最後に、コラーゲン含有組織をアセトンで処理し、整列させたコラーゲン束が固定するようにフレーム内で更に引き伸ばしながら空気乾燥した。次いで、コラーゲン含有組織を引き伸ばし、圧縮し、および/または圧延して平滑な表面を創出した。次いで、仕上がったコラーゲン膜組織を検査し、レーザーカッターを使用して適切な大きさに切断した。

【0108】

他の種類の膜と比較したコラーゲン膜の表面形態の特徴を明らかにするためにSEMを実行した。端的に言えば、組織サンプルを厚さ5nmの白金(SEMコーティングユニット、E1020、Hitachi Science Systems Ltd.、日本)でスパッタコーティングし、両側を走査型電子顕微鏡(S260、Leica、英国ケンブリッジ)下、低電圧(20kV)で観察した。

40

【0109】

図1は、本発明の方法で生成したコラーゲン膜(本明細書においてはACSと称するTympacol(商標))の表面形態を他の膜と比較して示す。走査電子顕微鏡画像は、3つの足場(パネルA~C;x500、D;x200)の表面形態を示す。Tympacol(商標)(図1においてはACSと称する)は、緻密なコラーゲン束を特徴とする平

50

滑な表面（パネルA）と、粗目のコラーゲン繊維の粗く多孔質な表面（パネルB）との2つの異なる表面を有する。紙パッチ（膜）表面は細孔がほとんどなくて起伏がある（パネルC）。Gel foam（登録商標）は、様々な大きさの実質的な細孔を示す（パネルD）。スケールバー：500 μm。

【0110】

図2は、上記方法により生成したコラーゲン膜の走査電子顕微鏡法（SEM）画像（×100）を示す。

【0111】

例2

腱の修復

12～20週齢で、体重3～5kgのアルビノニューージーランドホワイト（アナウサギ（*Oryctolagus cuniculus*））ウサギ50羽を使用する。ウサギは全てUniversity of Western Australia（オーストラリア、ネッドランズ）の動物舎施設に維持されている非近交系ウサギコロニーから飼育される。ウサギは、ウサギ/モルモットペレット、干し草を不断給餌され、水を不断供給される。ウサギは、足の皮膚炎を防ぐために格子床となっている幅1.5m、長さ0.75m、高さ0.75mのケージに収容される。手術的処置およびケージ作業の全ては、国立保健医療研究委員会（NHMRC：National Health and Medical Research Council、オーストラリア、キャンベラ）が詳細に定める厳密なガイドラインの元を実施される。

【0112】

50羽のウサギを25羽ずつ2つの群にランダムに振り分け、ケタミン（Parkes-Davis、ニューージーランド、オークランド）とキシラジン（Troy Laboratories Australia）の筋肉内注射により麻酔する。左肩を縦切開し、肩峰から僧帽筋と三角筋の一部を切り離すことで回旋腱板の腱を外科的露出する。回旋腱板の腱を切断することで、軟組織欠損を創出する。次いで、欠損を、（A）腱の切断した端部の単純縫合、または（B）本明細書に記載の方法のいずれかを使用して修復する。端的に言えば、ローズベンガル（Aldrich、ウィスコンシン州ミルウォーキー）0.1%（w/v）のリン酸緩衝生理食塩水溶液を切断した腱の外表面のおよそ5mmに慎重に施用する。腱の切断端が当接（接触）し、欠損が包囲されるように、例1の方法で作られた図3に示す厚さ50 μmのコラーゲン含有パッチを腱の両端に巻き付ける。次いで、350mWのCompass 415連続波、周波数2倍Nd/YAGレーザー（Coherent, Inc.、カリフォルニア州サンタクララ、約1cmのスポットサイズ）からの532nm緑色光を、約0.5W/cm<sup>2</sup>の放射照度で5分間パッチに当てる。この系は、励起波長がローズベンガルに強く吸収されることから選択される。他のレーザーパラメータは、ex vivoの予備研究から決定してもよい。腱再建に続いて傷口を層状に閉じ、包帯を巻いたが、患肢に添え木を当てることはしなかった。

