

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6324395号
(P6324395)

(45) 発行日 平成30年5月16日(2018.5.16)

(24) 登録日 平成30年4月20日(2018.4.20)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 11/04	(2006.01) C 12 N 11/04
C 12 N 1/04	(2006.01) C 12 N 1/04
A 61 L 27/00	(2006.01) A 61 L 27/00
A 61 P 19/02	(2006.01) A 61 P 19/02
A 61 K 35/545	(2015.01) A 61 K 35/545

請求項の数 14 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-539923 (P2015-539923)
(86) (22) 出願日	平成25年10月29日(2013.10.29)
(65) 公表番号	特表2015-534809 (P2015-534809A)
(43) 公表日	平成27年12月7日(2015.12.7)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/067349
(87) 國際公開番号	W02014/070796
(87) 國際公開日	平成26年5月8日(2014.5.8)
審査請求日	平成28年9月14日(2016.9.14)
(31) 優先権主張番号	61/719,902
(32) 優先日	平成24年10月29日(2012.10.29)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	514005652 スクリップス ヘルス アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州 サンディエゴ キャンパス・ポイント・コート 4275
(74) 代理人	100082072 弁理士 清原 義博
(72) 発明者	ディリーマ, ダリル, ディー. アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州 サンディエゴ キャンパス・ポイント・コート 4275
(72) 発明者	オリー, ツアイウェイ アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州 サンディエゴ キャンパス・ポイント・コート 4275

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】軟骨細胞を移植する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

3 成分マトリックスであって：

- a) 0 . 5 m g / m l 乃至 5 m g / m l の濃度の、分離され且つ精製された、非変性の I I 型コラーゲン；
 b) 1 m g / m l 乃至 3 m g / m l の濃度のヒアルロナン；及び
 c) 0 . 2 5 m g / m l 乃至 3 m g / m l の濃度の硫酸コンドロイチン
 とを含む、3 成分マトリックス。

【請求項 2】

基本培地を含む、請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス。

10

【請求項 3】

I I 型コラーゲンはウシ由来の I I 型コラーゲンである、ことを特徴とする請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス。

【請求項 4】

I I 型コラーゲンの濃度は 1 m g / m l 乃至 5 m g / m l である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス。

【請求項 5】

I I 型コラーゲンの濃度は 3 m g / m l である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス。

【請求項 6】

20

H 9 由来の軟骨前駆細胞を含む、ことを特徴とする請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス。

【請求項 7】

ヒアルロナンの濃度は 1 m g / m l である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス。

【請求項 8】

硫酸コンドロイチンの濃度は 1 m g / m l である、ことを特徴とする請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス。

【請求項 9】

軟骨細胞、軟骨前駆細胞、間葉系幹細胞、人工多能性幹細胞、軟骨細胞由来の人工多能性幹細胞、H 9 由来の軟骨前駆細胞、S o x - 9 により形質導入した軟骨細胞、骨芽細胞、骨前駆細胞、又はそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス。 10

【請求項 10】

軟骨細胞、軟骨前駆細胞、及びそれらの組み合わせから選択される細胞を含む、請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス。

【請求項 11】

人工多能性幹細胞を含む、請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス。

【請求項 12】

個体の内因性の軟骨増殖の誘発に使用するための、請求項 1 乃至 1 1 のいずれか 1 項に記載の 3 成分マトリックス。 20

【請求項 13】

個体の骨又は軟骨の欠損症の処置に使用するための 3 成分マトリックスであって、組成物が骨又は軟骨の欠損症の部位に投与される、請求項 1 乃至 1 1 のいずれか 1 項に記載の 3 成分マトリックス。 20

【請求項 14】

軟骨修復インプラントであって：

a) 請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス；

b) 軟骨細胞、軟骨前駆細胞、間葉系幹細胞、人工多能性幹細胞、軟骨細胞由来の人工多能性幹細胞、H 9 由来の軟骨前駆細胞、S o x - 9 により形質導入した軟骨細胞、骨芽細胞、骨前駆細胞、又はそれらの任意の組み合わせから選択される細胞の集まり；及び 30

c) ポリグリコール酸 (P G A) 、ポリ乳酸、アルギン酸塩、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸 - ポリグリコール酸のコポリマー、ヒト真皮、シートなどの膜、スポンジなどの多孔体、メリヤス地、布地、不織布、綿、多孔質材料等のメッシュ、及びそれらの組み合わせから選択される生体基質

とを含む、軟骨修復インプラント。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本出願は、2012年10月29日出願の米国特許出願第 6 1 / 7 1 9 , 9 0 2 号の利益を主張し、その全体は引用により本明細書に組み込まれる。 40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 2 】

本明細書には、幾つかの実施形態において、a) 分離され且つ精製された、非変性の I I 型コラーゲンと、b) ヒアルロナンと、c) 硫酸コンドロイチンとを含む、3 成分マトリックス (t r i - c o m p o n e n t m a t r i x) が開示される。幾つかの実施形態において、3 成分マトリックスは更に水を含む。幾つかの実施形態において、3 成分マトリックスは基本培地を更に含む。幾つかの実施形態において、基本培地は M e d i u m 1 9 9 である。幾つかの実施形態において、I I 型コラーゲンはウシ由来の I I 型コラ 50

ーゲンである。幾つかの実施形態において、I I型コラーゲンの濃度は約0.5mg/ml乃至約5mg/mlである。幾つかの実施形態において、I I型コラーゲンの濃度は約3mg/mlである。幾つかの実施形態において、ヒアルロナンの濃度は約0.25mg/ml乃至約3mg/mlである。幾つかの実施形態において、ヒアルロナンの濃度は約1mg/mlである。幾つかの実施形態において、硫酸コンドロイチンの濃度は約0.25mg/ml乃至約3mg/mlである。幾つかの実施形態において、硫酸コンドロイチンの濃度は約1mg/mlである。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、軟骨細胞、軟骨前駆細胞(chondroprogenitor cell)、間葉系幹細胞、人工多能性幹細胞(iPS細胞)、軟骨細胞由来のiPS細胞、H9由来の軟骨前駆細胞、Sox-9により形質導入した軟骨細胞、骨芽細胞、骨前駆細胞(osteoprogenitors)、又はそれらの任意の組み合わせを更に含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に軟骨細胞を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に軟骨前駆細胞を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更にiPS細胞を含む。

【0003】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨設計(cartilage engineering)のための移植組成物を生成するためのプロセスが開示され、該プロセスは、a)酸を含む溶液中で、分離され且つ精製された非変性のI I型コラーゲンを溶解する工程であって、I I型コラーゲンの終末濃度は約0.5mg/ml乃至約5mg/mlである、工程と、b)酸を中和する工程と、c)約0.25mg/ml乃至約3mg/mlのヒアルロナンを加える工程と、d)3成分マトリックスが生成される、約0.25mg/ml乃至約3mg/mlの硫酸コンドロイチンを加える工程とを含む。幾つかの実施形態において、酸は酢酸である。幾つかの実施形態において、酢酸は、約0.01Mの濃度である。幾つかの実施形態において、酢酸は、NaHCO₃/HEPESで中和される。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、Medium 199を含む。幾つかの実施形態において、ヒアルロナンは、約1mg/mlの濃度で加えられる。幾つかの実施形態において、硫酸コンドロイチンは、約1mg/mlの濃度で加えられる。幾つかの実施形態において、I I型コラーゲンの終末濃度は約3mg/mlである。幾つかの実施形態において、前記プロセスは、軟骨細胞、軟骨前駆細胞、間葉系幹細胞、iPS細胞、軟骨細胞由来のiPS細胞、H9由来の軟骨前駆細胞、Sox-9により形質導入した軟骨細胞、又はそれらの任意の組み合わせを、3成分マトリックスに加える工程を更に含む。幾つかの実施形態において、前記プロセスは、3成分マトリックスに軟骨細胞を加える工程を更に含む。幾つかの実施形態において、前記プロセスは、3成分マトリックスに軟骨前駆細胞を加える工程を更に含む。幾つかの実施形態において、前記プロセスは、3成分マトリックスにiPS細胞を加える工程を更に含む。

