

(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2004-520028
(P2004-520028A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00	E
C 1 2 M 3/00	C 1 2 M 3/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁)

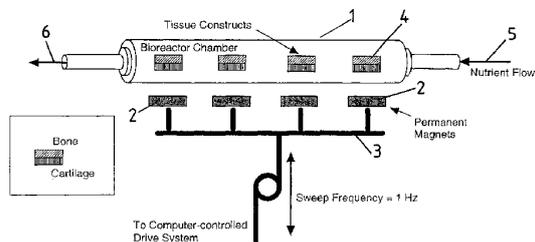
(21) 出願番号	特願2002-553466 (P2002-553466)	(71) 出願人	399045846 キール・ユニバーシティ KEELE UNIVERSITY イギリス、エステイ5・5ピージー、スタ ッフオードシャー、キール
(86) (22) 出願日	平成13年12月19日 (2001.12.19)	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月23日 (2003.6.23)	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/005606	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(87) 国際公開番号	W02002/051985		
(87) 国際公開日	平成14年7月4日 (2002.7.4)		
(31) 優先権主張番号	0031462.5		
(32) 優先日	平成12年12月22日 (2000.12.22)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	0031651.3		
(32) 優先日	平成12年12月23日 (2000.12.23)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	60/267,032		
(32) 優先日	平成13年2月7日 (2001.2.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁気的に発生させた機械的応力を使用して組織を培養する方法

(57) 【要約】

組織を培養する方法は、磁気的に発生される機械的応力に組織形成細胞を暴露しながら、組織形成細胞を増殖させるステップを含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

機械的応力に組織形成細胞を暴露しながら、該組織形成細胞を増殖させるステップを含む組織を培養する方法であって、該機械的応力が磁氣的に発生されることを特徴とする方法。

【請求項 2】

印加される磁場に応答して力を発生し、前記組織形成細胞にその力を伝達することができる磁性体によって前記応力が発生される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記磁性体が前記組織形成細胞に付着される請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記磁性体がマイクロ粒子またはナノ粒子を含む請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記磁性体が強磁性流体を含む請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記組織形成細胞の培養中に、前記磁場が変化する請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記磁場が正弦波的に変化する請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記磁場が、0.1 ~ 10 Hz の周波数で変化する請求項 6 または 7 に記載の方法。

20

【請求項 9】

インビトロにおいて適用される請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記組織形成細胞が、三次元的足場上または内で増殖される請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記組織形成細胞が、培地が流動するバイオリアクター内で培養される請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記バイオリアクターの外部から前記磁場を印加する請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 13】

インビボにおいて適用される請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

培養中の前記細胞が、結合組織を形成するためのものである請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

培養中の前記細胞が、骨、軟骨、靭帯または腱を形成するためである請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

2 つ以上の異なる細胞種が培養される請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 17】

前記異なる細胞種に異なる応力を印加する請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

培養中の前記細胞が、骨形成細胞および軟骨形成細胞を含む請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記細胞または前記足場に印加する力が、0.01 ~ 10 ニュートンの範囲である請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

培地用の導入口および流出口を有し、バイオリアクター内に変動磁場を印加するための手

50

段を備えているバイオリアクター。

【請求項 2 1】

前記変動磁場を印加する手段が電磁石を含む請求項 2 0 に記載のバイオリアクター。

【請求項 2 2】

前記変動磁場を印加する手段が、前記バイオリアクターに対して移動可能である少なくとも 1 つの永久磁石を含む請求項 2 1 に記載のバイオリアクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞を培養する方法に関し、さらに特に（しかし、限定的ではなく）、ヒトおよび動物用置換組織を形成するために細胞を培養することに関する。本発明は、限定的ではないが、よりさらに詳細には、機械応答的な（mechano-responsive）組織を培養することに関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトおよび動物用置換組織のインビトロにおける培養の重要な発展により、患者から採取した細胞から組織を増殖させることができるので、置換組織は拒絶問題を生じない。このような置換治療のために作製することができる置換組織の例には、結合組織、骨、軟骨、腱および臓腑が挙げられる。

【0003】

置換組織は、置換が意図されている組織と同じ種類の細胞を含まなければならず、さらに、要求され、おそらく複雑な三次元形状を有しなければならない。このように、置換組織は、バイオリアクター内の、培地に浸漬し、好適に形作られた足場上または足場内で一般に増殖される。足場は、組織を必要な三次元形態に増殖させるように形作られている細胞増殖基質（cell growth substrate）である。バイオリアクター内では、培地が（一般に一定速度で）流動しており、確実に、足場上または足場内の組織形成細胞（tissue-forming cell）には絶え間なく栄養物が供給され、細胞の代謝による老廃物が除去される。静的な培養フラスコと比較して、バイオリアクターに使用することができる培地の容量は典型的には多いので、数多くの異なる組織種を作製するのに好適な範囲のサイズの足場を浸漬することができる。足場全体に培地が灌流することにより、全ての細胞は、構造全体に行き渡っている増殖のための生育条件からの恩恵を得ることができる [1]。

【0004】

また、特に、機械応答的な組織の場合には、十分に機能する組織を作製するために、培養中に組織形成細胞を機械的応力（mechanical stress）に暴露する必要がある場合がある。したがって、例えば、骨、軟骨、靭帯および腱などの一部の種類の結合組織は、必要な機械的特性を得るために、培養中に機械的応力に暴露する必要がある [2]。

【0005】

必要な応力の程度は、使用する細胞種および必要な組織種により変わる。このような応力を生ずる数多くの方法が当技術上周知であり、細胞の直接的な機械的刺激や、流体力学的な圧縮システムが含まれる。前者の方法では、細胞を圧縮するためにローラー等を使用するが、後者では、細胞を機械的に刺激するために、バイオリアクターに入っている培地内でパルス状の高い圧力を使用する。しかし、機能的な組織を作製するために細胞を機械的に刺激する周知の方法はどれも、骨、腱および靭帯などの多数の種類の組織にはあまり満足できない。直接的な機械的方法は面倒であり、培養に必要な無菌状態を維持する際に困難を生じる。流体力学的圧縮方法は、一般に、効果がない。さらに、以前の周知の方法は全て、いずれの印加時においても、所定の大きさの応力を培養中の細胞種に印加することしかできず（一般に、細胞レベルに必要なものよりはるかに大きい応力）、印加される応力に耐えるために、細胞を増殖させている足場自体がかなりの機械的弾力性を持たなければならないという欠点がある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、本発明の目的は、上記の欠点を回避または軽減することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の第一の態様によると、機械的応力に組織形成細胞を暴露しながら、組織形成細胞を増殖させるステップを含み、機械的応力が磁氣的に発生されることを特徴とする組織を培養する方法が提供される。

【0008】

したがって、本発明によると、十分に機能する組織を確実に作製するために、組織形成細胞に磁氣的に発生された応力を印加する。 10

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明の方法は、患者に植え込むための組織をインビトロにおいて増殖させるために適用することができる。インビトロにおいて実施される場合には、好ましくは、組織培養培地を流動させているバイオリアクター内の三次元足場上または足場内で組織形成細胞を培養することが好ましい。しかし、他の種類の組織培養容器を使用してもよい。患者の生体内で新たな組織をインサイチュウにおいて増殖させるために、本発明の方法をインビボにおいて適用することも可能である。

