

(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2004-507237

(P2004-507237A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 11/02	C 1 2 N 11/02	4 B O 3 3
A 6 1 L 27/00	A 6 1 L 27/00	4 C O 8 1
	A 6 1 L 27/00	
	A 6 1 L 27/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁)

(21) 出願番号	特願2002-522231 (P2002-522231)	(71) 出願人	501249010 ライスユニバーシティ Rice University アメリカ合衆国 77005 テキサス ヒューストン 6100メイン
(86) (22) 出願日	平成13年8月21日 (2001.8.21)	(74) 代理人	100107489 弁理士 大塩 竹志
(85) 翻訳文提出日	平成15年2月21日 (2003.2.21)	(72) 発明者	ウエスト, ジェニファー エル. アメリカ合衆国 テキサス 77584, パウルランド, セノーバ ドライブ 3523
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/026170	(72) 発明者	マン, ブレンダ ケイ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 917 86, アップランド, クールクレスト アベニュー 1522
(87) 国際公開番号	W02002/016557		
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002.2.28)		
(31) 優先権主張番号	60/226, 771		
(32) 優先日	平成12年8月21日 (2000.8.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】マトリクスタンパク質の産生を促進する組織工学足場

(57) 【要約】

マトリクス増強分子(例えば、TGF-)は、組織工学、組織再生および創傷治癒適用のために細胞によってECM産生を増大するために、足場に結合体化されるかまたは足場に固定される。マトリクス増強分子は、組織工学または細胞増殖足場に対する結合のために、テザー(例えば、ポリエチレングリコール(PEG)モノアクリレートに結合体化される。マトリクス増強分子は、足場への結合後に活性を保持し、そして細胞の増殖を実質的に増大することなく(足場がさらに細胞接着リガンドを含んである場合であっても)細胞外マトリクス(ECM)産生を増大するために足場中または足場上での細胞の増殖を引き起こす。細胞によって産生されたECMの増大は、加水分解または酵素学的分解のいずれかによって細胞の完全性を維持することを助ける(特に、足場が分解性である場合)。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

足場に結合した細胞による細胞外マトリクスの形成を誘導するための組織工学足場を作製するための方法であって、該方法は、

細胞増殖を増大させることなく細胞外マトリクスの形成を誘発するのに有効な密度で、精製したマトリクス増強分子を該足場に結合させる工程を包含し、

ここで、該マトリクス増強分子が TGF- β である場合、該 TGF- β は、ゲル浸透クロマトグラフィーによって測定された場合に 2000 と 6000 との間の分子量を有するポリマーテザーによって該マトリクスに結合され、そして 1 ml のポリマーマトリクスもしくはポリマーマトリクス - 細胞混合物当たり 5 ng と 100 ng との間の TGF- β 密度であるか、または 1 ml のポリマーマトリクスもしくはポリマーマトリクス - 細胞混合物当たり約 4×10^{-6} nmol と 4×10^{-3} nmol との間の濃度である、方法。

10

【請求項 2】

細胞を前記足場に結合させる工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記マトリクス増強分子がアンジオテンシン II である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記マトリクス増強分子がインスリン様増殖因子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記マトリクス増強分子がアスコルビン酸である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記マトリクス増強分子が、前記足場に共有結合されるテザーに共有結合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記足場がヒドロゲルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法であって、ここで、前記ヒドロゲルが、アルギネート、コラーゲン、ヒアルロン酸、およびポリエチレングリコールポリマーからなる群より選択されるポリマーで形成される、方法。

30

【請求項 9】

請求項 7 に記載の方法であって、ここで、前記マトリクス増強分子が、約 4×10^{-6} nmol/ml と 4×10^{-3} nmol/ml との間の濃度でヒドロゲルに結合する TGF- β である、方法。

【請求項 10】

足場に結合した細胞による細胞外マトリクスの形成を誘導するための組織工学足場であって、

該足場は、細胞増殖を増大させることなく細胞外マトリクスの産生を誘発するのに有効な密度で、足場マトリクス増強分子に結合され、

ここで、該マトリクス増強分子が TGF- β である場合、該 TGF- β は、ゲル浸透クロマトグラフィーによって測定された場合に 2000 と 6000 との間の分子量を有するポリマーテザーによって該マトリクスに結合され、そして 1 ml のポリマーマトリクスもしくはポリマーマトリクス - 細胞混合物当たり 5 ng と 100 ng との間の TGF- β 密度であるか、または 1 ml のポリマーマトリクスもしくはポリマーマトリクス - 細胞混合物当たり約 4×10^{-6} nmol と 4×10^{-3} nmol との間の濃度である、足場。

40

【請求項 11】

細胞が結合されている、請求項 10 に記載の足場。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の足場であって、ここで、前記細胞は、平滑筋細胞、内皮細胞、線維芽

50

細胞、および軟骨細胞からなる群より選択される、足場。

【請求項 13】

請求項 10 に記載の足場であって、ここで、前記マトリクス増強分子は、約 4×10^{-6} nmol/ml と 4×10^{-3} nmol/ml との間の濃度で足場に結合される TGF-
である、足場。

【請求項 14】

請求項 10 に記載の足場であって、ここで、前記マトリクス増強分子は、該マトリクスに共有結合したテザーに結合され、ここで、該テザーは、ゲル浸透クロマトグラフィーによって測定された場合に約 200 と 10,000 との間の分子量を有する、足場。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の足場であって、ここで、前記テザーは、ゲル浸透クロマトグラフィーによって測定された場合に約 2000 と 6000 との間の分子量を有する、足場。

【請求項 16】

組織の修復または置換のための方法であって、該方法は、修復が必要な部位に組織工学足場を適用または移植する工程を包含し、

該組織工学足場は、細胞増殖を増大させることなく細胞外マトリクスの産生を誘発するのに有効な密度で、該足場マトリクス増強分子に結合され、

ここで、該マトリクス増強分子が TGF-
である場合、該 TGF-
は、ゲル浸透クロマトグラフィーによって測定された場合に約 2000 と 6000 との間の分子量を有するポリマーテザーによって該マトリクスに結合され、そして 1 ml のポリマーマトリクスもしくはポリマーマトリクス - 細胞混合物当たり 5 ng と 100 ng との間の TGF-
密度であるか、または 1 ml のポリマーマトリクスもしくはポリマーマトリクス - 細胞混合物当たり約 4×10^{-6} nmol と 4×10^{-3} nmol との間の濃度である、
方法。

【請求項 17】

前記マトリクス増強分子が TGF-
である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記マトリクス増強分子がアンジオテンシン II である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記マトリクス増強分子がインスリン様増殖因子である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記マトリクス増強分子がアスコルビン酸である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記マトリクス増強分子が、前記足場に共有結合するテザーに共有結合される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

前記足場がヒドロゲルである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法であって、ここで、前記ヒドロゲルが、アルギネート、コラーゲン、ヒアルロン酸、およびポリエチレングリコールポリマーからなる群より選択されるポリマーで形成される、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

これは、一般的に、組織工学、詳細には、細胞の過度の増殖を誘導することなく細胞のマトリクス産生を改善するための規定された密度のマトリクス増殖分子を組込む足場のための、改善された組成物の分野にある。

【0002】

本願は、2000年8月21日に出願された U.S.S.N. 60/226,771 の優先権を主張する。

10

20

30

40

50

【0003】

細胞増殖、維持、外因性因子の産生が重要である分野において（例えば、組織工学の分野において）において、細胞は、しばしば、細胞接着または細胞増殖に適切な基材を提供する固体基材または足場上で増殖される。これらの足場は、天然の材料または合成材料で作製され得る。

【0004】

組織工学および創傷治癒の適用のために開発された生体材料は、十分な細胞接着を支持する必要があり、その間に、これらの細胞によって合成された新規組織によって置換される。組織の正確な機械的完全性を維持するために、細胞は、十分な細胞外マトリクス（ECM）を生成しなければならない。組織工学足場における細胞によるECM産生の減少は、発生組織の構造的な完全性の低下を導き得る。

10

【0005】

このような材料に対する接着を最適に促進するために、研究者らは、細胞接着リガンド（例えば、RGDペプチド）の生体材料表面への結合を調べている（Massia & Hubbell, *Anal. Biochem.* 187: 292 - 301 (1990); Hern & Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.* 39: 266 - 276 (1998); Deera, *J. Biomed. Mater. Res.* 40: 371 - 377 (1998); Tong & Shoichet, *J. Biomed. Mater. Res.* 42: 85 - 95 (1998); Zhangら, *Biomaterials* 20: 1213 - 1220 (1999)。しかし、細胞接着における増大は、ECM産生に対して有害に影響を与え得る（Mannら, *Biomaterials* 1999）。さらに、未改変足場であっても、ECM産生を増大させる実質的な必要性が存在する。なぜなら、ECM中のタンパク質は、生じる組織の機械的な特性を大きく決定し、そしてしばしば、生物分解性の足場材料の機能を置換する必要があるからである。生じる組織の機械特性は、組織工学脈管移植片および整形外科的組織工学のような適用において特に重要であり、ここで、失敗は、不十分な機械的完全性に起因して生じ得る。

20

【0006】

研究者らはまた、ポリエチレングルコールのようなポリマーテザー（tether）を介して、TGFのような増殖因子を組織工学マトリクスに結合させている。PCT/US96/02851、「Cell Growth Substrates with Tethered Cell Growth Effector Molecules」Massachusetts Institute of Technologyを参照のこと。TGF- β が、活性な増殖因子の制御された放出のために、合成ポリマーキャリアまたは天然ポリマーキャリアに結合され得るかまたはこれらに分散され得る、という参考文献は多数存在する。例えば、「Collagen and heparin matrices for growth factor delivery」、Schroeder-Tefftら, *Journal of Controlled Release* 49 (2-3), 291 - 298 (1997); 「In vitro characterization of transforming growth factor- β 1 loaded composites of biodegradable polymer and mesenchymal cells.」Nicolliら, *Cells and Materials* 5 (3) 231 - 244 (1995)、Collagen Corporationに対するEP 00428541「Collagen Wound healing Matrices and Process for their Production」; Athanasiouらに対する米国特許第6,013,853号「Continuous release polymeric implant carrier」を参照のこと。さらなる参考文献は、細胞または組織（特に、骨）の増殖（growth）または増殖（proliferation）を増強するための組織工学足場におけるTGF- β の使用に関する。Bristol Myers Squibb CompanyによるEP 616814「Ceramic and P

30

40

50

olymer - Based Compositions for Controlled Release of Biologically Active TGF - Beta to Bone Tissue, and Implants Using The Compositions」を参照のこと。

【0007】

しかし、これらの開示はいずれも、細胞増殖を増大させることなく、細胞外マトリクスの増強された産生を達成し得る方法を開示しない。

【0008】

従って、本発明の目的は、すなわち細胞増殖をほとんどまたは全く増大させることなく、組織工学足場上または組織工学足場内に、良好な機械特性を有する組織の形成を増強するために、ECMの形成を促進する組織工学足場を提供することである。

10

【0009】

(発明の要旨)