【0004】

本明細書には、幾つかの実施形態において、必要とする被験体の内因性の軟骨増殖を誘発する方法が開示され、該方法は、本明細書に開示されるような3成分マトリックスを被験体に移植する工程を含む。

【0005】

本明細書には、幾つかの実施形態において、必要とする被験体の骨又は軟骨の欠損症を処置する方法が開示され、該方法は、骨又は軟骨の欠損症の部位にて、i)本明細書に開示されるような3成分マトリックスと、ii)細胞の集まりとを含む、移植組成物を投与する工程を含む。幾つかの実施形態において、細胞の集まりは、軟骨細胞、軟骨前駆細胞、iPS細胞、間葉系幹細胞、骨芽細胞、骨前駆細胞、又はそれらの組み合わせを含む。幾つかの実施形態において、新たな組織が生成される。幾つかの実施形態において、新たな組織はI I型コラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、新たな組織は、通常の関節軟骨の表面領域、中間領域、及び深い領域の特徴を含む。幾つかの実施形態において、新たな組織の表面領域はラブリシンを含む。幾つかの実施形態において、新たな組織は、奇形腫、腫瘍

10

20

30

40

50

細胞、変形の証拠、異常な構造的特徴、又は他の不適切な細胞型を含まない。幾つかの実施形態において、細胞の集まりは軟骨細胞を含む。幾つかの実施形態において、細胞の集まりは軟骨前駆細胞を含む。幾つかの実施形態において、細胞の集まりは i P S 細胞を含む。幾つかの実施形態において、i P S 細胞は、軟骨細胞由来である。幾つかの実施形態において、軟骨前駆細胞は、H 9 由来の軟骨前駆細胞である。幾つかの実施形態において、軟骨細胞は、S o x - 9 により形質導入した軟骨細胞である。

【0006】

本明細書には、幾つかの実施形態において、必要とする被験体の軟骨関連の障害を処置する方法が開示され、該方法は、軟骨の損傷又は欠損症の部位に、請求項 1 に記載の 3 成分マトリックス、及び軟骨細胞、軟骨前駆細胞、間葉系幹細胞、i P S 細胞、軟骨細胞由来の i P S 細胞、H 9 由来の軟骨前駆細胞、S o x - 9 により形質導入した軟骨細胞、骨芽細胞、骨前駆細胞、又はそれらの任意の組み合わせの混合物を投与する工程を含む。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は、関節軟骨外傷、半月板損傷、軟骨形成 (chondrogenesis) 障害、関節炎、軟骨疾患、軟骨肉腫、軟骨軟化症、多発性軟骨炎、再発性多発性軟骨炎、大腿骨頭すべり症、離断性骨軟骨炎、軟骨異形成症、肋軟骨炎、骨軟骨腫、脊椎症、骨軟骨症 (osteochondroses) 、ティーツェ症候群、フランソワの皮膚軟骨角膜ジストロフィー (dermochondrocorneal dystrophy) 、骨端異形成症、手根関連性 (carpotarsal) 骨軟骨腫症、軟骨無形成症 (achondropasia) 、軟骨石灰化症、遺伝性軟骨種症、軟骨腫、軟骨無発生症、内軟骨種 (echondromata) 、軟骨低形成症 (hypochondropasia) 、又はKeutel 症候群である。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は関節炎である。幾つかの実施形態において、関節炎は骨関節炎である。幾つかの実施形態において、骨関節炎は、被験体の膝、指、手首、殿部、脊椎、肩、肘、つま先、足首、又は頸部に生じる。

【0007】

本明細書には、幾つかの実施形態において、a) 本明細書に開示されるような 3 成分マトリックスと、b) 軟骨細胞、軟骨前駆細胞、間葉系幹細胞、i P S 細胞、軟骨細胞由来の i P S 細胞、H 9 由来の軟骨前駆細胞、S o x - 9 により形質導入した軟骨細胞、骨芽細胞、骨前駆細胞、又はそれらの任意の組み合わせから選択される細胞とを含む、軟骨修復インプラントが開示される。幾つかの実施形態において、軟骨修復インプラントは、ポリグリコール酸 (P G A) 、ポリ乳酸、アルギン酸塩、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸 - ポリグリコール酸のコポリマー、ヒト真皮、シートなどの膜、スポンジなどの多孔体、メリヤス地、布地、不織布、綿、多孔質材料等のメッシュ、又はそれらの組み合わせから選択される生体基質を更に含む。

【図面の簡単な説明】

【0008】

本発明の新規な特徴は、特に、添付の特許請求の範囲内に明記される。本発明の特徴及び利点のより良い理解は、本発明の原理が利用される、具体例を明記する後述の詳細な説明、及び以下の添付図面を参照することによって得られる。

【図 1】図 1 は、H 9 由来の軟骨前駆体 (chondroprogenitors) 、及び、成人のヒト軟骨細胞 (CHON - 1 及び CHON - 2) 由来の軟骨前駆体による組織修復を示す。アルシアンブルーとサフラニン O の染色は、H 9 由来の軟骨前駆体と、成人のヒト軟骨細胞由来の軟骨前駆体との間で比較可能であった。空の骨軟骨欠損、又はマトリゲルのみで満たされた骨軟骨欠損において、弱い組織修復が見られた。

【図 2】図 2 は、H 9 由来の軟骨前駆体 (H 9 - D M S C) 、成人のヒト軟骨細胞 (軟骨細胞) 、多能性細胞由来の軟骨前駆体 (I P S C) 、及び成人のヒト間葉系幹細胞 (成人の M S C) による組織修復を示す。細胞は、外科移植前に I I 型コラーゲン、硫酸コンドロイチン、及びヒアルロン酸の 3 成分マトリックスに埋め込まれた。

【図 3】図 3 は、外科移植前に I I 型コラーゲン、硫酸コンドロイチン、及びヒアルロン酸の 3 成分マトリックスに埋め込まれた、H 9 由来の軟骨前駆体 (H 9 由来の M S C) 、

10

20

30

40

50

成人のヒト軟骨細胞、多能性細胞由来の軟骨前駆体（軟骨細胞由来のIPS C）、及び成人のヒト間葉系幹細胞（成人のヒトM S C）によって生じさせられた、組織の機械的剛性を示す。示される単位はニュートン / mm である。

【図4】図4は、H 9由来の軟骨前駆体、及び成人のヒト軟骨細胞由来の軟骨前駆体による組織修復を示す。細胞は、外科移植前にアルギン酸塩に埋め込まれた。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本明細書には、幾つかの実施形態において、a) 分離され且つ精製された、非変性のI I型コラーゲンと、b) ヒアルロナンと、c) 硫酸コンドロイチンとを含む、3成分マトリックスが開示される。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に水を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは基本培地を更に含む。幾つかの実施形態において、基本培地はMedium 199である。幾つかの実施形態において、I I型コラーゲンはウシ由来のI I型コラーゲンである。幾つかの実施形態において、I I型コラーゲンの濃度は約0.5 mg / ml乃至約5 mg / mlである。幾つかの実施形態において、ヒアルロナンの濃度は約0.25 mg / ml乃至約3 mg / mlである。幾つかの実施形態において、ヒアルロナンの濃度は約1 mg / mlである。幾つかの実施形態において、硫酸コンドロイチンの濃度は約0.25 mg / ml乃至約3 mg / mlである。幾つかの実施形態において、硫酸コンドロイチンの濃度は約1 mg / mlである。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、軟骨細胞、軟骨前駆細胞、間葉系幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、軟骨細胞由来のiPS細胞、H 9由来の軟骨前駆細胞、S o x - 9により形質導入した軟骨細胞、骨芽細胞、骨前駆細胞、又はそれらの任意の組み合わせを更に含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に軟骨細胞を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に軟骨前駆細胞を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更にiPS細胞を含む。

