

(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2004-504835

(P2004-504835A)

(43) 公表日 平成16年2月19日(2004.2.19)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 5/00	E 4 B O 2 9
A 6 1 F 2/28	A 6 1 F 2/28	4 B O 6 5
A 6 1 F 2/30	A 6 1 F 2/30	4 C O 8 1
A 6 1 K 35/32	A 6 1 K 35/32	4 C O 8 7
A 6 1 L 27/00	A 6 1 L 27/00	G 4 C O 9 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 262 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-516067 (P2002-516067)	(71) 出願人	391018787
(86) (22) 出願日	平成13年7月30日 (2001.7.30)		スミス アンド ネフュー ピーエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月29日 (2003.1.29)		SMITH & NEPHEW PUBL
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/003463		IC LIMITED COMPANY
(87) 国際公開番号	W02002/010348		イギリス、ロンドン ダブルシー2エヌ
(87) 国際公開日	平成14年2月7日 (2002.2.7)		6エルエー、アダム ストリート 15
(31) 優先権主張番号	0018583.5	(74) 代理人	100065248
(32) 優先日	平成12年7月29日 (2000.7.29)		弁理士 野河 信太郎
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)	(72) 発明者	トムソン, ブライアン, マーク
(31) 優先権主張番号	0025939.0		イギリス、ヨーク ワイオー42 2キュー
(32) 優先日	平成12年10月24日 (2000.10.24)		ーイー、ポックリントン、バーンバイ レ
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		ー 33
(31) 優先権主張番号	0116885.5		
(32) 優先日	平成13年7月11日 (2001.7.11)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織インプラント

(57) 【要約】

この発明は、軟骨欠損の治療薬剤と方法に関する。また、この発明は、軟骨欠損の治療用インプラントに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された表層軟骨始原細胞群。

【請求項 2】

細胞が哺乳動物である請求項 1 に記載の単離された表層軟骨始原細胞群。

【請求項 3】

細胞がヒトである請求項 1 に記載の単離された表層軟骨始原細胞群。

【請求項 4】

単離された表層軟骨始原細胞群からなる組成物。

【請求項 5】

哺乳動物の軟骨の表層由来の増強された群を得ることからなる、表層軟骨始原細胞群の単離方法。

【請求項 6】

哺乳動物がヒトである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

表層軟骨始原細胞群を投与することからなる、患者の治療方法。

【請求項 8】

表層軟骨始原細胞を投与することからなる、軟骨欠損によって特徴付けられる疾患又は临床上の症状の治療方法。

【請求項 9】

軟骨欠損を特徴とするか、又はそれによって特徴づけられる、疾患又は临床上の症状の治療で用いるための表層軟骨始原細胞。

【請求項 10】

軟骨欠損を特徴とするか、又はそれによって特徴づけられる、疾患又は临床上の症状の治療で用いるための表層軟骨始原細胞を含む薬剤の製造方法。

【請求項 11】

表層軟骨始原細胞の投与からなる、軟骨の成長方法。

【請求項 12】

方法がインビトロである請求項 7 に記載の方法。

【請求項 13】

軟骨欠損を再植するよう増殖し、これが分化して成熟軟骨形成細胞を形成する表層軟骨始原細胞を供することによる、軟骨欠損の再修復方法。

【請求項 14】

成熟軟骨形成細胞が関節軟骨を形成する請求項 13 に記載の軟骨欠損の修復方法。

【請求項 15】

骨—軟骨の界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と暴露された関節表面に接触して、又はその近くに位置するのに適した第二表面とからなり、さらに表層軟骨始原細胞からなる軟骨欠損修復に適したインプラント。

【請求項 16】

生体適合性スカホールドからなる請求項 15 に記載のインプラント。

【請求項 17】

第一表面と第二表面との距離が d_1 であり、第二表面から d_2 の深部までに、インプラントの残りの深部よりも高い濃度の表層軟骨始原細胞を含み、 $d_2 / d_1 < 1$ である請求項 15 に記載のインプラント。

【請求項 18】

$d_2 / d_1 < 0.5$ である請求項 17 に記載のインプラント。

【請求項 19】

$d_2 / d_1 < 0.3$ である請求項 17 に記載のインプラント。

【請求項 20】

$d_2 / d_1 < 0.2$ である請求項 17 に記載のインプラント。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

生体適合性スカホールドが、軟骨始原細胞結合材を含む請求項 1 6 に記載のインプラント。

【請求項 2 2】

軟骨始原細胞結合材が、フィブロネクチン、I V 型コラーゲン、抗ノーチチ抗体、抗インテグリン β_1 抗体からなる群から選択される請求項 1 7 に記載のインプラント。

【請求項 2 3】

軟骨始原細胞結合材がフィブロネクチンであり、フィブロネクチンが細胞性フィブロネクチン、血漿フィブロネクチン、細胞性フィブロネクチン、フィブロネクチンエキストラドメイン A (EDA) からなる群から選択される請求項 2 2 に記載のインプラント。

10

【請求項 2 4】

表層軟骨始原細胞が、 d_2 の深部に表層軟骨始原細胞が高濃度となるように濃縮される請求項 1 7 に記載のインプラント。

【請求項 2 5】

表層軟骨始原細胞の濃縮が、

(i) 細胞の浮遊密度又は沈降速度 (フィコール勾配又は向流懸濁分離法) ;

(i i) 特定の細胞表面エピトープへの抗体結合 (蛍光細胞分類、磁気ビーズへの結合又は補足的な媒介細胞溶解を介する)、

(i i i) 特定の基質への識別接着 ;

(i v) それぞれの細胞型の成長に好ましい選択的な培養培地もしくは培養条件、又は

20

(v) 細胞の他の物理特性、例えば大きさ、粒状度又は電気キャパシタンス

に基づく技術範囲を用いて行われる請求項 2 5 に記載のインプラント。

【請求項 2 6】

ポリーアニオン性の特定のゲルからなる請求項 1 5 又は 1 7 に記載のインプラント。

【請求項 2 7】

ポリーアニオン性の特定のゲルが、スルフェートイントラサイト^{T M}である請求項 2 6 に記載のインプラント。

【請求項 2 8】

複数の層からなる請求項 1 5 に記載のインプラント。

【請求項 2 9】

マイクロ担体ビーズ又はビーズからなる請求項 1 5 に記載のインプラント。

30

【請求項 3 0】

生体再吸収材からなる請求項 1 5 ~ 2 8 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 3 1】

非再吸収材からなる請求項 1 5 ~ 2 8 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 3 2】

補強成分からなる請求項 1 5 ~ 3 0 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 3 3】

軟骨始原細胞結合材が、インプラントの第二表面又はその近くにある請求項 2 1 又は 2 2 に記載のインプラント。

40

【請求項 3 4】

第一表面が骨-軟骨界面又はその近くにあり、第二表面が暴露された関節表面又はその近くにあるのに適したインプラントの第一表面よりもインプラントの第二表面付近で、濃度の高い表層軟骨始原細胞を配置する工程からなる、インプラントの製造方法。

【請求項 3 5】

第一表面と第二表面との距離が d_1 であり、第二表面から d_2 の深部まで軟骨始原細胞結合材からなり、 $d_2 / d_1 < 1$ である請求項 3 3 に記載のインプラント。

【請求項 3 6】

骨-軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と暴露された関節表面に接触するか、又はその近くに位置するのに適した第二表面とからなり、骨-軟骨界面よりも関節

50

表面又はその近くに未成熟な軟骨始原細胞をより高濃度で含む、軟骨欠損修復に適したインプラント。

【請求項 37】

第一表面と第二表面との距離が d_1 であり、第二表面から d_2 の深部まで高濃度の未成熟軟骨始原細胞を含み、 $d_2 / d_1 < 1$ である請求項 36 に記載のインプラント。

【請求項 38】

$d_2 / d_1 < 0.5$ である請求項 36 に記載のインプラント。

【請求項 39】

$d_2 / d_1 < 0.3$ である請求項 36 に記載のインプラント。

【請求項 40】

$d_2 / d_1 < 0.2$ である請求項 36 に記載のインプラント。

【請求項 41】

生体適合性スカホールドからなる請求項 36～40 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 42】

未成熟軟骨始原細胞が、骨髄間質細胞からなる請求項 36～40 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 43】

未成熟軟骨始原細胞が、表層軟骨始原細胞からなる請求項 36～40 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 44】

軟骨始原細胞結合材からなる請求項 36～40 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 45】

軟骨始原細胞結合材が、フィブロネクチン、抗ノッチ抗体、抗インテグリン β_1 抗体からなる群から選択される請求項 44 に記載のインプラント。

【請求項 46】

軟骨始原細胞結合材がフィブロネクチンであり、フィブロネクチンが、血漿フィブロネクチン、細胞性フィブロネクチン、フィブロネクチン-E D A からなる群から選択される請求項 45 に記載のインプラント。

【請求項 47】

複数の層である請求項 36 に記載のインプラント。

【請求項 48】

生体再吸収材からなる請求項 36 に記載のインプラント。

【請求項 49】

非再吸収材からなる請求項 36 に記載のインプラント。

【請求項 50】

補強成分からなる請求項 36 に記載のインプラント。

【請求項 51】

スカホールドからなる請求項 36 に記載のインプラント。

【請求項 52】

スカホールドが、ポリーアニオン性微粒子である請求項 51 に記載のインプラント。

【請求項 53】

ポリーアニオン微粒子が、スルフェートイントラサイト^{T M}である請求項 52 に記載のインプラント。

【請求項 54】

装置の近く、又はこれと接触させて、あるいはこれに関連させて軟骨始原細胞を配置することによる軟骨欠損の修復方法であって、装置が互いに対向する第一表面と第二表面とからなり、第二表面又はその近くに未成熟軟骨始原細胞を高濃度を含み、その軟骨始原細胞が欠損を再植するよう増殖し、次いで分化して成熟軟骨形成細胞を形成する、軟骨欠損の修復方法。

10

20

30

40

50

【請求項 55】

成熟軟骨形成細胞が、関節軟骨を形成する請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

互いに対向する第一表面と第二表面とからなり、第二表面又はその近くに未成熟軟骨始原細胞を高濃度を含む装置の近く、又はこれと接触させて、あるいはこれに関連させて軟骨始原細胞を配置することによる、軟骨始原細胞の分化促進方法。

【請求項 57】

互いに対向する第一表面と第二表面とからなり、第二表面又はその近くに未成熟軟骨始原細胞を高濃度を含む装置の近く、又はこれと接触させて、あるいはこれに関連させて軟骨始原細胞を配置することによる、軟骨形成の促進方法。

10

【請求項 58】

未成熟軟骨始原細胞が、表層軟骨始原細胞からなる請求項 54～57 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 59】

未成熟軟骨始原細胞が、骨髄間質細胞からなる請求項 54、55、56 又は 57 に記載の方法。

【請求項 60】

インビトロである請求項 56 又は 57 に記載の方法。

【請求項 61】

骨—軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と、暴露された関節表面に接触させて、又はこれの近くに位置するのに適した第二表面を有し、第一表面と第二表面との距離が d_1 であり、インプラントの第二表面から d_2 の深部まで生体適合性スカホールドと軟骨始原細胞結合材を含み、 $d_2 / d_1 < 1$ である、軟骨欠損修復用インプラント。

20

【請求項 62】

インプラントの第二表面から d_2 の深部まで生体適合性スカホールドと軟骨始原細胞結合材吸収性物質を含み、 $d_2 / d_1 < 1$ である請求項 61 に記載の軟骨欠損修復用インプラント。

【請求項 63】

軟骨始原細胞結合材が、フィブロネクチン、抗—ノッチ抗体又は抗インテグリン β_1 抗体からなる群から選択される材を含む請求項 61 又は 62 に記載のインプラント。

30

【請求項 64】

軟骨始原細胞結合材がフィブロネクチンであり、フィブロネクチンが、血漿フィブロネクチン、細胞性フィブロネクチン、フィブロネクチン—EDA からなる群から選択される請求項 63 に記載のインプラント。

【請求項 65】

軟骨始原細胞結合材が間葉前駆体細胞を結合する、請求項 61～63 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 66】

軟骨始原細胞結合材が表層軟骨始原細胞を結合する、請求項 61～65 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

40

【請求項 67】

単層からなる請求項 61～66 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 68】

複数の層からなる請求項 61～67 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 69】

マイクロ担体ビーズ又はビーズの形態である請求項 61～64 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 70】

生体再吸収材からなる請求項 61～69 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 71】

50

非再吸収材からなる請求項 6 1 ～ 6 6 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 7 2】

補強成分からなる請求項 6 1 ～ 7 1 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 7 3】

軟骨始原細胞結合材が、スカホールド表面で被覆された層に含まれるか、又はスカホールド自体又はその双方の内部に含まれる請求項 6 1 ～ 7 1 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 7 4】

$d_2 / d_1 < 0.5$ である請求項 6 1 に記載のインプラント。

【請求項 7 5】

$d_2 / d_1 < 0.3$ である請求項 6 1 に記載のインプラント。

【請求項 7 6】

$d_2 / d_1 < 0.2$ である請求項 6 1 に記載のインプラント。

【請求項 7 7】

軟骨始原細胞結合材からなる軟骨欠損修復用インプラント。

【請求項 7 8】

軟骨始原細胞結合材が、フィブロネクチン、I V 型コラーゲン、抗ノッチ抗体又は抗インテグリン β_1 抗体からなる群から選択される材を含む請求項 7 7 に記載のインプラント。

【請求項 7 9】

軟骨始原細胞結合材がフィブロネクチンからなり、フィブロネクチンが、血漿フィブロネクチン、細胞性フィブロネクチン、フィブロネクチン-E D A からなる群から選択される、請求項 7 7 に記載のインプラント。

【請求項 8 0】

軟骨始原細胞が間葉前駆体細胞である、請求項 7 7 又は 7 8 に記載のインプラント。

【請求項 8 1】

軟骨始原細胞が表層軟骨始原細胞である、請求項 7 7、7 8 又は 7 9 に記載のインプラント。

【請求項 8 2】

生体再吸収材からなる請求項 7 7 ～ 8 1 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 8 3】

非一生体再吸収材からなる請求項 7 7 ～ 8 1 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 8 4】

さらに、補強化合物からなる請求項 7 7 ～ 8 2 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 8 5】

軟骨始原細胞結合材が、スカホールドの被覆層内に含まれるか、又はスカホールド自体又はその双方の内部に含まれる請求項 7 7 ～ 8 4 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 8 6】