【0010】

組織形成細胞に必要な応力を印加するために、バイオリアクター内に印加する磁場に応答して力を発生し、培養中の組織形成細胞にその力を伝達することができる磁性体によって応力を発生させることができる。本発明の好ましい実施態様において、磁性体は組織形成細胞に付着 (attach) され、好ましくは、マイクロ粒子またはナノ粒子、好ましくはコーティングされた磁性マイクロまたはナノ粒子の形態を取る。または、磁性体は、培地内に挿入される強磁性流体 (ferrofluid) であってもよい。さらに、細胞に付着した磁性体と強磁性流体を併用して使用することもできる。 20

【0011】

使用する特定の磁性体に関係なく、時間変化する磁気勾配または均一な磁場を使用することにより、磁性体の動きが調節され、結果として、組織形成細胞に反復的に応力を印加することができる。このような応力は大きさおよび印加方向を正確に変化させることができるので、十分に機能する組織を確実に作製するために必要な応力形成状況に組織形成細胞を暴露することができる。これは、同じ足場 (または異なる足場) の異なる領域の異なる細胞に付着させた粒子の磁気的特性を変えることによって、または勾配をかけた磁場中の磁界強度の空間的な変動を用いることによって実施することができる。 30

【0012】

磁場は、例えば、0.1 ~ 10 Hz の周波数で変えることができる。しかし、この範囲外の周波数を使用することもできる。磁場は、典型的には、10 mT ~ 1400 mT 程度 (これに限定されない) の磁束密度を持つ。

【0013】

細胞に印加される応力の大きさは、一般に、0.1 ~ 100 ピコニュートン (pN) 程度 (これに限定されない) であり、応力を印加する方向は、印加する磁場中の磁性体の直線的な移行運動 (linear transitional motion) (勾配のため、粒子は磁氣的にブロックされる必要がない) または回転運動 (印加する磁場による粒子の磁化ベクトルの角度のため、磁氣的にブロックされた粒子でなければならない) に起因する。 40

【0014】

本発明の重要な利点は、(示すように) 磁場の変動を遠隔的にコントロールすることができるので、インビトロ、例えば、バイオリアクターにおいて、またはインビボにおいて無菌状態を維持しながら、印加する応力の方向および大きさをコントロールすることが容易であるということである。さらに、細胞レベルで発生される応力は一般に小さく (例えば 50

、数ピコニュートン) [3]、したがって、いかなる足場(それに接着して、またはその内部で、組織形成細胞を増殖させている)も大きい機械的特性を必要としない。

【 0 0 1 5 】

機械的負荷または機械感受性(mechanosensitive)イオンチャネルの活性化を必要とするバイオリクターおよびインピボのいずれにおいても、種々の組織種を作製するために本発明の方法を使用することができる。これらには、骨、軟骨、靭帯および腱などの結合組織が挙げられる(しかし、これらに限定されない)。培養する細胞の生検は標準的な手法によって行うことができる[4]。

【 0 0 1 6 】

例えば、骨および軟骨のような少なくとも2つの異なる種類の組織を含む組織構築物に本発明の方法を適用することも可能である。足場上または足場内でインサイチューにおいて軟骨細胞または骨細胞に分化する細胞源として、ヒト間葉幹細胞を使用することも可能である。

【 0 0 1 7 】

上記のように、本発明の好ましい実施態様は、必要な応力を印加する目的のために、組織形成細胞に磁性ミクロまたはナノ粒子を付着させることに関する。磁性ミクロまたはナノ粒子は、それに接着して、またはその内部で組織を増殖させるための足場に組織形成細胞を播種する前に、官能基化して、組織形成細胞に付着させることができる。したがって、例えば、細胞に付着させるために、ミクロ粒子およびナノ粒子に、例えば、フィブロネクチンおよびRGD分子のような接着分子をコーティングしてもよい。

【 0 0 1 8 】

ミクロ粒子およびナノ粒子(細胞に付着させることが意図されている)は、一般に、球形または楕円形であり、10nm~10μmの範囲の直径を有する。

【 0 0 1 9 】

細胞に付着させる粒子はコーティングされていても、されていなくてもよく、単磁区または多磁区であってもよい。好適な粒子の例として、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない。

(i) Spherotech, Inc.社製のコーティング磁性マイクロスフェア($d = 4 \mu m$)。これらのマイクロスフェアは、ポリマーでコーティングされ、磁氣的にブロックされたコアからなる。

(ii) サイズ調整可能で($d = 50 \sim 300 nm$)、サイズ分布が狭い単磁区フェライト塗布シリカ粒子[5]。

【 0 0 2 0 】

しかし、磁性体は粒子である必要もなければ、細胞に付着させる必要もない。例えば、バイオリクターまたはインピボにおけるプロフュージョン(profusion)培地が、印加する磁気勾配のある磁場により培養中の細胞への力を発生させるために使用される強磁性流体を含有することが可能である。強磁性流体は、例えば、PVA/磁鉄鉱ナノ粒子系強磁性流体($d = 4 \sim 10 nm$)であってもよい[6]。細胞に付着させた粒子を強磁性流体と併用して使用することも可能である。

【 0 0 2 1 】

バイオリクターは、例えば、プロフュージョン、攪拌培養フラスコ、流体力学的圧縮および回転容器システムなどの既存のバイオリクターを改良したものでもよい。

【 0 0 2 2 】

便利なことに、磁場は、組織培養容器(本発明の方法がインピボにおいて適用される場合)の外から、またはインピボにおける使用の場合には生体の外から発生させられ、永久磁石または電磁石によって提供することができる。変動磁場を発生するためには、永久磁石を、培養中の細胞に対して移動させることができる。したがって、バイオリクターの場合には、このような動きは、例えば、リアクターの長手軸方向、リアクターに近づいたり離れたり、またはリアクターの周囲方向であってもよい。これらの動きの任意の組み合わせも使用することができる。電磁石の場合には、変動磁場は、必要に応じて、永久磁石

10

20

30

40

50

について記載するものと同じ方法で、電磁石の動きと併用して、電磁石に適当なレベルの電流を提供することによって発生させることができる。

【0023】

使用することができる市販の磁石の例には、必要な磁場勾配および磁束密度を発生することができるネオジム - 鉄 - ホウ素およびサマリウム - コバルト永久磁石が挙げられる。それらは構造的に注文製造して、種々の必要な仕様に磁化することができ、1 T (10,000 Gauss) を超える表面磁束密度を生じることができる。使用することができる電磁石の例には、数テスラの磁場を生じることができる極低温冷却した超伝導磁気コイルが挙げられる。

【0024】

細胞に印加される力は、一般に、0.1 ~ 10 pN であり (以前に示してある)、このような力は、膜貫通イオンチャネルを開通することができる。このような力を発生するのに必要な磁場および磁場勾配は、粒子の磁氣的、容積的および形状的特性ならびに組織構築物と磁石の距離に応じて変わる。これらのパラメーターは、以下の等式によって支配される。