【0010】

本明細書には、幾つかの実施形態において、軟骨設計のための移植組成物を生成するためのプロセスが開示され、該プロセスは、a) 酸を含む溶液中で、分離され且つ精製された非変性のI I型コラーゲンを溶解する工程であって、I I型コラーゲンの終末濃度は約0.5 mg / ml乃至約5 mg / mlである、工程と、b) 酸を中和する工程と、c) 約0.25 mg / ml乃至約3 mg / mlのヒアルロナンを加える工程と、d) 3成分マトリックスが生成される、約0.25 mg / ml乃至約3 mg / mlの硫酸コンドロイチンを加える工程とを含む。幾つかの実施形態において、酸は酢酸である。幾つかの実施形態において、酢酸は、約0.01Mの濃度である。幾つかの実施形態において、酢酸は、NaHCO₃ / HEPESで中和される。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、Medium 199を含む。幾つかの実施形態において、ヒアルロナンは、約1 mg / mlの濃度で加えられる。幾つかの実施形態において、硫酸コンドロイチンは、約1 mg / mlの濃度で加えられる。幾つかの実施形態において、I I型コラーゲンの終末濃度は約3 mg / mlである。幾つかの実施形態において、前記プロセスは、軟骨細胞、軟骨前駆細胞、間葉系幹細胞、iPS細胞、軟骨細胞由来のiPS細胞、H 9由来の軟骨前駆細胞、S o x - 9により形質導入した軟骨細胞、又はそれらの任意の組み合わせを、3成分マトリックスに加える工程を更に含む。幾つかの実施形態において、前記プロセスは、3成分マトリックスに軟骨細胞を加える工程を更に含む。幾つかの実施形態において、前記プロセスは、3成分マトリックスに軟骨前駆細胞を加える工程を更に含む。幾つかの実施形態において、前記プロセスは、3成分マトリックスにiPS細胞を加える工程を更に含む。

【0011】

本明細書には、幾つかの実施形態において、必要とする被験体の内因性の軟骨増殖を誘発する方法が開示され、該方法は、本明細書に開示されるような3成分マトリックスを被験体に移植する工程を含む。

10

20

30

40

50

【0012】

本明細書には、幾つかの実施形態において、必要とする被験体の骨又は軟骨の欠損症を処置する方法が開示され、該方法は、骨又は軟骨の欠損症の部位にて、i) 本明細書に開示されるような3成分マトリックスと、ii) 細胞の集まりとを含む、移植組成物を投与する工程を含む。幾つかの実施形態において、細胞の集まりは、軟骨細胞、軟骨前駆細胞、iPS細胞、間葉系幹細胞、骨芽細胞、骨前駆細胞、又はそれらの組み合わせを含む。幾つかの実施形態において、新たな組織が生成される。幾つかの実施形態において、新たな組織は、軟骨又は骨の表面を修復する。幾つかの実施形態において、新たな組織は、通常の関節軟骨の表面領域、中間領域、及び深い領域の特徴を含む。幾つかの実施形態において、新たな組織の表面領域はラブリシンを含む。幾つかの実施形態において、新たな組織は、奇形腫、腫瘍細胞、変形の証拠、異常な構造的特徴、又は他の不適切な細胞型を含まない。幾つかの実施形態において、細胞の集まりは軟骨細胞を含む。幾つかの実施形態において、細胞の集まりは軟骨前駆細胞を含む。幾つかの実施形態において、細胞の集まりはiPS細胞を含む。幾つかの実施形態において、iPS細胞は、軟骨細胞由来である。幾つかの実施形態において、軟骨前駆細胞は、H9由来の軟骨前駆細胞である。幾つかの実施形態において、軟骨細胞は、Soxにより形質導入した軟骨細胞である。

【0013】

本明細書には、幾つかの実施形態において、必要とする被験体の軟骨関連の障害を処置する方法が開示され、該方法は、軟骨の損傷又は欠損症の部位に、請求項1に記載の3成分マトリックス、及び軟骨細胞、軟骨前駆細胞、間葉系幹細胞、iPS細胞、軟骨細胞由来のiPS細胞、H9由来の軟骨前駆細胞、Sox-9により形質導入した軟骨細胞、骨芽細胞、骨前駆細胞、又はそれらの任意の組み合わせの混合物を投与する工程を含む。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は、関節軟骨外傷、半月板損傷、軟骨形成障害、関節炎、軟骨疾患、軟骨肉腫、軟骨軟化症、多発性軟骨炎、再発性多発性軟骨炎、大腿骨頭すべり症、離断性骨軟骨炎、軟骨異形成症、肋軟骨炎、骨軟骨腫、脊椎症、骨軟骨症、ティーツェ症候群、フランソワの皮膚軟骨角膜ジストロフィー、骨端異形成症、手根関連性骨軟骨腫症、軟骨無形成症、軟骨石灰化症、遺伝性軟骨種症、軟骨腫、軟骨無発生症、内軟骨種、軟骨低形成症、又はKeutel症候群である。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は関節炎である。幾つかの実施形態において、関節炎は骨関節炎である。幾つかの実施形態において、骨関節炎は、被験体の膝、指、手首、殿部、脊椎、肩、肘、つま先、足首、又は頸部に生じる。

【0014】

本明細書には、幾つかの実施形態において、a) 本明細書に開示されるような3成分マトリックスと、b) 軟骨細胞、軟骨前駆細胞、間葉系幹細胞、iPS細胞、軟骨細胞由来のiPS細胞、H9由来の軟骨前駆細胞、Sox-9により形質導入した軟骨細胞、骨芽細胞、骨前駆細胞、又はそれらの任意の組み合わせから選択される細胞とを含む、軟骨修復インプラントが開示される。幾つかの実施形態において、軟骨修復インプラントは、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸、アルギン酸塩、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸-ポリグリコール酸のコポリマー、ヒト真皮、シートなどの膜、スポンジなどの多孔体、メリヤス地、布地、不織布、綿、多孔質材料等のメッシュ、又はそれらの組み合わせから選択される生体基質を更に含む。

【0015】

<軟骨>

関節軟骨は、可動関節(例えば膝、殿部、肩、等)における、対向した骨の表面を覆う硝子軟骨の一種である。関節軟骨は、骨の間にほぼ摩擦がない(near-frictionless)関節をもたらし、その一方で、関節が受ける圧縮力及び剪断力を吸収し且つ伝達するように機能する。更に、関節軟骨に関連した組織が1つの神経系(aneurinal)であるため、これらの負荷の吸収と伝達の機能が健康な関節において痛みを伴うことなく生じる。

【0016】

纖維軟骨は、滑車 (p u l l y) の周囲を包み込む特定の腱における包含物として、可動関節、恥骨結合関節、椎間板、関節円板において見出され、及び、骨の中への韌帯と腱の挿入部位にて見出される。I型及びII型コラーゲンの纖維の混合物で作られると、纖維軟骨は傷つけられ、その結果患部関節に疼痛を引き起こし得る。

【0017】

用語「軟骨」は関節軟骨と纖維軟骨を含むことが、この適用の目的のために理解される。

【0018】

<3成分インプラント・マトリックス> 10
本明細書には、医療用移植と細胞培養に役立つ新規な物質と、それを作り且つ使用する方法が開示される。本発明の特徴及び利点と同様に、付加的な実施形態も、本明細書の記載から明白になる。

【0019】

本明細書には、幾つかの実施形態において、3成分マトリックスが開示される。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、コラーゲン；ヒアルロナン；及び硫酸コンドロイチンを含む。幾つかの実施形態において、コラーゲンはII型コラーゲンである。幾つかの実施形態において、コラーゲンは非変性である。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に水を含む。

【0020】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に、軟骨細胞又は軟骨前駆細胞を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に間葉系幹細胞を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に、人工多能性幹 (i P S) 細胞を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に、軟骨細胞由来のi P S細胞を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に、H9由来の軟骨前駆細胞を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に、S o x - 9により形質導入した軟骨細胞を含む。