【0113】

4および8週間後、ウサギを麻酔し、ペントバルビトンの静脈内注射によって屠殺した。上腕頭骨、腱板の腱、および筋肉の一部を両肩（手術をした肩としていない肩）から摘出した。弛緩状態で手術をした腱としていない腱両方の長さ（ノギスで測定し、厚さをマイクロメーターで測定した。次いで、サンプルを4%パラホルムアルデヒドで固定する。固定後、試料を10%ギ酸で脱灰し、脱水し、パラフィン包埋し、5 μmの切片に切断し、ヘマトキシリン、エオシン、およびアルシアンブルーで染色する。

10

20

30

40

【 図 1 】

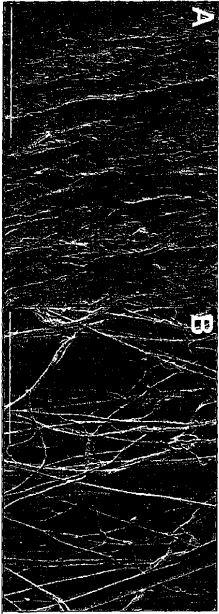


Figure 1

【 図 2 】

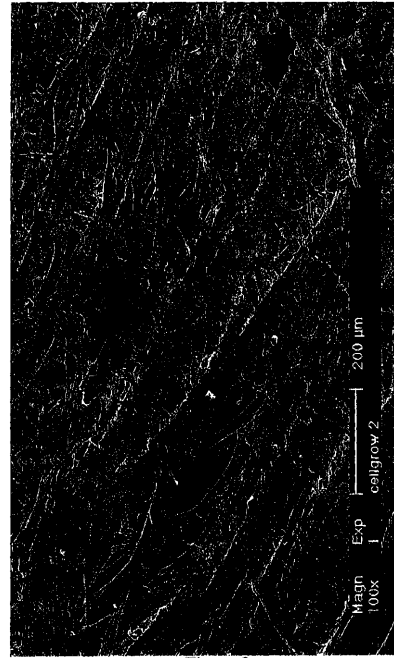


Figure 2

【 図 3 】

図 3

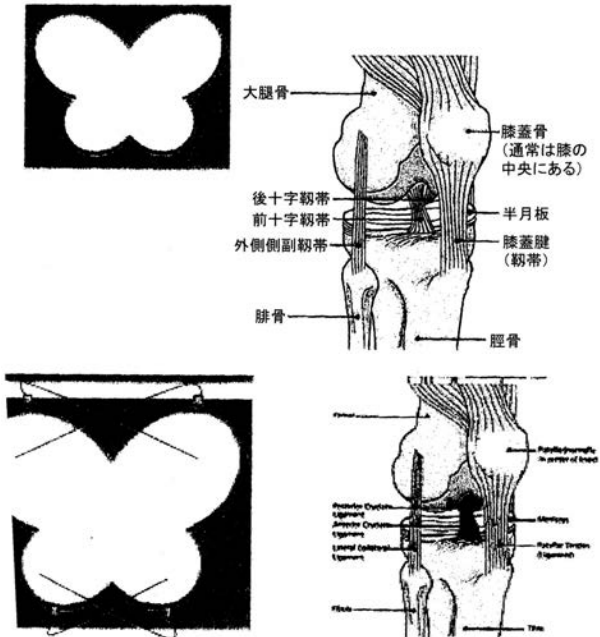


Figure 3

## 【手続補正書】

【提出日】平成29年6月13日(2017.6.13)

## 【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】

軟組織欠損を修復する無縫合方法であって、

(i) 前記軟組織欠損の少なくとも一部を包囲するように構成されたコラーゲン含有パッチを用意すること；

(ii) 前記軟組織欠損および/またはコラーゲン含有パッチをアセトフェノン、ベンゾフェノン、ナフタレン、ピアセチル、エオシン、ローズベンガル、ビレン、アントラセン、およびフェノチアジンからなる群から選択される感作物質と接触させること；

(iii) 前記軟組織欠損を前記コラーゲン含有パッチで包囲してパッチの下側および組織欠損の上側に生体活性チャンバを生成すること；および

(iv) 前記コラーゲン含有パッチを前記軟組織欠損に、前記コラーゲン含有パッチにレーザーまたは光源からの光を当てることにより縫合せずに付着させること

を含む、方法。

【請求項2】

前記コラーゲン含有パッチは、

(i) コラーゲン含有組織を単離し、エタノール溶液中でインキュベートすること；

(ii) 工程(i)からの前記コラーゲン含有組織を、その中に含有される非コラーゲン性タンパク質を変性させるために無機塩と陰イオン界面活性剤とを含む第1の溶液中でインキュベートすること；