【0025】

【数1】

$$F_{mag} = (\chi_2 - \chi_1) V \frac{1}{\mu_0} B (\nabla B)$$

【0026】

(式中、 χ_2 は、磁性粒子の容積磁化率であり、 χ_1 は、周囲の媒体 (すなわち、組織 / 骨) の容積磁化率であり、 μ_0 は、自由空間の透磁率であり、B はテスラ (T) 単位の磁石の磁束密度である) これは、球形粒子であり、磁気双極子相互作用はないと仮定しているが、システムに必要な磁場および勾配の良好な近似を与えるはずである。

【0027】

ヒト組織の χ_1 の値は非常に小さく、磁石 (または強磁性流体およびナノ粒子に使用される他の磁性体) の磁化率と比較して陰性なので、 χ_1 はこの算式では無視でき、式 ($\chi_2 - \chi_1$) は χ_2 に省略することができる。また、本発明者らは、z 軸 (垂直) 方向に印加される磁場における磁性粒子 / 流体 / 材料の並進運動 (translational motion) に関心があり、比透磁率を 1 と仮定しているため、磁場源に近い粒子については、力の式は以下のように省略することができる。

【0028】

【数2】

$$F_{mag} = (\chi_2) V B \frac{dB}{dz}$$

【0029】

強磁性流体および磁性粒子の存在下において組織構築物が経験する圧縮 (並進) 力は、磁場強度、磁場勾配ならびに粒子の容積および磁氣的性質に依存していることがこれらの等式からわかる。これらのパラメーターの 1 つは、強力な空間変動 - 磁場強度 / 勾配の産物 - を有する。これは、三次元方向に区別される力 (differential force) が印加されることを可能にする。また、足場の異なる領域に、磁氣的特性および容積的特性が異なる粒子、強磁性流体および磁性体を播種することによって、印加された力の三次元的な変動を増強することができる。これは、バイオリアクター内部に印加される力の空間変動を介して、複雑な組織構築物の増殖を促進する。

【0030】

数多くの異なる足場の種類 (本質的には、寸法が異なってもよい三次元多孔性ブロック) を使用することができる。本発明の利点の 1 つは、関与する応力が一般に小さいので、足

10

20

30

40

50

場は大きい機械的特性を必要としないということである。例えば、生物分解性多孔性ポリ乳酸（PLA）系足場を使用することが可能である。別の足場には、迅速に分解し、機械的にあまり強くないPGA（ポリグリコール酸）および天然材料であるコラーゲン足場が挙げられる[7]。足場は、細胞接着性を改善するために、1型コラーゲンまたは他の接着分子（RGDまたは非-RGD系分子など）でコーティングすることができる。

【実施例】

【0031】

本発明は、以下の添付の図面を単なる例として参照して例示されている。

【0032】

図1を参照すると、リアクター1の外側に位置づけられ、図面には詳細には例示していないコンピュータ制御式（または他の時間変化）駆動システムに接続したキャリアアレイメント3に搭載された永久磁石2に関連する管状バイオリアクター1が例示されている。

10

【0033】

バイオリアクター1内には、長手方向に間隔をおいて配置された数多くの組織構築物4が存在し、各々、一方の側（こちらの側は磁石3から離れている）に骨組織、他方の側に軟骨組織（他の種類の組織を使用してもよい）を含むように図示されている。組織細胞には磁気ビーズ（示していない）が付着されており、三次元足場（示していない）に播種されている。栄養物は、矢印5で図示するように、バイオリアクターに供給され、矢印6で図示するように排出される。

【0034】

バイオリアクターの外側に、長手方向に間隔をおいて合計4つの磁石（組織構築物の数に合わせてこの数は変更することができる）2が配置されている。磁石の位置づけは、1つの磁石が各組織構築物に関連し、磁石は軟骨側に提供されるようにする。

20

【0035】

装置を使用する際には、磁石を横断方向にバイオリアクターに近づけたり、遠ざけたり振動させるようにキャリアを駆動する。磁石を駆動する振動振幅は、通常、変化し、一般に、0.1~10Hzの範囲であるが、この範囲外の値を使用してもよい。

【0036】

磁石の振動は、組織構築物に印加される圧縮/弛緩サイクルを刺激し、その周波数は、磁石に接続される機械的な駆動装置（示していない）によって変化させることもできる。磁場勾配（空間的に変動する磁場強度）により、軟骨は骨細胞よりわずかに大きい磁束密度を確実に受けられる。

30

【0037】

強力な磁場勾配は、ナノ粒子に磁石方向に向けられる並進運動を生じ、バイオリアクター内の細胞および足場を圧縮する。この圧縮は、バイオリアクター内の細胞に直接アクセスしなくても機械的負荷を刺激する。負荷は、組織構築物を圧縮する磁場強度および勾配、磁石位置および/またはナノ粒子の物理的特性を変化させることによって容易に変えることができる。

【0038】

望ましい場合には、異なる機械的応力が2つの異なる種類の細胞に印加されるように、骨細胞に関連する磁性粒子は、軟骨に関連するものとは異なる磁気的特性を持ってよい。

40

【0039】

図2は、図1に示す装置を改良したものを例示する。図2の改良箇所は、（永久）磁石は、（図1の場合の軸に対して横断方向ではなく）バイオリアクターの長手軸に平行に振動される。

【0040】

例示されている実施態様に数多くの改良を加えることができる。

【0041】

したがって、例えば、磁石はバイオリアクターの周囲を走査してもよい。これは、最も便利なことに、磁石を固定し、長手軸の周囲をバイオリアクターを回転させることによって

50

実施することができるが、必ずしもこのようでもなくともよい。

【0042】

別の方法としてまたは追加の方法として、図1および2に例示する永久磁石を電磁石と交換してもよい。さらに別の可能性は、細胞に付着されるナノ粒子を強磁性流体と交換することである。望ましい場合には、付着されるナノ粒子と強磁性流体を併用して使用することもできる。

【0043】

さらに、足場全体を変形させるために、磁石/金属板または磁石に接着すると思われる他の構造物を使用することも可能である。

【0044】

組織構築物の周期的な機械的負荷を刺激するために、磁場を使用することによる機械感受性膜貫通イオンチャネルの別の活性化方法を例示している図3をここで参照する。

【0045】

さらに特に、図3は、細胞質12を封入している膜11を有する細胞10を例示している。膜11の内部には、機械感受性イオンチャネル13が存在する。官能基化して磁気的にブロックした粒子14 (Spherotechコーティングした強磁性粒子など、 $d = 4.5 \mu\text{m}$) は、細胞骨格カップリングを介して直接的または間接的に細胞膜にしっかり付着されている[8, 9]。