【0021】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックスはゲルである。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは成型固体である。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは液体である。 30

【0022】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは基本培地を更に含む。幾つかの実施形態において、基本培地は、Medium 199、D MEM (例えば、ウシ胎仔血清により補足されたD MEM)、RPMI-1640、HamのF-12、又はそれらの任意の組み合わせである。幾つかの実施形態において、基本培地は軟骨細胞基本培地である。幾つかの実施形態において、基本培地は次の成分を含む：グリシン；L-アラニン；L-塩酸アルギニン；L-アスパラギン酸；L-塩酸シテイン-H₂O；L-시스チン2H C1；L-グルタミン酸；L-グルタミン；L-塩酸ヒスチジン-H₂O；L-ヒドロキシプロリン；L-イソロイシン；L-ロイシン；L-塩酸リジン；L-メチオニン；L-フェニルアラニン；L-プロリン；L-セリン；L-スレオニン；L-トリプトファン；L-チロシン・ジナトリウム塩脱水物 (Tyrosine disodium salt dehydrate)；L-バリン；アルファ-リン酸トコフェロール；アスコルビン酸；ビオチン；塩化コリン；D-パントテン酸カルシウム；葉酸；メナジオン (ビタミンK3)；ナイアシンアミド；ニコチン酸 (ナイアシン)；パラアミノ安息香酸；塩酸ピリドキサール；塩酸ピリドキシン；リボフラビン；塩酸チアミン；ビタミンA (酢酸塩)；ビタミンD2 (カルシフェロール)；i-イノシトール；塩化カルシウム (CaCl₂) (無水)；硝酸第2鉄 (Ferric nitrate) (Fe(NO₃)₂·9H₂O)；硫酸マグネシウム (MgSO₄) (無水)；塩化カリウム (KCl)；重炭酸ナトリウム (NaHCO₃)；塩化ナトリウム (NaCl)；一塩基性リン酸ナトリウム (NaH 40

$\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$); 2-デオキシ-D-リボース; 硫酸アデニン; アデノシン 5'-ホスファート; アデノシン 5'-トリホスファート; コレステロール; D-グルコース(デキストロース); グルタチオン(還元した(reduced)); 塩酸グアニン; ヒポキサンチン・ナトリウム; フェノールレッド; リボース; 酢酸ナトリウム; チミン; *Twine 80* (登録商標); ウラシル; 及びキサンチン-Na。幾つかの実施形態において、基本培地はMedium 199である。

【0023】

幾つかの実施形態において、基本培地は、血小板由来の増殖因子(PDGF)(例えばPDGF-BB、PDGF-AB、及びPDGF-AA)、脂質(例えばステアリン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸、パルミトレイൻ酸、アラキドン酸、リノレン酸、コレステロール、酢酸アルファ-トコフェロール)、骨形態形成タンパク質(BMP)(例えばBMP-4又はBMP-6)、TGF-(例えばTGF-1、TGF-2、TGF-3)、インスリン様増殖因子(IGF)、ヒドロコルチゾン、フィブロネクチン、bFGF、アルブミン、インスリン、FBS、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

【0024】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、II型コラーゲン(例えば、分離され且つ精製された非変性のII型コラーゲン)を含む。幾つかの実施形態において、II型コラーゲンは非変性である。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に、VI型、IX型、X型、XI型、及び/又はXII型のコラーゲンを含む。

【0025】

幾つかの実施形態において、II型コラーゲンは任意の適切なソースに由来する。幾つかの実施形態において、II型コラーゲンは、哺乳動物以外の脊椎動物(例えばサメ)に由来する。幾つかの実施形態において、II型コラーゲンは哺乳動物に由来する。幾つかの実施形態において、II型コラーゲンはヒトに由来する。幾つかの実施形態において、II型コラーゲンは非ヒト哺乳動物に由来する。幾つかの実施形態において、II型コラーゲンは、ウシ由来、ウマ由来、又はブタ由来である。幾つかの実施形態において、II型コラーゲンはウシ由来のII型コラーゲンである。

【0026】

幾つかの実施形態において、II型コラーゲンの濃度は約0.1mg/ml乃至約50mg/mlである。幾つかの実施形態において、II型コラーゲンの濃度は約0.5mg/ml乃至約2.5mg/mlである。幾つかの実施形態において、II型コラーゲンの濃度は約1mg/ml乃至約10mg/mlである。幾つかの実施形態において、II型コラーゲンの濃度は約1mg/ml乃至約5mg/mlである。幾つかの実施形態において、II型コラーゲンの濃度は約3mg/mlである。

【0027】

ヒアルロナン(ヒアルロン酸又はHAとも呼ばれた)は、陰イオン性の非硫酸化グリコサミノグリカンである。それは、D-グルクロン酸とD-N-アセチルグルコサミンからなり、交互の(alternating)-1,4及び-1,3のグリコシド結合を介して結合される、二糖類上で構成される。ヒアルロナンの大きさは異なる。ヒアルロナンは、25,000の二糖類の繰り返しと共に見出された。それらは、インビボにて大きさが5,000乃至20,000,000Daまで変動する。ヒト関節液における平均分子量は、300万-400万Daであり、ヒト臍帯から精製したヒアルロナンは3,140,000Daである。

【0028】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、高分子量のヒアルロナン(即ち、約1000Daより大きい)を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、低分子量のヒアルロナン(即ち、約1000Da未満)を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約500Da乃至約20,000,000Daの大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約500

乃至約 5,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 80,000 乃至約 800,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 1000 乃至約 15,000,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 2000 乃至約 10,000,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 3000 乃至約 7,500,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 4000 乃至約 5,000,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 5000 乃至約 2,500,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 6000 乃至約 1,000,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 7000 乃至約 9000,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 8000 乃至約 800,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 9000 乃至約 7000,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 10,000 乃至約 600,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 15,000 乃至約 5000,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 20,000 乃至約 400,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 25,000 乃至約 3000,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 30,000 乃至約 2000,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 35,000 乃至約 2000,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 40,000 乃至約 100,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、約 50,000 乃至約 100,000 Da の大きさを持つヒアルロナンを含む。

【0029】

幾つかの実施形態において、ヒアルロナンの濃度は約 0.1 mg / ml 乃至約 25 mg / ml である。幾つかの実施形態において、ヒアルロナンの濃度は約 0.25 mg / ml 乃至約 10 mg / ml である。幾つかの実施形態において、ヒアルロナンの濃度は約 0.25 mg / ml 乃至約 5 mg / ml である。幾つかの実施形態において、ヒアルロナンの濃度は約 0.25 mg / ml 乃至約 3 mg / ml である。幾つかの実施形態において、ヒアルロン酸の濃度は約 1 mg / ml である。

【0030】

硫酸コンドロイチンは、一連の交互の糖：N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) 及びD-グルクロン酸 (GlcA) からなる硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) である。特定の例において、コンドロイチン鎖には、100以上の個々の糖があり、その各々は、変更可能な位置と量で硫酸化され得る。硫酸コンドロイチンは軟骨の構造成分である。硫酸コンドロイチンの堅くパックされ (packed) 且つ高度に負荷した硫酸エステル基は、圧縮に対する軟骨の抵抗性の大半を提供する静電気反発を生じさせる。硫酸化の部位はコンドロイチン鎖の中で異なる。コンドロイチン硫酸 A は、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 糖の炭素 4 上で硫酸化される。コンドロイチン硫酸 C は、GalNAc 糖の炭素 6 上で硫酸化される。硫酸コンドロイチン D は、グルクロン酸の炭素 2 と GalNAc 糖の炭素 6 上で硫酸化される。硫酸コンドロイチン E は、GalNAc 糖の炭素 4 及び 6 の上で硫酸化される。

【0031】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、任意の適切な硫酸コンドロイチンを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、硫酸コンドロイチン A、硫