骨-軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と暴露された関節表面に接触して、又はその近くに位置するのに適した第二表面を有し、

a. 生体適合性スカホールド、及び

b. それに結合して、又はその中に含まれる、第一表面から第二表面に伸びる適合性領域

からなる、軟骨欠損修復用合成インプラント。

【請求項 8 7】

移植片に接触して配置することを意図した組織よりも低い圧縮率を有する、請求項 8 6 に記載の合成インプラント。

【請求項 8 8】

合成インプラントの圧縮率が、第一表面から第二表面に移動する方向で増加する、請求項 8 6 に記載の合成インプラント。

10

20

30

40

50

【請求項 89】

適合性領域の圧縮率が 1.0 MPa 未満である、請求項 86、87 又は 88 のいずれか 1 つに記載の合成インプラント。

【請求項 90】

第二表面から第一表面に伸びる関節領域からなる、請求項 86、87、88 又は 89 のいずれか 1 つに記載の合成インプラント。

【請求項 91】

関節領域が 1.0 MPa より大きい弾性率を有する、請求項 90 に記載の合成インプラント。

【請求項 92】

三次元の織物、三次元のニット材、フリース、スポンジ、発泡体又は微粒子からなる群から選択される材を含む請求項 86～90 のいずれか 1 つに記載の合成インプラント。

【請求項 93】

生体再吸収材からなる請求項 86～92 のいずれか 1 つに記載の合成インプラント。

【請求項 94】

ポリ（乳酸）からなる請求項 86 に記載の合成インプラント。

【請求項 95】

適合性領域と関節領域が異なる材からなる、請求項 90 に記載の合成インプラント。

【請求項 96】

骨－軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と、暴露された関節表面に接触して又はその近くに位置するのに適した第二表面を有し、適合性領域と関節領域からなるスカホールドを含み、関節領域が第二表面から第一表面に向かって伸び、第一表面から第二表面に向かって伸びる適合性領域に合う、軟骨欠損修復用合成インプラント。

【請求項 97】

さらに生物活性物を含む、請求項 86～95 に記載の合成インプラント。

【請求項 98】

細胞を接種した、請求項 86～95 に記載の合成インプラント。

【請求項 99】

スカホールドを含む請求項 86 に記載の合成インプラント。

【請求項 100】

スカホールドが、ポリアニオン性微粒子ゲルである請求項 99 に記載の合成インプラント。

【請求項 101】

ポリアニオン性微粒子ゲルが、スルフェートイントラサイトTMである請求項 100 に記載の合成インプラント。

【請求項 102】

骨－軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と、暴露された関節表面に接触して、又はその近くに位置するのに適した第二表面とを有し、生体適合性スカホールドと、それに結合するか、又はその中に含まれる、第一表面から第二表面に向かって伸びる適合性領域からなる細胞接種合成インプラントの製造法であって、

- a. 細胞が微粒子表面に接着するよう、細胞を微粒子と接触させ、
- b. 次に、スカホールド内に細胞被覆微粒子を導入する

工程からなる方法。

【請求項 103】

骨－軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と、暴露された関節表面に接触して、又はその近くに位置するのに適した第二表面とを有し、適合性領域と関節領域からなるスカホールドを含み、関節領域が第二表面から第一表面に向かって伸びて、第一表面から第二表面に向かって伸びる適合性領域に合う、細胞－接種合成インプラントの製造法であって、

- a. 細胞が微粒子表面に接着するよう、細胞を微粒子と接触させ、

10

20

30

40

50

b. 次いで、スカホールド内に細胞被覆微粒子を導入する工程からなる方法。

【請求項 104】

細胞接種微粒子のインキュベートに適したインキュベーションチャンバーとスカホールド手段の支持に適した直径 d_1 のスカホールド支持チャンバーからなり、

a. $d_2 = d_1$ の時点でスカホールド支持チャンバーに合うよう、インキュベーションチャンバーの直径 d_2 がスカホールド支持チャンバーに接近するにつれて減じるか、又は
b. インキュベーションチャンバーとスカホールド支持チャンバーが、インキュベーションチャンバーと接触する端部で直径 d_2 を有し、スカホールド支持チャンバーと接触する端部における直径 d_1 に細くなる、ろうと手段で接続される、
バイオリアクター。

10

【請求項 105】

インキュベーションチャンバーが管形状である請求項 104 に記載のバイオリアクター。

【請求項 106】

ろうと手段とスカホールド支持チャンバーが、バイオリアクターへの挿入に適した担体内に必須として含まれる請求項 104 及び 105 に記載のバイオリアクター。

【請求項 107】

a. バイオリアクターのスカホールド支持チャンバー内にスカホールドを配置し、
b. バイオリアクターのインキュベーションチャンバーに細胞接種微粒子を導入し、
c. 十分なインキュベーション作用を行うのに適当な期間のあいだ、温度、湿度、pH 及び栄養素などの適当な条件下でバイオリアクターを攪拌し、
d. バイオリアクターを遠心分離して、スカホールドを有する細胞接種微粒子を集め、
かつ
e. バイオリアクターのスカホールド支持チャンバーから細胞接種微粒子からなるスカホールドを除くこと
からなる、細胞接種微粒子を有するスカホールドを有するバイオリアクターの製造方法。

20

【請求項 108】

成熟軟骨始原細胞結合材からなる軟骨欠損修復用インプラント。

【請求項 109】

成熟軟骨始原細胞結合材が、I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、ビトロネクチンからなる群から選択される材を含む請求項 108 に記載のインプラント。

30

【請求項 110】

生体再吸収材からなる請求項 108 又は 109 に記載のインプラント。

【請求項 111】

非生体再吸収材からなる請求項 108 又は 109 に記載のインプラント。

【請求項 112】

補強化合物からなる請求項 108 又は 111 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 113】

スカホールドからなる請求項 108 又は 111 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 114】

スカホールドが、ポリーアニオン性微粒子ゲルからなる請求項 113 に記載のインプラント。

40

【請求項 115】

ポリーアニオン性微粒子ゲルが、スルフェートイントラサイトゲルである請求項 114 に記載のインプラント。

【請求項 116】

スカホールドからなる請求項 77～82 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 117】

スカホールドが、ポリーアニオン性微粒子ゲルからなる請求項 116 に記載のインプラント。

50

【請求項 1 1 8】

ポリーアニオン性微粒子ゲルが、スルフェートイントラサイト^{T M}である請求項 1 1 7 に記載のインプラント。

【請求項 1 1 9】

スカホールドが、軟骨始原細胞結合材からなる請求項 1 1 6 ～ 1 1 8 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 1 2 0】

機械的に強力なスカホールド内に収容される請求項 1 5 ～ 3 3 及び 3 5 ～ 5 3 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 1 2 1】

機械的に強力なスカホールドが、1. 0 M P a より高い圧縮率を有する請求項 1 2 0 に記載のインプラント。

【請求項 1 2 2】

スカホールドが、中に含まれているか、中にあるか、又はその近くにある周囲組織より脆弱な材である請求項 1 2 0 又は 1 2 1 に記載のインプラント。

【請求項 1 2 3】

適合性領域を有する請求項 1 5 ～ 3 5、3 6 ～ 5 3 又は 1 2 0 ～ 1 2 2 のいずれか 1 つに記載のインプラント。

【請求項 1 2 4】

第三及び第四表面間の距離が d_3 である第三表面と第四表面からなり、第三表面の少なくとも部分的な長さについて第三表面から d_4 の深部まで高濃度の未成熟軟骨始原細胞を有し、 $d_4 / d_3 < 1$ である請求項 3 7 に記載のインプラント。 20

【請求項 1 2 5】

第三及び第四表面間の距離が d_3 である第三表面と第四表面からなり、第四表面の少なくとも部分的な長さについて第四表面から d_5 の深部まで高濃度の未成熟軟骨始原細胞を有し、 $d_5 / d_3 < 1$ である請求項 3 7 に記載のインプラント。

【請求項 1 2 6】

未成熟軟骨始原細胞が、表層軟骨始原細胞又は骨髄間質細胞又はその双方からなる請求項 1 2 4 又は 1 2 5 に記載のインプラント。

【請求項 1 2 7】

$d_4 / d_3 < 0.3$ である請求項 1 2 4 に記載のインプラント。 30

【請求項 1 2 8】

$d_5 / d_3 < 0.3$ である請求項 1 2 4 に記載のインプラント。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

この発明は、損傷を受けた軟骨の置換、より詳しくは、負荷のかかった軟骨組織、例えば関節間軟骨及び関節軟骨の置換用インプラントに関する。また、この発明は、本発明によるインプラントを外科的に移植する工程からなる治療方法及びスカホールドの選択領域で低割合の細胞混合物として存在する軟骨始原細胞 (chondroprogenitor cells) を選択的に濃縮する方法に関する。 40

【0 0 0 2】

関節軟骨欠損の治療に一般的な現在の手法には、(主として欧州で行われる) 高度な脛骨切骨及び関節の生体力学と負荷を変える筋肉弛緩; 胃洗浄及び骨増殖体や軟骨の原繊維からなる領域を除く創面切除ならびに出血や血塊の形成を誘発する肋軟骨下骨の穿孔と透過が含まれる。しかし、これらの技術は、いずれも関節軟骨の構造、組成、機械的特性又は耐久性を二倍にする組織の再生には至っていない。

最も一般的な技術は、フィブリン血塊及び繊維組織を形成する肋軟骨下ドリル (subchondral drilling) の技術である。約 75% の患者では結果は十分なものであるが、手術から 2 年後には、依然として無症状の患者はわずか 12% である。この手法の限界は、臨床結果の質と持続を予測し難く、長期的にみて、この手法がしばしば患 50

者を悪化状態にすることである。他方、肋軟骨下ドリルと創面切除は、症状の緩和と1～3年ごとの膝関節全体を置換する必要性を延期する点で一般的に成功している。

【0003】

この技術に対する代替的な同種異型組織－工学的解決策は、外科的手法を1回のみ伴うが、長期にわたる複雑な製造過程を介した移植可能な組織工学的移植片の生産を要し、実際的かつ規則的な困難性を伴う。

予測どおりに痛みを和らげ、機能を回復し、良好な固定を達することができ、少なくとも10～15年以上持続可能な耐久性を有する軟骨修復製品は、多くの外科医によって重要な目標とみなされている。

【0004】

上記の目的に合致するよう試みられている現在利用可能な製品は、炭素繊維のロッドからなる：軟骨損傷は清浄にされて、肋軟骨下骨に摘出され、そこにつくられた穴に炭素繊維ロッドが挿入される。修復は、ロッドの上部周囲でのコラーゲンの沈着で開始する。これらの島細胞群の成長はすぐに大きくなって完全に欠損を充たし、ロッドが欠損での修復組織用の固定源となる。この製品に伴う顕著な問題は、滑液腔でみられる炭素繊維磨耗残がいの生成であり、これは剥離の問題を生ずる可能性がある。

10

【0005】

検討されている別の手法は、ニット織物からなる、ある面積のインプラントの使用である。これは、構造上の安定性を生じ、中に接種された細胞を含み、支持する膨張性ハイドロゲルを生じる。このインプラントは軟骨の損傷に配置され、ハイドロゲルの膨張から生じる圧力の増加によって軟骨の成長を促進することを目的とする。

20

上記の進歩にもかかわらず、十分な厚みがある関節軟骨の病巣の障害に十分な治療は、現在のところない：利用可能な方法は、作用が不十分であるか、かなり高価であるか、又はそれらに付随する他の問題があるものと一般的にはみなされている。

【0006】

本発明者らの手法もまた、軟骨、特に関節軟骨の構造を詳細に検討した。関節軟骨は、関節表面で層を形成している。この組織は、当初は構造及び組成において均一であると思われるが、実際には、幾つかの層からなっている。組織について表面、中央（又は中間）及び深部の層があるので、3層が同定されている。表層は、軟骨表面と平行した方向の平坦な細胞からなる。比較すると、中間層と深層の細胞は、球形で、ランダムに、又は関節表面に垂直な方向の列で配置される傾向にある。これらの特徴的な層特異的な細胞と構造の特性は、現在の技術を用いて生産される修復組織、組織工学的構築物及び製品にはない。

30

【0007】

いずれの理論にも拘束されず、表層の細胞で軟骨－形成性軟骨始原細胞が多いことが初めて今回考慮されている。これは、(i) この層の細胞が、深層の細胞より代謝上かつ合成上活性であり；(ii) それらがインビトロでコロニーを形成し（高度に増殖性の前駆体細胞について広く認識される特徴）；(iii) 前駆体細胞に特徴的なシグナル系を有し、かつ(iv) 代謝ラベルの取り込みの動力学が初期の軟骨始原細胞のプールの存在と一致しているためである。表層は、組織の深部領域にはない幾つかの細胞外マトリクス（ECM）成分を含む。これらの成分の幾つかは組織内で純粋な構造上又は機械的な役割を有している可能性があるが、他の表層のECM成分は、軟骨始原細胞に適切な生化学的環境（いわゆる「幹細胞ニッチ」）を生ずるのにさらに役立っている可能性がある。さらに、中間層と深層で見られるあるECM成分は、それらの層の構造及び組成の形成と維持に寄与している可能性のあることが考慮される。いずれの理論にも拘束されず、表層の細胞は軟骨の形成と修復に重要な役割を果たしていることが、初めて考えられている。

40

【0008】

軟骨の修復に対する改良法は、層状化された組織構造と同定された組成を少なくとも幾つか回復することを目的としている。特に、軟骨修復の改良法は、健康な関節軟骨の表層に存在するものに似た軟骨始原細胞の層を回復することがここで同定された。

さらに、病巣の関節軟骨欠損の修復に対する現在の組織工学的手法は、機械的弾性及び側

50

方結合の矛盾する要求に合致できない。細胞接種されたインプラントが機械的負荷に耐えるように十分に強固な細胞外マトリクスを有する場合、その細胞はマトリクス内に捕捉されて、周囲の組織に移動できず、その結果、側方結合に寄与できない。逆に、組織工学的な関節軟骨移植片の細胞外マトリクスが十分に透過性で細胞の移動と側方結合を許容できれば、あまりにも弱くて、機械的負荷に耐えることができない。

【0009】

堅い基質上で平坦な細胞の単層として成長すると、軟骨細胞は増殖するが脱分化する一方、丸い形態を採用できる条件（例えばアルギナートゲル内）、特に高細胞密度の条件で維持されれば、機能上の表現型を維持するが、分裂しないことが文献で認識されている。既存のスカホールドは、限られた数の初期の細胞から多数の機能的な軟骨細胞を生ずるための環境刺激について必要な組み合わせを提供しない。 10

本発明の第一の目的は、軟骨欠損によって特徴づけられる疾患又は症状の治療用薬剤を提供することである。

本発明の第二の目的は、軟骨欠損、特に関節軟骨の欠損に流し込む（flush-fit）ことができ、迅速な治癒及び組織再生を促進する組織インプラントを提供することである。