【0046】

図3(a)に示す条件では、磁場は細胞10に印加されておらず、イオンチャネル13は閉じている。

【0047】

磁場供給源(示していない)を振動させることによって、細胞10に付着された磁性粒子14が捻られ、細胞膜11に機械的応力を発揮し、チャネル13の機械感受性を活性化することができる(図3b)。このイオンチャネル活性化は、培養中の細胞の生化学的経路を開始し、バイオリクター内の組織構築物の周期的な機械的負荷を刺激する。

【0048】

参照文献

【表1】

1. Ying, Y., Peak, M., Magnay, J., and El Haj, A.J. (2000) Dynamic cell scaffold interactions: implications for tissue engineering. *Proceedings of the second Smith and Nephew international symposium on tissue engineering, York, UK.*
2. El Haj, AJ, LM Walker, MR Preston, SJ Publicover (1999) Mechanotransduction pathways in bone: calcium fluxes and the role of voltage-operated calcium channels. *Med. Biol. Eng. Comp.*, 37: 403-409. 10
3. Howard J and AJ Hudspeth (1989) Compliance of the hair bundle associated with the gating of mechano-electrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron* 1: 189-199.
4. Walker et al *J Cell Biochem* 2000.
5. Pardoe, H, W Chua-anusorn, TG St. Pierre, J Dobson (2000) Structural and magnetic properties of nanoscale magnetic particles synthesised by coprecipitation of iron oxide in the presence of dextran or polyvinyl alcohol. *J. Magn. Mag. Materials*. In Press. 20
6. Tan, W, S Santra, Z Peng, R Tapeç and J Dobson (2000) Coated nanoparticles. *US Patent Pending* (Filed May 17, 2000).
7. Sittinger et al 1996.
8. Kirschvink, JL (1992) Comments on "Constraints on biological effects of weak extremely-low-frequency electromagnetic fields". *Phys. Rev. A*. 46: 2178-2184.
9. Dobson, J and TG St. Pierre (1996) Application of the Ferromagnetic Transduction Model to D.C. and Pulsed Magnetic Fields: Effects on Epileptogenic Tissue and Implications for Cellular Phone Safety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227:718-723. 30

【図面の簡単な説明】

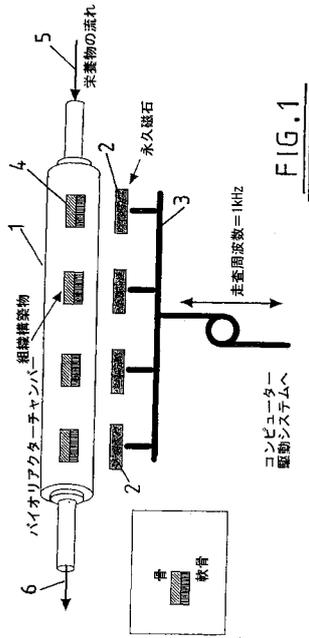
【0049】

【図1】本発明の第1の実施態様を例示する。 40

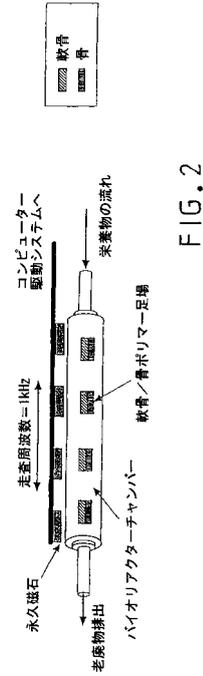
【図2】本発明の第2の実施態様を例示する。

【図3】磁場を使用することによる機械感受性膜貫通イオンチャネルの活性化を例示する

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

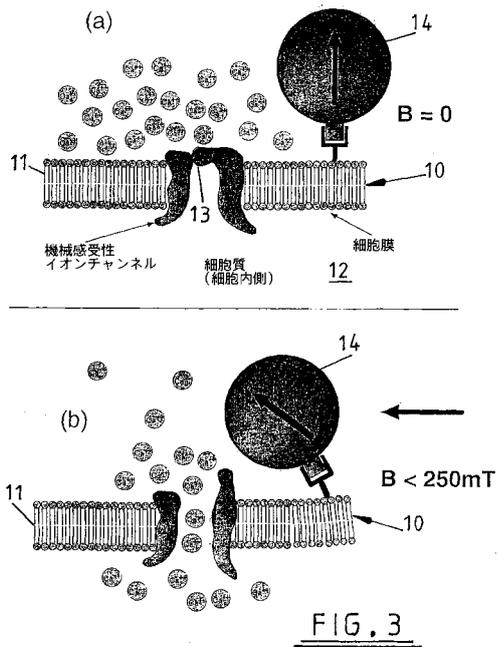


FIG. 3

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 July 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/051985 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 5/00 (74) Agent: ATKINSON, Peter, Birch, Marks & Clerk, Sussex House, 83-85 Mosley Street, Manchester M2 3LG (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB01/05606
- (22) International Filing Date:
19 December 2001 (19.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0031462.5 22 December 2000 (22.12.2000) GB
0031651.3 23 December 2000 (23.12.2000) GB
60267,032 7 February 2001 (07.02.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **KEELE UNIVERSITY** [GB/GB]; Keele, Staffordshire ST5 5BG (GB).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **EL-HAJJ, Alica, Jennifer, Hafeeza** [GB]; Beardsough Cottage, White Road, New Mills, High Peak SK22 4BQ (GB). **DOBSON, Jon, Paul** [GB]; Clarendon Brook Lane, London, Stoke-on-Trent ST9 9EZ (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/051985 A2

(54) Title: CULTURING TISSUE USING MAGNETICALLY GENERATED MECHANICAL STRESSES

(57) Abstract: A method of culturing tissue comprises growing tissue forming cells whilst subjecting the tissue forming cells to mechanical stresses which are generated magnetically.

**CULTURING TISSUE USING MAGNETICALLY GENERATED
MECHANICAL STRESSES**

The present invention relates to a method of culturing cells and relates more particularly (but not exclusively) to the culturing of cells to form replacement human or animal tissue. The invention relates even more particularly, but again not exclusively, to the culturing of mechano-responsive tissue.

The *in vitro* cultivation of replacement tissue for humans and animals is an important development allowing the tissue to be grown from cells taken from the patient so that the replacement tissue does not cause rejection problems. Examples of replacement tissues that may be produced for such replacement therapies include connective tissue, bone, cartilage, tendon and pancreas.

The replacement tissue must not only be comprised of the same type of cells as the tissue it is intended to replace but must also have the required, possibly complex, 3-dimensional shape. As such, the replacement tissue is generally grown on or within a suitably shaped scaffold immersed in a culture medium in a bioreactor. The scaffold is a cell growth substrate which is shaped to provide growth of the tissue into the required 3-dimensional form. Within the bioreactor there is a (generally constant) flow of culture medium ensuring that the tissue-forming cells on or within the scaffold continuously receive a supply of nutrients and that the metabolic waste products of the cells are removed. The typically increased volumes of culture medium that can be used in bioreactors, compared to static culture flasks, allow immersion of scaffolds of a range of sizes suitable for production of a number of different tissue types. The perfusion of culture medium throughout the scaffold allows all cells to benefit from viable conditions for growth throughout the structure [1].