(iii) 工程(ii)において生成された前記コラーゲン含有組織を、材料中のコラーゲンが変性するまで無機酸を含む第2の溶液中でインキュベートすること；および

(iv) 工程(iii)において生成された前記コラーゲン含有組織を、無機酸を含む第3の溶液中で、同時に機械的刺激を加えながら前記コラーゲン含有組織中のコラーゲン束を整列させるのに十分な時間インキュベートすること

を含む方法により生成され、

前記機械的刺激が前記コラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む、

請求項1に記載の無縫合方法。

【請求項3】

前記軟組織欠損は、靱帯組織、腱組織、静脈組織、動脈組織、および神経管組織からなる群から選択される軟組織に存在する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記軟組織欠損は、靱帯欠損である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記靱帯欠損は、前十字靱帯(ACL)の断裂または破断である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記感作物質はローズベンガルである、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記コラーゲン含有パッチは、80%を超えるI型コラーゲンを含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記コラーゲン含有パッチは、90%を超えるI型コラーゲンを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記コラーゲン含有パッチの最大引張荷重強度が 25 N を超える、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記コラーゲン含有パッチの弾性率が 100 MPa を超える、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記コラーゲン含有パッチの最大荷重時伸びが元の長さの 85 % 未満である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記コラーゲン含有パッチは、25  $\mu\text{m}$  と 200  $\mu\text{m}$  の間の厚さである、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記コラーゲン含有パッチは、約 50  $\mu\text{m}$  の厚さである、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 14】

請求項 1 の軟組織の無縫合修復に使用するキットであって、

(i) 25  $\mu\text{m}$  と 200  $\mu\text{m}$  の間の厚さであり、90 % を超える I 型コラーゲンを含み、最大引張荷重強度が 100 N を超え、弾性率が 200 MPa を超え、前記軟組織を包囲してパッチの下側および組織欠損の上側に生体活性チャンバを生成することができるコラーゲン含有パッチ；および

(ii) アセトフェノン、ベンゾフェノン、ナフタレン、ピアセチル、エオシン、ローズベンガル、ピレン、アントラセン、およびフェノチアジンからなる群から選択される感作物質、  
からなるキット。

## 【請求項 15】

前記パッチは、

(i) コラーゲン含有組織を単離し、エタノール溶液中でインキュベートすること；

(ii) 工程 (i) からの前記コラーゲン含有組織を、その中に含有される非コラーゲン性タンパク質を変性させるために無機塩と陰イオン界面活性剤とを含む第 1 の溶液中でインキュベートすること；

(iii) 工程 (ii) において生成された前記コラーゲン含有組織を、材料中のコラーゲンが変性するまで無機酸を含む第 2 の溶液中でインキュベートすること；および

(iv) 工程 (iii) において生成された前記コラーゲン含有組織を、無機酸を含む第 3 の溶液中で、同時に機械的刺激を加えながら前記コラーゲン含有組織中のコラーゲン束を整列させるのに十分な時間インキュベートすること

を含む方法により生成され、

前記機械的刺激が前記コラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む、

請求項 14 に記載のキット。

## 【請求項 16】

前十字靭帯 (ACL) 断裂を修復する方法であって、

(i) 前記 ACL 断裂の少なくとも一部を包囲するように構成されたコラーゲン含有パッチを用意すること；

(ii) 前記 ACL 断裂および/またはコラーゲン含有パッチをアセトフェノン、ベンゾフェノン、ナフタレン、ピアセチル、エオシン、ローズベンガル、ピレン、アントラセン、およびフェノチアジンからなる群から選択される感作物質と接触させること；

(iii) 前記 ACL 断裂を前記コラーゲン含有パッチで包囲してパッチの下側および組織欠損の上側に生体活性チャンバを生成すること；および

(iv) 前記コラーゲン含有パッチを前記 ACL 断裂に、前記コラーゲン含有パッチにレーザーまたは光源からの光を当てることにより縫合せずに付着させること

を含む方法。

【請求項 17】

前記コラーゲン含有パッチに 532 nm 緑色光を、約 0.5 W / cm<sup>2</sup> の放射照度で 5 分間パッチに当てる、

請求項 1 から 13、16 のいずれか一項に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0113

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0113】

4 および 8 週間後、ウサギを麻酔し、ペントバルビトンの静脈内注射によって屠殺した。上腕頭骨、腱板の腱、および筋肉の一部を両肩（手術をした肩としていない肩）から摘出した。弛緩状態で手術をした腱としていない腱両方の長さ幅をノギスで測定し、厚さをマイクロメーターで測定した。次いで、サンプルを 4% パラホルムアルデヒドで固定する。固定後、試料を 10% ギ酸で脱灰し、脱水し、パラフィン包埋し、5 μm の切片に切断し、ヘマトキシリン、エオシン、およびアルシアンブルーで染色する。