マトリクス増強分子(例えば、トランスフォーミング増殖因子(TGF-))が、足場に結合体化されるかまたは足場に固定されて、細胞によるECM産生を増大させ得ることが、見出されている。このマトリクス増強分子は、組織工学足場または細胞増殖足場(これらは、組織工学適用のみでなく、組織再生適用および創傷治癒適用にも有用である)に結合させるために、ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール(PEG)モノアクリレート)に結合体化される。マトリクス増強分子は、足場への結合後に活性を保持し、そしてたとえ、足場がさらに細胞接着リガンドを含む場合であってもECM産生を増大するために足場中または足場上での細胞の増殖を引き起こす。ECM産生におけるこの増大は、細胞増殖ではなく、遺伝子発現における増大に起因するものと考えられている。細胞によって産生されたECMの増大は、加水分解または酵素学的分解のいずれかによって足場の完全性を維持することを助ける(特に、足場が分解性である場合)。

20

【0010】

実施例は、PEGヒドロゲルから形成されたポリマー性足場(共有結合した接着リガンドを含む)中で増殖された脈管平滑筋細胞(SMC)によって産生されたマトリクスが、TGF-が存在しない場合に対して、足場につながれた $4 \times 10^{-5} \text{ nmol TGF-} / \text{ml}$ の存在下で増大したことを実証する。同じ時、細胞増殖は増大せず、これは、有利である。なぜなら、SMCの増大した増殖は血管の管腔を狭めるように導き得るからである。TGF-をポリマー性足場につなげることによって、同じ量の可溶性TGF-に対して、細胞外マトリクス産生において有意な増大を引き起こした(実施例1、図3を参照のこと)。これはおそらく、細胞による可溶性TGF-のインターナリゼーションまたはヒドロゲルからの可溶性TGF-の分散に起因し、これによって、TGF-は、細胞に対して利用可能ではなくなる。

30

【0011】

(発明の詳細な説明)

組織工学は、細胞の接着を可能にする足場物質を使用して行なわれる。足場物質は、マトリクス増強分子を含む。本明細書中に記載されるように、マトリクス増強分子は、細胞外マトリクスタンパク質の産生を促進すべきであるが、細胞増殖は促進すべきではない。

40

【0012】

(足場物質)

好ましい実施形態において、足場は、合成ポリマーまたは天然ポリマーから形成されるが、ヒドロキシアパタイト、シリコン、および他の無機物質のような他の物質が使用され得る。この足場は、生分解性であってもよいし非分解性であってもよい。

【0013】

分解性および非分解性の多数の生体適合性ポリマーが存在する。代表的な合成の非生分解性ポリマーとしては、エチレンビニルアセテートおよびポリ(メタ)アクリレートが挙げられる。代表的な生分解性ポリマーとしては、ポリ乳酸およびポリグリコール酸のようなポリヒドロキシ酸、ポリ無水物、ポリオルトエステル、ならびにそれらのコポリマーが挙

50

げられる。天然のポリマーとしては、コラーゲン、ヒアルロン酸、およびアルブミンが挙げられる。

【0014】

好ましい物質は、ヒドロゲルである。特に好ましいヒドロゲル形成物質は、ポリエチレングリコール-ジアクリル酸ポリマーであり、これは、光重合している。他のヒドロゲル物質としては、アルギン酸カルシウム、および展性がありそして細胞をカプセル化するために使用され得るイオン性ヒドロゲルを形成し得る特定の他のポリマーが挙げられる。

【0015】

(足場の形成)

足場は、インサイチュまたはインビトロで形成され得る。滑膜の形成のための好ましい実施形態において、足場物質は、希釈溶液で関節に噴霧され、次いで重合し、その結果、ポリマーは、関節組織の表面に結合したヒドロゲルコーティングを形成する。細胞は、ポリマー中に分散されてもよく、またはポリマーマトリクス上に播種されてもよい。足場はまた、細胞の接着および増殖を支持するために使用され得るメッシュに編まれたかまたは編まれていないポリマーの線維から形成され得る。これらの足場は、キャストすること、編むこと、塩浸出すること、紡績すること、または成形することによって形成され得る。なお別の実施形態において、足場は、微細加工および写真平版技術によって形成される鋳型を使用して形成され得、ここで、細胞は、鋳型の中にあるときに、または足場を取り出した後に、足場に播種され得る。好ましい実施形態において、細胞-ポリマー水溶液は、鋳型中に配置されそして光重合され、液体は、細胞がヒドロゲル内に播種されたヒドロゲルに変換される。

【0016】

足場はまた、組織が所望される部位に、移植の際または移植の前に播種され得る。メッシュは、好ましくは、栄養分および気体が足場全体に自由に拡散するのを可能にするように十分に開放性であるべきである。

【0017】

(マトリクス増強分子)

ECMの増加した産生を促進するマトリクス増強分子は、細胞増殖を実質的に増加させることなく、マトリクスタンパク質(例えば、糖タンパク質、エラスチン、およびコラーゲン)の産生を誘導する足場物質に結合され得る。これらのマトリクス増強物質としては、TGF- β 、アンギオテンシンII、インスリン様増殖因子およびアスコルビン酸が挙げられる。

【0018】

TGF- β は、培養中に増殖する血管SMCによって、細胞外マトリクスタンパク質の産生を増加させることが公知である(Amentoら、Arterioscler. Thromb. 11:1223-1230(1991); Lawrenceら、J. Biol. Chem. 269:9603-9609(1994); Plenzら、Atherosclerosis 144:25-32(1999))。TGF- β (血管損傷の間の天然のSMCによるかまたは遺伝子移入による産生を介する)はまた、インビボでSMCによるECM産生を増加させ得る(Majeskyら、J. Clin. Invest. 88:904-910(1991); Nabelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10759-10763(1993))。培養された線維芽細胞はまた、TGF- β の存在下で、コラーゲン合成(Clarkら、J. Cell Sci. 108:1251-1261(1995); Eickelbergら、Am. J. Physiol. 276:L814-L824(1999))およびプロテオグリカン合成(Heimerら、J. Mol. Cell Cardiol. 27:2191-2198(1995))を増加させることが示されている。さらに、TGF- β の局所的送達(Puolakkainenら、J. Surg. Res. 58:321-329(1995))およびコラーゲン足場を介するTGF- β への送達(Panditら、J. Invest. Surg. 12:89-100(1999))は、創傷治癒を強化することが示されている。

【0019】

上に参照された研究の全ては、可溶性 TGF- β の存在下での効果を調べた。以下の実施例によって示されるように、テザー TGF- β を用いてまた、細胞（平滑筋細胞および軟骨細胞のような細胞を含む）による ECM の形成を誘導し得ることが、現在示されている。

【0020】

（テザー）

マトリクス増強分子が ECM の形成を誘導するために、分子がテザーによって足場につながることが必要である。これらのテザーは、好ましくは、約 200 と約 10,000 との間、最も好ましくは、約 2000 と約 6,000 との間の分子量を有する。テザーは、好ましくは、直鎖状ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）である。マトリクス増強分子は、当業者に公知の任意の方法によって、テザー、すなわちさらに言えば、足場物質に結合され得、好ましくは、n-ヒドロキシスクシンイミド、カルボジイミド、ジイソシアネート、カルボニルジアミダゾール、またはトシルクロリドのような試薬を使用して共有結合され得る。

10

【0021】

（マトリクス増強物質の密度）

マトリクス増強物質の密度は、細胞増殖をほとんど有さないかまたは全く有さない、ECM 産生を誘発する際に重要である。最も望ましい ECM 産生の量は、組織工学足場の上またはその中で、良好な機械的特性を有する組織の形成を生じる量である。最適密度は、足場に結合される細胞の型に依存する。TGF- β の場合において、ECM 産生を誘導するための最適な濃度は、大動脈平滑筋細胞について 1 ng TGF- β / ml と 5 ng TGF- β / ml との間、そして耳介軟骨細胞について 5 ng TGF- β / ml と 100 ng TGF- β / ml との間の範囲であり、これは、 4×10^{-6} nmol / ml と 4×10^{-3} nmol / ml との間に等しい。

20

【0022】

（細胞の供給源）

細胞は、ドナー、ドナー由来の細胞の培養物、または樹立された細胞培養株から直接獲得され得る。好ましい実施形態において、同じ種の細胞（好ましくは、同じまたは同様の免疫学的プロファイルを有する）は、患者または近親者のいずれかから生検によって獲得され、次いで、標準的な条件を使用して培養物中で増殖され得る。免疫反応を誘発しそうな細胞（例えば、免疫学的に異なる個体由来のヒト筋細胞）が使用される場合、レシピエントは、例えば、ステロイドおよび他の免疫抑制薬物（例えば、シクロスポリン）のスケジュールを使用して、必要な場合、免疫抑制され得る。

30

【0023】

好ましい実施形態において、細胞は、ドナーから直接獲得され、洗浄され、そしてポリマー物質と組み合わせて直接移植される。細胞は、組織培養の当業者に公知の技術を使用して培養される。生検によって獲得された細胞は、収集され、そして培養され、混入細胞を除くために必要な場合、継代される。

【0024】

血管組織の形成のための好ましい細胞としては、平滑筋細胞、内皮細胞、および線維芽細胞が挙げられる。結合組織の形成のための好ましい細胞としては、軟骨細胞、線維芽細胞、および骨または軟骨に分化する他の型の細胞が挙げられる。

40

【0025】

（足場を使用する方法）

足場は、新しい組織（例えば、血管組織、軟骨、腱、および靭帯）を生成するために使用される。足場は、代表的に、細胞で播種され；細胞は培養され；次いで、足場は、移植される。あるいは、上記のように、足場は、滑膜のような部位中またはその上に噴霧され、細胞が播種され、次いで、その部位は、外科的に閉じられる。液体ポリマー-細胞懸濁液はまた、物質が重合され得る部位中（例えば、関節内）に注入され得る。

50

【0026】

適用としては、器官または組織（例えば、血管、軟骨、滑膜、腱、または靭帯）の修復および/または置換、あるいは「バルキング剤」としての使用のための組織の作製が挙げられ、「バルキング剤」は、代表的に、灌流の処置におけるように、開口部もしくは管腔をブロックするため、または隣接組織を移動するために使用される。

【0027】

本発明は、以下の非制限的な実施例を参照して、さらに理解される。

【0028】

（実施例1：PEG-ジアクリル酸ヒドロゲルと組み合わせた可溶性TGF- β の効果と、PEG-ジアクリル酸ヒドロゲルと組み合わせた結合したTGF- β の効果との比較）
TGF- β が、固定された細胞接着リガンドによって引き起こされるECM合成における減少を打ち消し得るか否かを決定した。SMCを、ペプチド改変ガラス基板上およびつながれた細胞接着リガンドを含むヒドロゲル中の両方で、増殖させた。さらに、TGF- β を、ポリマー足場に共有結合的につなぎ、TGF- β がECM産生を増加させるその能力を保持することを示した。

10

【0029】

（材料および方法）

（細胞維持）

化学薬品は、他に述べない限り、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から得た。Wistar-Kyotoラットの胸部大動脈由来のSMCを単離し、そしてScott-Burdenら、Hypertension 13:295-305 (1989) によって以前に記載されるように特徴づけた。ヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMC) を、Clonetics (San Diego, CA) から獲得した。SMCおよびHASMCを両方とも、10%ウシ胎児血清 (FBS; BioWhittaker, Walkersville, MD)、2mM L-グルタミン、500ユニットペニシリンおよび100mg/l ストレプトマイシンを補充した最少必須イーグル培地 (MEM) で維持した。細胞を、5% CO₂ 環境下で37°C でインキュベートした。