In addition, and particularly in the case of mechano-responsive tissue, it may be necessary to subject the tissue forming cells to mechanical stresses during their culture to produce fully functional tissue. Thus, for example, some types of

connective tissue such as bone, cartilage, ligament and tendons need to be subjected to mechanical stress during culturing thereof to give the required mechanical properties [2].

The degree of stress needed varies according to the cell types used and tissue types required. A number of ways of producing such stresses are known in the art, including direct mechanical stimulation of the cells, and hydrodynamic compression systems. The former method uses rollers or the like to compress the cells, whereas the latter utilises pulses of increased pressure in the culture medium supplying the bioreactor to mechanically stimulate the cells. None of the known methods of mechanically stimulating cells in order to produce functional tissue are, however, entirely satisfactory for many types of tissue such as bone, tendon and ligaments. Direct mechanical methods are cumbersome, and produce difficulties in maintaining the aseptic conditions required for culture. Hydrodynamic compression methods are generally ineffective. Moreover, all previously known methods suffer from the disadvantages that only one magnitude of stress can be applied across the range of cultured cells at any one time (generally a much higher stress than is required at a cellular level), and that the scaffold upon which the cells are grown must itself have considerable mechanical resilience to withstand the stresses applied to it.

It is therefore an object of the present invention to obviate or mitigate the above mentioned disadvantages.

According to a first aspect of the present invention there is provided a method of culturing tissue comprising growing tissue forming cells while subjecting the cells to mechanical stresses characterised in that the mechanical stresses are generated magnetically.

Thus in accordance with the invention, magnetically generated stresses are applied to the tissue forming cells so as to ensure that fully functional tissue is produced.

The method of the invention may be applied *in vitro* for the growth of tissue to be implanted in a patient. If effected *in vitro* it is preferred that the tissue forming cells are cultured on or in a 3-dimensional scaffold and preferably also in a bioreactor through which flows a tissue culture medium. Other types of tissue culture vessels may however be used. It is also possible for the method of the invention to be applied *in vivo* to grow new tissue *in situ* within the body of the a patient.

The stresses may be generated by a magnetic material capable of generating a force in response to a magnetic field applied within the bioreactor and transmitting that force to the tissue forming cells being cultured so as to apply the required stresses thereto. In preferred embodiments of the invention, the magnetic material is attached to the tissue forming cells and, for preference, takes the form of micro- or nano-particles, preferably coated magnetic micro- or nano-particles. Alternatively the magnetic material may be a ferrofluid which is inserted into the culture medium. A further possibility is the combined use of magnetic material attached to the cells and a ferrofluid.

Irrespective of the particular magnetic material used, the use of a time-varying magnetic gradient or homogeneous field modulates the movement of the magnetic material and consequently allows stresses to be repeatedly applied to the tissue forming cells. Such stresses may be accurately varied both in their magnitude and direction of application so that the tissue forming cells may be subjected to the required stress forming regime to ensure that fully functional tissue is produced. This can be accomplished by varying the magnetic properties of particles attached to different cells in different regions of the same scaffold (or different scaffolds) or through the use of the spatial variation of field strength in the gradient field.

The magnetic field may be varied at a frequency of, for example, 0.1 to 10 Hz. But, frequencies outside this range can also be used. The magnetic field will typically have a flux density on the order of (but not limited to) 10 mT to 1400 mT.

The magnitude of the stresses applied to the cells will be generally on the order of (but not limited to) 0.1 to 100 piconewtons (pN) and the direction in which the stress is applied may result from a linear, translational motion (due to the gradient, particle does not need to be magnetically blocked) or rotational motion (due to the angle of the particle's magnetization vector with the applied field, must be a magnetically blocked particle) of the magnetic material in the applied magnetic field.

Significant advantages of the present invention are that (as indicated) it is easy to control the direction and magnitude of the applied stresses whilst maintaining aseptic conditions *in vitro* e.g. in a bioreactor or *in vivo* since variation of the magnetic field may be controlled remotely. Moreover the stresses that are generated at the cellular level are generally small (e.g. a few piconewtons) [3] and as such any scaffolds (on or in which the tissue forming cells are grown) do not need enhanced mechanical properties.

The method of the invention can be used to produce a variety of tissue types in both bioreactors and *in vivo* which require mechanical loading or activation of mechanosensitive ion channels. These include (but are not limited to) connective tissue such as bone, cartilage, ligament and tendons. Biopsies of the cells to be cultured may be obtained by standardized procedure [4].

It is also possible for the method of the invention to be applied to tissue constructs comprised of tissues of at least two different types, e.g. bone and cartilage. It is also possible to use human mesenchymal stem cells as a source which are differentiated into chondrocytes or bone cells *in situ* on or within scaffolds.

As mentioned above, a preferred embodiment of the invention involves attachment of magnetic micro- or nano- particles to the tissue forming cells for the purposes of applying the required stresses thereto. The magnetic micro- and nano-particles may be functionalised and attached to the tissue forming cells prior to seeding of the latter onto a scaffold on or in which the tissue is to be grown. Thus, for

example, the micro- and nano- particles may be coated with adhesion molecules, e.g. fibronectin and RGD molecules for attachment to the cells.

The micro- and nano- particles (intended to be attached to the cells) will generally be spherical or elliptical and have a diameter in the range 10nm to 10µm.

The particles for attachment to the cells may be coated or uncoated and single or multi-domain. Examples of suitable particles include, but are not limited to:

(i) Coated magnetic microspheres ($d = 4 \mu\text{m}$) available from Spherotech, Inc. These microspheres consist of a magnetically blocked core -coated by a polymer.

(ii) Single-domain, ferrite-doped silica nanoparticles with tunable size ($d = 50\text{--}300 \text{ nm}$) and narrow size distribution [5].

It is not however essential for the magnetic material to be particulate nor that it be attached to the cells. It is possible, for example, for the perfusion medium in a bioreactor or *in vivo* to contain a ferrofluid which is used to generate forces, from an applied magnetic gradient field, to the cells being cultured. The ferrofluid may for example be a PVA/magnetite nanoparticle-based ferrofluid ($d = 4\text{--}10\text{nm}$) [6]. It is possible also to use particles attached to the cells in combination with a ferrofluid.

The bioreactor may for example be a modification of an existing bioreactor such as perfusion, spinner flask, hydrodynamic compression and rotating vessel systems.

Conveniently the magnetic field is generated outside the tissue culture vessel (if the method is applied *in vitro*), or outside the body for the case of *in vivo* applications, and may be provided by a permanent magnet or an electromagnet. In order to generate variable fields, a permanent magnet may be moved relative to the cells being cultured. Thus, in the case of a bioreactor, such movement may for

WO 02/051985

PCT/GB01/05606

6

example be longitudinally along the reactor, towards-and-away from the reactor or around the reactor. Any combination of these movements may also be used. In the case of an electromagnet, varying magnetic fields may be generated by provision of appropriate electric current levels to the electromagnet optionally in combination with movement of the electromagnet in the same manner as described for the permanent magnet.