10

20

30

40

50

酸コンドロイチンC、硫酸コンドロイチンD、及び／又は硫酸コンドロイチンEを含む。

【0032】

幾つかの実施形態において、硫酸コンドロイチンの濃度は約0.1mg/ml乃至約2.5mg/mlである。幾つかの実施形態において、硫酸コンドロイチンの濃度は約0.25mg/ml乃至約1.0mg/mlである。幾つかの実施形態において、硫酸コンドロイチンの濃度は約0.25mg/ml乃至約5mg/mlである。幾つかの実施形態において、硫酸コンドロイチンの濃度は約0.25mg/ml乃至約3mg/mlである。

【0033】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、天然の軟骨細胞の内部成長のための培地である。幾つかの実施形態において、マトリックスは更に、インビボでの移植前又は後に、軟骨細胞を含む。幾つかの実施形態において、マトリックスは、（例えば注射により）被験体への移植の直前に軟骨細胞を含浸される。

【0034】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは追加の添加剤を更に含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスに含まれる追加の添加剤は、例えば、chondronectin、ラミニン、フィブロネクチン、アルギン酸カルシウム、anchorin II、バイグリカン(biglycan)、デコリン、バーシカン、フィブロモジュリン、ルミカン、骨、軟骨細胞成長促進ホルモン、及び軟骨誘導因子(CIP)、インスリン様増殖因子(IGF)、IGF-1、形質転換増殖因子[ベータ](TGF)、TGF-1などの増殖因子、天然又は組み換え型のヒトBMP-2、BMP-3(オステオゲニンosteogenin)、BMP-4、BMP-7、BMP-8、bFGF、CDMP、又は他の骨格マトリックス分子などの骨形成タンパク質-1(OP-1)及び骨形成因子(BMP)、同様に、血管内皮成長因子(EGF/VEGF)、副甲状腺ホルモン関連タンパク(PTHrP)、及び血小板由来の増殖因子(PDGF)などのシグナル伝達ペプチドを含む。幾つかの実施形態において、上記に列挙した追加の添加剤の何れかをコード化する、又は上記に列挙した添加剤のインビボ産生を誘発又は促進することができる、核酸配列(例えば、哺乳動物の発現ベクター)が、3成分マトリックス材料に組み込まれる。

【0035】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは活性薬剤を更に含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、抗菌剤(例えば、タウロリジン、タウルルタム、又はテトラサイクリン及びゲンタマイシンなどの抗生物質)を更に含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更に、抗炎症剤を含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは更にNSAIDを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、セレコキシブ、オキサプロジン、サルサレート、ジフルニサル、インドメタシン、メロキシカム、ケトロラク、ジクロフェナク、ナプロキセン、スリンダク、テノキシカム、エトドラク、ナブメトン、ピロキシカム、カルプロフェン、フルビプロフェン、イブプロフェン、アスピリン、パラセタモール、又はそれらの任意の組み合わせを更に含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、ステロイド(例えばコルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、ソルメドロール、トリアムシノロン、kenalog、セレストン、及びデボメドロール)を更に含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、疾患を修飾する抗リウマチ性薬物(DMARD)を更に含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、アバタセプト、アダリムマブ、アザチオプリン、クロロキン、水酸化クロロキン、シクロスボリンA、D-ペニシラミン、エタネルセプト、ゴリムマブ、インフリキシマブ、レフルノミド、メトレキサート、ミノサイクリン、リツキシマブ、スルファサラジン、又はそれらの任意の組み合わせを更に含む。

【0036】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは、血管新生を予防又は減少する薬剤を更に含む。血管新生を予防又は減少する薬剤の例は、限定されないが、チロシンキナ-

10

20

30

40

50

ゼ阻害剤(チロシンキナーゼ受容体F1t-1(VEGFR1)及びF1k-1/KDR(VEGFR2)の阻害剤、表皮由来の阻害剤など)、線維芽細胞由来又は血小板由来の増殖因子、MMP(マトリックスメタロプロテアーゼ)阻害剤、インテグリン遮断薬、インターフェロン-、インターロイキン-12、ペントサンポリサルフェート、シクロオキシゲナーゼ阻害剤(アスピリンとイブプロフェンのような非ステロイド性の抗炎症剤(NSAID)、同様に、セレコキシブとロフェコキシブのような選択的なシクロオキシゲナーゼ-2阻害剤を含む)、ステロイド抗炎症剤(コルチコステロイド、ミネラルコルチコイド、デキサメタゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレド(methylpred)、ベタメタゾンなど)、カルボキシアミドトリアゾール、コンブレタスタチンA-4、スクワラミン、6-O-クロロアセチル-カルボニル)-フマギロール、サリドマイド、血液造成阻害剤、トロポニン-1、アンジオテンシンII受容体拮抗薬、及びVEGFに対する抗体を含む。

【0037】

幾つかの実施形態において、本明細書に開示される3成分マトリックスは、アルギナートマトリックスほど炎症反応をあまり誘発しない。

【0038】

<細胞を培養する方法>

本発明はまた、本明細書で開示されるような3成分マトリックス中で細胞を培養する工程を含む、細胞を培養する方法を提供し、該3成分マトリックスは、a)分離され且つ精製された、非変性のII型コラーゲンと、b)ヒアルロナンと、c)硫酸コンドロイチンとを含む。幾つかの実施形態において、3成分マトリックス内の細胞は、組織培養容器中で培養される。幾つかの実施形態において、組織培養容器は組織培養グレードのプラスチックである。幾つかの実施形態において、プラスチックはポリスチレンである。幾つかの実施形態において、組織培養容器はガラスである。

【0039】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは細胞培養培地を更に含む。幾つかの実施形態において、細胞培養培地は基本培地である。幾つかの実施形態において、基本培地は、Medium 199、D MEM(例えば、ウシ胎仔血清により補足されたD MEM)、RPMI-1640、HamのF-12、又はそれらの任意の組み合わせである。幾つかの実施形態において、基本培地は軟骨細胞基本培地である。幾つかの実施形態において、基本培地は次の成分を含む：グリシン；L-アラニン；L-塩酸アルギニン；L-アスパラギン酸；L-塩酸システィン-H₂O；L-시스チン2HCl；L-グルタミン酸；L-グルタミン；L-塩酸ヒスチジン-H₂O；L-ヒドロキシプロリン；L-イソロイシン；L-ロイシン；L-塩酸リジン；L-メチオニン；L-フェニルアラニン；L-プロリン；L-セリン；L-スレオニン；L-トリプトファン；L-チロシン・ジナトリウム塩脱水物；L-バリン；アルファ-リン酸トコフェロール；アスコルビン酸；ビオチン；塩化コリン；D-パントテン酸カルシウム；葉酸；メナジオン(ビタミンK3)；ナイアシンアミド；ニコチン酸(ナイアシン)；パラアミノ安息香酸；塩酸ピリドキサール；塩酸ピリドキシン；リボフラビン；塩酸チアミン；ビタミンA(酢酸塩)；ビタミンD2(カルシフェロール)；i-イノシトール；塩化カルシウム(CaCl₂)(無水)；硝酸第2鉄(Fe(NO₃)₂·9H₂O)；硫酸マグネシウム(MgSO₄)(無水)；塩化カリウム(KCl)；重炭酸ナトリウム(NaHCO₃)；塩化ナトリウム(NaCl)；一塩基性リン酸ナトリウム(NaH₂PO₄·H₂O)；2-デオキシ-D-リボース；硫酸アデニン；アデノシン5'-ホスファート；アデノシン5'-トリホスファート；コレステロール；D-グルコース(デキストロース)；グルタチオン(還元した)；塩酸グアニン；ヒポキサンチン・ナトリウム；フェノールレッド；リボース；酢酸ナトリウム；チミン；Tween 80(登録商標)；ウラシル；及びキサンチン-Na。幾つかの実施形態において、基本培地はMedium 199である。