20

【0030】

（表面改変）

この研究で使用したペプチドは、RGDS (配列番号1)、VAPG (配列番号2)、およびKQAGDV (配列番号3) (Research Genetics, Huntsville, AL) であった。REGS (配列番号4) を、非接着コントロールペプチドとして使用した。これらのペプチドを、Mannら、Biomaterials 20:2281-2286 (1999) によって以前に記載されるように、アセチル化し、そしてアミノフェーズガラススライドに結合させた。手短に言うと、アミノフェーズスライドを、37°C で一晩、無水アセトン中で3-アミノプロピルトリエトキシシランと共にガラススライドをインキュベートすることによって、調製した。次いで、アセチル化ペプチドを、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDAC) 化学を使用して、スライドに結合させた。スライドを、使用の前に、一晩UV光下で滅菌した。

30

【0031】

（アクリロイル-PEG-TGF- β の調製）

TGF- β を、TGF- β を、50mM TRIS緩衝液 (pH 8.5) 中アクリロイル-PEG-N-ヒドロキシスクシンイミド (アクリロイル-PEG-NHS, 3400Da; Shearwater Polymers, Huntsville, AL) と、2時間反応させることによって、ポリエチレングリコール (PEG) に結合体化させた。次いで、混合物を、凍結乾燥し、そして凍結して貯蔵した。UV/Vis (260nm) および蒸発光散乱検出器 (evaporative light scattering detector) を備えたゲル透過クロマトグラフィーを使用して、得られたアクリロイル-PEG-TGF- β およびPEG標準 (Polymer Laboratories, Amherst, MA) を分析した。

40

50

【0032】

(表面でのマトリクスタンパク質産生の評価)

マトリクスタンパク質産生を、Mann (1999) によって以前に記載にされたとおりに評価した。SMCの懸濁物を、5 µg/mlのアスコルビン酸を補充したMEM中に、40,000細胞/mlの濃度で調製した。TGF- β を受けたサンプルについては、0.04 pmol/ml (1 ng/ml)の未改変TGF- β または0.04 pmol/mlのアクリロイル-PEG-TGF- β を、この培地中に添加した。ECMタンパク質産生の測定のために用いられる細胞懸濁物にまた、1 µCi/ml 3 H-グリシン (40 Ci/mmol)を補充した。ガラススライドを、QuadriPerm Cell Culture Vessels (Heraeus, Osterode am Harz, Germany) 中でFlexiPermストリップに取り付けて、各スライドに8つのウェル (1.11 x 0.79 x 0.79 cm) を作製した。各スライドの8つのウェルのうちの4つを利用してECM産生を測定し、一方、残りの4つのウェルを細胞数決定のために利用し、そして 3 H-グリシンの非存在下で培養した。細胞数を、トリプシンを使用して単細胞懸濁物を調製し、そしてCoulter計数器 (Multisizer #0646, Coulter Electronics, Hialeah, FL) を用いて細胞を計数することによって、2日間の培養後に決定した。

10

【0033】

ECMタンパク質の合成を評価するために、細胞増殖培地に、上記のとおり、 3 H-グリシンを補充した。 3 H-グリシン添加の2日後、細胞を、25 mM水酸化アンモニウムで非酵素的に取り出し、次いで70%エタノールでリンスし、そして乾燥させた。このプロセスは、培養の間に細胞によって製造されたECMをインタクトなままにする (Jonesら, Proc. natl. Acad. Sci. USA 76:353-357 (1979))。逐次の酵素消化を、Mann (1999) によって以前に記載されたとおりに用いて、ECMタンパク質の総組成を決定した。手短に述べると、ECMを、最初にトリプシンで、続いてエラスターゼで、次いでコラゲナーゼで消化した。最後の酵素消化後、基材上に残っているあらゆる物質を、1N NaOHとのインキュベーションによって溶解した。アリコート用、シンチレーションカウンティングのために消化の各ステップから採取した。

20

【0034】

(アクリロイル-PEG-RGDS (配列番号1)の調製)

RGDS (配列番号1)を、TGF- β と同じ様式でアクリロイル-PEG-NHSに結合体化させた。

30

【0035】

(PEG-ジアクリレートの調製)

PEG-ジアクリレートを、0.1 mmol/ml乾燥PEG (6,000 Da; Fluka, Milwaukee, WI)、0.4 mmol/mlアクリロイルクロリドおよび0.2 mmol/mlトリエチルアミンを無水ジクロロメタン中で合わせ、そしてアルゴン下で一晩攪拌することによって調製した。次いで、得られたPEG-ジアクリレートをエーテルで沈澱させ、濾過し、そして減圧オープン中で乾燥させた。

40

【0036】

(ヒドロゲルの調製)

ヒドロゲルを、0.4 g/ml PEG-ジアクリレート、1.4 µmol/mlアクリロイル-PEG-RGDS (配列番号1) および0.3 mmol/mlトリエタノールアミンを10 mM HEPES緩衝化生理食塩水 (pH 7.4, HBS) 中で合わせることで調製した。このポリマー水溶液を、濾過 (0.8 µmプレフィルターおよび0.2 µmフィルター) によって滅菌し、そして等容量のSMC懸濁物に 2×10^6 細胞/mlで添加し、その結果、得られたポリマー-細胞溶液は、 1×10^6 細胞/mlを含んでいた。TGF- β を含有するヒドロゲルについては、0.04 pmol/ml (1 ng/ml)未改変TGF- β または0.04 pmol/mlアクリロイル-PEG-TGF- β

50

を、このポリマー - 細胞溶液に添加した。次いで、*n*-ビニルピロリドン (600 mg / ml) 中の 2, 2 - ジメチル - 2 - フェニル - アセトフェノン 40 μ l を添加し、そしてこの溶液の 0.25 ml を、ディスク型の鋳型に配置した (20 mm 直径、2 mm の厚さ)。次いで、このポリマー - 細胞水溶液を UV 光 (365 nm、10 mW / cm²) に 20 秒間暴露して、ポリマー - 細胞水溶液を、均質に播種された細胞を有するヒドロゲルへと変換した。ヒドロゲルを、10% FBS を含有する MEM 中で 7 日間にわたって 37 で、5% CO₂ を用いてインキュベートした。培地を、3 日毎に交換した。

【0037】

(ヒドロゲル中の DNA およびヒドロキシプロリンの決定)

7 日間の培養後、ヒドロゲルを、培養培地から取り出し、計量し、そして 1 ml 0.1 N NaOH で 37 で一晩消化した。次いで、消化したヒドロゲルを、1 ml 0.1 N HCl で中和した。消化して中和したヒドロゲルの DNA 含量を、蛍光 DNA 結合染料 Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いて決定した。このサンプルの蛍光を、360 nm での励起フィルターおよび 460 nm での発光フィルターを備えた蛍光計 (VersaFluor, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて決定し、そして仔ウシ胸腺 DNA 標準の蛍光に対して比較した。ヒドロキシプロリン濃度を、クロラミン T (ICN Biomedicals, Aurora, OH) を用いた酸化および *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (ICN Biomedicals) を用いた発色 (Woessner, Arch. Biochem. Biophys. 93: 440 - 447 (1961)) によって決定した。ヒドロキシプロリンは、コラーゲン産生についてのマーカーである。従って、マトリクス合成の指標として用いた。

【0038】

(ヒドロゲルの機械的試験)

ヒドロゲルを、2 ml のポリマー - 細胞水溶液を 3 mm 厚さの長方形鋳型 (42 mm x 14 mm) に配置したこと以外は、上記のとおり調製した。この実験について、HASMC を、 3.5×10^5 細胞 / ml の最終細胞密度で用いた。ヒドロゲルは、TGF- を含んでいないか、または 0.04 pmol / ml アクリロイル - PEG - TGF- を含んでいるかのいずれかであった。

【0039】

光重合後、このヒドロゲルを、10% FBS を含有する 10 ml 培地を有する QuadriPerm Cell Culture Vessel 中に配置し、そして 37 で、5% CO₂ を用いてインキュベートした。培地を、3 日毎に交換した。7 日間の培養後、このヒドロゲルを 3 つのセクション (14 mm x 14 mm) に切断し、そして Vitrodyne V-1000 Universal Tester (Chatillon, Greensboro, NC) を用い、100 μ m / s のひずみ速度で、150 g の荷重セルを用いて機械的試験を行った。

【0040】

(統計的解析)

データセットを、独立両側 t 検定を用いて比較した。0.05 未満の P 値を、有意であるとみなした。

【0041】

(結果)

現在の研究の目的は、TGF- が、生体材料 (特に、細胞接着リガンドで改変された材料) 上または生体材料 (特に、細胞接着リガンドで改変された材料) 中で増殖した細胞による ECM 合成速度を増強し得るか否かを決定することであった。図 1 は、マトリクスタンパク質産生を、TGF- なしの培地または 0.04 pmol / ml (1 ng / ml) 可溶性 TGF- を有する培地のいずれかで増殖させた細胞について、細胞あたりに基づいて示す。培地中に TGF- がない場合、接着性ペプチド上で増殖させたよりも多くのマトリクスが、非接着剤コントロールである RGES (配列番号 4) 上で増殖させた細胞

10

20

30

40

50

によって産生された。TGF- β をこの培地に添加した場合、マトリクス産生は、TGF- β が添加されなかった場合に産生されたよりも多く、接着表面で増加した。(RGDS (配列番号1)表面で224%増加、VAPG (配列番号2)表面で20%増加、KQAGDV (配列番号3)表面で104%増加)。TGF- β の存在下でのRGDS (配列番号1) 改変表面およびKQAGDV (配列番号3) 改変表面でのマトリクス産生は、非接着性コントロールで見られた産生を超えて増加した。

【0042】

RGDS (配列番号1) 改変ガラス表面に播種した細胞をまた、0.04 pmol/ml アクリロイル-PEG-TGF- β の存在下で増殖させて、TGF- β がポリマーに共有結合され得る(可溶性ポリマー鎖に共有結合しているが、三次構造に係留していない)か否かおよびECM産生を増加させるその能力を保持するか否かを決定した。図2は、培地中にTGF- β なしで増殖させた細胞、可溶性TGF- β を用いて増殖させた細胞またはアクリロイル-PEG-TGF- β を用いて増殖させた細胞によるマトリクス産生を示す。SMCは、可溶性TGF- β またはポリマー結合体化TGF- β のいずれかの存在下で、TGF- β の非存在下で産生されるよりも多くの量のマトリクスを産生した。しかし、ポリマー結合体化TGF- β を用いた場合、非改変TGF- β を用いた場合よりも少ないマトリクスが産生された。