【0010】

本発明の別の目的は、軟骨、特に関節軟骨の表層の細胞及び構造の特性を回復できる組織インプラントを提供することである。

本発明のさらなる目的は、表層下に位置する軟骨、特に関節軟骨の細胞及び構造の特性を回復できる組織インプラントを提供することである。 20

本発明のさらなる目的は、機械的負荷に耐えることができるが、十分に透過性で、細胞の移動と側方結合を可能にする組織インプラントを提供することである。

また、本発明の目的は、軟骨始原細胞結合材を提供することである。

さらに、この発明の別の目的は、細胞、例えば軟骨始原細胞を保持するのに適した代替的なスカホールドを提供することである。

【0011】

細胞

この発明の第一の観点によれば、単離された表層軟骨始原細胞群が提供される。

用語「表層軟骨始原細胞」は、健康な関節軟骨の表層内にみられる軟骨始原細胞を意味する。これらの軟骨始原細胞は、特異的な組織配置を有し（つまり、表層内）、隣接する軟骨細胞に異なるコントロール系を有し（例えばシグナルレセプターノッチ（ノッチ）が存在する）、かつフィブロネクチンのスプライス変異体 Fibronectin-EDA を含む特徴的な細胞外マトリクスを有する。 30

好ましくは、細胞は、哺乳動物細胞、適切にはヒトである。

【0012】

表層軟骨始原細胞群の単離は、哺乳動物、例えばヒトの関節の軟骨の表層由来の表層軟骨始原細胞が多いいずれかの群を得ることによる単離であってもよい。これらの細胞は、患者への投与前にインビトロで成長させることができる。生細胞の投与は、適当な担体、例えばインプラント上のスカホールドを用いても、又は用いなくともよい。 40

意外なことに、表層軟骨始原細胞は、身体に単に投与することによって身体の軟骨欠損を修正することができる。

【0013】

これらの表層軟骨始原細胞は軟骨の修復で役割を果たしていないというのが、技術分野での以前の見解であった。

外観が平坦な表層軟骨始原細胞は、マトリクス機能に関わる機械的機能のみを有すると以前は考えられていた。

一般に、関節軟骨組織は、関節軟骨損傷の治癒の細胞源に寄与しないと認められている（Mankin HJ The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. Part I NE 50

ngl. J Med. 1974; 291: 1286, Mankin HJ The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. Part I I N Engl. J Med. 1974; 241: 1335, Operative Arthroscopy Editor-in-Chief John B McGinty)。

【0014】

通常の環境下、成熟関節軟骨の軟骨細胞は、あったとしても分裂することがほとんどなく、軟骨、特に表層の細胞数密度は加齢に伴って低下すると当該分野では一般的に考えられている (Stockwell R A: The cell density of human articular and costal cartilage. J Anat 1967; 101: 753-763, Stockwell R A, Meachion G: The chondrocytes, in Freeman MAR (編集): Adult Articular Cartilage, ed 2, Tunbridge Wells, Pitman Medical, 1979, pp 69-144 参照)。

これらの年齢に関連する細胞密度と細胞の合成機能の低下は、損傷を受けたマトリクスを回復する細胞の能力を制限する可能性がある (American Academy of Orthopaedic Surgeons Symposium-Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues; 第9章、段落 Chondrocytes; pp 414~416)。

【0015】

実際、当該分野では、軟骨の修復手法は、肋軟骨下骨に多数の小さなドリル穴をつくる技術によるものであると考えられていた。修復組織は、ドリル穴から成長し、暴露された骨中に広がる (Articular Cartilage and Knee Joint Function, Basic Science and Arthroscopy, Perforation or Abrasion of Subchondral Bone paragraph; pp 44, A symposium Organized by the arthroscopy Association of North America and sponsored by Bristol-Myers/Zimmer, J W Hitt Ewing 編集)。

意外なことに、軟骨始原細胞、特に表層軟骨始原細胞は、他の軟骨始原細胞の分化を促進し、また軟骨形成を促進することができる。

意外なことに、軟骨始原細胞、特に表層軟骨始原細胞は、軟骨の修復を促進し、特に関節軟骨の修復を促進することができる。

【0016】

したがって、表層軟骨始原細胞は、軟骨の欠損によって特徴づけられる疾患又は症状を治療する薬剤又は組成物又はインプラントで用いることができる。

この発明のひとつの観点によれば、表層軟骨始原細胞を投与することからなる、軟骨欠損によって特徴づけられる疾患又は臨床上的症状の治療方法が提供される。

この発明の別の観点によれば、骨-軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と、暴露された関節表面と接触するか、又はその近くに位置するのに適した第二表面からなり、さらに表層軟骨始原細胞を含む、軟骨欠損修復に適したインプラントが提供される。

【0017】

層状化構造物

この発明の別の観点によれば、骨-軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と、暴露された関節表面に接触して、又はその近くに位置するのに適した第二表面とからなり、骨-軟骨界面よりも関節表面又はその近くに高濃度の未成熟軟骨始原細胞を含む、軟骨欠損修復に適したインプラントが提供される。骨-軟骨の界面近くか、あるいはそこでの軟骨始原細胞は、軟骨の関節表面近く又はそこでの細胞よりも成熟した軟骨始原細胞である傾向にある。この発明は、ある具体例において、この取り合わせを反映している

。

【0018】

適切には、未成熟細胞は、表層軟骨始原細胞である。

未成熟な軟骨始原細胞、例えば表層軟骨始原細胞と成熟な軟骨始原細胞を軟骨でみられるのと同じ又は類似の構造で配置すると、軟骨の成長及び修復に有用である。未成熟な軟骨細胞、例えば表層軟骨始原細胞と、成熟な軟骨始原細胞を軟骨で見られるのと同じ又は類似の構造で配置することの重要性は、これまでに知られていなかった。

【0019】

前記のとおり、これらの細胞は分化せず（又は分化能力が限られ）、軟骨の成長又は修復と関係しないということが、広く考えられていた。これは、細胞の平坦な外観と軟骨－骨の界面からのその距離に起因する事実であると考えられた。

適切には、第一及び第二表面間の距離が d_1 であるこの発明のインプラントは、第二表面から d_2 の深部までに、インプラントの残りの深部よりも高濃度の未成熟な軟骨始原細胞、例えば表層軟骨始原細胞を含む。ここで、 $d_2 / d_1 < 1$ であるが、 $d_2 / d_1 < 0.5$ 、 < 0.3 又は < 0.2 でもある。

【0020】

適切な生体適合性スカホールドは、軟骨始原細胞、例えば表層軟骨始原細胞を保持するようインプラント内で用いてもよい。スカホールド又は担体として作用するいずれかの適当な物質、例えばスルフェートイントラサイト（*Intra site*）ゲルを用いてもよい

。

インプラントは、単層、複層、マイクロビーズの形態又は本発明を実施し得る何れかの他の適当な形状であってもよい。

インプラントは、インプラントの強度を補助する補強成分を有していてもよい。好ましくは、インプラントは生体再吸収材からなる。

【0021】

また、この発明によれば、第一表面が骨－軟骨界面又はその近くに位置するのに適しており、第二表面が暴露された関節表面に接触して、又はその近くに位置するのに適した、インプラントの第一表面よりもインプラントの第二表面付近で、濃度の高い未成熟軟骨始原細胞、例えば表層軟骨始原細胞を局在又は配置する工程からなる、インプラントの製造方法が提供される。

また、この発明によれば、この発明のインプラントの近く、又はこれと接触させて、又はこれと関連させて細胞を配置することによる、軟骨形成の促進方法が提供される。適切には、軟骨形成が促進される細胞は、軟骨始原細胞又は軟骨細胞であろう。

【0022】

同様に、この発明によれば、この発明のインプラント近く、又はこれと接触させて、あるいはこれと関連させて軟骨始原細胞を配置することによる、軟骨始原細胞の分化の促進方法が提供される。

関連手段は、表層軟骨始原細胞が分化又は軟骨形成を生じることのできるいずれの手段であってもよい。

【0023】

結合材

この発明の別の観点によれば、骨－軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と、暴露された関節表面に接触させて、又はこれの近くに位置するのに適した第二表面を有し、第一表面と第二表面との距離が d_1 であり、インプラントの第二表面から d_2 の深部まで生体適合性スカホールドと軟骨始原細胞結合材を含み、 $d_2 / d_1 < 1$ である、軟骨欠損修復用インプラントが示される。

【0024】

この発明の別の観点によれば、骨－軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と、暴露された関節表面に接触させて、又はこれの近くに位置するのに適した第二表面を有し、第一表面と第二表面との距離が d_1 であり、インプラントの第二表面から d_2 の深

10

20

30

40

50

部まで生体適合性スカホールドと軟骨始原細胞結合材吸収性物質を含み、 $d_2 / d_1 < 1$ である、軟骨欠損修復用インプラントが示される。

【0025】

序文に述べたように、この発明の目的は、ひとつの具体例において、天然の軟骨、特に関節軟骨で同定される層状化組織構造及び組成を少なくとも幾つか回復することである。重要なことに、この発明の幾つかの具体例では、表層の構造と組成を回復することが望ましい。軟骨始原細胞結合材又は軟骨始原細胞結合材吸収性物質を第二表面（暴露面に接触するか、又はその近くに位置するのに適当な表面、つまり表層が従属している表面）からの従属領域に導入することによって、軟骨始原細胞は、インプラントのこの領域に引き寄せられて結合し、その結果、前述の目的に達するのに役立ち得る。

10

【0026】

ここで、物質が「生体適合性」であるというとき、それは、物質が哺乳動物の生体に外科的に導入される際、擬似外科手術のみの結果として生じることに加えて、臨床上著しい急性又は慢性的な副作用反応が本質的にないことを意味する。

「スカホールド」というとき、それは、三次元の少なくとも部分的に多孔性の構造物であり、その孔度は細胞が浸透できる程度で、スカホールドの暴露部分（内外双方）は、細胞の増殖と細胞外マトリクス（ECM）の生成が生じ、組織がつくられるように、細胞を接着させ、成長させることができる。

「軟骨始原細胞」というとき、それは、間葉幹細胞のような、軟骨細胞系の最初又はその付近にあり、一般に増殖能が高い細胞を意味する。

20

【0027】

「軟骨細胞系」というとき、それは、間葉幹細胞が、分化した有糸分裂後の軟骨細胞を最終的に生じるように成熟する経路を意味する。

「軟骨始原細胞結合材」というとき、それは、軟骨細胞系の最後にある細胞よりも、間葉幹細胞のような系の最初又はその付近の細胞に選択的に結合する物質である。

「軟骨始原細胞結合材吸収性物質」というとき、それは、上記のように軟骨始原細胞結合材を物理的に吸収する（つまり、非共有結合できる）か、又は化学的（つまり、共有架橋の作用を介して）に結合でき、それにより、軟骨始原細胞への結合親和性を増した複合体を形成できる物質を意味する。

【0028】

本発明によるスカホールドは、1つの層からなってもよく、又は複数の層からなってもよい。層又は各層は、上記のとおり三次元の少なくとも部分的に多孔性の構造からなる。層又は各層は、例えば三次元の織物又はニット織物（つまり、スパーサー織物）、フリース（つまり不織）材、スポンジ、発泡体、マイクロ担体ビーズ又はこれらの材の組み合わせからなってもよい。スカホールドが複数の層からなる場合、これらの層は全て同一の材からなってもよい。あるいは、各層は、幾つかの又は全ての他の層とは異なる材からなってもよい。

30

【0029】

この発明によるスカホールドが少なくとも1層の三次元の織物又はニット織物からなる場合には、層を熱硬化（heat set）することが好ましい。この工程は、織物に賦課した方向に再配置するよう分子を織物に生じ、織物をやや縮める。いずれの作用によっても、織物をより安定にすることができる。熱硬化は、この分野の当業者に公知であり、当該物質に依存した温度及び時間で行われる。

40

好ましい形態では、この発明によるスカホールドは2層からなる。有利には、1層は三次元のニット構造からなり、他方の層はそれに貼り合わされる不織（フェルト）材からなる。これらの2層は、ステッチ、縫製、（ニット層とフェルト層の1方又は双方に熱硬化繊維を導入することによる）熱結合などの種々の方法により、又は接着剤もしくはポリマー溶液によって互いに固定させてもよい。

【0030】

ここで用いられるように、用語「マイクロ担体ビーズ」は、細胞の接着を支持するか、又

50

は細胞結合表層を有することのできる何らかの微粒子材を意味する。そのような微粒子は、 $25 \sim 2000 \mu\text{m}$ の大きさであってもよく、好ましくは $100 \sim 250 \mu\text{m}$ の範囲である。そのようなビーズが構築される材の例は、架橋性タンパク質、多糖類、誘導性多糖類及び合成生体適合性ポリマー、例えばスカホールドの製造について後述されるポリマーである。市場で入手可能なマイクロ担体ビーズは、Pharmacia と Sigma によって提供されている。

スカホールドの層又は層類は、生体再吸収材又は非生体再吸収材からなってもよい。

【0031】

材が生体再吸収性であるというとき、それは、材が化学／生物学的作用によって時間をかけて崩壊することを意味し、用語「再吸収」ならびに「再吸収する」は、それに応じて解釈される。好ましくは、完全な再吸収は約5年以内に、より好ましくは約3年以内に生じる。生体再吸収材を用いる利点は、後に材を除く外科手術が不要であるように、それらが崩壊して、完全に組織を修復し、欠損部位を充填できることである。

10

【0032】

ある生体再吸収材を用いる場合、好ましい選択基準は、組織が材の内部でつくられるあいだは、材が有意に再吸収しないという条件である。この条件を満たすことにより、その形状と機械的完全性をも本質的に保持する、生細胞からなるインプラントが確実に生成される。数字の観点では、生体再吸収材を12週間インビボで移植する際、重量損失が5%未満であることが好ましい。より好ましくは、同一時間中、重量損失は2%未満である。他方、生体再吸収材が2以上あれば、インプラントを構造上完全にするため、生体再吸収材の少なくとも1つがこの基準を満たすことが好ましい。

20

【0033】

インビボでの再吸収時間が異なる、広範囲な生体再吸収材が知られている。材によって再吸収時間が変化するのみならず、1つの材自体の再吸収時間は分子量及び構造の配置で著しく変化することができる。最後に、異なる生体再吸収材をブレンド及び／又は共重合して、及び／又は成分の分子量もしくは結晶度を変えることによって、要求に対する生体再吸収材の再吸収時間を、近い将来、正確に調整できるものと思われる。