【0040】

幾つかの実施形態において、基本培地は、血小板由来の増殖因子(PDGF)(例えば

P D G F - B B 、 P D G F - A B 、 及び P D G F - A A) 、 脂質 (例えはステアリン酸、 ミリスチン酸、 オレイン酸、 リノール酸、 パルミチン酸、 パルミトレイイン酸、 アラキドン酸、 リノレン酸、 コレステロール、 酢酸アルファ - トコフェロール) 、 骨形態形成タンパク質 (B M P) (例えは B M P - 4 又は B M P - 6) 、 T G F - 1 (例えは T G F - 1 、 T G F - 2 、 T G F - 3) 、 インスリン様増殖因子 (I G F) 、 ヒドロコルチゾン、 フィプロネクチン、 b F G F 、 アルブミン、 インスリン、 F B S 、 又はそれらの任意の組み合わせを含む。

【 0 0 4 1 】

< 使用方法 >

本明細書には、 特定の実施形態において、 必要とする被験体の内因性の軟骨増殖を誘発する方法が開示され、 該方法は、 本明細書に開示されるような 3 成分マトリックスを被験体に移植する工程を含み、 該 3 成分マトリックスは、 a) 分離され且つ精製された、 非変性の I I 型コラーゲンと、 b) ヒアルロナンと、 c) 硫酸コンドロイチンとを含む。幾つかの実施形態において、 3 成分マトリックスは更に、 軟骨細胞及び / 又は軟骨前駆細胞を含む。幾つかの実施形態において、 前記方法は、 針で軟骨 (c a r t i l a g e o n o u s) 領域に 3 成分を注入する工程を含む。幾つかの実施形態において、 前記方法は、 関節 (例えは滑膜性関節) に 3 成分マトリックスを注入する工程を含む。幾つかの実施形態において、 被験体には、 軟骨の欠損症 (例えは軟骨の変質又は欠如) がある。幾つかの実施形態において、 被験体には軟骨関連疾患がある。幾つかの実施形態において、 被験体には、 变形性関節症、 関節リウマチ、 肋軟骨炎、 再発性多発性軟骨炎、 又はその任意の組み合わせがある。幾つかの実施形態において、 被験体には骨関節炎がある。幾つかの実施形態において、 被験体には関節リウマチがある。幾つかの実施形態において、 被験体には、 身体外傷によって軟骨に引き起こされる損傷がある。

10

【 0 0 4 2 】

幾つかの実施形態において、 本明細書に開示される 3 成分マトリックスが、 軟骨組織を再生成する方法に使用される。幾つかの実施形態において、 3 成分マトリックスは、 軟骨細胞、 軟骨前駆細胞、 間葉系幹細胞、 i P S 細胞、 軟骨細胞由来の i P S 細胞、 H 9 由来の軟骨前駆細胞、 S o x - 9 により形質導入した軟骨細胞、 骨芽細胞、 骨前駆細胞、 又はそれらの任意の組み合わせを更に含む。幾つかの実施形態において、 3 成分マトリックスは、 骨又は軟骨の欠損症の領域に直接入れられる。幾つかの実施形態において、 3 成分マトリックスは、 追加の支持生体材料と共に、 骨又は軟骨の欠損症の領域に入れられる。幾つかの実施形態において、 新たな軟骨組織が形成される。幾つかの実施形態において、 新たな軟骨組織は、 骨又は軟骨の欠損症の組織を統合する。幾つかの実施形態において、 新たな軟骨組織は、 軟骨又は骨の表面を修復する。幾つかの実施形態において、 新たな軟骨組織は I I 型コラーゲンを含む。幾つかの実施形態において、 新たな軟骨組織は、 通常の関節軟骨の表面領域、 中間領域、 及び深い領域の特徴を含む。幾つかの実施形態において、 新たな軟骨組織の表面領域はラブリシンを含む。幾つかの実施形態において、 新たな軟骨組織は、 奇形腫、 肿瘍細胞、 变形の証拠、 異常な構造的特徴、 又は他の不適切な細胞型を含まない。

20

【 0 0 4 3 】

本明細書には、 幾つかの実施形態において、 軟骨関連の障害を処置する方法が開示され、 該方法は、 本明細書に記載されるような 3 成分マトリックスの、 必要とする被験体の軟骨損傷又は欠損症の部位への投与を含む。幾つかの実施形態において、 3 成分マトリックスは、 軟骨細胞、 軟骨前駆細胞、 間葉系幹細胞、 i P S 細胞、 軟骨細胞由来の i P S 細胞、 H 9 由来の軟骨前駆細胞、 S o x - 9 により形質導入した軟骨細胞、 骨芽細胞、 骨前駆細胞、 又はそれらの任意の組み合わせを更に含む。幾つかの実施形態において、 軟骨関連の障害は、 関節軟骨外傷、 半月板損傷、 軟骨形成障害、 関節炎、 軟骨疾患、 軟骨肉腫、 軟骨軟化症、 多発性軟骨炎、 再発性多発性軟骨炎、 大腿骨頭すべり症、 離断性骨軟骨炎、 軟骨異形成症、 肋軟骨炎、 骨軟骨腫、 脊椎症、 骨軟骨症、 ティーツェ症候群、 フランソワの皮膚軟骨角膜ジストロフィー、 骨端異形成症、 手根関連性骨軟骨腫症、 軟骨無形成症、 軟

30

40

50

骨石灰化症、遺伝性軟骨種症、軟骨腫、軟骨無発生症、内軟骨種、軟骨低形成症、又はK e u t e l 症候群である。幾つかの実施形態において、軟骨関連の障害は関節炎である。幾つかの実施形態において、関節炎は骨関節炎である。幾つかの実施形態において、骨関節炎は、被験体の膝、指、手首、殿部、脊椎、肩、肘、つま先、足首、又は頸部に生じる。

【0044】

本明細書には、幾つかの実施形態において、本明細書に開示されるような3成分マトリックスを含み、更に、軟骨細胞、軟骨前駆細胞、間葉系幹細胞、iPS細胞、軟骨細胞由来のiPS細胞、H9由来の軟骨前駆細胞、S0x-9により形質導入した軟骨細胞、骨芽細胞、骨前駆細胞、又はそれらの任意の組み合わせを含む、軟骨修復インプラントが開示される。幾つかの実施形態において、軟骨修復インプラントは追加の生体材料基質を更に含む。追加の生体材料の例は、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸、アルギン酸塩(例えばカルシウム塩)、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸-ポリグリコール酸のコポリマー、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、ヒト真皮、又はそれらの組み合わせを含む。幾つかの実施形態において、プロテオグリカンとグリコサミノグリカンは硫酸化される。幾つかの実施形態において、追加の生体材料基質は、シートなどの膜、スポンジなどの多孔体、ニット、布地、不織布、綿などのメッシュなどである。幾つかの実施形態において、追加の生体材料は多孔質材料である。

【0045】

幾つかの実施形態において、軟骨修復インプラントは、軟骨組織を形成し、軟骨性骨化を誘発する。幾つかの実施形態において、骨化はまた、骨形態形成蛋白(BMP)などの、骨形成を促進する増殖因子によって促進される。

【0046】

記載された軟骨治療材料の移植前に、処置される領域を準備することが望ましい。この目的のために、欠損症は、インプラントが血管新生等の危険性を減少させるために(特にその付着に関して)効果的になる(take)と確認するために準備されねばならない。一般的に、欠損症は、(領域から全ての欠陥のある軟骨を排除するために)前もって処置され、その後、清浄される。次に、様々な移植技術が、移植した材料(懸濁液、マトリックス、インビトロで再構築された軟骨)に応じて実施され得る。