10

【0043】

次いで、SMCを、共有結合的に係留されたRGDS (配列番号1)を含むポリエチレングリコール(PEG)ヒドロゲル中に均質に播種した。このヒドロゲルは、TGF- β を含まないか、未改変(可溶性)TGF- β を含むか、またはPEGに係留されたTGF- β を含むかのいずれかであった。これらの光重合ヒドロゲルにおいては、TGF- β の係留したペプチドは、高度に可撓性のPEG鎖を介してこのヒドロゲル構造に共有結合されている。このことによって、係留された部分は、この部分がこのヒドロゲル材料中に保持されながらも、それらのレセプターとコンホメーション的に自由に相互作用する。7日間の培養後、このヒドロゲルを消化し、そしてDNAおよびヒドロキシプロリンについてアッセイした。ヒドロキシプロリンはコラーゲンについてのマーカーであるので、これは、どれくらい多くの細胞外マトリクスが産生されたかの指標である。

20

【0044】

0.04 pmol/mlのTGF- β の存在下で増殖させた細胞についての結果を図3に示す。TGF- β が存在しない場合よりも多くのヒドロキシプロリン、従ってより多くのコラーゲンが、可溶性TGF- β または係留TGF- β のいずれかの存在下で増殖させたSMCによって産生された。さらに、TGF- β をヒドロゲル上に係留した場合、可溶性TGF- β を用いた場合よりも有意に多くのヒドロキシプロリンが産生された。

30

【0045】

さらに、TGF- β を用いて作製したヒドロゲルおよびTGF- β を用いずに作製したヒドロゲルの機械的特性を調べた。足場の剛性の尺度であるヤング率は、TGF- β を足場に係留した場合、TGF- β を用いなかった場合よりも有意に高かった(係留したTGF- β については 66.6 ± 3.7 kPa、これに対して、TGF- β を用いない場合、 $58.5 + 1.8$ kPa、 $p = 0.03$)。

40

【0046】

(実施例2: TGF- β に対する大動脈平滑筋細胞の用量応答)
大動脈平滑筋細胞を、アミノフェース(aminophase)ガラスに共有結合した0.5 nmol/cm² RGDS (配列番号1)を有するこのガラス上で増殖させた。TGF- β を、0、1または5 ng/ml (0、 4×10^{-5} 、 2×10^{-4} nmol/ml)でこの媒体に添加した。2日間の期間でのこの細胞によるECMタンパク質産生を、細胞によって製造されたECM中に取り込まれた³H-グリシンの量を調べることによって決定した。

【0047】

図4に見られるように、TGF- β を1 ng/mlおよび5 ng/mlの両方でこの媒体

50

に添加した場合、細胞あたりのECMタンパク質産生（コントロールの%）は増加した。さらに、細胞数は、1細胞あたりのマトリクス産生における変化にかかわらず、2日間にわたって増加しなかった。このことは、このヒドロゲルにおいて見られたように、TGF- β の存在が、SMCの増殖を増加させなかったことを示す。

【0048】

（実施例3：TGF- β に対する耳介軟骨細胞の用量応答）

耳介軟骨細胞を、培地に添加した種々の量（0 ng/ml、1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、25 ng/mlまたは100 ng/ml）のTGF- β を含む組織培養ポリスチレンで増殖させた。2日間の期間の間での細胞によるECMタンパク質産生を、細胞によって製造されたECM中に取り込まれた³H-グリシンの量を調べることによ

10

【0049】

図5に見られるように、1細胞あたりのECMタンパク質産生は、TGF- β を1 ng/mlを超える濃度で培地に添加した場合増加し、最適濃度は25 ng/ml（ 1×10^{-3} nmol/ml）であった。さらに、細胞数は、1細胞あたりのマトリクス産生における変化にもかかわらず、2日間にわたって増加しなかった（図6を参照のこと）。このことは、このヒドロゲルにおいて見られたように、TGF- β の存在が、この軟骨細胞の増殖を増加させなかったことを示す。

【0050】

（実施例4：アスコルビン酸の存在下でのマトリクス産生における増加）

大動脈平滑筋細胞および耳介軟骨細胞を、培地に添加した50 μ g/mlアスコルビン酸を含む組織培養ポリスチレンおよびアスコルビン酸を含まない組織培養ポリスチレン上で増殖させた。2日間の期間の間での細胞によるECMタンパク質産生を、細胞によって製造されたECM中に取り込まれた³H-グリシンの量を調べることによ

20

【0051】

図7に見られるように、1細胞あたりのECMタンパク質産生は、SMC（薄灰色）および軟骨細胞（濃灰色）の両方について、アスコルビン酸の存在下で増加した。さらに、細胞数は、1細胞あたりのマトリクス産生における変化にもかかわらず、2日間にわたって増加しなかった（図8）。このことは、アスコルビン酸の存在が、この平滑筋細胞（薄灰色）の増殖も軟骨細胞（濃灰色）の増殖も増加させなかったことを示す。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、培地中でTGF- β の有りまたは無しで、RGDS（配列番号1）、VAPG（配列番号2）、KQAGDV（配列番号3）、またはRGES（配列番号4）と共有結合したガラス表面上で増殖させたSMCによる、細胞当たりのマトリクス産生のグラフである。「+」は、TGF- β が培地に添加されたことを示し、一方、「-」は、培地からTGF- β が欠如していることを示す。

【図2】図2は、ヒドロゲル中TGF- β 無し、 4×10^{-5} nmol/mlの可溶性TGF- β またはアクリロイルPEG-TGF- β と共に、RGDS（配列番号1）改変ガラス表面上で増殖させたSMCによる、細胞あたりのマトリクス産生のグラフである。コントロールは、ヒドロゲル中にTGF- β がない。

40

【図3】図3は、ヒドロゲル中TGF- β 無し、 4×10^{-5} nmol/mlの可溶性TGF- β またはアクリロイルPEG-TGF- β と共に、RGDS（配列番号1）含有ヒドロゲル中で増殖させたSMCによる、DNA 1 ngあたりのヒドロキシプロリン産生のグラフである。コントロールは、ヒドロゲル中にTGF- β がない。

【図4】図4は、コントロールのパーセントとして、TGF- β 濃度（0、1、および5 ng/ml）の関数としての、RGDS（配列番号1）改変ガラス表面上で増殖させたSMCによる、マトリクス産生のグラフである。

【図5】図5は、培地中に種々の量のTGF- β （0、0.1、1、5、10、25、および100 ng/ml）が存在する組織培養ポリスチレン上で増殖させた心耳軟骨細胞による、コントロールのパーセントとしての、マトリクス産生のグラフである。コントロー

50

ルは、培地中に T G F - が ない。

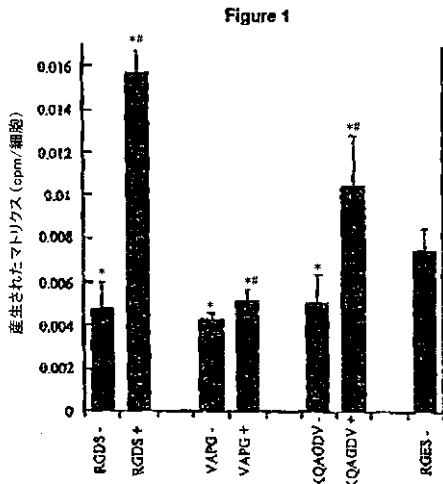
【 図 6 】 図 6 は、培地中に種々の量の T G F - (0、0.1、1、5、10、25、および 100 n g / m l) が存在する組織培養ポリスチレン上で増殖する心耳軟骨細胞による、コントロールのパーセントとしての、細胞数のグラフである。コントロールは、培地中に T G F - が ない。

【 図 7 】 図 7 は、培地中に 0 および 50 μ g / m l アスコルビン酸が存在する組織培養ポリスチレン上で増殖させた心耳軟骨細胞および大動脈平滑筋細胞による、コントロールのパーセントとしての、マトリクス産生のグラフである。コントロールは、培地中にアスコルビン酸がない。

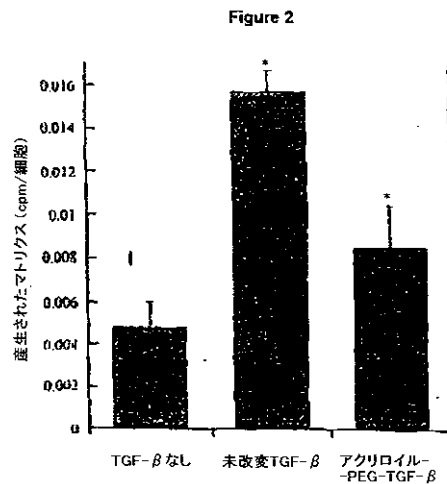
【 図 8 】 図 8 は、培地中に 0 および 50 μ g / m l アスコルビン酸が存在する組織培養ポリスチレン上で増殖させた心耳軟骨細胞および大動脈平滑筋細胞による、コントロールのパーセントとしての、細胞数のグラフである。コントロールは、培地中にアスコルビン酸がない。