上記の点に留意すれば、本発明による生体再吸収材は、以下のモノマー又はポリマー混合物及び／又はそれによって形成されるコポリマーからなる生体再吸収ポリマー又はコポリマーからなってもよい：ヒドロキシ酸、特に乳酸、グリコール酸；カプロラクトン；ヒドロキシブチレート；ジオキサノン；オルトエステル；オルトカーボネート；アミノカーボネート。

30

【0034】

この発明による生体再吸収材は、コラーゲン、セルロース、フィブリン、ヒアルロン酸、フィブロネクチン、キトサン又はこれらの2以上の材の混合物のような天然の材からなってもよい。生体再吸収材は、誘導化された異種移植片及び／又は誘導化された同種移植片からなってもよい。

生体再吸収性セラミックが、スカホールド内に含まれてもよい。この発明により使用される生体再吸収性セラミックは、モノー、ジー、オクター、 α -トリー、 β -トリー及びテトラカルシウムリン酸、ヒドロキシアパタイト、フルオロアパタイト、硫酸カルシウム、フッ化カルシウム、酸化カルシウム又はこれらの2以上の材の混合物である。

40

【0035】

この発明による好ましい生体再吸収材は、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリジオキサノン、ポリカプロラクトン、ポリヒドロキシブチレート及びポリ（トリメチレンカーボネート）又はその混合物からなる。

特に、ポリ（乳酸）を用いることが好ましい。この材は、良好な機械的強度を有し、あまり迅速に再吸収せず、その結果、修復された組織が荷重のかかった機能を引き継ぐ時点で組織修復に十分な時間のあいだ、その機械的特性を保持できる利点を有する： A. G. A. Coombes 及び M. C. Meikle, 'Resorbable Synthetic Polymers as Replacements for Bone Gra

50

ft', Clinical Materials 17, (1994), pp 35-67 を参照すると、ポリ(乳酸)の試料は、12週間の試験に対しわずか1~2%の重量を損失しているにすぎないことが示されている。

【0036】

この発明による適当な非一生体再吸収材には、ポリエステル、特に芳香族ポリエステル、例えばポリエチレンテレフタレート(PET)及びポリブチレンテレフタレートのようなポリアルキレンテレフタレート；ポリアミド；ポリエチレン及びポリプロピレンのようなポリアルケン；ポリ(フッ化ビニル)ポリテトラフルオロエチレン炭素繊維、シルク(天然又は合成)、炭素繊維、ガラス及びこれらの材の混合物が含まれる。さらに、非再吸収セラミックを用いてもよい。そのような材の例は、純粋なヒドロキシアパタイト、ジルコニア及びアルミナである。非生体再吸収材の利点は、それらが本質的にその当初の機械特性つまり、強度が時間中に低減しないような特性を保持していることである。したがって、それらは、長期にわたって修復組織に機械的な支持を提供し得る。

【0037】

この発明によるスカホールドが2層—上記のようなフェルト層に貼り付けたニット層からなる有利な場合には、ポリ(乳酸)又はPETからなるようにニット層を製造し、かつポリ(グリコール酸)からなるようにフェルト層を製造することが特に好ましい。この発明の第一の観点の好ましい形態によれば、スカホールドは、抵抗性の機械的な荷重を補助するための構造内に補強成分を含むことにより補強されてもよい。スカホールドが複数の層からなる場合、ひとつの層から全ての層が補強されてもよい。補強成分は、スカホールドの製造について上記した生体再吸収性又は非生体再吸収性のポリマー型からなってもよい。好ましくは、補強成分は、スカホールド内の隣接する鎖に連結し、それによりその圧縮率を改善するようにスカホールドに添加される熱硬化溶融ポリマー又は熱硬化ポリマー溶液からなる。より好ましくは、補強成分はポリカプロラクトンからなる。

【0038】

上記補強材を提供するひとつの方法は、2つの「ニップ」ローラー間で織物を圧縮し、その上に溶融又は溶解した補強ポリマーのプールを供給することである。ローラー間で織物が圧縮され、引き出されるにつれて、少量の補強ポリマーがそれとともに運ばれ、これが、片側のローラーで織物が再度拡張した際に織物に取り込まれ、それにより織物をコーティングする。

本発明によるインプラントは、1MPa以上の圧縮率を有する少なくとも1つの層からなることが有利である。好ましくは、層又は層類の圧縮率は1~3MPaの範囲であり、より好ましくは、1~2MPaの範囲である。層又は層類の圧縮率は、固有の特性であるか、あるいは上記のような補強工程から生じててもよい。

【0039】

本発明により用いられ得る軟骨始原細胞結合材には、フィブロネクチン、I V型コラーゲン、抗ノッチ抗体、抗インテグリン β_1 抗体及びこれらの材の組み合わせが含まれる。

フィブロネクチンは、ひとつの遺伝子によってエンコードされる細胞外マトリクス糖タンパク質で、代替的なRNAスプライシング及び翻訳後修飾によって導入されるタンパク質不均一性が著しい。「フィブロネクチン」というときには、フィブロネクチン；フィブロネクチンの結合スプライス変異体、例えばFibronectin-EDA、又はフィブロネクチンエキストラドメインA(EIIIA又はEDIとも称される)、Fibronectin-EDB(EDIIB又はEDIとも称される)及びFibronectin-IIICS(V等とも称される)；ドメイン自体、例えばEDA、EDB；フィブロネクチンの同族体又はその成分ドメイン(配列等価性75%以上)又はフィブロネクチンの修飾変異体又はそのドメイン、例えばリンカー配列及び／又はポリHISのような生体適合物質結合配列に結合したEDA配列が含まれる。

【0040】

この発明の第一の観点の好ましい形態では、軟骨始原細胞結合材は、Fibronect

in-EDA (EDAドメイン自体及び／又はリンカーに結合したEDAドメインは生体適合物質表面に結合できる) からなる。Fibronectin-EDAのようなフィブロネクチンのスプライス変異体は、天然の関節軟骨の表層に濃縮していることが知られている。インプラントの表層に上記の材が結合することにより、機器表面への軟骨始原細胞の付着の選択性が増し得る。

この発明による軟骨始原細胞結合材吸収性物質は、ヘパリン、スルフェートイントラサイト^{T M}及びテトラヒドロフルフルルを含むポリアニオンである。これらの材はこの発明によるインプラント内に含まれると、移植後に周囲の組織から天然に存在する上記のような軟骨始原細胞結合材を吸収することができる。あるいは、軟骨始原細胞結合材は、移植の前後にインプラントに添加されてもよい。

10

【0041】

上記のように、この発明によるインプラントは、軟骨始原細胞結合材又は軟骨始原細胞結合材吸収性物質からなる。これらの物質はスカホールドの第二表面に被覆された層内に含まれてもよく、又はスカホールド自体又はその双方の内部に含まれてもよい。

また、上記のように、インプラントの第一表面と第二表面との距離が d_1 であれば、インプラントは、 $d_2 / d_1 < 1$ であるように、インプラントの第二表面から深部 d_2 まで軟骨始原細胞結合材又は軟骨始原細胞結合材吸収性物質を含む。好ましくは、 $d_2 / d_1 < 0.5$ 、より好ましくは $d_2 / d_1 < 0.3$ 、もっとも好ましくは $d_2 / d_1 < 0.2$ である。

【0042】

20

インプラント内に配置される軟骨始原細胞結合材又は軟骨始原細胞結合材吸収性物質は、連続的な濃度勾配又は一連の不連続段階からなる濃度勾配として一定濃度で存在してもよい。いずれかのタイプの濃度勾配として存在する場合には、濃度は、第一表面から第二表面への直接移動又は第二表面から第一表面への移動で増加する可能性があるが、濃度は、第一表面から第二表面への直接移動で増加することが好ましい。というのは、最高濃度、つまり最大の結合度は、スカホールドの第二表面に向かって有利に生じるからである。一般的に、軟骨始原細胞結合材又は軟骨始原細胞結合材吸収性物質からなる領域の厚み、つまり第二表面からの深部 d_2 は、 $0.05\text{ mm} \sim 8\text{ mm}$ 、より好ましくは $0.2\text{ mm} \sim 8\text{ mm}$ である。

【0043】

30

序文に述べたように、表層以外の層にみられるあるECM成分は、構造の形成と維持ならびにそれらの層の組成に寄与しているものと考えられる。この発明の第一の観点の好ましい形態では、インプラントは、軟骨、特に関節軟骨、例えばI型コラーゲン、II型コラーゲン、VI型コラーゲン又はビトロネクチンの表層以外の層に見られる細胞を結合し得る別の細胞結合材をさらに含む。これらの材は、 $d_3 / d_1 < 0.8$ であるようにインプラントの第一表面から深部 d_3 までインプラント内に含まれる。好ましくは、 $d_3 / d_1 < 0.7$ 、より好ましくは $d_3 / d_1 < 0.5$ である。

【0044】

前記の記載から明らかなように、この発明によるインプラントは細胞を有することを意図する。これは、滅菌インプラントが周囲の宿主組織からインプラントに移動する細胞を有することによって達成され得る。このような移動過程は、例えばマトリクス分解酵素又は走化性因子をインプラント内とその周囲に導入して補助され得る。

40

あるいは、自己又は同種異系の軟骨始原細胞を、インプラントに添加してもよい。適当な軟骨始原細胞源には、未分化間葉細胞の何らかの源（例えば骨髄、精製されるか、又は増加した骨髄間質細胞群、血管周囲細胞、骨膜、軟骨膜、脂肪又は骨膜もしくは軟骨膜のカンプリア層由来細胞）が含まれる。これらの細胞は、移植前後に加えてもよい。

【0045】

この発明の別の観点によれば、上記のインプラントを外科的に移植する工程からなる、哺乳動物生体の軟骨欠損の治療方法が提示される。

この発明の別の観点によれば、方法は、支持体マトリクスに軟骨始原細胞結合材を結合さ

50

せ、それを介して又はその間、細胞混合物をとすか、又はそれによって静置させ、その結果、軟骨始原細胞を軟骨始原細胞結合材に接着させ、洗浄し、汚染細胞を除く工程からなる、少量の細胞混合物として存在する軟骨始原細胞を選択的に濃縮することを提示している。

【0046】

この発明の特別な観点による方法では、軟骨始原細胞からなる細胞混合物は、例えばワルトンゼリー (Whartons jelly)、骨髓、関節軟骨の表層、骨膜又は軟骨膜のような初期間葉組織前駆細胞の軟骨源及び非軟骨源に由来してもよい。

この発明のひとつの具体例による支持体マトリクスは、ペトリ皿又はアフィニティカラムであってもよく、結合は物理的又は化学的であってもよい。最後の工程は、例えば培養培地での穏やかな洗浄からなってもよい。

【0047】

出願している図を参照する。

図1. 1は、N1 (ノッチー1) の免疫学的局在性を示す。N1を発現しない新生ウシ関節軟骨細胞の表層の上部の2~3細胞層にほぼ完全に制限されていることが分かっている。N1発現 (緑、1. 11) は、ヨウ化プロピジウムによって対比染色される (赤、1. 10)。矢印1. 13は、関節表面を示す。

図1. 2は、図1. 1の拡大図である。

図1. 3は、Fibronectin-EDAの免疫学的局在性を示す。Fibronectin-EDA発現は細胞結合性で、関節軟骨の外表面にほぼ完全に制限されている (緑、1. 31)。Fibronectin-EDAを発現しない細胞は、ヨウ化プロピジウムによって対比染色される (赤、1. 32)。矢印 (1. 33) は、関節表面を示す。

【0048】

図1. 4は、中央層でのFibronectin-EDAについて最小限の免疫学的局在性を示す。

図1. 5は、図1. 4のコントロールを示す；コントロール区分、緑染色がないことに注意。

図1. 6は、N1免疫学的局在性を示す。

図1. 7は、Fibronectin-EDAの免疫学的局在性の図である。

図1. 8は、未成熟なウシ軟骨におけるN1とFibronectin-EDAの同時局在を示す。N1免疫局在 (緑、1. 81)、フィブロネクチン-EDA免疫局在 (赤、1. 82) の重層。矢印は、関節表面を示す。これは、N1発現細胞もフィブロネクチン-EDAを発現することを示している。

【0049】

図1. 9は、「早期-フィブロネクチン結合 (fast-fibronectin binding)」表層のコロニー形成効率が、他の軟骨細胞群に見られるよりも著しく高かったグラフを示している ($p < 0.01$)。

図1. 10は、「早期-フィブロネクチン結合」表層細胞によって形成されるコロニーの顕微鏡写真である。

図1. 11は、軟骨細胞単離直後のノッチ標識を示す。FACS分析を用いる軟骨細胞による特異なN1発現の分析。約75%の表層、10%の中央層及び25%の深層の細胞が、組織からの単離直後のN1に陽性であった。

【0050】

図1. 12は、ノッチ陽性細胞の磁気ビーズ分離を用いて6日目のコロニー形成効率についてのN1陽性選択の作用を示す。N1陽性の中央層及び深層の細胞のものより、N1陽性表層細胞由来のコロニーが著しく多かった ($p < 0.001$)。

図1. 13は、FACSを用いる表層軟骨細胞による特異なインテグリン発現の分析である。

図1. 14は、表層、中央層及び深層の軟骨細胞の平均細胞径のグラフである (平均土

S E M)。表層、中央層及び深層の軟骨細胞の平均細胞サイズの測定。S Z C（表層軟骨細胞）とM Z C（中央層軟骨細胞）（ $p < 0.05$ ）ならびにS Z CとD Z C（深層軟骨細胞）（ $p < 0.005$ ）との直径には有意差がある。

【0051】

図1. 15 a、b、cは、相対比光学（phase contrast optics）を用いてそれぞれ視覚化されたS Z C、M Z C及びD Z Cの代表写真である（倍率 $\times 200$ ）。

図1. 16は、ペレット培養の組織学的研究を示す。「早期－結合」表層軟骨細胞ペレットのH+E染色は、試料図1. 16 a（7日；S Z C；H+E； $\times 500$ obj）及び図1. 16 b（7日；S Z Cエッジ；H+E； $\times 200$ obj）全体に形態学的に正常で生存力ある細胞の存在を示した。 10

図1. 17は、ペレット培養の組織学的研究を示す。ピクロシリウスレッド（Picrosirius red）は、特に細胞を取巻く領域のマトリクスでコラーゲンの沈着を示した（21日； $\times 200$ obj）。

【0052】

図1. 18は、ペレット培養の組織学的研究を示す。グリコサミノグリカンのサフラニンO染色は、細胞によって産生される細胞外マトリクスの濃い暗橙色染色を呈し、細胞がプロテオグリカン－リッチなマトリクスを分泌することを示した（21日；S Z C； $\times 500$ obj）。