Examples of commercially available magnets that may be used include Neodymium-Iron-Boron and Samarium-Cobalt permanent magnets that are capable of generating the required field gradients and flux densities. They can be geometrically tailored and magnetized to a variety of required specifications and produce flux densities at the surface in excess of 1 T (10,000 Gauss). Examples of electromagnets that may be used include cryo-cooled, superconducting magnetic coils capable of producing fields of several tesla.

The forces applied to the cells will generally be from 0.1 to 10pN (as previously indicated), such forces being capable of opening transmembrane ion channels. The magnetic fields and field gradients required to generate these forces vary depending on the magnetic, volumetric and shape properties of the particles and the distance between the tissue construct and the magnet. These parameters are governed by the equation:

$$F_{mag} = (\chi_2 - \chi_1)V \frac{1}{\mu_0} B(\nabla B)$$

where χ_2 is the volume magnetic susceptibility of the magnetic particle, χ_1 is the volume magnetic susceptibility of the surrounding medium (i.e. tissue/bone), μ_0 is the magnetic permeability of free space, \mathbf{B} is the magnetic flux density in Tesla (T). Though this assumes spherical particles and no magnetic dipole interactions, it should give a good approximation of the field and gradient required for the system.

As the value of χ_1 for human tissue is very small and negative in comparison with the magnetic susceptibility of magnetite (or other magnetic material which will be used in the ferrofluids, and nanoparticles), χ_1 is negligible for this calculation and the expression $(\chi_2 - \chi_1)$ can be reduced to χ_2 . Also, as we are interested in the translational motion of the magnetite particle/fluid/material in an applied field along the z-axis (vertical) and, assuming a relative permeability of 1, the force expression can be reduced to:

$$F_{mag} = (\chi_2)VB \frac{dB}{dz}$$

for particles close to the magnetic field source.

It can be seen from these equations that the compressional (translational) force experienced by the tissue constructs in the presence of ferrofluids and magnetic particles is dependent on the strength of the field, the field gradient and the volumetric and magnetic properties of the particles. One of these parameters will have a strong spatial variation – the field strength/gradient product. This will enable the application of differential forces in three dimensions. In addition, by seeding different regions of the scaffold with particles, ferrofluids and magnetic materials of differing magnetic and volumetric properties, the three-dimensional variation in applied force can be enhanced. This facilitates the growth of complex tissue structures via the spatial variation of applied forces inside the bioreactor.

A number of different scaffold types (essentially 3-dimensional porous blocks which can be varied in dimension) can be used. One of the advantages of the present invention is that the scaffolds do not need enhanced mechanical properties as the stresses involved are generally small. It is possible, for example, to use a biodegradable, porous polylactic acid (PLA) based scaffold. Alternative scaffolds include PGA (poly glycolic acid) materials which are rapidly degrading and are less mechanically strong and collagen scaffolds which are natural materials [7]. The

WO 02/051985

PCT/GB01/05606

8

scaffold may be coated with collagen type 1 or other adhesion molecules (such as RGD or non-RGD based molecules) to improve cell adhesion.

The invention will be illustrated, by way of example only, with reference to the accompanying drawings, in which:

Fig 1 illustrates a first embodiment of the invention;

Fig 2 illustrates a second embodiment of the invention; and

Fig 3 illustrates activation of a mechano-sensitive transmembrane ion channel by the use of a magnetic field.

Referring to Fig 1, there is illustrated a tubular bioreactor 1 associated with permanent magnets 2 which are positioned externally of the reactor 1 and which are mounted on a carrier arrangement 3 connected to a computer-controlled (or other time-varying) drive system not illustrated in detail in the drawings.

Within the bioreactor 1 are a number of longitudinally spaced tissue constructs 4 each depicted as being comprised on bone tissue on one side (the side remote from the magnets 3) and cartilage tissue on the other side (other tissue types may also be used). The tissue cells have magnetic beads (not shown) attached thereto and are seeded on 3-D scaffolds (again not shown). Nutrients are supplied to the bioreactor as depicted by arrow 5 and exit therefrom as depicted by arrow 6.

There are a total of four magnets 2 (though this number can vary to match the number of tissue constructs) which are external of the bioreactor and longitudinally spaced therealong. The positioning of the magnets is such that there is one magnet associated with each of the tissue constructs, the magnets being provided on the cartilage sides thereof.

In use of the apparatus, the carrier is driven so as to oscillate the magnets transversely towards and away from the bioreactor. The oscillation frequency at which the magnets are driven will usually be varied and generally be in the range of 0.1 to 10 Hz although values outside this range may be used.

The oscillation of the magnets stimulates a compression/relaxation cycle which is applied to the tissue constructs, the frequency of which can also be varied by mechanical drivers (not shown) attached to the magnets. The magnet field gradient (spatially varying magnetic field strength) ensures that the cartilage experiences slightly higher flux densities than the bone cells.

Strong magnetic field gradients will produce a translational motion on the nanoparticles directed towards the magnets, compressing the cells and scaffold inside the bioreactor. This compression will simulate mechanical loading without requiring direct access to the cells inside the bioreactor. Loads can be easily varied by changing the magnetic field strength and gradient, magnet position and/or the physical properties of the nanoparticles compressing the tissue constructs.

If desired, the magnetic particles associated with the bone cells may have different magnetic properties from those associated with the cartilage so that different mechanically stresses are applied to the two different types of cells.

Fig 2 illustrates a modification of the apparatus shown in Fig 1. In the modification of Fig 2, the (permanent) magnets are oscillated parallel to the longitudinal axis of the bioreactor (rather than transversely to the axis in the case of Fig 1).

A number of modifications may be made to the illustrated embodiments.

Thus, for example, the magnets may be swept relatively around the bioreactor. This may most conveniently, but not necessarily, be achieved by keeping the magnets fixed and rotating the bioreactor around its longitudinal axis.

Alternatively or additionally the permanent magnets illustrated in Figs 1 and 2 may be replaced by electromagnets. A further possibility is for the nanoparticles attached to the cells to be replaced by ferrofluids. If desired, a combination of attached nanoparticles and ferrofluids may also be used.

A further possibility is to use magnetic/metal plates or other structures which could be attracted to the magnets in order to deform the entire scaffold.

Reference is now made to Fig 3 which illustrates an alternative method of activation of mechano-sensitive transmembrane ion channels by the use of a magnetic field so as to simulate period mechanical loading of a tissue construct.

More particularly, Fig 3 illustrates a cell 10 having a membrane 11 enclosing the cell's cytoplasm 12. Within membrane 11 is a mechanosensitive ion channel 13. A functionalized magnetically blocked particle 14 (such as Sphereotech's coated ferromagnetic particles, $d=4.5\mu\text{m}$) is rigidly attached to the cell membrane 11 either directly or indirectly via cytoskeletal coupling [8, 9].

In the condition shown in Fig 3(a), no magnetic field is applied to the cell 10 and the ion channel 13 is closed.