【0047】

一般的に、記載した軟骨治療材料の移植は、手術中に、生物分解性の縫合糸を介して、又は生物接着剤の適用によりインプラントを取り付けるなどの、当業者に既知の様々な外科技術を適用することにより、実行される。生物接着剤の例は、著しくは、フィブリン及び/又はトロンビンで作られた生物学的グルー、又は他の生体適合性材料を含む。より具体的に、再吸収可能な生体適合性フィルムは、生物学的又は生体適合性のグルーによって、処置される領域に付けられる。好ましい変異体において、フィルムは、軟骨の欠損症部位に置かれ、それ故、構築されるポケットは軟骨治療材料で満たされる。

【0048】

幾つかの実施形態において、内因性の軟骨増殖を誘発する方法は、インプラントが投与される領域の関節鏡検査の(arthroscopic)洗浄法及び/又は創面切除を更に含む。幾つかの実施形態において、損傷を受けた軟骨の一部又は全てが除去され、3成分マトリックス(例えば、軟骨細胞又は軟骨前駆細胞を更に含む3成分マトリックス)が、その領域に移植される(例えば、注入される)。

【0049】

幾つかの実施形態において、内因性の軟骨増殖を誘発する方法は、骨髓刺激技術(例えば微小骨折手術)を更に含む。幾つかの実施形態において、(a)損傷を受けた軟骨の一部又はすべてが必要な領域から除去され、下にある骨が部分的又は完全に露出し、(b)微小骨折が(例えば突錐の使用により)軟骨下骨組織に作られ、及び(c)3成分マトリックス(例えば、軟骨細胞又は軟骨前駆細胞を更に含む3成分マトリックス)が、領域に移植される(例えば、注入される)。

10

20

30

40

50

【0050】

幾つかの実施形態において、3成分マトリックス（例えば、軟骨細胞又は軟骨前駆細胞を更に含む3成分マトリックス）は、任意の適切な針（例えば、16ゲージの針、17ゲージの針、18ゲージの針、19ゲージの針、20ゲージの針、21ゲージの針、22ゲージの針、23ゲージの針、24ゲージの針、25ゲージの針、26ゲージの針、27ゲージの針、28ゲージの針、29ゲージの針、又は30ゲージの針）で注入される。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは22ゲージの針で注入される。幾つかの実施形態において、3成分マトリックスは25ゲージの針で注入される。

【実施例】

【0051】

<実施例1：軟骨細胞を含む3成分マトリックスの产生>

3成分マトリックスを製造する典型的な方法は以下のとおりである。

【0052】

第1に、ウシのII型コラーゲンを、0.01M酢酸に溶解した。ウシのII型コラーゲン(10mg)を、2.4mlの10mM酢酸O/Nに溶解した。300μlの10倍のMedium 199と、300μlのNaHCO₃/HEPESを、コラーゲン/酢酸の混合物に加えて中和した。

【0053】

330μlのヒアルロン酸(10mg/mlにてHA)(1mg/mlの終末濃度)を、混合物に加えた。

【0054】

60μlの硫酸コンドロイチン(50mg/ml、ウシ)を1mg/mlの終末濃度まで混合物に加え、3成分マトリックスを形成した。

【0055】

その後、軟骨細胞を3成分マトリックスに加えた。

【0056】

<実施例2：アルギン酸塩に埋め込まれた軟骨前駆体による骨軟骨欠損の処置>

外科手術用ドリルを使用して、3mmの骨軟骨欠損を、ウサギの大腿部の滑車の溝と顆に作成した。2つの異なる処置を使用して欠損症を修復した。対照として、1つの欠損症部位には何も移植しなかった。第1の処置において、成人のヒト軟骨細胞由来の軟骨前駆細胞ペレットをアルギン酸塩に埋め込み、その後、欠損症部位へ外科移植した。第2の処置において、H9由来の軟骨前駆細胞ペレットをアルギン酸塩に埋め込み、その後、欠損症部位へ外科移植した。

【0057】

塩化カルシウムに浸した外科手術用ガーゼを使用して、アルギン酸塩を欠損症部位に架橋結合した。

【0058】

組織学的検査(図4)は、アルギン酸塩に埋め込んだ軟骨前駆体によって生成された組織修復が、アルギン酸塩に埋め込んだ成人のヒト軟骨細胞由来の軟骨前駆体によって生成されたものよりも劣っていることを示した。しかし、両方とも、何も移植しなかった欠損症よりも優れていた。

【0059】

<実施例3：マトリゲルに埋め込まれた軟骨前駆体による骨軟骨欠損の処置>

外科手術用ドリルを使用して、3mmの骨軟骨欠損を、ウサギの大腿部の滑車の溝と顆に作成した。4つの異なる処置を使用して欠損症を修復した。対照として、1つの欠損症部位には何も移植しなかった。第1の処置において、対照としてマトリゲルのみを欠損症部位へ外科移植した。第2の処置において、ドナー#1からの、成人のヒト軟骨細胞由来の軟骨前駆細胞ペレットをマトリゲルに埋め込み、その後、欠損症部位へ外科移植した。第3の処置において、ドナー#2からの、成人のヒト軟骨細胞由来の軟骨前駆細胞ペレットをマトリゲルに埋め込み、その後、欠損症部位へ外科移植した。第4の処置において、

10

20

30

40

50

H 9 由来の軟骨前駆細胞ペレットをマトリゲルに埋め込み、その後、欠損症部位へ外科移植した。

【0060】

マトリゲル (BD Biosciences) を摂氏4度で液体として維持し、移植後、摂氏37度でゼラチン状となった。

【0061】

組織学的検査 (図1) は、マトリゲルに埋め込んだH 9 由来の軟骨前駆体によって生成された組織修復が、マトリゲルに埋め込んだ成人のヒト軟骨細胞由来の軟骨前駆体によって生成されたものと比較可能であることを示した。しかし、両方の処置は、何も移植しなかった欠損症、又はマトリゲルのみを移植した欠損症よりも優れていた。

10

【0062】

<実施例4：3成分マトリックスに埋め込まれた軟骨前駆体による骨軟骨欠損の処置>

外科手術用ドリルを使用して、3mmの骨軟骨欠損を、ウサギの大腿部の滑車の溝と顆に作成した。4つの異なる処置を使用して欠損症を修復した。全ての4つ処置 (成人のヒト軟骨細胞、H 9 由来のMSC、軟骨細胞由来のiPSC、及び成人のヒトMSC)において、I型コラーゲン、硫酸コンドロイチン、及びヒアルロン酸からなる3成分マトリックスを使用した。

【0063】

以下のプロトコルを、3成分マトリックスを構築するために使用した：

1) ウシのI型コラーゲン (Innovative Research) を、0.01M酢酸に溶解した (2.4mlの10mM酢酸、300μlの10倍のMedium 199、及び300μlのNaHCO₃ / HEPESに、10mgのウシのI型コラーゲンを加えて、酢酸を中和する)；

20

2) 300μgのヒアルロン酸を1mg/mlの濃度で加えた；

3) 60μgの硫酸コンドロイチン (ウシ) を1mg/mlの濃度で加えた；

4) I型コラーゲンの終末濃度はおよそ3mg/mlである。

【0064】

組織学的検査 (図2) は、3成分マトリックスに埋め込んだH 9 由来の軟骨前駆体によって生成された組織修復が、成人のヒト軟骨細胞由来の軟骨前駆体、多能性細胞由来の軟骨前駆体、及び成人のヒト間葉系幹細胞よりも、組織再生にて優れており、且つ優れた機械的性質 (図3) を有していたことを示した。

30

【0065】

<実施例5：変形性関節症の処置において3成分マトリックスを使用する臨床研究>

患者は、滑膜への、軟骨細胞 (又はリン酸緩衝生理食塩水の対照) を備えた3成分マトリックスの単一の5mL注射を受け、16週の訪問後に繰り返しの処置を受けることが可能となる。

【0066】

研究のタイプ：介入

【0067】

割当：無作為化

40

【0068】

エンドポイント分類：安全性 / 有効性研究

【0069】

介入モデル：並列の割当

【0070】

マスキング：二重盲検 (被験体、結果評価者 (Outcomes Assessor))

)