ここに、出願当初の特許請求の範囲の記載事項を付記する。

[1] 軟組織欠損を修復する無縫合方法であって、

(i) 前記軟組織欠損の少なくとも一部を包囲するように構成されたコラーゲン含有パッチを用意すること；

(ii) 前記軟組織欠損および/またはコラーゲン含有パッチを感作物質と接触させること；

(iii) 前記軟組織欠損を前記コラーゲン含有パッチで包囲して生体活性チャンバを生成すること；および

(iv) 前記コラーゲン含有パッチを前記軟組織欠損に縫合せずに付着させることを含む、方法。

[2] 靭帯欠損を修復する無縫合方法であって、

(i) 前記靭帯欠損の少なくとも一部を包囲するように構成されたコラーゲン含有パッチであって、25 μm と 200 μm の間の厚さであるパッチを用意すること；

(ii) 前記靭帯欠損および/またはコラーゲン含有パッチをローズベンガルと接触させること；

(iii) 前記靭帯欠損を前記コラーゲン含有パッチで包囲して生体活性チャンバを生成すること；および

(iv) 前記コラーゲン含有パッチにレーザーまたは光源からの光を当てて前記靭帯欠損に付着させること

を含む、方法。

[3] 前記コラーゲン含有パッチは、

(i) コラーゲン含有組織を単離し、エタノール溶液中でインキュベートすること；

(ii) 工程 (i) からの前記コラーゲン含有組織を、その中に含有される非コラーゲン性タンパク質を変性させるために無機塩と陰イオン界面活性剤とを含む第 1 の溶液中でインキュベートすること；

(iii) 工程 (ii) において生成された前記コラーゲン含有組織を、材料中のコラーゲンが変性するまで無機酸を含む第 2 の溶液中でインキュベートすること；および

(iv) 工程 (iii) において生成された前記コラーゲン含有組織を、無機酸を含む第 3 の溶液中で、同時に機械的刺激を加えながら前記コラーゲン含有組織中のコラーゲン束を整列させるのに十分な時間インキュベートすること

を含む方法により生成され、

前記機械的刺激が前記コラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む、

[ 1 ] または [ 2 ] に記載の無縫合方法。

[ 4 ] 前記軟組織欠損は、靭帯組織、腱組織、静脈組織、動脈組織、および神経管組織からなる群から選択される軟組織に存在する、[ 1 ] に記載の方法。

[ 5 ] 前記靭帯欠損は、前十字靭帯 ( A C L ) に存在する、[ 2 ] から [ 4 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 6 ] 前記感作物質は、アセトフェノン、ベンゾフェノン、ナフタレン、ピアセチル、エオシン、ローズベンガル、ピレン、アントラセン、およびフェノチアジンからなる群から選択される、[ 1 ] に記載の方法。

[ 7 ] 前記感作物質はローズベンガルである、[ 1 ]、[ 3 ] から [ 6 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 8 ] 前記コラーゲン含有パッチは、80%を超えるI型コラーゲンを含む、[ 1 ] から [ 7 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 9 ] 前記コラーゲン含有パッチは、90%を超えるI型コラーゲンを含む、[ 1 ] から [ 8 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 10 ] 前記コラーゲン含有パッチの最大引張荷重強度が25Nを超える、[ 1 ] から [ 9 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 11 ] 前記コラーゲン含有パッチの弾性率が100MPaを超える、[ 1 ] から [ 10 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 12 ] 前記コラーゲン含有パッチの最大荷重時伸びが元の長さの85%未満である、[ 1 ] から [ 11 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 13 ] 前記コラーゲン含有パッチは、25 $\mu$ mと200 $\mu$ mの間の厚さである、[ 1 ] から [ 12 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 14 ] 前記コラーゲン含有パッチは、約50 $\mu$ mの厚さである、[ 1 ] から [ 12 ] のいずれか一項に記載の方法。