By oscillating a magnetic field source (not shown) the magnetic particle 14 attached to the cell 10 can be twisted, exerting a mechanical stress on the cell membrane 11 and activating the mechano-sensitive in channel 13 (Figure 3b). This ion channel activation initiates biochemical reaction pathways in the cells being cultured and simulates periodic mechanical loading of tissue constructs inside the bioreactor.

REFERENCES:

1. Ying, Y., Peak, M., Magnay, J., and El Haj, A.J. (2000) Dynamic cell scaffold interactions: implications for tissue engineering. *Proceedings of the second Smith and Nephew international symposium on tissue engineering, York, UK.*
2. El Haj, AJ, LM Walker, MR Preston, SJ Publicover (1999) Mechanotransduction pathways in bone: calcium fluxes and the role of voltage-operated calcium channels. *Med. Biol. Eng. Comp.*, 37: 403-409.
3. Howard J and AJ Hudspeth (1989) Compliance of the hair bundle associated with the gating of mechano-electrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron* 1: 189-199.
4. Walker et al *J Cell Biochem* 2000.
5. Pardoe, H, W Chua-ansorn, TG St. Pierre, J Dobson (2000) Structural and magnetic properties of nanoscale magnetic particles synthesised by coprecipitation of iron oxide in the presence of dextran or polyvinyl alcohol. *J. Magn. Mag. Materials*. In Press.
6. Tan, W, S Santra, Z Peng, R Tapecc and J Dobson (2000) Coated nanoparticles. *US Patent Pending* (Filed May 17, 2000).
7. Sittinger et al 1996.
8. Kirschvink, JL (1992) Comments on "Constraints on biological effects of weak extremely-low-frequency electromagnetic fields". *Phys. Rev. A*. 46: 2178-2184.
9. Dobson, J and TG St. Pierre (1996) Application of the Ferromagnetic Transduction Model to D.C. and Pulsed Magnetic Fields: Effects on Epileptogenic Tissue and Implications for Cellular Phone Safety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227:718-723.

CLAIMS

1. A method of culturing tissue comprising growing tissue forming cells whilst subjecting tissue forming cells to mechanical stresses characterised in that the mechanical stresses are generated magnetically.
2. A method as claimed in claim 1 wherein the stresses are generated by a magnetic material capable of generating a force in response to a magnetic field applied and transmitting that force to the tissue forming cells.
3. A method as claimed in claim 2 wherein the magnetic material is attached to the tissue forming cells.
4. A method as claimed in claim 3 wherein the magnetic material comprises micro- or nano-particles.
5. A method as claimed in any one of claims 2 to 4 wherein the magnetic material comprises a ferrofluid.
6. A method as claimed in any of claims 1 to 5 wherein the magnetic field is varied during culture of the these tissue forming cells.
7. A method as claimed in claim 6 wherein the magnetic field is varied sinusoidally.
8. A method as claimed in claim 6 or 7 wherein the magnetic field is varied at a frequency of 0.1 to 10Hz.
9. A method as claimed in any one of claims 1 to 8 which is applied *in vitro*.
10. A method as claimed in claim 9 wherein the tissue forming cells are grown on or in a 3-dimensional scaffold.

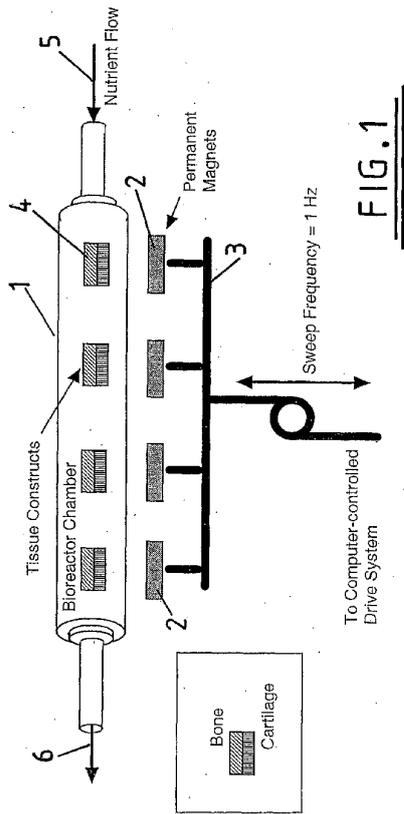
11. A method as claimed in claim 9 or 10 wherein the tissue forming cells are cultured in a bioreactor through which flows a culture medium.
12. A method as claimed in claim 11 wherein the magnetic field is applied from externally of the bioreactor.
13. A method as claimed in any one of claims 1 to 8 applied *in vivo*.
14. A method as claimed in any one of claims 1 to 13 wherein the cells being cultured are for forming connective tissue.
15. A method as claimed in claim 14 wherein the cells being cultured are for forming bone, cartilage, ligament or tendons.
16. A method as claimed in any one of claims 1 to 15 wherein two or more different cell types are cultured.
17. A method as claimed in claim 16 wherein different stresses are applied to the different cell types.
18. A method as claimed in claim 16 or 17 wherein the cells being cultured comprise bone-forming cells and cartilage-forming cells.
19. A method as claimed in any one of claims 1 to 18 wherein the forces applied to the cells or scaffold are in the range 0.01 to 10 Newtons.
20. A bioreactor having an inlet and an outlet for a culture medium and being provided means for applying a variable magnetic field within the bioreactor.
21. A bioreactor as claimed in claim 20 wherein the means for applying the variable magnetic field comprise an electromagnet.

WO 02/051985

PCT/GB01/05606

14

22. A bioreactor as claimed in claim 21 wherein the means for applying the variable magnetic field comprises at least one permanent magnet which is moveable relative to the bioreactor.



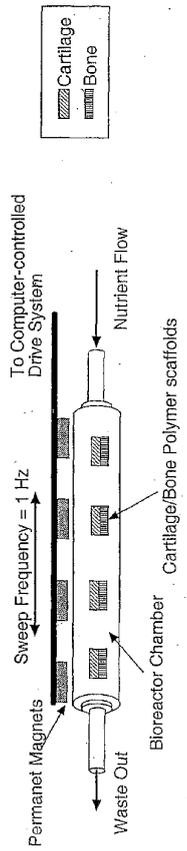
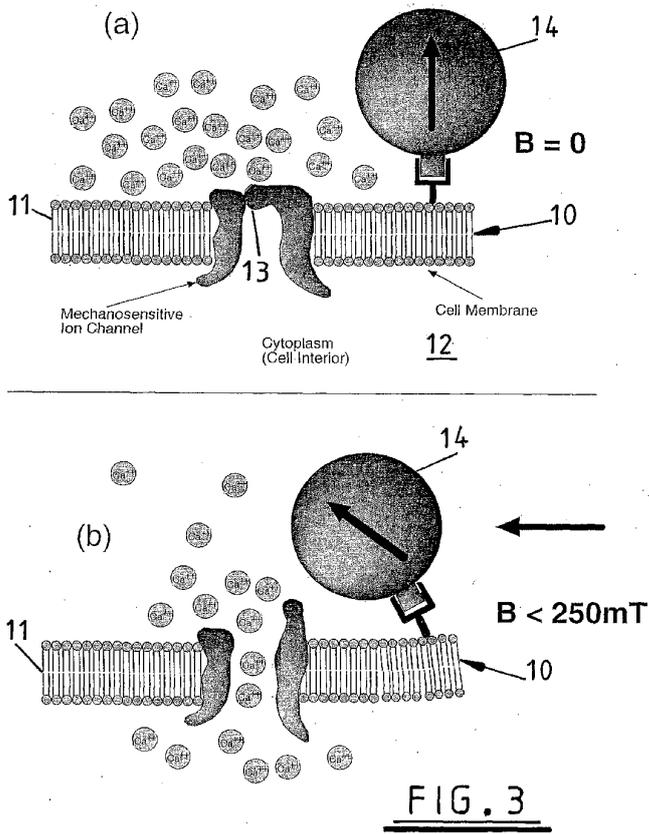