【0071】

第1の目的：処置

【0072】

50

評価項目：

【0073】

参加者の疼痛の評価。基線（0日目）と、16週まで（2週、4週、8週、12週、及び16週）のすべての訪問に、平均スコアを使用した。WOMAC Pain Subscaleには0 - 4のスコア範囲があり、0 = 疼痛が無い、4 = 極端な疼痛、である。

【0074】

参加者は、WOMAC LK 3.1 A1 (Walking Pain) Subscaleを使用して、歩行中に自身が感じた疼痛を分類した。スケールは疼痛を、無し、穏やか、中度、重度、及び極端なものと評価する。

【0075】

参加者の身体機能の評価を使用する、16週の初期治療期間にわたる基線からの変化。基線（0日目）と、26週まで（4週、8週、12週、18週、及び26週）のすべての訪問に、平均スコアを使用した。WOMAC Function Subscaleには、過去48時間以内にタスク（tasks）を完了する困難の程度を評価するための0 - 4のスコア範囲があり、0 = 困難が無い、4 = 極端に困難、である。

【0076】

研究の資格を持つ年齢：40歳以上；

【0077】

研究の資格を持つ性別：両方

【0078】

健康なボランティアの受け入れ：無し

【0079】

包含基準：

【0080】

試験の少なくとも3か月前に作られた、標的の膝の初期の変形性関節症（OA）の文書化した診断を持つ患者。

【0081】

スクリーニングの、及び任意の基線評価の長くとも3か月前に得た標準のX線によって診断されるような、少なくとも1つの明確な骨増殖体及び測定可能な関節窩を伴う標的の膝の脛大腿区分におけるOAのX線写真術の証拠を持つ。

【0082】

保存処置（例えば減量、物理療法、鎮痛薬）を行ったにもかかわらず標的の膝の疼痛が持続していた。

【0083】

Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index Likert Scale Version 3.1 (WOMAC LK 3.1) A1 (Walking Pain) Subscaleで2又は3のスコアによって実証されるような、標的の膝に疼痛がある。

【0084】

Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index Likert Scale Version 3.1 (WOMAC LK 3.1) A (Pain) Subscaleにて平均スコアが1.5乃至3.5である。

【0085】

反復相（Repeat Phase）のための包含基準：研究者によって評価されるような、処置の第1過程中に、主要な安全性の懸念があつてはならない；少なくとも1のWOMAC LK 3.1 Aのスコアがなければならない。

【0086】

除外基準：

10

20

30

40

50

【0087】

スクリーニングの、及び任意の基線評価の長くとも3カ月前に得た標準のX線によって確認される、標的の膝の膝蓋大腿区分における、グレードIVの修飾したKellgren-Lawrence Numerical Grading Systemを持つ。

【0088】

標的の膝の臨床的に明白な緊張状態の流出(tense effusion)を持つ。

【0089】

スクリーニング前の9か月以内に標的の膝を含む任意の関節に関節内補充療法(viscosupplementation)があった。

【0090】

関節に影響を及ぼす炎症性疾患又は他の疾病(例えば、関節リウマチ、代謝性骨疾患、乾癬、痛風、徵候的な軟骨石灰化症、及び活発な感染等)が付随している。

10

【0091】

パラセタモールに反応せず、他の治療を必要とする、反対側の膝又は一方の殿部の徵候的なOA。

【0092】

トリのタンパク質及び/又はヒアルロナンベースの注射装置の任意の構成要素に対する、関連する過敏症を持つ。

【0093】

<実施例6：軟骨細胞を含む3成分マトリックスによる骨関節炎の処置>

20

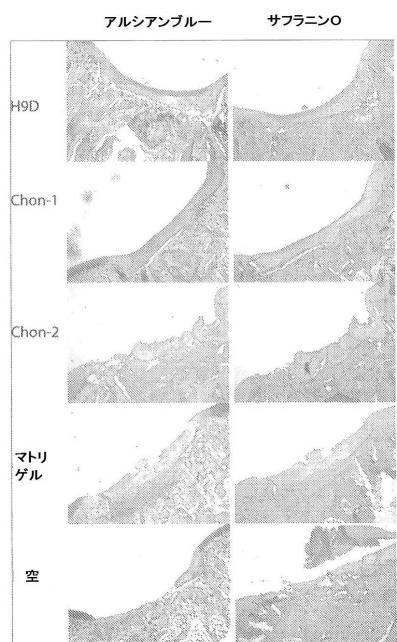
患者は、自身の膝に骨関節炎を患っている。石灰化軟骨を両膝から取り除く。外科医は、軟骨下骨に割れ目をもたらす。軟骨細胞を持つ3成分マトリックスを膝に注入する。患者は、軟骨細胞を含む3成分マトリックスの両膝への注入のため、4週、8週、及び16週後に、医師の元へ戻る。膝の軟骨は再生する。

【0094】

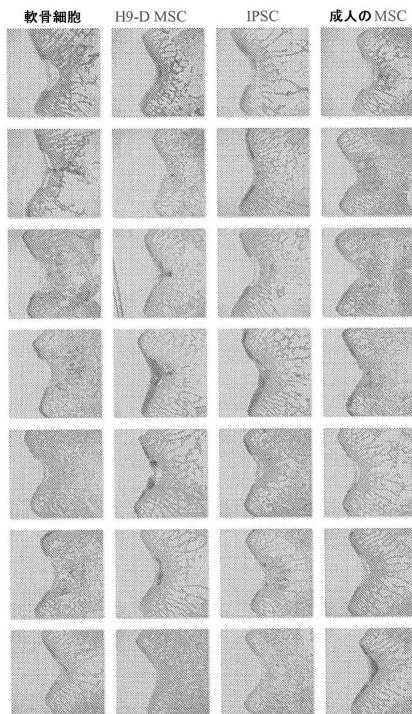
本発明の好ましい実施形態が、本明細書に示され記載されている一方で、このような実施形態が、ほんの一例として提供されることは当業者に明白であろう。多数の変形、変化、及び置換は、本発明から逸脱することなく、当業者によって現在想到される。本明細書に記載される本発明の実施形態の様々な代案が、本発明の実施において利用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義するものであり、この特許請求の範囲及びそれらの同等物の範囲内 の方法及び構成がそれによって包含されることが、意図される。

30

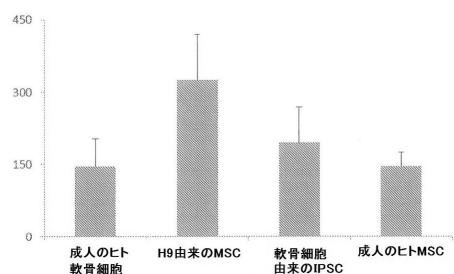
【図1】



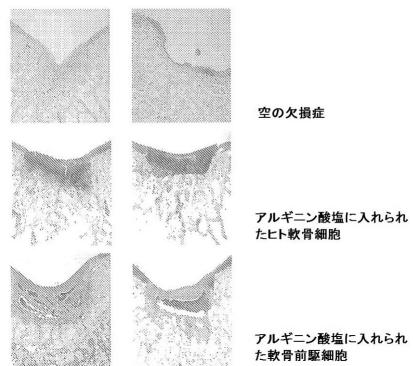
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 35/32 (2015.01)	A 6 1 K 35/32
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17
A 6 1 K 31/728 (2006.01)	A 6 1 K 31/728
A 6 1 K 31/737 (2006.01)	A 6 1 K 31/737

(72)発明者 コールウェル,クリフォード,ダブリュ.
アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州 サンディエゴ キャンパス・ポイント・コート
4275

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 中国特許出願公開第101934092(CN, A)
国際公開第2011/124894(WO, A1)
国際公開第2011/066403(WO, A1)
特開2011-015662(JP, A)
Chih-Sheng Ko, et al, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009年, Vol.107, N
o.2, pp.177-182

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 12 N 11/00
C 12 N 1/04
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
W P I D S / W P I X (S T N)