図1. 19は、ペレット培養の免疫細胞化学研究を示す。免疫化学は、細胞がペレット培養で軟骨特異的なマトリクス成分を合成していたことを示した。ペレット中の細胞外マトリクスは、I I型コラーゲンを含んだ（14日；S Z C； $\times 200$ obj）。 20

【0053】

図1. 20は、ペレット培養の免疫細胞化学研究を示す。I型コラーゲンの不在は、細胞が分化して軟骨細胞を形成し、脱分化が生じていないことを示す（14日；S Z C； $\times 200$ obj）。

図1. 21は、ペレット培養のマトリクスにおけるコンドロイチン4スルフェートの存在を示す。

図1. 22 は、ペレット培養のマトリクスにおけるコンドロイチン6スルフェートの存在を示す。 30

図1. 23は、ペレット培養中の関連結合タンパク質の分布を示す蛍光画像である（10日； $\times 1260$ obj）。

図1. 24は、部分的に厚みのある軟骨欠損に移植された表層、中央層及び深層の軟骨細胞のペレット培養を示す。

【0054】

図1. 25は、発達中の軟骨、例えば耳の盃状窩（otic cup）を含む胚のCFDA SE標識細胞域を用いるインオボ（in ovo）の軟骨始原細胞追跡を示す。

図1. 26は、H&H段階30－32のニワトリ胚の軟結合組織におけるCy3－接合第二抗体で局在化されるウシMHC1陽性細胞を示す（倍率 $\times 126$ ）。

図1. 27は、H&H段階30－32のトルイジンブルー染色したニワトリ胚を示す。 40
ひよこの翼のウシ異所性軟骨は、注入された表層軟骨細胞から生じた。

A. 崩壊した異所性軟骨のメタ染色性顆粒染色。

B. 周囲の繊維組織。

【0055】

図2. 1と2. 2は、培養物の「層状化」領域の潜在的な形態とプロフィールを示す。

図2. 3は、細胞接合因子被覆スルフェートに結合した骨髓間質細胞を示す。16時間以内のイントラサイトと増殖。

図2. 4は、4日後の材表面上の接着細胞群を示すカルセイン（calcein）AM染色を示す。

図2. 5は、ピクロシリウスレッドで示される培養物中の7日後のコラーゲンマトリクス 50

の沈着を示す。

図 2. 6 は、10 日後のフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトで培養される骨髄間質細胞の試料における I 型コラーゲンの産生を示す免疫化学を示す。

図 2. 7 は、コラーゲン I I の産生の証拠が認められないことを示している。

【0056】

図 2. 8 は、材粒子表面上とそれらの間の空間の双方における、凝集物全体にわたる生存力ある細胞を示す M T T 染色を示す。

図 2. 9 a は、細胞が、ピクロシリウスレッドで染色された凝集物内に膠原マトリクスを沈積していることを示し、また軟骨細胞が特異的な軟骨形態のコラーゲン、I I 型コラーゲンを発現したことを免疫細胞化学的に示している (図 2. 9 b)。

10

図 2. 10 は、細胞表面マトリクスへ軟骨細胞がコラーゲン V I を分泌していることを免疫細胞化学により示している。

図 2. 11 は、培養中 27 日後ですら、軟骨細胞がコラーゲン I を産生していないことを免疫細胞化学により示している。

【0057】

図 2. 12 は、ウシの軟骨細胞が、最初の 10 日間に生じるかなり迅速な発生を伴って培養期間中 14.4 倍に増すことを示すグラフである。

図 2. 13 は、二層の繊維補強細胞／生態適合性構築物を形成するためのスカホールドに (I) 骨髄間質細胞を接種したフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト及び (I I) 軟骨細胞－接種被覆スルフェートイントラサイトを連続的に遠心分離することによ

20

る、二層構築物の形成に用いられる使用装置及び方法の概要を示す。

図 2. 14 は、遠心分離回転の回転方向に対する「非対称カラー」の好ましい方向とローターの根軸を示す。

図 2. 15 は、着色したスルフェートイントラサイトの二分子層の沈着を示す。

【0058】

図 2. 16 は、(I) ピコグリーン (p i c o g r e e n) 染色した骨髄間質細胞を接種した、フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトの層及び (I I) E t B r H D 染色した軟骨細胞を接種した、被覆スルフェートイントラサイトの層からなる二分子層構築物を示す。

図 2. 17 は、コントロールに比較した、2つのフェルトにおける緑蛍光の定量を示す。直接的な外観では、下部のフェルトを同一細胞群で接種する前の 30 分間、フィブロネクチンで被覆され、軟骨細胞混合群で接種された上部のフェルトに多量の N 1 + 蛍光がある。

30

図 2. 18 は、種々の層における緑蛍光の定量を示す。直接的な外観では、フィブロネクチンで被覆した上部表面を有するフェルトの上部表面に多量のノッチ 1 + 蛍光がある。

【0059】

図 3. 1 a ~ 3. 1 d は、この発明によるインプラントを示す。

図 3. 2 a ~ 3. 2 c は、多層インプラントを製造するための、細胞結合特性及び浮遊密度／沈降速度が異なる被覆マイクロビーズの使用を例示している。沈降速度の異なる 2 種のマイクロビーズ (微粒子体) を軟骨細胞懸濁液に混合し (図 3. 2 a)、凝集させる (図 3. 2 b)。マイクロビーズ型の 1 つは、軟骨始原細胞を選択的に結合する材で被覆されるが、他方のマイクロビーズ型は、別の細胞種 (例えば下方の軟骨細胞系に見られる多くの成熟軟骨細胞) に選択的に結合する。細胞の接着後、細胞被覆マイクロビーズが沈降されて、多層沈着物を形成する (図 3. 2 c)。次いで、沈着物が一緒になって、元の場所で硬化する結合材 (例えばアルギネートゲル) を用いてインプラントを形成する。

40

【0060】

図 3. 3 a ~ 3. 3 c は、沈降速度の異なる 2 種以上のマイクロビーズと組み合わせさせた、3 D-ユニットであり得るスカホールド材を用いる多層インプラントの製造を例示する。

図 3. 2 にあるように、あるマイクロビーズ型を軟骨始原芽細胞結合材で被覆し；別の型を別の細胞種 (例えば下方の軟骨細胞系に見られる多くの成熟軟骨細胞系) を選択的に結

50

合する材で被覆する。図 3. 2 にあるように、マイクロビーズを軟骨細胞の懸濁液と混合し（図 3. 3 a）、懸濁液中の細胞と相互作用させ（図 3. 3 b）、生体適合性スカホールドの空のスペースに沈降させて多層インプラントを形成する（図 3. 3 c）。

【0061】

図 3. 4 a～3. 4 c は、均質な紙（*graded filter*）として役立つことを目的とした、3D-ニットであり得る、大きさ、細胞結合親和性及び生体スカホールド材の異なる 2 種以上のマイクロビーズとの組み合わせを用いる多層インプラントの製造を例示する。前記の図にあるように、あるマイクロビーズ型は軟骨始原細胞結合材で被覆され；他方は、下方の軟骨細胞系に見られる別の細胞種に選択的に結合する材で被覆される。細胞結合粒子と軟骨細胞（示さず）を混合し（図 3. 4 a）、細胞をある又は別の群のビーズに選択的に結合させた（図 3. 4 b）。細胞被覆マイクロビーズを均質な紙に出す。別の型のマイクロビーズよりもさらに小さいマイクロビーズ（ある細胞型で被覆）をさらにろ紙に出し、（細胞型が異なるので）、それにより層状化装置を生ずる。

10

【0062】

図 3. 5 は、本発明によるインプラントの概略図である。

図 3. 6 は、種々のリガンドへの最初の結合から 4 日後の表面と D Z C のコロニー形成効率を示す（FN、フィブロネクチン； C I、コラーゲン I； C I I、コラーゲン I I； B S A、ウシ血清アルブミン； C I V、コラーゲン I V； L M、ラミニン； T N、テンサシン（*tensacin*））。合計した 3 実験の平均（ $\pm$ s e m）、n = 4 ディッシュ／リガンド／実験。

20

図 3. 7 は、P B S 被覆スルフェートイントラサイトに比較される、フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトへの表層細胞結合を形成する多くのコロニーを示すコロニー涸渇アッセイの使用を示す。結果は、4 個の複製マルチウェルプレートの 12 ウェルそれぞれで形成されるコロニー数である。

【0063】

図 3. 8 は、P B S、血漿フィブロネクチン、細胞性フィブロネクチン、コラーゲン I V、ラミニン又はポリリジンで被覆したスルフェートイントラサイトへのコロニー形成骨髄間質細胞結合を比較するコロニー涸渇アッセイの使用を示す。血漿フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトは、コロニー形成細胞に最も高い親和性を有するが、コラーゲン I V 被覆イントラサイトは、コロニー形成細胞結合について高いレベルを示す。

30

【0064】

この発明の好ましい具体例を、これらの図を引用して詳細に説明する：

図 3. 1 は、この種の装置の 4 つの可能性ある具体例を示す：

図 3. 1 a は、不織ポリマーフェルトからなる単層スカホールドからなるインプラントを示す。その上部（関節）表面（3. 2）から拡張しているスカホールドの一部は、軟骨始原細胞結合材（例えばフィブロネクチン）からなる。下方の（骨-接触）表面（3. 1）は、軟骨始原細胞結合材を含まない。

図 3. 1 b は、三次元のニット織物からなる、単層のスカホールドからなるインプラントを示す。インプラントは、軟骨始原細胞結合材（例えばフィブロネクチン）からなる被覆材で被覆される上部（関節）表面（3. 2）を有する。また、下方（骨接触）表面（3. 1）は、軟骨始原細胞結合材を含まない。

40

【0065】

図 3. 1 c は、中に軟骨始原細胞結合材（例えばフィブロネクチン）を配置した三次元ニット織物からなる単層スカホールドからなるインプラントを示す。上部（関節）表面（3. 4）がインプラントの深部領域、特に下方の表面（3. 3）より軟骨始原細胞に高い親和性を有するように、該表面からの距離に伴って濃度を減じる軟骨始原細胞結合材の濃度勾配がある。

図 3. 1 d は、三次元のニット織物の上部（関節）層と高度に適合性の不織材の下方（骨接触）層を導入する、二層スカホールドからなるインプラントを示す。軟骨始原細胞結合材（例えばフィブロネクチン）は、装置の上部（関節）表面（3. 6）が深部の骨界面層

50

(3.5)より軟骨始原細胞に高い親和性を有するように、装置内に含まれる。軟骨始原細胞結合材は、下方層に拡張してもよく、あるいは、層の厚みに応じて上部の層に制限されてもよい。

【0066】

軟骨始原細胞結合材で被覆されたマイクロビーズからなるスカホールドからなるインプラント

この発明によるインプラントは、軟骨始原細胞結合材で被覆されたマイクロビーズからなってもよい。そのような場合、スカホールドは非被覆ビーズからなってもよく、被覆されたビーズは、スカホールドの第二表面から下方、深部 d_2 に位置するように配置される。このような配置は、例えば大きさ又は密度が他の型と異なるビーズ型を生じることによるなどの幾つかの方法によって成すことができる。

さらにこの概念を工程に考慮すれば、軟骨始原細胞結合材で幾つかのビーズを被覆し、軟骨の中央層び深層、特に関節軟骨に一般に見られる他の細胞、例えば多くの成熟軟骨細胞（下方の軟骨細胞系）を結合する材で他のビーズを被覆することができる。図3.2a～3.2c、3.3a～3.3c及び3.4a～3.4cでは、2つの異なる細胞種を以下の記号によって示している：

【0067】

【化1】



20

【0068】

軟骨始原細胞結合材の例は、この場合フィブロネクチン-E D Aであり、深層の結合材の例はコラーゲンV Iである。フィブロネクチン-E D AとコラーゲンV Iは、マイクロ担体ビーズのような、大きさ、密度及び／又は沈降速度の異なる2つの異なるタイプの微粒子生体物質で被覆される。図3.2a～3.2c、3.3a～3.3c及び3.4a～3.4cでは、2つの異なるビーズ型を以下の記号で示している：

【0069】

【化2】



30

【0070】

マイクロ担体ビーズは沈降されて多層沈積物を形成する。これは、アルギネート又はプルロニックゲルのような結合剤で凝集され、2つの結合剤それぞれがその適当な層に本質的に制限されるインプラントを生ずる（図3.2a～3.2c参照）。あるいは、被覆されたビーズは、スカホールド材上に沈降し、次いで結合剤をその後適用するか、適用せずに使用することができる（図3.3a～3.3c参照）。また、あるいは2種のビーズの大きさが異なっていれば、均質な紙として役立つスカホールドにそれらを封入して分離し（図3.4a～3.4c参照—細胞示さず）、それにより、大きな粒子よりも小さい粒子が（細胞型の異なる）ろ紙内にさらに出され、この結果、多層装置が生ずる。

40

【0071】

図3.5に関して、本発明によるインプラント（3.7）の概略図を示す。このインプラントは、骨—軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一下方表面（3.8）及び暴露された関節表面に接触して、又はその近くに位置するのに適した第二の上部表面（3.9）を有する。第一表面と第二表面との距離は、 d_1 である。第二表面から d_2 の深部まで、インプラントは軟骨始原細胞結合材を含む。第一表面（3.8）から d_3 の深部まで、インプラントは、軟骨の表層以外の層に見られる細胞を結合し得る、コラーゲンV Iのような別の細胞結合材を含む。

【0072】

50

さらに本発明の別の観点によれば、成熟軟骨細胞結合材からなる軟骨欠損の修復用インプラントが提供される。適切には、成熟軟骨細胞結合材は、I型コラーゲン、II型コラーゲン、VI型コラーゲン又はビトロネクチンである。

【0073】

実施例1：表層軟骨始原細胞の特性

要約

この実施例は、健康な関節軟骨の表層内に軟骨始原細胞の層が存在することを実証する：

1. 無傷の軟骨の免疫細胞化学分析は、軟骨始原細胞が、特有の組織位置（すなわち表層内）、隣接する軟骨細胞と異なるコントロール系（例えば、シグナルレセプターN）、及び特有の細胞外マトリクス質（フィブロネクチンスプライス変異Fibronectin-EDAを含む）を有することを示す。 10

2. インビトロ分析は、細胞がフィブロネクチンを迅速に結合し、高いコロニー形成効率（始原細胞用「ゴールドスタンダード」試験）、インテグリン発現の特異なパターン、及び平均より小さい細胞サイズを有することを示す。インビトロ分析は、抗ノッチ抗体被覆磁気ビーズを用いて細胞を増強できること、及びノッチ陽性細胞がコロニー形成活性を強化することも示している。