[ 15 ] 軟組織欠損の無縫合修復に使用するコラーゲン含有パッチであって、25 $\mu$ mと200 $\mu$ mの間の厚さであり、90%を超えるI型コラーゲンを含み、最大引張荷重強度が100Nを超え、弾性率が200MPaを超え、前記軟組織を包囲して生体活性チャンバを生成することができるコラーゲン含有パッチ。

[ 16 ] 前記パッチは、

( i ) コラーゲン含有組織を単離し、エタノール溶液中でインキュベートすること；

( i i ) 工程 ( i ) からの前記コラーゲン含有組織を、その中に含有される非コラーゲン性タンパク質を変性させるために無機塩と陰イオン界面活性剤とを含む第1の溶液中でインキュベートすること；

( i i i ) 工程 ( i i ) において生成された前記コラーゲン含有組織を、材料中のコラーゲンが変性するまで無機酸を含む第2の溶液中でインキュベートすること；および

( i v ) 工程 ( i i i ) において生成された前記コラーゲン含有組織を、無機酸を含む第3の溶液中で、同時に機械的刺激を加えながら前記コラーゲン含有組織中のコラーゲン束を整列させるのに十分な時間インキュベートすること

を含む方法により生成され、

前記機械的刺激が前記コラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む、

[ 15 ] に記載のコラーゲン含有パッチ。

[ 17 ] 前十字靭帯 ( A C L ) の部分的または完全な断裂を修復する方法であって、

( i ) 前記 A C L の少なくとも一部を包囲するように構成されたコラーゲン含有パッチを用意すること；

( i i ) 前記 A C L および / またはコラーゲン含有パッチを感作物質と接触させること

；  
( i i i ) 前記 A C L を前記コラーゲン含有パッチで包囲して生体活性チャンバを生成すること；および

( i v ) 前記コラーゲン含有パッチを前記 A C L に縫合せずに付着させること  
を含む方法。

## 【手続補正書】

【提出日】平成29年6月14日(2017.6.14)

## 【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】

靱帯組織、腱組織からなる群から選択される軟組織における欠損を修復する無縫合方法であって、

(i) 前記欠損が包囲されるように前記軟組織に巻きつけられるコラーゲン含有パッチを用意すること、ここで、前記コラーゲン含有パッチは100MPaを超える弾性率を有する；

(ii) 前記軟組織および/またはコラーゲン含有パッチをアセトフェノン、ベンゾフェノン、ナフタレン、ピアセチル、エオシン、ローズベンガル、ピレン、アントラセン、およびフェノチアジンからなる群から選択される感作物質と接触させること；

(iii) 前記軟組織を組織が包囲され、そしてパッチの下側および組織欠損の上側に生体活性チャンバが生成されるように前記コラーゲン含有パッチで巻くこと；および

(iv) 前記コラーゲン含有パッチを前記軟組織に、前記コラーゲン含有パッチにレーザーまたは光源からの光を当てることにより縫合せずに付着させることを含む、方法。

【請求項2】

前記コラーゲン含有パッチは、

(i) コラーゲン含有組織を単離し、エタノール溶液中でインキュベートすること；

(ii) 工程(i)からの前記コラーゲン含有組織を、その中に含有される非コラーゲン性タンパク質を変性させるために無機塩と陰イオン界面活性剤とを含む第1の溶液中でインキュベートすること；

(iii) 工程(ii)において生成された前記コラーゲン含有組織を、材料中のコラーゲンが変性するまで無機酸を含む第2の溶液中でインキュベートすること；および

(iv) 工程(iii)において生成された前記コラーゲン含有組織を、無機酸を含む第3の溶液中で、同時に機械的刺激を加えながら前記コラーゲン含有組織中のコラーゲン束を整列させるのに十分な時間インキュベートすること

を含む方法により生成され、

前記機械的刺激が前記コラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む、請求項1に記載の無縫合方法。