10

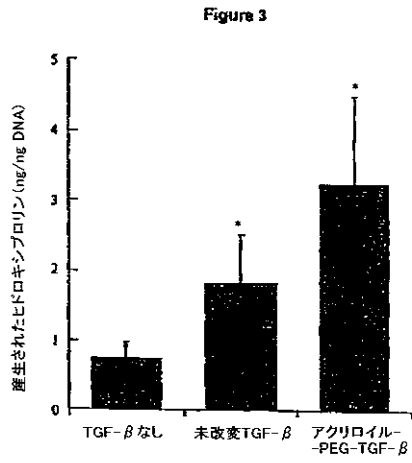
【 図 1 】



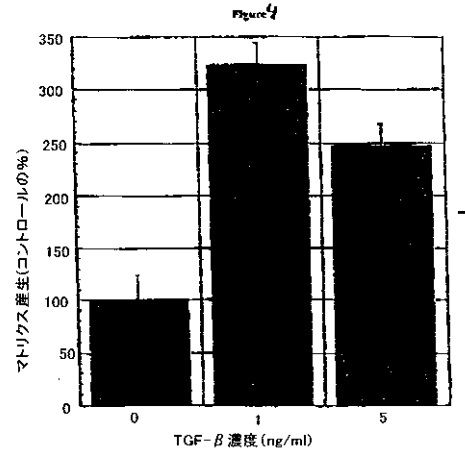
【 図 2 】



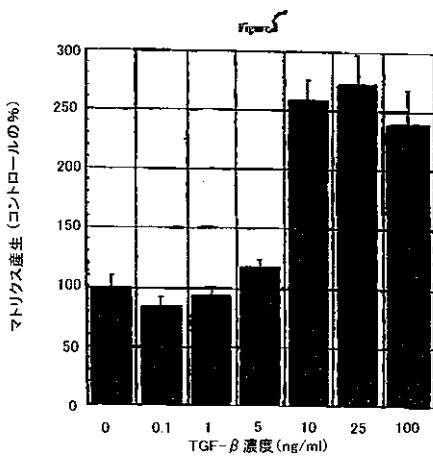
【 図 3 】



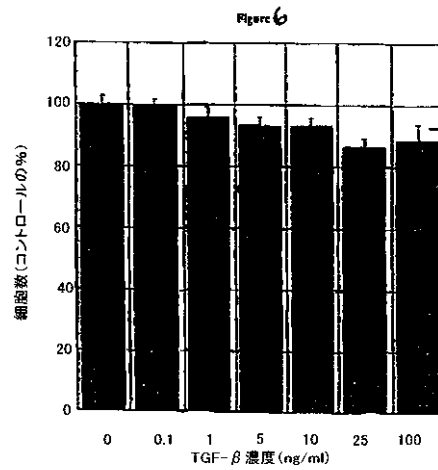
【 図 4 】



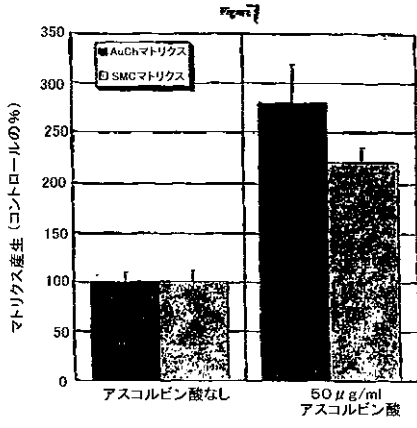
【 図 5 】



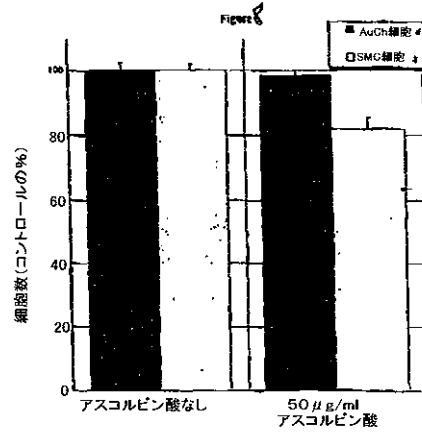
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【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
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/16557 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 5/00; A61L 27/52, A61P 17/02, 19/00
- (21) International Application Number: PCT/US01/26170
- (22) International Filing Date: 21 August 2001 (21.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Date: 21 August 2000 (21.08.2000) US 60/226,771
- (71) Applicant: RICE UNIVERSITY [US/US], 6100 Main, Houston, TX 77005 (US).
- (72) Inventors: WEST, Jennifer, L., 3523 Senova Drive, Pearland, TX 77384 (US); MANN, Brenda, K., 1522 Cookcrest Avenue, Upland, CA 91786 (US).
- (74) Agents: PABST, Patrea, L., et al.; Holland & Knight LLP, One Atlantic Center, Suite 3000, 1201 West Peachtree Street, Atlanta, GA 30309-3400 (US).
- (81) Designated States (national): AB, AG, AI, AM, AU, AT, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GG, GU, GW, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KR, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (82) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, 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, NG, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- 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 02/16557 A2

(54) Title: TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS PROMOTING MATRIX PROTEIN PRODUCTION

(57) Abstract: Matrix-enhancing molecules, such as TGF- β , are conjugated to or immobilized on scaffolds to increase ECM production by cells for tissue engineering, tissue regeneration and wound healing applications. The matrix enhancing molecule is conjugated to a tether, such as polyethylene glycol (PEG) monoacrylate, for attachment to a tissue engineering or cell growth scaffold. The matrix-enhancing molecule retains activity after attachment to the scaffold, and causes cells growing in or on the scaffold to increase extracellular matrix (ECM) production, without substantially increasing proliferation of the cells, even when the scaffold additionally contains cell adhesion ligands. The increased ECM produced by the cells aids in maintaining the integrity of the scaffold, particularly when the scaffold is degradable, either by hydrolysis or by enzymatic degradation.

WO 02/16557

PCT/US01/26170

**TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS PROMOTING
MATRIX PROTEIN PRODUCTION**

Background of the Invention

This is generally in the field of improved compositions for tissue engineering, specifically scaffolds incorporating defined densities of matrix-enhancing molecules for improving matrix protein production of cells, without inducing excessive proliferation of the cells.

This application claims priority to U.S.S.N. 60/226,771 filed August 21, 2000.

In fields where cell growth, maintenance, or production of exogenous factors are important, such as in the field of tissue engineering, cells are often grown on solid substrates or scaffolds which provide a suitable substrate for cell adhesion and growth. These scaffolds may be made of natural or synthetic materials.

Biomaterials developed for tissue engineering and wound healing applications need to support adequate cell adhesion while being replaced by new tissue synthesized by those cells. In order to maintain proper mechanical integrity of the tissue, the cells must generate sufficient extracellular matrix (ECM). Decreased ECM production by cells in tissue engineering scaffolds may lead to reduced structural integrity of the developing tissue.

In order to optimally promote adhesion to such materials, researchers have investigated attachment of cell adhesion ligands, such as the RGD peptide, to surfaces of biomaterials (Massia & Hubbell, *Anal. Biochem.* 187:292-301 (1990); Hern & Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.* 39:266-276 (1998); Dse, et al. *J. Biomed. Mater. Res.* 40:371-377 (1998); Tong & Shoichet, *J. Biomed. Mater. Res.* 42:85-95 (1998); Zhang, et al., *Biomaterials* 20:1213-1220 (1999)). However, an increase in cell adhesion can adversely affect ECM production (Mann, et al., *Biomaterials* 1999). In addition, there exists a substantial need to increase ECM production, even in unmodified scaffolds, as the proteins in the ECM largely determine the mechanical properties of the resultant tissue and are often needed to replace

WO 02/16557

PCT/US01/26170

the functions of a biodegradable scaffold material. The mechanical properties of the resultant tissue are particularly important in applications such as tissue engineered vascular grafts and orthopedic tissue engineering wherein failure can occur due to poor mechanical integrity.

5 Researchers have also attached growth factors such as TGF to a tissue engineering matrix via a polymeric tether such as a polyethylene glycol. See PCT/US96/02851 "Cell Growth Substrates with Tethered Cell Growth Effector Molecules" Massachusetts Institute of Technology. There are a number of references that TGF-beta can be bound to or dispersed within a
10 synthetic or natural polymeric carrier for controlled release of active growth factor. See, for example, "Collagen and heparin matrices for growth factor delivery", Schroeder-Tefft, et al. Journal of Controlled Release 49(2-3), 291-298 (1997); "*In vitro* characterization of transforming growth factor-beta-1-loaded composites of biodegradable polymer and mesenchymal cells. Nicoll, et al. Cells and Materials 5(3), 231-244 (1995). EP 00428541 "Collagen Wound healing Matrices and Process for their Production" to Collagen Corporation; U.S. Patent No. 6,013,853 "Continuous release polymeric implant carrier" to Athanasiou, et al. Additional reference relate to the use of
15 TGF-beta in tissue engineering scaffolds to enhance cell or tissue growth or proliferation, particularly of bone. See EP 616814 "Ceramic and Polymer-Based Compositions for Controlled Release of Biologically Active TGF-Beta to Bone Tissue, and Implants Using The Compositions" by Bristol-Myers Squibb Company.

20 However, none of these disclosures disclose how one can achieve enhanced production of extracellular matrix, while not increasing cellular proliferation.

25 It is therefore an object of the present invention to provide tissue engineering scaffolds which promote formation of ECM, to enhance the formation of tissue with good mechanical properties, on and within the tissue
30 engineering scaffold, i.e., with little or no increase in cellular proliferation.

WO 02/16557

PCT/US01/26170

Summary of the Invention

It has been found that matrix-enhancing molecules, such as transforming growth factor-beta (TGF- β), can be conjugated to or immobilized on scaffolds to increase ECM production by cells. The matrix-enhancing molecule is conjugated to a polymer, such as polyethylene glycol (PEG) monoacrylate, for attachment to a tissue engineering or cell growth scaffold, useful in not only tissue engineering but also for tissue regeneration and wound healing applications. The matrix-enhancing molecule retains activity after attachment to the scaffold, and causes cells growing in or on the scaffold to increase ECM production, even when the scaffold additionally contains cell adhesion ligands. This increase in ECM production is believed to be due to an increase in gene expression, not cell proliferation. The increased ECM produced by the cells aids in maintaining the integrity of the scaffold, particularly when the scaffold is degradable, either by hydrolysis or by enzymatic degradation.

The examples demonstrate that matrix production by vascular smooth muscle cells (SMCs) grown in a polymer scaffold, which was formed from PEG hydrogels, containing covalently bound adhesive ligands was increased in the presence of 4×10^{-5} nmol TGF- β /ml tethered to the scaffold over when no TGF- β was present. At the same time cell proliferation was not increased, which is advantageous since increased proliferation of SMCs could lead to narrowing of a vessel lumen. Tethering TGF- β to the polymer scaffold resulted in a significant increase in extracellular matrix production over the same amount of soluble TGF- β (see Example 1, Figure 3). This is most likely due to internalization of the soluble TGF- β by the cells or diffusion of the soluble TGF- β from the hydrogels, making the TGF- β unavailable to the cells.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a graph of matrix production per cell by SMCs growing on glass surfaces covalently coupled with RGDS (SEQ ID NO:1), VAPG (SEQ ID NO:2), KQAGDV (SEQ ID NO:3), or RGES (SEQ ID NO:4) with

WO 02/16557

PCT/US01/26170

and without TGF- β in the media. The "+" indicates that TGF- β was added to the media, while the "-" indicates that TGF- β was absent from the media.

Figure 2 is a graph of matrix production per cell by SMCs growing on

- 5 RGDS (SEQ ID NO:1)-modified glass surfaces with no TGF- β , soluble TGF- β or acryloyl-PEG- TGF- β at 4×10^{-5} μ mol/ml in the hydrogel. The control is with no TGF- β in the hydrogel.

Figure 3 is a graph of hydroxyproline production per ng of DNA by SMCs growing in RGDS (SEQ ID NO:1) -containing hydrogels with no
10 TGF- β , soluble TGF- β or acryloyl-PEG- TGF- β at 4×10^{-5} μ mol/ml in the hydrogel. The control is with no TGF- β in the hydrogel.

Figure 4 is a graph of matrix production by SMCs growing on RGDS (SEQ ID NO:1) -modified glass surfaces, as percent of control, as a function of TGF- β concentration (0, 1 and 5 ng/ml).

- 15 Figure 5 is a graph of matrix production, as percent of control, by articular chondrocytes growing on tissue culture polystyrene in the presence of varying amounts of TGF- β (0, 0.1, 1, 5, 10, 25 and 100 ng/ml) in the media. The control is with no TGF- β in the media.

- 20 Figure 6 is a graph of cell number, as percent of control, by articular chondrocytes growing on tissue culture polystyrene in the presence of varying amounts of TGF- β (0, 0.1, 1, 5, 10, 25 and 100 ng/ml) in the media. The control is with no TGF- β in the media.

- 25 Figure 7 is a graph of matrix production, as percent of control, by articular chondrocytes and aortic smooth muscle cells growing on tissue culture polystyrene in the presence of 0 and 50 μ g/ml ascorbic acid in the media. The control is with no ascorbic acid in the media.

- 30 Figure 8 is a graph of cell number, as percent of control, by articular chondrocytes and aortic smooth muscle cells growing on tissue culture polystyrene in the presence of 0 and 50 μ g/ml ascorbic acid in the media. The control is with no ascorbic acid in the media.