【0074】

3. 細胞のペレット培養物は表層始原細胞が軟骨を形成できることを示し、それらが軟骨産生細胞系の一部であることを立証している。

4. 損傷した軟骨に接触させて始原細胞をインキュベートしたところ、損傷した軟骨における細胞死及びマトリクス崩壊が減少し、始原細胞が軟骨損傷の修復を促進し得ることを示している。 20

5. 細胞は、インオボで血管内注入されれば、発達中の軟骨組織に集中し、それらが未分化な間葉前駆体というよりむしろ軟骨始原細胞であることを示唆している。

【0075】

上記性質が組み合わさった細胞は、中間層や深層の軟骨では見られない。表層軟骨始原細胞も、骨髄間質から得た早期の間葉細胞とは異なる。なぜなら、間質細胞コロニーは線維芽細胞性であり、4日以内に形成されるのに対して、表層軟骨細胞はより長期間で（通常6日間）球状の細胞コロニーを形成するからである。これらの結果をまとめると、表層細胞が間葉細胞系ファミリーの軟骨細胞分枝内で特異な前駆体細胞期を構成していることが分かる。マーカー発現の詳細なパターンは、種によって加齢及び疾患又は損傷修復期間中で異なる一方、この始原細胞層の存在は、おそらく関節軟骨の発達、維持及び修復の継続的な特徴であろう。 30

【0076】

実施例1.1：ウシの新生関節軟骨表層内の軟骨始原細胞の免疫細胞化学的証拠

方法

凍結軟骨切片の準備。 2～3週齢のウシの中足指節関節から、全層関節軟骨の細片（約30mm×3mm）を取り出し、OCT（Gurr）に包埋し、液体窒素で冷却されたイソペンタンスラッシュを用いて凍結した。切片（7μm）を、Leica Jung CM3000クリオスタットを用いて試料から切り取り、ポリリジン被覆スライドガラス（Sigma）の上に置いた。切片を、室温で10分間アセトンに浸漬して固定し、空気乾燥させた。スライドは使用するまで-20℃で保管した。 40

【0077】

N1の免疫局在決定。 切片をPBS中で洗浄し（2×10分；Oxoid）、PBS中の正常な2.5%ウサギ血清（Dako）で20分間室温でブロックした。ペーパーティッシュを用いてブロッキング溶液を吸い取り、ポリクロナルヤギ抗ヒトN1（C末端）抗体（PBS中20μg/ml；Santa Cruz）又は同濃度の非免疫ヤギIgG（Dako）で切片を1時間室温でインキュベートした。切片をPBSで洗浄し（3×10分）、ウサギ抗ヤギFITC結合体のPBS中1：100希釈液と室温で45分間インキュベートし、続いてPBS中で3×10分間洗浄した。ヨウ化プロピジウムを含むVe 50

ctashield (Vector) に切片をのせ、カバーガラスで覆って、488 nm 及び 568 nm で励起する ArKr レーザーを用いた Leica DM-RE 共焦点顕微鏡を使用して観察した。

【0078】

Fibronectin-EDA の免疫局在決定。ウシの新生関節軟骨の凍結切片をヒアルロニダーゼで消化し (5 μ g/ml、37℃、1時間; Sigma)、細胞周囲のマトリクスを露出させ、PBS で洗浄し (2×10分)、PBS 中の正常な 2.5% ウサギ血清 (DAKO) で 20 分間ブロックした。ペーパーティッシュを用いてブロッキング溶液を吸い取り、切片を、マウスモノクローナル抗フィブロネクチン-EDA 抗体 (PBS 中 50 μ g/ml; Oxford Biotechnologies) 又は同濃度の非免疫マウス IgG 1 (Dako) と 4℃ で一晩インキュベートした。試料を PBS で 3 回洗浄し、ビオチニル化ウサギ抗マウス二次抗体 (PBS 中 1:100 希釈; Dako) とインキュベートし、PBS 中で 3 回洗浄し、ストレプトアビジン-FITC 結合体で処理した (PBS 中 1:100 希釈; 60分; Amersham)。切片を PBS 中で 3 回洗浄し、共焦点顕微鏡検査で観察した。

【0079】

未成熟なウシの軟骨における N1 及び Fibronectin-EDA の共局在。切片をブロックし、2つの一次抗体培養物を結合させた (上記に記載)。N1 にはウサギ抗ヤギー FITC 結合二次抗体 (Dako) を、フィブロネクチン-EDA にはビオチニル化ウサギ抗マウス二次抗体、続いてストレプトアビジン-テキサスレッド (Streptavidin-Texas Red) 結合体 (Amersham Pharmacia) を使用して検出を行った。

【0080】

結果

N1 の免疫局在決定。N1 発現 (緑) は、ウシの新生関節軟骨の表層の上部 2~3 細胞層にはほぼ限定されているのが示された (図 1. 1 及び 1. 2)。N1 を発現しない細胞は、ヨウ化プロピジウムにより赤に対比染色される。矢印は関節表面を示す。

フィブロネクチン-EDA の免疫局在決定。フィブロネクチン-EDA 発現が細胞に関連しており、関節軟骨の表層にはほぼ限定されていることを結果は示した (図 1. 3)。少量の蛍光が中間層に見られるが (図 1. 4)、これはコントロールの切片にも見られたので (図 1. 5)、非特異的な染色である可能性がある。Fibronectin-EDA を発現しない細胞は、ヨウ化プロピジウムにより赤に対比染色される。矢印は関節表面を示す。

【0081】

未成熟なウシの軟骨における N1 及び Fibronectin-EDA の共局在。図 1. 6、1. 7 及び 1. 8 は、それぞれ N1 免疫局在決定、フィブロネクチン-EDA 免疫局在決定及び 2つの画像を重ね合わせたものを示す。矢印は関節表面を示す。重ねた画像は、N1 発現細胞がフィブロネクチン-EDA も発現することを示す。コントロールの画像は蛍光を示さなかった (画像示さず)。

【0082】

考察

これらの結果は、ノッチ陽性及びフィブロネクチン-EDA 陽性軟骨始原細胞の群が健康な関節軟骨の表層内に存在するという仮説と一致する。ノッチ及びフィブロネクチン-EDA は、非軟骨組織の始原細胞のマーカーとしてこれまで認識されてきた。ノッチレセプターは、細胞内の転写因子発現を変えるシグナル系の一部であり、細胞が分化するのを防ぐ。フィブロネクチン-EDA は、始原細胞又は未分化細胞がたくさんある状況 (例えば、胚発生、損傷修復及び腫瘍形成) で産生されるため、フィブロネクチンの「腫瘍-胎児 (onco-fetal)」形態として記述されてきた。フィブロネクチン-EDA は、初期始原細胞を支持する特殊な細胞外マトリクスの一領域である「幹細胞-ニッチ」の構成部分であるかもしれない。共局在実験は、表層内の細胞により 2つのマーカーが同時

に発現され、個々の標識細胞に識別可能なパターンが無かったことを示した。これは、ノッチ及びフィブロネクチン-EDAが、軟骨細胞分化の2つの別個の、又は重なる段階を標識するという仮説と一致せず、表層軟骨始原細胞が表層内に存在する十分に均質な細胞の集団であることを示す。

【0083】

実施例1.2：表層軟骨細胞のインビトロ特性決定

方法

ウシの関節軟骨からの表層、中間層及び深層細胞の分離。ウシの新生中足指節関節から表層、中間層及び深層の軟骨を切除し、プロナーゼ(DMEM/5% FCS中0.1%; 3時間; Merck 4×10^6 単位/g)及びコラゲナーゼ(DMEM/5% FCS中0.04%; 16時間静かに振盪; Worthington 237 U/mg)中で連続的に消化することにより軟骨細胞を放出させた。組織消化物を、濾過し(70 μ m細胞ストレーナー; Falcon)、遠心分離し(1000 rpm; 5分)、無血清DMEM(10 ml)で洗浄し、再び遠心分離して、無血清DMEM中に再懸濁させた。

フィブロネクチン被覆培養プラスチックの製造。24ウェル培養プレート及び35 mm ペトリ皿を、ウシの血漿フィブロネクチン(1 mM $MgCl_2$ 及び1 mM $CaCl_2$ を加えたダルベッコのPBS中に10 μ g ml⁻¹; 16時間; 4°C)又は賦形剤で被覆し、1% BSAでブロックした。

【0084】

フィブロネクチン及びPBS被覆皿への細胞接着。表層、中間層及び深層の関節軟骨細胞(4000細胞/ペトリ皿)を、フィブロネクチン(FIBRONECTIN、10 μ g ml⁻¹)又はPBS被覆の35 mmの皿に20分間植えつけた。未接着細胞を取り除き、新しいFIBRONECTIN又はPBS被覆皿にさらに40分間置いてから、もう一度未接着細胞を取り除いた。

20分及び40分間フィブロネクチンに識別接着された表層、中間層及び深層の軟骨細胞のコロニー形成効率。表層、中間層及び深層の関節軟骨細胞(4000細胞/ペトリ皿)を、フィブロネクチン(FIBRONECTIN 10 μ g ml⁻¹)又はPBS被覆皿に20分間植えつけ、未接着細胞を取り除き、それを同様に処理した皿に40分間植えつけてから未接着細胞を取り除いた。形成されたコロニー数(>4細胞)を6日及び10日間培養後評価し、「コロニー形成効率」(すなわち、コロニー数/最初の接着細胞)として表した。

【0085】

蛍光活性化細胞分類(FACS)分析を用いた、表層軟骨細胞による特異なインテグリン及びN1発現の分析。1 mM $MgCl_2$ 及び1 mM $CaCl_2$ (PBS+)を含むPBS中の10 μ g ml⁻¹のウシのフィブロネクチン(Sigma, UK)で、ペトリ皿(35 mm)を一晩4°Cで被覆した。軟骨細胞を添加する前に、PBS+中の1% BSAで皿をブロックした。コントロールの皿をPBS+で一晩4°Cで処理した。7日齢の子ウシの表層、中間層及び深層の関節軟骨から軟骨細胞を前述のとおり単離した。単離後、0.1% ゲンタマイシンを含むDMEM中で軟骨細胞(4,000 ml⁻¹)を35 mm プラスチック皿に37°Cで20分間植えつけた。20分後、培地(及び未接着細胞)を取り除き、第二皿に37°Cで40分間置いてから、この培地(及び未接着細胞)を取り除き、第三皿に置いた。20分及び40分後に培地を取り除いた後、ゲンタマイシン及び1% FCSを含む新鮮なDMEMを残っている接着細胞に添加し、10日間まで培養を維持した。

【0086】

プロナーゼ/コラゲナーゼ連続単離直後、及び識別接着後の異なる時点において軟骨細胞を非酵素的に皿から除き、PBS中の 1×10^6 細胞 ml⁻¹で再懸濁した。 2×10^5 細胞を、室温で3時間 $\alpha 5$ 及び $\beta 1$ インテグリンのサブユニットならびにN1に対する抗体とインキュベートした。細胞を2,500 rpmで遠心分離し、上澄みを除去し、各洗浄の間に遠心分離を行いながら細胞をPBS中で3回洗浄した。次いで、細胞を1時間室

温で適切な F I T C 結合二次抗体とインキュベートし、上記のとおり P B S 中で 3 回洗浄した。最後に、標識細胞を 2 0 0 μ l の P B S 中に再懸濁させ、シングルチャンネル F A C S 分析にかけた。

【0087】

表層、中間層及び深層の軟骨細胞の平均細胞サイズの測定。精密切開及びプロナーゼ／コラゲナーゼ連続消化作用を用いて、1～3週齢のウシの中足指節関節の関節軟骨から表層（S Z C）、中間層（M Z C）及び深層（D Z C）の軟骨細胞を単離した。単離細胞懸濁液のアリコート血球計数器に分注し、カバーガラスで覆った。O l y m p u s C K 4 0 倒立顕微鏡を用いて細胞を観察し、画像内に細胞が十分存在するか（ $n > 120$ ）を確認しながら倍率 $\times 100$ で撮影した。グラティキュールで目盛を定めたソフトウェア付き I m a g e - P r o を用いて画像分析を行い、画像内に存在する細胞の平均直径を測定した。

10

【0088】

結果

「早期－フィブロネクチン結合」表層軟骨細胞によるコロニー形成。添加された細胞のうち3～4時間後に結合したものの%として表した、フィブロネクチン被覆組織培養プラスチックへの最初の細胞接着を表1に示す：

【0089】

【表1】

接 着 時間	表層フィブロ ネクチン	表 層 PBS	中間層フィブ ロネクチン	中 間 層 PBS	深層フィブロ ネクチン	深 層 PBS
20 分	9.05% +/-0.44 * ***	3.83% +/-0.27	14.53% +/-0.86 ** ^ ^^	3.94% +/-0.19	3.59% +/-0.22	3.68% +/-0.23
40 分	4.89% +/-0.43	4.12% +/-0.34	10.85% +/-0.51 ***	4.2% +/-0.19	3.95% +/-0.30	4.21% +/-0.36

20

【0090】

表1. 1. フィブロネクチン及びP B S 被覆組織培養プラスチックへの表層、中間層及び深層の軟骨細胞接着。*、40分と比較した $p < 0.001$ 、**、40分と比較した $p < 0.01$ 、***、P B S コントロールと比較した $p < 0.001$ 、^、表層F I B R O N E C T I N 2 0 と比較した $p < 0.01$ 、^^、深層F I B R O N E C T I N 2 0 と比較した $p < 0.001$ 。

【0091】

接着細胞により形成されたコロニー数（ > 4 細胞）を6日及び10日間培養後評価し、「コロニー形成効率」（すなわち、コロニー数／最初の接着細胞数）として表した。「早期－フィブロネクチン結合」表層細胞のコロニー形成効率は、他の軟骨細胞の群で観察されたものよりも極めて高かった（図1. 9参照。* = $p < 0.01$ ）。図1. 10は、「早期－フィブロネクチン結合」表層細胞により形成されたコロニーの顕微鏡写真を示す。

40

F A C S 分析を用いた軟骨細胞による特異なノッチー1発現の分析。7日齢の子ウシの表層、中間層及び深層の間接軟骨から軟骨細胞を、プロナーゼ／コラゲナーゼ連続消化作用を37℃で一晩用いて単離し、P B S 中で洗浄して、抗N1ポリクローナル抗体を用いてF A C S 分析にかけた。組織からの単離直後、表層細胞の約75%、中間層細胞の約10%及び深層細胞の約25%がN1に陽性であった（図1. 11）。

【0092】

ノッチ陽性細胞の磁気ビーズ分離。抗N1抗体被覆磁気D y n a b e a d s を用いて、N1免疫陽性S Z C、M Z C 及びD Z C を単離し、6日間培養してコロニー形成効率を評