【請求項3】

前記軟組織は、靱帯組織である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記靱帯組織における前記欠損は、前十字靱帯(ACL)の断裂または破断である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記感作物質はローズベンガルである、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記コラーゲン含有パッチは、80%を超えるI型コラーゲンを含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記コラーゲン含有パッチは、90%を超えるI型コラーゲンを含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記コラーゲン含有パッチの最大引張荷重強度が25 Nを超える、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記コラーゲン含有パッチの最大荷重時伸びが元の長さの85%未満である、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記コラーゲン含有パッチは、25 μmと200 μmの間の厚さである、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記コラーゲン含有パッチは、約50 μmの厚さである、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

請求項1の方法に使用するキットであって、

(i) 25 μmと200 μmの間の厚さであり、90%を超えるI型コラーゲンを含み、最大引張荷重強度が100 Nを超え、弾性率が200 MPaを超え、欠損が包囲され、そしてパッチの下側および組織欠損の上側に生体活性チャンバが生成されるように前記軟組織に巻きつけられるコラーゲン含有パッチ；

(ii) アセトフェノン、ベンゾフェノン、ナフタレン、ピアセチル、エオシン、ローズベンガル、ピレン、アントラセン、およびフェノチアジンからなる群から選択される感作物質；および、

(iii) 使用のための説明書、  
からなるキット。

【請求項13】

前記パッチは、

(i) コラーゲン含有組織を単離し、エタノール溶液中でインキュベートすること；

(ii) 工程(i)からの前記コラーゲン含有組織を、その中に含有される非コラーゲン性タンパク質を変性させるために無機塩と陰イオン界面活性剤とを含む第1の溶液中でインキュベートすること；

(iii) 工程(ii)において生成された前記コラーゲン含有組織を、材料中のコラーゲンが変性するまで無機酸を含む第2の溶液中でインキュベートすること；および

(iv) 工程(iii)において生成された前記コラーゲン含有組織を、無機酸を含む第3の溶液中で、同時に機械的刺激を加えながら前記コラーゲン含有組織中のコラーゲン束を整列させるのに十分な時間インキュベートすること

を含む方法により生成され、

前記機械的刺激が前記コラーゲン含有組織に周期的に張力を加えることを含む、

請求項12に記載のキット。

【請求項14】

前十字靱帯(ACL)を修復する方法であって、

(i) 前記ACLまたは前記ACLの部分が包囲されるように前記ACLに巻きつけるコラーゲン含有パッチを用意すること、ここで、前記コラーゲン含有パッチは100 MPaを超える弾性率を有する；

(ii) 前記ACLおよび/またはコラーゲン含有パッチをアセトフェノン、ベンゾフェノン、ナフタレン、ピアセチル、エオシン、ローズベンガル、ピレン、アントラセン、およびフェノチアジンからなる群から選択される感作物質と接触させること；

(iii) 前記ACLまたはその部分が包囲され、そして前記パッチの下側およびACLの上側に生体活性チャンバが生成されるように前記コラーゲン含有パッチを前記ACLに巻くこと；および

(iv) 前記コラーゲン含有パッチを前記ACLに、前記コラーゲン含有パッチにレーザーまたは光源からの光を当てることにより縫合せずに付着させること  
を含む方法。

## 【請求項 15】

前記コラーゲン含有パッチに 532 nm 緑色光を、約  $0.5 \text{ W/cm}^2$  の放射照度で 5 分間パッチに当てる、

請求項 1 から 11、14 のいずれか一項に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2015/000612
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>A61L 15/32 (2006.01) A61L 27/58 (2006.01) A61F 2/08 (2006.01)</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
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 practicable, search terms used)		
Google Patents, Espacenet, EPODOC, TXTE, MEDLINE, Google Scholar		
CPC: A61L2430/10, A61L27/3633, A61L27/3662, A61L27/3683, A61L27/24 A61L27/36/low A61B2017/00508, A61B2017/00517, A16L15/32, A16L15/325		
Keywords: PTB, photochemical, ligament scaffold, collagen patch or scaffold or matrix, wrap, ECM, tissue binding, tissue welding, collagen scaffold manufacture or process or method, tendon or ligament xenograft, allograft, autograft, laser, crosslink, denature and like terms		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 28 January 2016	Date of mailing of the international search report 28 January 2016	
<b>Name and mailing address of the ISA/AU</b>  AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au	<b>Authorised officer</b>  Leanne Walsh AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262832180	