Detailed Description of the Invention

Tissue engineering is performed using a scaffold material that allows for attachment of cells. The scaffold material contains a matrix enhancing molecule. As described herein, the matrix-enhancing molecule should promote the production of extracellular matrix proteins, but should not promote cell proliferation.

Scaffold Materials

In the preferred embodiment, the scaffold is formed of synthetic or natural polymers, although other materials such as hydroxyapatite, silicone, and other inorganic materials can be used. The scaffold may be biodegradable or non-degradable.

There are a number of biocompatible polymers, both degradable and non-degradable. Representative synthetic non-biodegradable polymers include ethylene vinyl acetate and poly(meth)acrylate. Representative biodegradable polymers include polyhydroxyacids such as polylactic acid and polyglycolic acid, polyanhydrides, polyorthoesters, and copolymers thereof. Natural polymers include collagen, hyaluronic acid, and albumin.

A preferred material is a hydrogel. A particularly preferred hydrogel forming material is a polyethylene glycol-diacrylate polymer, which is photopolymerized. Other hydrogel materials include calcium alginate and certain other polymers that can form ionic hydrogels that are malleable and can be used to encapsulate cells.

Formation of Scaffolds

Scaffolds can be formed *in situ* or *in vitro*. In a preferred embodiment for formation of joint linings, the scaffold material is sprayed in a dilute solution onto the joint, then polymerized, so that the polymer forms a hydrogel coating bonded onto the surface of the joint tissues. Cells can be dispersed within the polymer, or seeded onto the polymeric matrix. Scaffolds may also be formed of fibers of polymer, woven or non-woven into meshes that can be used to support cell attachment and growth. These scaffolds can be formed by casting, weaving, salt leaching, spinning, or molding. In still another embodiment, scaffolds can be formed using molds

WO 02/16557

PCT/US01/26170

formed by micromachining and photolithographic techniques, where the cells can be seeded into the scaffold while in the molds or after removal of the scaffold. In a preferred embodiment, a liquid cell-polymer solution is placed in a mold and photopolymerized, converting the liquid to a hydrogel with the cells seeded within the hydrogel.

The scaffolds can be seeded at the time of or before implantation at a site where tissue is desired. Meshes should preferably be sufficiently open to allow free diffusion of nutrients and gases throughout the scaffold.

Matrix-enhancing Molecules

Matrix-enhancing molecules which promote increased production of ECM can be attached to the scaffold material to induce production of matrix proteins, such as glycoproteins, elastin, and collagen, without substantially increasing cell proliferation. These matrix-enhancing molecules include TGF- β , angiotensin II, insulin-like growth factors and ascorbic acid.

TGF- β is known to increase production of extracellular matrix proteins by vascular SMCs growing in culture (Amento, et al. *Arterioscler. Thromb.* 11:1223-1230 (1991); Lawrence, et al., *J. Biol. Chem.* 269:9603-9609 (1994); Plenz, et al., *Atherosclerosis* 144:25-32 (1999)). TGF- β , through production by SMCs naturally during vessel injury or by gene transfer, can also increase ECM production by SMCs *in vivo* (Majesky, et al., *J. Clin. Invest.* 88:904-910 (1991); Nabel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10759-10763 (1993)). Cultured fibroblasts have also been shown to increase collagen synthesis (Clark, et al., *J. Cell Sci.* 108:1251-1261 (1995); Eickelberg, et al., *Am. J. Physiol.* 276:L814-L824 (1999)) and proteoglycan synthesis (Heimer, et al., *J. Mol. Cell Cardiol.* 27:2191-2198 (1995)) in the presence of TGF- β . Further, topical delivery of TGF- β (Puolakkainen, et al., *J. Surg. Res.* 58:321-329 (1995)) and delivery to TGF- β through a collagen scaffold (Pandit, et al., *J. Invest. Surg.* 12:89-100 (1999)) have been shown to enhance wound healing.

All of the above-referenced studies have examined effects in the presence of soluble TGF- β . As demonstrated by the following examples, it has now been shown that tethered TGF- β can also be used to induce

WO 02/16557

PCT/US01/26170

formation of ECM by cells, including cells such as smooth muscle cells and chondrocytes.

Tethers

For the matrix-enhancing molecules to induce formation of ECM, it is necessary for the molecule to be tethered to the scaffold by a tether. These tethers have a molecular weight of preferably between about 200 and 10,000, most preferably between about 2000 and 6,000. The tether is preferably a linear polymer, such as polyethylene glycol. The matrix-enhancing molecule may be coupled to the tether, or for that matter, to the scaffold material, by any method known to those of skill in the art, preferably covalently coupled using a reagent such as *n*-hydroxysuccinimide, carbodiimide, diisocyanate, carbonyldiamidazole, or tosyl chloride.

Density of Matrix-enhancing Materials

The density of the matrix-enhancing materials is important in eliciting ECM production with little or no cellular proliferation. The amount of ECM production that is most desirable is that which results in formation of tissue with good mechanical properties, on and within the tissue engineering scaffold. The optimal density will depend on the type of cells to be attached to the scaffold. In the case of TGF- β , optimal concentrations to induce ECM production is in the range of between one and five ng TGF- β /ml for aortic smooth muscle cells and between 5 and 100 ng TGF- β /ml for auricular chondrocytes, which is equivalent to between 4×10^{-6} and 4×10^{-3} nmol/ml.

Source of Cells

Cells can be obtained directly from a donor, from a culture of cells from a donor, or from established cell culture lines. In the preferred embodiment, cells of the same species and, preferably having the same or a similar immunological profile, are obtained by biopsy, either from the patient or a close relative, which can then be grown in culture using standard conditions. If cells that are likely to elicit an immune reaction are used, such as human muscle cells from an immunologically distinct individual, then the

WO 02/16557

PCT/US01/26170

recipient can be immunosuppressed as needed, for example, using a schedule of steroids and other immunosuppressant drugs, such as cyclosporine.

In the preferred embodiments, cells are obtained directly from a donor, washed and implanted directly in combination with the polymeric material. The cells are cultured using techniques known to those skilled in the art of tissue culture. Cells obtained by biopsy are harvested and cultured, passaging as necessary to remove contaminating cells.

Preferred cells for formation of vascular tissue include smooth muscle cells, endothelial cells, and fibroblasts. Preferred cells for formation of connective tissue include chondrocytes, fibroblasts, and other types of cells that differentiate into bone or cartilage.

Methods of Using the Scaffolds

The scaffolds are used to produce new tissue, such as vascular tissue, cartilage, tendons, and ligaments. The scaffold is typically seeded with the cells; the cells are cultured; and then the scaffold implanted. Alternatively, as noted above, the scaffold is sprayed into or onto a site such as a joint lining, seeded with cells, and then the site is closed surgically. Liquid polymer-cell suspensions can also be injected into a site, such as within a joint, where the material may be polymerized.

Applications include the repair and/or replacement of organs or tissues, such as blood vessels, cartilage, joint linings, tendons, or ligaments, or the creation of tissue for use as "bulking agents", which are typically used to block openings or lumens, or to shift adjacent tissue, as in treatment of reflux.

The present invention will be further understood by reference to the following non-limiting examples.

Example 1: Comparison of effect of soluble and bound TGF- β in combination with PEG-diacrylate hydrogel.

It was determined whether TGF- β can counteract the decrease in ECM synthesis caused by immobilized cell adhesion ligands. SMCs were grown on both peptide-modified glass substrates and in hydrogels containing tethered cell adhesion ligands. Further, TGF- β was covalently tethered to a

WO 02/16557

PCT/US01/26170

polymer scaffold and shown that it retains its ability to increase ECM production.

Materials & Methods

Cell maintenance

5 Chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) unless otherwise stated. SMCs from the thoracic aorta of Wistar-Kyoto rats were isolated and characterized as previously described by Scott-Burden, et al., *Hypertension* 13:295-305 (1989). Human aortic smooth muscle cells (HASMCs) were obtained from Clonetics (San Diego, CA). Both SMCs and
10 HASMCs were maintained on Minimal Essential Medium Eagle supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; BioWhittaker, Walkersville, MD), 2 mM L-glutamine, 500 units penicillin and 100 mg/l streptomycin (MEM). Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ environment.

15 Surface modification

 Peptides used in this study were RGDS (SEQ ID NO:1), VAPG (SEQ ID NO:2), and KQAGDV (SEQ ID NO:3) (Research Genetics, Huntsville, AL). RGES (SEQ ID NO:4) was used as a non-adhesive control peptide. The peptides were acetylated and coupled to aminophase glass slides as
20 previously described by Mann, et al., *Biomaterials* 20:2281-2286 (1999). Briefly, aminophase slides were prepared by incubating glass slides with 3-aminopropyltriethoxysilane in dry acetone at 37 °C overnight. Acetylated peptides were then coupled to the slides using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) chemistry. Slides were
25 sterilized under UV light overnight prior to use.

Preparation of acryloyl-PEG-TGF-β

 TGF-β was conjugated to polyethylene glycol (PEG) by reacting TGF-β with acryloyl-PEG-N-hydroxysuccinimide (acryloyl-PEG-NHS, 3400 Da; Shearwater Polymers, Huntsville, AL) in 50 mM TRIS buffer (pH 8.5)
30 for 2 hr. The mixture was then lyophilized and stored frozen. Gel permeation chromatography equipped with UV/Vis (260 nm) and evaporative light scattering detectors was used to analyze the resulting

WO 02/16557

PCT/US01/26170

acryloyl-PEG-TGF- β and PEG standards (Polymer Laboratories, Amherst, MA).

Evaluation of matrix protein production on surfaces.

Matrix protein production was evaluated as previously described by Mann (1999). Suspensions of SMCs were prepared in MEM supplemented with 5 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid at a concentration of 40,000 cells/ml. For samples receiving TGF- β , 0.04 pmol/ml (1 ng/ml) unmodified TGF- β or 0.04 pmol/ml acryloyl-PEG-TGF- β was added to the media. Cell suspensions to be used for measurement of ECM protein production were also supplemented with 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -glycine (40 Ci/mmol). The glass slides were attached to FlexiPerm strips in QuadriPerm Cell Culture Vessels (Heraeus, Osterode am Harz, Germany) to create eight wells (1.11 x 0.79 x 0.79 cm) on each slide. Four of the wells on each slide were utilized to measure ECM production, while the remaining four wells were utilized for cell number determination and were cultured in the absence of ^3H -glycine. Cell number was determined after 2 days of culture by preparing single cell suspensions using trypsin and counting cells using a Coulter counter (Multisizer #0646, Coulter Electronics, Hialeah, FL).

To evaluate synthesis of ECM proteins, the cell growth media was supplemented with ^3H -glycine, as described above. Two days following ^3H -glycine addition, cells were removed non-enzymatically with 25 mM ammonium hydroxide, then rinsed with 70% ethanol and dried. This process leaves intact the ECM elaborated by cells during culture (Jones, et al., Proc. natl. Acad. Sci. USA 76:353-357 (1979)). Sequential enzyme digestion was used as previously described by Mann (1999) to determine the gross composition of the ECM proteins. Briefly, the ECM was digested first with trypsin, followed by elastase, and then collagenase. After the final enzymatic digestion, any material remaining on the substrate was dissolved by incubation with 1 N NaOH. Aliquots were taken from each step of the digest for scintillation counting.