50

価した。N 1 陽性の中間層及び深層の細胞由来よりも N 1 陽性表層細胞由来のコロニーが有意に ($p < 0.001$) 多かった (図 1. 12)。

【0093】

FACSを用いたSZCによる特異なインテグリン発現の分析。識別接着後、SZC、MZC及びDZCは、標識強度及び標識細胞数における差が顕著ではあったが、分析された全ての時点において基質に関係なく $\alpha 5$ 及び $\beta 1$ サブユニットを発現した。単離直後及び識別接着から4時間後にフローサイトメトリーを用い、MZC (5%) 及びDZC (2.5%)と比較して、SZC (79%+ve)が $\beta 1$ サブユニットを優先的に発現することが分かった。 $\alpha 5$ サブユニット発現の差は軟骨細胞では検出されず、発現レベルは表層から深層まで、88~67%の範囲に及んだ。フィブロネクチンへの識別接着に続いて72時間培養した後、軟骨細胞 $\alpha 5$ 及び $\beta 1$ サブユニット発現の差は、組織の深さに関係なく検出されなかった。しかしながら、識別接着から4時間後の発現に比べて、 $\alpha 5$ 及び $\beta 1$ サブユニットの発現全体は、あらゆる組織深さの軟骨細胞において減少した (図 1. 13)。

【0094】

【表2】

	$\alpha 5$ 4時間	$\beta 1$ 4時間	$\alpha 5$ 72時間	$\beta 1$ 72時間
表層	88.64+/-4.30	76.16+/-4.8	40.95+/-2.9	43.01+/-3.8
中間層	69.02+/-3.2	5.16+/-5.2	26.68+/-4.1	40+/-4.2
深層	67.32+/-2.4	2.52+/-3.7	34.46+/-3.9	27.12+/-

【0095】

表2

SZC、MZC及びDZCの平均細胞サイズの測定。図 1. 14 は、表層 ($n = 124$)、中間層 ($n = 275$) 及び深層 ($n = 182$) の軟骨細胞の平均細胞直径を図示する。SZCとMZC ($p > 0.05$) 及びSZCとDZC ($p > 0.005$) の直径には双方とも有意差があった。このデータは、未成熟なウシ軟骨の表層由来細胞が中間層及び深層の細胞より小さい直径を平均的に有することを証明する。図 1. 15 a、1. 15 b 及び 1. 15 c は、それぞれ位相差顕微鏡レンズ (倍率 $\times 200$) を用いて観察した、表層細胞、中間層細胞及び深層細胞の代表的な写真である。

【0096】

考察

これらの結果は、コロニー形成軟骨細胞の群が関節軟骨の表層内に存在することを示す。インビトロのコロニー形成は、始原細胞について最も信頼できる試験である。なぜなら、高い反復細胞分裂の能力を細胞が有する (すなわち、細胞が自己再生する) ことが証明されるからである。したがって、これらの結果は、始原細胞が表層内に存在することを示す。コロニー形成表層細胞はフィブロネクチンに高い親和性を有することが示された。これは、表層内での $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの高いレベルの発現に関係があると推測される観察である。表層と中間層/深層との $\beta 1$ インテグリン発現の差は、特に顕著であった。ノッチ発現が表層細胞に集中していることをFACS分析が立証したのに対して、形態学的分析は、表層細胞が他の軟骨細胞より小さいことを示した。これらの結果をまとめると、表層細胞は他の軟骨細胞とは異なる特性を持つ別個の細胞群であることがわかった。

【0097】

結果が、抗ノッチ抗体がノッチ陽性細胞を生体適合物質の表面に選択的に結合させるのに使用でき、それによってコロニー形成始原細胞を粒状材料の表面に濃縮させることを示したのは重要である。同様に、抗インテグリン $\beta 1$ 抗体は軟骨始原細胞を生体適合物質の表

面に選択的に結合させるのに使用できる。コロニー形成細胞のフィブロネクチンに対する高い親和性は、コロニー形成軟骨始原細胞を生体適合物質の表面に結合させるのにフィブロネクチンも使用できるであろうことを示唆する。細胞と生体適合物質間のこのような選択的親和性は、正常な軟骨内で発生するのと同じ解剖学的位置に軟骨始原細胞が集中される、軟骨インプラントの形成に適用できるであろう。

【0098】

実施例 1. 3 : フィブロネクチンに高い親和性を持つ S Z C のペレット培養物によるインビトロ軟骨形成

方法

「早期-フィブロネクチン結合」 S Z C のペレット培養。 ペレット培養は、軟骨始原細胞がインビトロで軟骨を形成するのを可能にする、確立された方法である (N i s h i m u r a ら、1999)。

精密切開により、1~3週齢のウシの中足指節関節から、表層及び中間層の関節軟骨を得た。軟骨の削りくずをプロナーゼで消化し (D M E M / 5 % F C S 中 0.1 % ; 37℃で3時間 ; M e r c k、4×10単位/g)、P B S 中で洗浄し、コラゲナーゼを用いて表層及び中間層の細胞懸濁液を単離した (D M E M / 5 % F C S 中 0.04 % ; 静かに振盪して37℃で16時間 ; W o r t h i n g t o n I I 型 ; 237 U / m g)。放出された細胞を70 μm細胞ストレーナー (F a l c o n) で濾過し、遠心分離し (1000 r p m ; 5分)、無血清 D M E M 中で洗浄し、血球計測器を用いて計数し、1×10⁶ 細胞 / m l に希釈した。

【0099】

6 ウェルプレートのウェルをウシの血漿フィブロネクチンで被覆した (1 m M M g C l₂ 及び 1 m M C a C l₂ を加えたダルベッコの P B S 中 10 μg / m l ; 4℃で16時間 ; S i g m a)。フィブロネクチン溶液を吸引し、プレートを B S A でブロックした (1 % w / v ; 1時間)。

S Z C 又は M Z C (無血清 D M E M 中 2×10⁶ 細胞 ; 2 m l) をフィブロネクチン被覆ウェルに植え付け、37℃で20分間インキュベートした。次いで、培地を静かにかき混ぜ、破棄し、接着した「早期-結合」細胞を D M E M / 10 % F C S 中で、5 % 加湿 C O₂ の雰囲気下、37℃で96時間インキュベートした。「早期-結合」表層及び中間層の細胞をトリプシン処理し、ピルビン酸塩 (S i g m a)、I T S (1 % ; S i g m a)、アスコルビン酸-2-リン酸塩 (100 μm ; S i g m a)、デキサメタゾン (10⁻⁷ M ; S i g m a)、H E P E S (20 μl / m l ; 1 M ; S i g m a) 及び形質転換成長因子 β 1 (10 ng / m l ; R + D s y s t e m s) を補足した 0.5 m l D M E M 中、2 m l 無菌丸底遠心管 (E p i n d o r f) にアリコートした (500 k 細胞)。管を遠心分離し (2500 r p m ; 10分)、2日ごとに培地を変えながら、5 % C O₂ の加湿雰囲気下、37℃で7、14及び21日間インキュベートした。

【0100】

組織学的分析。 インキュベート期間の終わりに、培地を取り除き、試料を10 % ホルマール緩衝食塩水に固定し (0.5 m l ; 24時間)、V I P プロセッサで加工し、ろう包埋し、L e i c a ミクロトームで切断した (5 μm)。組織学的分析のため、標本を脱ろうし、再水和して、サフラニン O (0.1 %、6分)、ピクロシリウスレッド (P i c r o s i r i u s r e d) (飽和アルコールピクリン酸中 0.1 %、90分)、トルイジンブルー (0.5 % ; 15秒) 又はヘマトキシリン及びエオシン (G i l l s h a e m a t o x y l i n、6分及びアルコールエオシン、4分) のいずれかで染色した。H i s t o m o u n t を用いて標本をのせ、L e i c a 顕微鏡、S P O T カメラ及び関連ソフトウェアを用いて撮像した。

【0101】

免疫細胞化学分析。 スライドを脱ろうし、再水和して D a k o H M A R [熱媒介抗原回復システム ; D a k o] にかけた。I 型コラーゲン検出のため、スライドをブタの血清中でブロックし (2.5 %、室温で20分 ; D a k o)、P B S 中で完全に洗浄して、ウ

10

20

30

40

50

サギポリクローナル抗Iコラーゲン抗体 ($10 \mu\text{mg/ml}$; Biogenesis) 又は同等濃度の非免疫ウサギIgG免疫グロブリン (Dako) のいずれかに 4°C で一晚浸漬した。スライドを次いでPBS中で洗浄し、ブタ抗ウサギビオチニル化二次抗体に浸漬し ($1:100$; 室温で30分; Dako)、PBS中で洗浄し、ストレプトアビジンテキサスレッドに浸漬し ($1:100$ 、室温で30分; Amersham Pharmacia Biotech)、PBS中で洗浄して、蛍光のためVectormountを用いて載せて、カバーガラスで覆った。

【0102】

II型コラーゲン検出のため、スライドをウサギ血清中でブロックし (2.5% 、室温で20分; Dako)、PBS中で完全に洗浄して、マウスモノクローナルIIコラーゲン一次抗体 ($1 \mu\text{g/ml}$; Neomarkers) 又は同等濃度の非免疫マウスIgG免疫グロブリン (Dako) のいずれかに 4°C で一晚浸漬した。スライドを次いでPBS中で洗浄し、ウサギ抗マウスビオチニル化二次抗体 ($1:100$; 室温で30分間; Dako) に浸漬して、PBS中で完全に洗浄し、ストレプトアビジン FITC ($1:100$; 室温で30分; Amersham Pharmacia Biotech) に浸漬させ、PBS中で完全に洗浄し、蛍光のためVectormountを用いて載せて、カバーガラスで覆った。

10

【0103】

グリコサミノグリカンエピトープコンドロイチン4スルフェート、コンドロイチン6スルフェート及びデルマトンスルフェートの検出のため、 0.1% Tween 20 (Sigma) を含むPBSで切片を湿らせ、(i) コンドロイチナーゼAC (0.25u/ml)、(ii) コンドロイチナーゼABC (0.25u/ml) 又は (iii) コンドロイチナーゼABC (0.25u/ml) のいずれかで1時間 37°C で消化し、PBS/Tween 20で洗浄して、適切なブロッキング血清で30分間室温でインキュベートした。ブロッキング血清を次いで吸い取り、切片を、(i) 抗体2B6 (500中1; コンドロイチナーゼAC処理後、コンドロイチン4スルフェートGAGの残骸 (stub) を認識; Cattersonら、1985)、(ii) 抗体2B6 (500中1; コンドロイチナーゼABC処理後、デルマトンスルフェートGAGの残骸を認識; Cattersonら、1985)、又は (iii) 抗体3B3+ (500中1; コンドロイチナーゼABC処理後、コンドロイチン6スルフェートの残骸を認識; Couchmanら、1984) のいずれかの中でインキュベートした。スライドを、PBS/Tween 20中で洗浄し、 20% FCSを含むPBSで希釈された適切な蛍光複合抗体を用いて室温で1時間抗体結合を検出し、次いでPBSで洗浄した。

20

30

【0104】

Link蛋白質の検出のため、 0.1% Tween 20を含むPBS (Sigma) で切片を湿らせ、コンドロイチナーゼABC (0.25u/ml) を加えたコンドロイチナーゼAC (0.25u/ml) で1時間 37°C で消化し、PBS/Tween 20で洗浄し、ブロッキング血清中で30分間室温でインキュベートした。ブロッキング血清を吸い取り、ポリクローナル抗リンク蛋白質抗体 (30中1) 又は同等濃度の非免疫血清のいずれかの中で切片をインキュベートした。スライドをPBS/Tween 20中で洗浄し、 20% FCSを含むPBSで希釈された関連蛍光複合抗体を用いて室温で1時間抗体結合を検出し、次いでPBSで洗浄した。

40

スライドを観察し、Spotカメラ付きLeica顕微鏡及び関連ソフトウェアを用いて撮像した。

【0105】

結果及び考察

組織学的研究。「早期-結合」表層軟骨細胞ペレットのH+E染色は、形態学的に正常で生存可能な細胞の存在を標本全体にわたって示した (図1. 16)。ピクロシリウスレッドは、特に細胞を囲むマトリクス領域でコラーゲン沈着を示した (図1. 17)。グリコサミノグリカンのサフラニンO染色は、細胞により生じた、細胞外マトリクスに非常に

50

濃いオレンジ色の染色を呈し、細胞がプロテオグリカン—リッチなマトリクスを分泌したことを示している（図1. 18）。この結果は、マトリクスが紫／青に染色されたトルイジンブルー染色標本により確認されたが、これもグリコサミノグリカン生成のしるしである。これらの結果をまとめると、「早期—結合」表層細胞のペレット培養物が、正常な軟骨の組織学的特徴を持つマトリクスを分泌することが分かる。

【0106】

免疫細胞化学的研究。免疫細胞化学は、細胞がペレット培養物内で軟骨特異的なマトリクス成分を合成していたことを示した。ペレット内の細胞外マトリクスはⅠⅠ型コラーゲンを含んでいたが（図1. 19）、Ⅰ型コラーゲンを含んでおらず（図1. 20）、細胞が分化して軟骨細胞を形成したこと、及び脱分化が起こらなかったことを示している。免疫染色は、ペレット培養物のマトリクスにおいて、コンドロイチン4スルフェート及びコンドロイチン6スルフェートが存在することを示した（図1. 21及び1. 22）。サフラニンO及びトルイジンブルーの組織化学染色の結果とまとめると、これらのデータは、細胞がかなりの量の軟骨マトリクス様プロテオグリカンを分泌していることを示す。これは、主要な軟骨構成成分アグレカンの成分であるリンクタンパク質の存在により確認された（図1. 23）。

これら結果は全体として、ペレット培養物内で成長した早期—フィブロネクチン結合表層細胞が、関節軟骨の2つの主要な構成成分であるコラーゲンⅠⅠ及びアグレカンを生成することを示す。これは、早期—フィブロネクチン結合表層細胞が軟骨産生性であることを示す。

【0107】

実施例1. 1及び1. 2の結果をまとめると、これらの結果は、軟骨産生コロニー形成軟骨始原細胞の群が関節軟骨の表層内に存在すること、及びこれらの細胞が、（i）フィブロネクチン及び／又は（i i）抗N1抗体及び／又は（i i i）抗インテグリン β_1 抗体のいずれかで被覆された生体適合物質に急速に／選択的に結合することを示す。このような選択的細胞結合は、前駆細胞及び成熟軟骨細胞が正しい解剖学的位置にある層状インプラントを生成するのに使用できるであろう。