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		<b>PCT/AU2015/000612</b>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2013/0158342 A1 (CHAN et al.) 20 June 2013 abstract and paragraphs [0017] - [0021], [0067] - [0069], [0120] [0138] - [0140] paragraphs [0017] - [0018], [0137] - [0140]	1, 2, 4 - 9, 17 3, 10 - 12, 16
X	US 6773699 B1 (SOLTZ et al.) 10 August 2004 abstract and column 2 lines 5 - 40	1, 4, 8
X	US 5749895 A (SAWYER et al.) 12 May 1998 abstract, figs. 1 and 6, column 5 lines 54 - 65	1, 4, 13, 14
Y	BADYLAK, S. F. et al., 'Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function' Acta Biomater. (2009) vol. 5, pages 1-13.  <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.013">http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.013</a> Items 3 and 4	3, 16
X Y	EP 2644692 A1 (TOKYO INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 02 October 2013 abstract, paragraphs [0027] - [0031], [0038] pages 12 - 14	15 3, 10 - 12 and 16
A	BUSILACCHI et al., 'Biological scaffolds for tendon and ligament repair: new trend' Journal of Orthopedics (2013) Vol.5 Issue 3, pages 123-128 entire document	1 - 17

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b> Information on patent family members		International application No. <b>PCT/AU2015/000612</b>	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
US 2013/0158342 A1	20 June 2013	US 2013158342 A1	20 Jun 2013
		AU 4998401 A	20 Aug 2001
		AU 2001249984 B2	26 May 2005
		CA 2399414 A1	16 Aug 2001
		EP 1272119 A2	08 Jan 2003
		EP 1272119 B1	24 Nov 2010
		EP 2335634 A1	22 Jun 2011
		JP 2003531647 A	28 Oct 2003
		JP 5101778 B2	19 Dec 2012
		JP 2012210474 A	01 Nov 2012
		JP 5456102 B2	26 Mar 2014
		US 2002187935 A1	12 Dec 2002
		US 7073510 B2	11 Jul 2006
		US 2002022606 A1	21 Feb 2002
		US 7331350 B2	19 Feb 2008
		US 2006212070 A1	21 Sep 2006
		US 8092490 B2	10 Jan 2012
		US 2005038471 A1	17 Feb 2005
		US 8215314 B2	10 Jul 2012
		US 2002006394 A1	17 Jan 2002
		US 2008009901 A1	10 Jan 2008
		US 2012095455 A1	19 Apr 2012
		US 2012136387 A1	31 May 2012
WO 0158495 A2	16 Aug 2001		
US 6773699 B1	10 August 2004	US 6773699 B1	10 Aug 2004
US 5749895 A	12 May 1998	US 5749895 A	12 May 1998
		AU 1444292 A	15 Sep 1992
		AU 3506495 A	27 Mar 1996
		AU 3506995 A	27 Mar 1996
		AU 4819897 A	11 May 1998
		CA 2103727 A1	14 Aug 1992
		EP 0572526 A1	08 Dec 1993
		EP 0786960 A1	06 Aug 1997
		EP 0901345 A1	17 Mar 1999
		EP 0959795 A1	01 Dec 1999

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b> Information on patent family members		International application No. <b>PCT/AU2015/000612</b>	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
		JP H06505656 A	30 Jun 1994
		US 5156613 A	20 Oct 1992
		US 5669934 A	23 Sep 1997
		US 5690675 A	25 Nov 1997
		US 5791352 A	11 Aug 1998
		US 5824015 A	20 Oct 1998
		US 5931165 A	03 Aug 1999
		WO 9214513 A1	03 Sep 1992
		WO 9607355 A1	14 Mar 1996
		WO 9607356 A1	14 Mar 1996
		WO 9816165 A1	23 Apr 1998
EP 2644692 A1	02 October 2013	EP 2644692 A1	02 Oct 2013
		US 2014044948 A1	13 Feb 2014
		WO 2012070679 A1	31 May 2012
<b>End of Annex</b>			
<p><small>Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)</small></p>			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100189913  
弁理士 鷗飼 健

(74)代理人 100199565  
弁理士 飯野 茂

(72)発明者 ツェン、ミン・ハオ  
オーストラリア国、6015 ダブリュ・エー・、シティー・ビーチ、キングスランド・アベニュー  
ー 2

Fターム(参考) 4C081 AB18 BA12 BB07 BB08 CE11 DA02 DC04 DC05 DC06 EA02  
4C097 AA21 BB01 CC01 CC04 DD15 EE19 FF11 FF20 MM02