WO 02/16557

PCT/US01/26170

Preparation of acryloyl-PEG-RGDS (SEQ ID NO:1)

RGDS (SEQ ID NO:1) was conjugated to acryloyl-PEG-NHS in the same manner as TGF- β .

Preparation of PEG-diacrylate

5 PEG-diacrylate was prepared by combining 0.1 mmol/ml dry PEG (6,000 Da; Fluka, Milwaukee, WI), 0.4 mmol/ml acryloyl chloride, and 0.2 mmol/ml triethylamine in anhydrous dichloromethane and stirring under argon overnight. The resulting PEG-diacrylate was then precipitated with ether, filtered, and dried in a vacuum oven.

10 Preparation of hydrogels

Hydrogels were prepared by combining 0.4 g/ml PEG-diacrylate, 1.4 μ mol/ml acryloyl-PEG-RGDS (SEQ ID NO:1), and 0.3 mmol/ml triethanolamine in 10 mM HEPES-buffered saline (pH 7.4, HBS). This aqueous polymer solution was sterilized by filtration (0.8 μ m prefilter and 15 0.2 μ m filter) and added to an equal volume of a suspension of SMCs at 2×10^6 cells/ml, such that the resulting polymer-cell solution contained 1×10^6 cells/ml. For hydrogels containing TGF- β , 0.04 pmol/ml (1 ng/ml) unmodified TGF- β or 0.04 pmol/ml acryloyl-PEG-TGF- β was added to the polymer-cell solution. Then, 40 μ l of 2,2-dimethyl-2-phenyl-acetophenone in *n*-vinylpyrrolidone (600 mg/ml) was added, and 0.25 ml of the solution 20 was placed in a disk-shaped mold (20 mm diameter, 2 mm thickness). This liquid polymer-cell solution was then exposed to UV light (365 nm, 10 mW/cm²) for 20 sec to convert the liquid polymer-cell solution to a hydrogel with homogeneously seeded cells. Hydrogels were incubated in MEM 25 containing 10% FBS for 7 days at 37 °C with 5% CO₂. Media was changed every 3 days.

DNA and hydroxyproline determination in hydrogels

After 7 days of culture, hydrogels were removed from the culture media, weighed, and digested with 1 ml 0.1 N NaOH overnight at 37 °C. 30 Digested hydrogels were then neutralized with 1 ml 0.1 N HCl. DNA content of the digested, neutralized hydrogels was determined using a fluorescent DNA binding dye, Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene,

WO 02/16557

PCT/US01/26170

OR). Fluorescence of the samples was determined using a fluorometer (VersaFluor, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with excitation filter at 360 nm and emission filter at 460 nm, and compared to fluorescence of calf thymus DNA standards. Hydroxyproline concentration was determined by oxidation with chloramine T (ICN Biomedicals, Aurora, OH) and development with p-dimethylaminobenzaldehyde (ICN Biomedicals) (Woessner, et al. Arch. Biochem. Biophys. 93:440-447 (1961)). Hydroxyproline is a marker for collagen production, and thus was used as an indication of matrix synthesis.

10 Mechanical testing of hydrogels

Hydrogels were prepared as described above, except that 2 ml of the liquid polymer-cell solution was placed in a 3 mm thick rectangular mold (42 mm x 14 mm). For this experiment, HASMCs were used at a final cell density of 3.5×10^5 cells/ml. Hydrogels contained either no TGF- β or 0.04 pmol/ml acryloyl-PEG-TGF- β .

15 Following photopolymerization, the hydrogels were placed in QuadriPenn Cell Culture Vessels with 10 ml media containing 10% FBS and incubated at 37 °C with 5% CO₂. Media was changed every 3 days. After 7 days of culture, the hydrogels were cut into 3 sections (14 mm x 14 mm), and mechanical testing was performed using a Vitrodync V-1000 Universal Tester (Chatillon, Greensboro, NC) at a strain rate of 100 μ m/s using a 150 g loading cell.

20 Statistical analysis

Data sets were compared using two-tailed, unpaired *t*-tests. P-Values less than 0.05 were considered to be significant.

Results

The goal of the current study was to determine whether TGF- β can enhance the rate of ECM synthesis by cells grown on or in biomaterials, particularly materials that have been modified with cell adhesion ligands. Figure 1 shows the matrix protein production on a per cell basis for cells grown with either no TGF- β or 0.04 pmol/ml (1 ng/ml) soluble TGF- β in the media. With no TGF- β in the media, more matrix was produced by cells

growing on the non-adhesive control, RGEs (SEQ ID NO:4), than on the adhesive peptides. When TGF- β was added to the media, matrix production increased on the adhesive surfaces over that produced when no TGF- β was added (224% increase on RGDS (SEQ ID NO:1) surfaces, 20% increase on VAPG (SEQ ID NO: 2) surfaces, 104% increase on KQAGDV (SEQ ID NO:3) surfaces). Matrix production on the RGDS (SEQ ID NO:1) and KQAGDV (SEQ ID NO:3) modified surfaces in the presence of TGF- β increased over that seen with the non-adhesive control.

Cells seeded onto RGDS (SEQ ID NO:1)-modified glass surfaces were also grown in the presence of 0.04 pmol/ml acryloyl-PEG-TGF- β to determine if TGF- β could be covalently bound to a polymer (covalently attached to a soluble polymer chain but not tethered to a three dimensional structure) and retain its ability to increase ECM production. Figure 2 shows the matrix production by cells grown with no TGF- β , soluble TGF- β , or acryloyl-PEG-TGF- β in the media. SMCs produced greater amounts of matrix in the presence of either soluble or polymer-conjugated TGF- β over that produced in the absence of TGF- β . However, less matrix was produced when polymer-conjugated TGF- β was used than when unmodified TGF- β was used.

SMCs were then homogeneously seeded into polyethylene glycol (PEG) hydrogels containing covalently tethered RGDS (SEQ ID NO:1). The hydrogels contained either no TGF- β , unmodified (soluble) TGF- β , or PEG-tethered TGF- β . In these photopolymerized hydrogels, the tethered peptides of TGF- β are covalently bound to the hydrogel structure via a highly flexible PEG chain. This gives the tethered moieties conformational freedom to interact with their receptors while causing them to be retained in the hydrogel material. After 7 days of culture, the hydrogels were digested and assayed for DNA and hydroxyproline. Since hydroxyproline is a marker for collagen, it is an indication of how much extracellular matrix has been produced.

The results for cells grown in the presence of 0.04 pmol/ml of TGF- β are presented in Figure 3. More hydroxyproline, and thus more collagen,

WO 02/16557

PCT/US01/26170

was produced by SMCs grown in the presence of either soluble or tethered TGF- β than when no TGF- β was present. Additionally, significantly more hydroxyproline was produced when TGF- β was tethered onto the hydrogels than when soluble TGF- β was used.

5 Additionally, the mechanical properties of hydrogels made with and without TGF- β were examined. Young's modulus, a measure of the stiffness of the scaffold, was significantly higher when TGF- β was tethered to the scaffolds than when no TGF- β was used (66.6 ± 3.7 kPa with tethered TGF- β versus 58.5 ± 1.8 kPa with no TGF- β , $p = 0.03$).

10 **Example 2: Dose Response of Aortic Smooth Muscle Cells to TGF- β .**

Aortic smooth muscle cells were grown on aminophase glass that had 0.5 nmol/cm^2 RGDS (SEQ ID NO:1) covalently coupled to the glass. TGF- β was added to the media at 0, 1, or 5 ng/ml ($0, 4 \times 10^{-5}, 2 \times 10^{-4}$ nmol/ml). ECM protein production by the cells over a 2-day time period was

15 determined by examining the amount of ^3H -glycine incorporated into the ECM elaborated by the cells.

As seen in Figure 4, ECM protein production per cell (% of control) was increased when TGF- β was added to the media at both 1 and 5 ng/ml. Further, cell numbers did not increase over the 2 days, despite changes in

20 matrix production per cell, indicating that the presence of TGF- β did not increase proliferation of the SMCs, as seen in the hydrogels.

Example 3: Dose Response of Auricular Chondrocytes to TGF- β .

Auricular chondrocytes were grown on tissue culture polystyrene with varying amounts of TGF- β added to the media: 0, 1, 5, 10, 25, or 100

25 ng/ml. ECM protein production by the cells over a 2-day time period was determined by examining the amount of ^3H -glycine incorporated into the ECM elaborated by the cells.

As seen in Figure 5, ECM protein production per cell was increased when TGF- β was added to the media at concentrations above 1 ng/ml, with

30 an optimal concentration of 25 ng/ml (1×10^{-3} nmol/ml). Further, cell numbers did not increase over the 2 days (see Figure 6), despite changes in

WO 02/16557

PCT/US01/26170

matrix production per cell, indicating that the presence of TGF- β did not increase proliferation of the chondrocytes.

Example 4. Increase in Matrix Production in the Presence of Ascorbic Acid.

- 5 Aortic smooth muscle cells and auricular chondrocytes were grown on tissue culture polystyrene with and without 50 μ g/ml ascorbic acid added to the media. ECM protein production by the cells over a 2-day time period was determined by examining the amount of 3 H-glycine incorporated into the ECM elaborated by the cells.
- 10 As seen in Figure 7, ECM protein production per cell was increased in the presence of ascorbic acid for both SMCs (light gray) and chondrocytes (dark gray). Further, cell numbers did not increase over the 2 days (Figure 8), despite changes in matrix production per cell, indicating that the presence of ascorbic acid did not increase proliferation of the smooth muscle cells
- 15 (light Grey) or the chondrocytes (dark Grey).

We claim:

1. A method for making a tissue engineering scaffold for inducing formation of extracellular matrix by cells bound to the scaffold comprising coupling matrix-enhancing molecules to the scaffold in an effective density to elicit production of extracellular matrix without increasing cellular proliferation, wherein when the matrix-enhancing molecules are TGF- β , the TGF- β is coupled to the matrix by a polymer tether having a molecular weight between 2000 and 6000 and is in a density between 1 and 100 ng TGF- β /ml or in a concentration of between about 4×10^{-6} and 4×10^{-3} nmol/ml.
2. The method of claim 1 further comprising attaching cells to the scaffold.
3. The method of claim 1 wherein the matrix-enhancing molecules are angiotensin II.
4. The method of claim 1 wherein the matrix-enhancing molecules are insulin-like growth factor.
5. The method of claim 1 wherein the matrix-enhancing molecules are ascorbic acid.
6. The method of claim 1 wherein the matrix-enhancing molecules are covalently coupled to tethers which are covalently coupled to the scaffold.
7. The method of claim 1 wherein the scaffold is a hydrogel.
8. The method of claim 7 wherein the hydrogel is formed of a polymer selected from the group consisting of alginate, collagen, hyaluronic acid, and polyethylene glycol polymers.
9. The method of claim 7 wherein the matrix-enhancing molecules are TGF- β coupled to the hydrogel in a concentration of between about 4×10^{-6} and 4×10^{-3} nmol/ml.
10. A tissue engineering scaffold for inducing formation of extracellular matrix by cells bound to the scaffold comprising coupled to the scaffold matrix-enhancing molecules in an effective density to elicit production of extracellular matrix without increasing cellular proliferation, wherein when the matrix-enhancing molecule is TGF- β , the TGF- β is coupled to the matrix

by a polymer tether having a molecular weight between 2000 and 6000 and is in a density between 1 and 100 ng TGF- β /ml or in a concentration of between about 4×10^{-6} and 4×10^{-3} nmol/ml.