FIG. 2

WO 02/051985

PCT/GB01/05606

3 / 3



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 July 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/051985 A3

(51) International Patent Classification: C12N 5/08, C12M 3/00 (74) Agent: HARRISON GODDARD FOOTE, 31 St. Saviourgate, York YO1 8NQ (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB01/05606 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, GT, HN, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 19 December 2001 (19.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0031462.5 22 December 2000 (22.12.2000) GB, 0031651.3 23 December 2000 (23.12.2000) GB, 60/267,032 7 February 2001 (07.02.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): KEELE UNIVERSITY [GB/GB], Keele, Staffordshire ST5 5BG (GB).

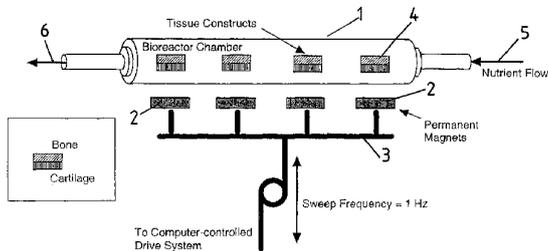
Published: with international search report

(72) Inventors: and (75) Inventors/Applicants (for US only): EL-HAJ, Alicia, Jennifer, Hafeeza [GB], Beardlough Cottage, White Road, New Mills, High Peak SK22 4EQ (GB), DOBSON, Jon, Paul [GB], Claremont Brauk Lane, Endon, stoke-on-Trent ST9 9EZ (GB).

(88) Date of publication of the international search report: 16 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: CULTURING TISSUE USING MAGNETICALLY GENERATED MECHANICAL STRESSES



WO 02/051985 A3

(57) Abstract: A method of culturing tissue comprises growing tissue forming cells whilst subjecting the tissue forming cells to mechanical stresses which are generated magnetically.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In I Application No P/01/68 01/05605
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/08 C12M3/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12M		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YUGE LOUIS ET AL: "Differentiation of myoblasts is accelerated in culture in a magnetic field." IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY ANIMAL, vol. 36, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 383-386, XP001061490 ISSN: 1071-2690 page 383, right-hand column; figure 1 page 385 -/--	1,2,4,9, 12
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** 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 *C* 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 *** 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. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 June 2002	Date of mailing of the international search report 06.09.02	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5516 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2000, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Steffen, P	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No. PCT/GB 01/05606
G/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indicator, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU MINGYAO ET AL: "Bio-stretch, a computerized cell strain apparatus for three-dimensional organotypic cultures." IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY ANIMAL, vol. 35, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 87-93, XP001080069 ISSN: 1071-2690 page 87, right-hand column, last paragraph -page 88, left-hand column, paragraph 1; figures 1,3 page 89 -page 92 ---	1,2,6, 8-10,12
X	KASPAR D ET AL: "Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity." JOURNAL OF BIOMECHANICS, vol. 33, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 45-51, XP002203098 ISSN: 0021-9290 page 46; table 1 page 48; figure 2	1,2,6-9, 12,14, 15,19
A	-& BOTTLANG M ET AL: "A cell strain system for small homogeneous strain applications." BIOMEDIZINISCHE TECHNIK, vol. 42, no. 11, November 1997 (1997-11), pages 305-309, XP001080015 ISSN: 0013-5585 page 306 --- -/--	

Form PCT/GB 01/05606 (continuation of second sheet) (July 1997)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor	Application No
Pf. 1/68	01/05606

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GLOGAUER MICHAEL ET AL: "A new method for application of force to cells via ferric oxide beads." PFLUEGERS ARCHIV EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 435, no. 2, January 1998 (1998-01), pages 320-327, XP002203099 ISSN: 0031-6768 page 320, right-hand column -page 321, right-hand column, paragraph 2; figure 1 page 323 page 324, left-hand column, paragraph 2 -page 325, left-hand column, paragraph 2 -& DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US1995 GLOGAUER, M. ET AL.: "Magnetic fields applied to collagen-coated ferric oxide beads induce stretch-activated Ca-2+ flux in fibroblasts." Database accession no. PREV199698605117 XP002203103 abstract & AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 269, no. 5 PART 1, 1995, pages C1093-C1104, ISSN: 0002-9513 ---	1-4,9, 12,19
X	SMALT R ET AL: "Induction of NO and prostaglandin E2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 273, no. 4 PART 1, October 1997 (1997-10), pages E751-E758, XP002203100 ISSN: 0002-9513 page E752; figure 1 ---	1,2,6-8, 12,14,15
X	US 5 486 457 A (BUTLER JAMES P ET AL) 23 January 1996 (1996-01-23) figure 1; examples 1,2 ---	1-4
X	WANG NING ET AL: "Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, vol. 279, no. 1 Part 1, July 2000 (2000-07), pages C188-C194, XP002203101 ISSN: 0002-9513 page C189, left-hand column ---	1-4
	-/--	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/US 01/05606

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG NING: "Mechanical interactions among cytoskeletal filaments." HYPERTENSION (DALLAS), vol. 32, no. 1, July 1998 (1998-07), pages 162-165, XP002203102 ISSN: 0194-911X page 162, right-hand column, paragraph 2 -page 163, left-hand column, paragraph 1 -----	1-4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP 01/05606**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-19

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB 01/05666

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-19

A method of culturing tissue comprising growing tissue forming cells whilst subjecting tissue forming cells to mechanical stresses characterised in that the mechanical stresses are generated magnetically. Furthermore further embodiments of said method.

2. Claims: 20-22

A bioreactor having an inlet and an outlet for a culture medium and being provided with means for applying a variable magnetic field within the bioreactor. Furthermore further embodiments of said bioreactor.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
... or mention on patent family members

Int'l Application No
PCT/GB 01/05606

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5486457 A	23-01-1996	NO 9506248 A	02-03-1995

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 エル ハジ, アリシア・ジェニファー・ハフェーザ
イギリス国, エスケイ 2 2 4 イーキュー ハイ・ピーク, ニュー・ミルズ, ホワイトル・ロード
ピアードハフ・コティジ

(72)発明者 ドブソン, ジョン・ポール
イギリス国, エスティー 9 9 イーゼット ストーク オン トレント, エンドン, クレアマウン
ト・ブルック・レイン