11. The scaffold of claim 10 having cells attached thereto.
12. The scaffold of claim 11 wherein the cells are selected from the group consisting of smooth muscle cells, endothelial cells, fibroblasts, and chondrocytes.
13. The scaffold of claim 10 wherein the matrix-enhancing molecule is TGF- β coupled to the scaffold in a concentration of between about 4×10^{-6} and 4×10^{-3} nmol/ml.
14. The scaffold of claim 10 wherein the matrix-enhancing molecule is coupled to a tether covalently bound to the matrix, wherein the tether has a molecular weight of between about 200 and 10,000.
15. The scaffold of claim 14 wherein the tether has a molecular weight of between about 2000 and 6,000.
16. A method for repair or replacement of tissue comprising applying or implanting at a site in need of repair a tissue engineering scaffold comprising coupled to the scaffold matrix-enhancing molecules in an effective density to elicit production of extracellular matrix without increasing cellular proliferation, wherein when the matrix-enhancing molecule is TGF- β , the TGF- β is coupled to the matrix by a polymer tether having a molecular weight between 2000 and 6000 and is in a density between 1 and 100 ng TGF- β /ml or in a concentration of between about 4×10^{-6} and 4×10^{-3} nmol/ml.
17. The method of claim 16 wherein the matrix-enhancing molecule is TGF- β .
18. The method of claim 16 wherein the matrix-enhancing molecule is angiotensin II.
19. The method of claim 16 wherein the matrix-enhancing molecule is an insulin-like growth factor.
20. The method of claim 16 wherein the matrix-enhancing molecule is ascorbic acid.

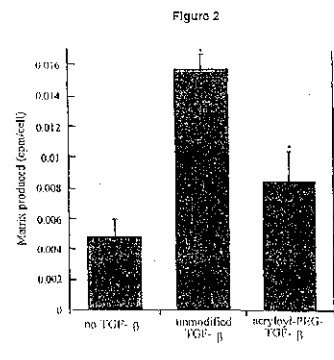
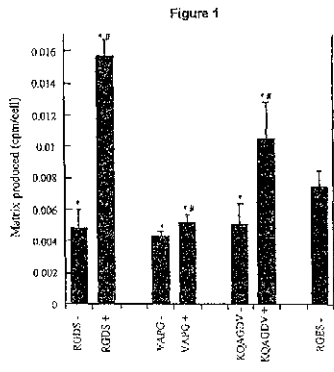
WO 02/16557

PCT/US01/26170

21. The method of claim 16 wherein the matrix-enhancing molecule is covalently coupled to a tether which is covalently coupled to the scaffold.
22. The method of claim 16 wherein the scaffold is a hydrogel.
23. The method of claim 22 wherein the hydrogel is formed of a polymer selected from the group consisting of alginate, collagen, hyaluronic acid, and polyethylene glycol polymers.

WO 02/16557

PCT/US01/26170



WO 02/16557

PCT/US01/26170

Figure 3

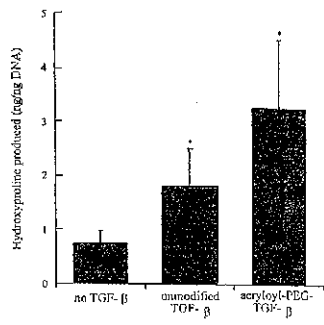
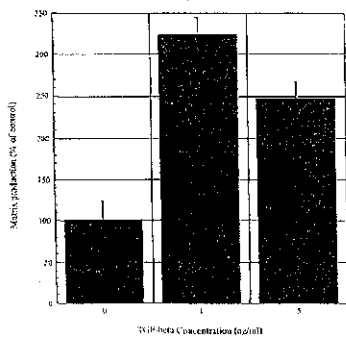
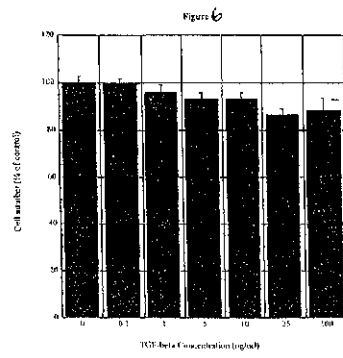
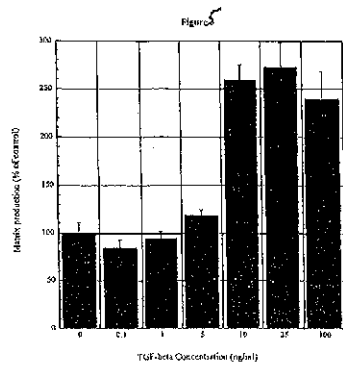


Figure 4



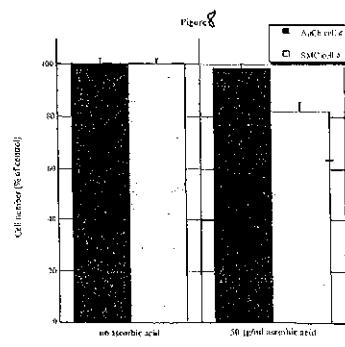
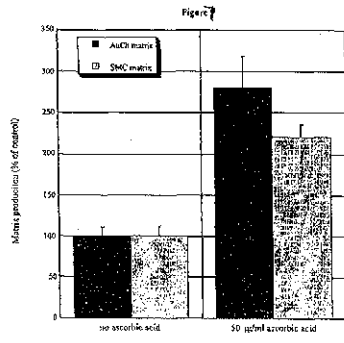
WO 02/16557

PCT/US01/26170



WO 02/16557

PCT/US01/26170



WO 02/16557

PCT/US01/26170

SEQUENCE LISTING

<110> Rice University
<120> Tissue Engineering Scaffolds Promoting Matrix Protein Production
<130> RICE 103 PCT
<160> 4
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> cell adhesion ligand
<400> 1
Arg Gly Asp Ser
1

<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> cell adhesion ligand
<400> 2
Val Ala Pro Gly
1

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220>
<223> cell adhesion ligand

WO 02/16557

PCT/US01/26170

<400> 3

Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> cell adhesion ligand

<400> 4

Arg Gly Glu Ser

1

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/016557 A3

- (61) International Patent Classification: C12N 5/00. (81) Designated States (national): AN, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CC, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NG, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US01/26170
- (22) International Filing Date: 21 August 2001 (21.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Date: 21 August 2000 (21.08.2000); US 60/226,771
- (71) Applicant: RICE UNIVERSITY [US]; 6.00 Main, Houston, TX 77005 (US).
- (72) Inventors: WEST, Jennifer, L.; 3523 Seneca Drive, Pentacle, TX 77561 (US); MANN, Brenda, K.; 1822 Goodwin Avenue, Upland, CA 91786 (US).
- (74) Agents: PARST, Patrea, L., et al.; Holland & Knight LLP, One Atlanta Center, Suite 2000, 1201 West Peachtree Street, Atlanta, GA 30309-3400 (US).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, 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, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (85) Date of publication of the international search report: 3 January 2003
- Published: with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidelines Concerning Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/016557 A3

(54) Title: TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS PROMOTING MATRIX PROTEIN PRODUCTION

(57) Abstract: Matrix-enhancing molecules, such as TGF- β , are conjugated to or immobilized on scaffolds to increase ECM production by cells for tissue engineering, tissue regeneration and wound healing applications. The matrix-enhancing molecule is conjugated to a tether, such as poly(ethylene glycol) (PEG) monoacrylate, for attachment to a tissue engineering or cell growth scaffold. The matrix-enhancing molecule retains activity after attachment to the scaffold, and causes cells growing in or on the scaffold to increase extracellular matrix (ECM) production, without substantially increasing proliferation of the cells, even when the scaffold additionally contains cell adhesion ligands. The increased ECM produced by the cells aids in maintaining the integrity of the scaffold, particularly when the scaffold is degradable, either by hydrolysis or by enzymatic degradation.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/26170
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/00 A61L27/52 A61P17/02 A61P19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. RELEDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the RELEDs searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) COMPENDEX, EPD-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MANN BRENDA K ET AL: "Modification of surfaces with cell adhesion peptides alters extracellular matrix deposition" BIOMATER;BIOMATERIALS 1999 ELSEVIER SCIENCE LTD, EXETER, ENGL, vol. 20, no. 23, 1999, pages 2281-2286, XP001086553	1-3, 10-12, 16,17,21
Y	cited in the application the whole document	1,2,4, 6-17,19, 21-23
	---	-/--
<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		*1* Inter document published after the international filing date of priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*2* 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
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)		*3* 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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*4* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 July 2002		15/07/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5010 Patentstrasse 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2043, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3015		Authorized officer NoE, V

Form PCT/ISA/210 (prior dated) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/26170
G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHROEDER-TEFFT J A ET AL: "Collagen and heparin matrices for growth factor delivery" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 48, no. 1, 22 September 1997 (1997-09-22), pages 29-33, XP004125838 ISSN: 0168-3659 the whole document	1,7-10, 13,16, 17,22,23
Y	WO 96 27657 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 12 September 1996 (1996-09-12) cited in the application abstract page 8, line 8 - line 12 page 9, line 20 - line 21 page 10, line 25 - line 26 page 11, line 11 - line 12 page 4, line 11 - line 12	1,2,4, 6-17,19, 21-23
A	HOERSTRUP S P ET AL: "TISSUE ENGINEERING OF A BIOPROSTHETIC HEART VALVE: STIMULATION OF EXTRACELLULAR MATRIX ASSESSED BY HYDROXYPROLINE ASSAY" ASAIO JOURNAL, J.B.LIPPINCOTT CO., HAGERSTOWN, MD, US, vol. 45, no. 5, September 1999 (1999-09), pages 397-402, XP00080997 ISSN: 1058-2916 the whole document	
P,X	MANN B K ET AL: "Tethered-TGF-beta increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 22, no. 5, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 439-444, XP004227889 ISSN: 0142-9612 the whole document	1-23

Form PCT/IB42/E (form 2) (edition of second sheet) (July 1997)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/26170

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. <input checked="" type="checkbox"/>	<p>Claims Nos. _____ because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 16-23 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</p>
2. <input type="checkbox"/>	<p>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:</p>
3. <input type="checkbox"/>	<p>Claims Nos. _____ because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>
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. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	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. _____
<p>Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/26170

Parent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9627657	A	WO 9627657 A1	12-09-1996
		US 6045818 A	04-04-2000
		US 5906828 A	25-05-1999

Form PCT/ISA/210 (continued on reverse) (July 1999)

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,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,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

Fターム(参考) 4B033 NA15 NB12 NB15 NB34 NB44 NB48 NB58 NB63 NC02 ND02
ND12
4C081 AB00 BA12 BA16 CA18 CD04 CD08 CD12 CD34 CE11 DA12
EA01