これらの結果を概括してみると、軟骨始原細胞もしくは他の軟骨産生間葉前駆細胞のいずれかを選択的に結合する細胞外マトリクス成分又は抗体はいずれも、生体適合性インプラント材料の表面に付着させ、（i）軟骨始原細胞を結合し、（i i）それらを軟骨修復用に設計されたインプラントの選択領域に局在化させるのに使用できるものと予測される。

【0108】

実施例1. 4：損傷した関節軟骨への軟骨細胞ペレット移植の効果

方法

フィブロネクチンに親和性が高い表層軟骨細胞のペレットならびに中間層及び深層の軟骨細胞ペレットを7日間培養し、局部的に深い傷を含むウシの軟骨外植片に埋め込んだ。さらに7日後、外植片をエチジウムホモダイマーとインキュベートし（90分）、（i）10% N B F Sで固定し、ろう包埋し、切断してサフラニンOで染色するか、又は（i i）脱ろうし、蛍光光学のもとに検査して細胞死を評価した。

【0109】

結果及び考察

コントロール外植片（ペレットを与えない）ならびに中間層及び深層の軟骨由来のペレットを与えた外植片は、創縁及び関節表面の両方から明確なマトリクスの損失を示した。コントロール試料ならびに中間層及び深層ペレットを与えた試料の創縁及び関節表面に沿って、細胞死もまた明らかであった。対照的に、表層関節軟骨由来のペレットを与えた外植片は、創縁からのマトリクス損失の減少及び細胞死の減少を示した。N1陽性コロニー形成表層細胞が、軟骨細胞形成及び修復で重要な役割を果たす可能性が結論付けられた。

【0110】

実施例1. 5：ニワトリ胚に注入された軟骨始原細胞：C F D A S Eを用いたインオボ軟骨始原細胞追跡

10

20

30

40

50

材料及び方法

プロナーゼ／コラゲナーゼ連続消化作用を用いて、7日齢のウシの関節軟骨からS Z C及びD Z Cを単離し、60 mmの皿で20分間 5×10^6 個の細胞をF I B R O N E C T I Nに識別接着させた。次いで、5% C O₂中37℃で30分間、20 μM C F D A - S E (m o l e c u l a r p r o b e s ; w w w . p r o b e s . c o m)を用いて細胞をP B S中で標識した。無血清D M E M / F 1 2で細胞を30分間洗浄し、次いで10% F C S D M E M / F 1 2中で48時間インキュベートした。標識細胞をトリプシン処理し、プールし、計数し、いかなる添加物も含まないD M E M / F 1 2中に、第一実験 1×10^5 細胞 $100 \mu l^{-1}$ 、そして第二実験 2.5×10^5 細胞 $100 \mu l^{-1}$ で再懸濁した。窓を開けた (w i n d o w e d) 4日齢のニワトリ胚の胚体外管に、100 μl細胞懸濁液を注入した。セロテープ (登録商標) でウィンドーを封止した後、6日まで胚をインキュベートした。注入から3日及び6日後、頸管転位により胚を殺し、10% N B F S中に固定し、ろう包埋するか、又は-70℃のn-ヘキサン中に沈漬して冷却した。

蛍光顕微鏡を用いて、標識細胞の存在について切片を検査した。

【0111】

結果

発達中軟骨、例えば盃状窩を含む胚の領域内で、標識細胞が観察された (図1. 25)。低レベルの染色細胞が発達中の腱で観察された。これらの結果は、表層細胞が発達中の軟骨に結合することを示唆している。注入細胞を高感度に検出することにより、細胞のクラスター及び異所性軟骨組織の形成が発達中の胚内で示された。これらの結果は、表層細胞がインビボで軟骨組織を形成できることを示唆している (図1. 26及び1. 27)。

【0112】

実施例2：層状培養物の生成

実施例は、未成熟なウシの関節軟骨表層内に軟骨始原細胞群があることを示している。これらの細胞は、フィブロネクチンに対する高い親和性及びコロニー形成効率に基づいて同定された。細胞は、N1及びF i b r o n e c t i n - E D Aを発現することも示された。

現在の組織工学的手法は、天然の関節軟骨の層状構造の再生を全く試みていない。これらの実施例は、層状構造の異なる組織工学的な軟骨構築物をいかにして生成するかについて、いくつかの方法を示している。実施例は、特定の領域に軟骨始原細胞が局在化した生体適合物質を生成するため、特異的な結合材料 (例えばフィブロネクチン) を用いた例を示している。

本発明の実施例はさらに、本発明の層状構造が、コントロールよりも軟骨修復／成長を改善することを示す。

【0113】

実施例2. 1：層状構造－選択肢の範囲

培養物の「層状」領域は、多くの潜在的な形状及びプロフィールを呈することができる。成熟した被験者の軟骨と比べると、治癒の潜在能力が高いことが知られているので、軟骨が胎児段階又は新生段階にある構造を再生するというのが1つの考えである。境界層の軟骨始原細胞の濃度変化は、1段変化又は曲線的変化のどちらであってもよい、すなわち、表層は軟骨始原細胞で満たされ、残りの部分は混合成熟軟骨細胞で充填される。図2. 1。

しかし、軟骨始原細胞は、移植組織を天然の軟骨と統合し、創縁周辺の細胞死を減少させるのに、より効果的であるものと予測される。統合が無いことが移植失敗の主な要因である。このため、外面だけでなく側面周辺にも軟骨始原細胞が豊富な層を持つインプラントを設計した。図2. 2。

【0114】

【表3】

模範選択肢の一覧

選択肢	軟骨始原細胞	成熟軟骨細胞	細胞選択	スカホールド
1	BMSC	軟骨	組織切断	各層に異なる部分
2	SZCs	軟骨	CBM	各層に異なる部分
3	SZCs	軟骨	CBM	内部を層状にした単一のスカホールド

BMSC：骨髓間質細胞

SZC：表層軟骨始原細胞

CBM：軟骨始原細胞結合材

10

【0115】

実施例 2. 2

序文

この実施態様は、線維性スカホールド、2種類の被覆粒状生体適合物質及び自己骨軟骨栓から得た細胞を組み合わせて、(i)軟骨始原細胞層が装置の関節表面付近（すなわち表層内）に凝縮され、(ii)成熟した軟骨細胞層が肋軟骨下骨近く（すなわち中間層及び深層；図2. 16参照）に凝縮される層状線維強化軟骨インプラント（直径～1.5 cm及び厚さ4 mm）を形成する。この方法は、最初に得た組織の体積より18.4倍大きい構造物を生成する。 20

【0116】

骨髓間質細胞分離

方法

ウシの新生中足指節関節を無菌的に切開し、Acufex円筒形のみを用いて、直径3.5 mm×深さ5 mmの骨軟骨栓を関節表面から手動で抽出した。骨軟骨栓の骨部から骨髓間質細胞を得た。メスで軟骨から骨を切り離し、DMEM/5% FCS（3 ml）中で0.08% コラゲナーゼにフラグメント化し（WorthingtonタイプII）、激しく攪拌して37℃で90分間インキュベートし、骨髓細胞懸濁液を放出した。次いで、骨片を再攪拌し、上澄みを回収して、骨片の3つのPBS洗浄液と合わせた。プールされ、回収された骨髓細胞を遠心分離し（1000 rpm；5分間）、PBS中で洗浄し、再遠心分離して（1000 rpm；5分間）、細胞ペレットをDMEM/10% FCS（5 ml）中に再懸濁させた。5% CO₂の加湿雰囲気下、6ウェルプレートのウェル内で、放出された細胞を、接着細胞が融合性になるまで（通常6日間）37℃でインキュベートした。接着線維芽細胞をPBSで洗浄して、非接着造血細胞を取り除き、トリプシンを用いて残屑及び線維芽細胞を回収した。 30

単一の骨軟骨栓から得た回収済（「第1継代」）骨髓間質細胞を使用して、二層構造物の1層を生成するのに十分な、4.125 mgの細胞接着因子被覆スルフェートイントラサイトを植えた。 40

【0117】

結果

新たに培養された骨髓細胞分離物は、多くの赤血球、非接着造血細胞、残屑ならびに不定期接着線維芽及びマクロファージ様細胞で構成された。組織培養プラスチック上で培養すると、接着線維芽細胞は急速に増殖し、それによって、利用可能な軟骨始原細胞数が増した。3.5 mm骨軟骨栓由来の典型的な培養物は、～6日目後、骨髓間質細胞の10 cm² 融合単層を生成した（一般的に500,000～750,000回収済細胞）。 50

【0118】

ウシの新生軟骨細胞の分離

方法

ウシの新生中足指節関節を無菌的に切開し、Acufex円筒形のみを用いて、直径3. 50

5 mm×深さ5 mmの骨軟骨栓を関節表面から手動で抽出した。栓の上軟骨部から軟骨細胞を得た。軟骨を骨から切断し、スライスして、ペニシリン、ストレプトマイシン、非必須アミノ酸、L-グルタミン (Sigma、上記のとおり) 及び5%ウシ胎児血清 (Sigma; DMEM/5% FCS) を補足したDMEM中で、コラゲナーゼ (0.1%; 3 ml; WorthingtonタイプII) を含む玉 (bijou) に移した。5%CO₂ の加湿雰囲気下、静かに混合しながら、組織を37℃で16時間消化し、軟骨細胞の懸濁液を放出した。放出された細胞を、70 µmナイロンメッシュ (Falcon) を通して濾過し、DMEM/10% FCSで10 mlに希釈し、遠心分離して (1000 rpm; 5分間)、上澄みを廃棄し、洗浄工程を繰り返した。

【0119】

10

単一の骨軟骨栓の軟骨から得た軟骨細胞を使用して、二層構造物の一層を生成するのに十分な、4.125 mgの細胞接着因子被覆スルフェートイントラサイトを植えつけた。

結果

直径3.5 mmの軟骨栓は $668 \pm 85 \times 10^3$ 個の軟骨細胞を放出した (通常、1外植片当たり500~900×10³ 細胞)

【0120】

血漿フィブロネクチン又はFCSから吸着された細胞付着分子の混合物を用いたスルフェートイントラサイトの生成及び被覆

スルフェートイントラサイトゲル (構造物の一層当たり4.125 mg; PBS中6.5 mg/ml) を調製し、実施例4に記載するように滅菌した。DMEM (500 ml) 、ペニシリン及びストレプトマイシン (Sigma; 5 ml) 、非必須アミノ酸 (Sigma; 5 ml) ならびにL-グルタミン (Sigma; 5 ml) を混合して無血清DMEMを生成した。

オートクレーブしたスルフェートイントラサイトをPBSで40 mlに希釈し、遠心分離し (2500 rpm; 5分) 、上澄み30 mlを除去して、30 mlの無血清DMEMを添加した。管を遠心分離し (2500 rpm; 5分) 、上澄みを除去して、2.5 mlの液体中に生体適合物質を残した。細胞付着因子 (例えば、血漿フィブロネクチン; 60 µg/ml) 、PBS賦形剤又はウシ胎児血清 (10%) を添加し、管を4℃で2時間激しく混合した。

【0121】

30

血漿フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト上での骨髄間質細胞の付着及び成長

方法

アスコルビン酸2リン酸 (最終25 µg/ml; Sigma) をDMEM中に溶解し (Sigma) 、濾過滅菌し (0.2 µm; Sartorius) 、ペニシリン、ストレプトマイシン、非必須アミノ酸、L-グルタミン及び10%ウシ胎児血清を補足したDMEM (DMEM/10% FCS/ASCP) に添加した。

直径3.5 mmの骨軟骨栓から得たトリプシン処理済骨髄間質細胞を、DMEM/10% FCS/ASCP (20 ml) 中で、血漿フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトゲル (4.125 mg) に添加した。最初の2時間、培養物を時々混合して、植え付けをより均一にし、次いで、5%CO₂ の加湿雰囲気下、37℃で10日間インキュベートした。

【0122】

培養培地にMTT (1 mg/ml; Sigma) を2.5時間添加し、試料をPBS中で洗浄し、位相差顕微鏡で細胞を観察して、フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト上に成長する骨髄間質細胞の生存度を評価した。さらに、カルセインAMを添加し (0.6 µl/ml; 1 mg/ml; 90分; Molecular Probes) 、細胞をPBS中で洗浄し、Leica共焦点顕微鏡を用いて標本を観察して、細胞生存度を測定した。

組織染料ピクロシリウスレッドを用いて、コラーゲンマトリクスの沈着を評価した。細胞

50

を植え付けた生体適合物質の試料（200 μ l）をリン酸緩衝ホルマリンで固定し、PBSで洗浄して（2 $\times$ 3 ml）、ピクロシリウスレッド（1 ml、30分；100 ml 飽和水性ピクリン酸中0.1 gシリウスレッド；Sigma）で染色した。PBS中で試料を16時間繰り返し洗浄し、特異的に結合していない染料を除去し、顕微鏡検査で観察した。

【0123】

I型コラーゲン及びII型コラーゲンの生成を免疫細胞学により測定した。骨髓間質細胞を植え付けた、フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトを、20 ml DMEM/10% FCS/ASCP中で10日間インキュベートし、PBS中で3回洗浄して（10 ml；2500 rpmで遠心分離；5分）、メタノール中で固定した（-20 $^{\circ}$ C；10分）。試料をPBSで2回洗浄し（10 ml；2500 rpmで遠心分離；5分）、BSAでブロックして（PBS中3% w/v；5 ml；37 $^{\circ}$ Cで1時間）、PBS中で3回洗浄した。次いで、抗コラーゲン抗体又は同濃度及び同体積の非免疫性イムノグロブリンと標本を37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした〔すなわち、ウサギ抗I型コラーゲン抗体（PBSで20 μ lを10中1希釈；200 μ l；Biogenesis）、非免疫ウサギ血清コントロール（PBSで2000中1希釈；200 μ l；Dako）、マウス抗II型コラーゲン抗体（200中1希釈；500 μ l；New Markers）又は非免疫マウス血清（100中1希釈；500 μ l；Dako）のいずれか〕。次いで、標本をPBS中で3回洗浄した。標本及びそのコントロールを、「Dead cell stain」（2 μ l；Molecular Probes）を加えたブタ抗ウサギイムノグロブリンFITCと37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートして、抗I型コラーゲン抗体を視覚化した。

【0124】

標本又はそのコントロールを、ビオチニル化ウサギ抗マウスイムノグロブリン（PBS中100中1；Dako）と37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、PBS中で3回洗浄し、37 $^{\circ}$ Cで30分間「Dead cell stain」（2 μ l；Molecular Probes）を加えたストレプトアビジンFITC（PBS中、100中1希釈；Amersham）中でインキュベートして、抗II型コラーゲン抗体を視覚化した。試料をPBS中で3回洗浄し、Leica顕微鏡及びスポットカメラを用いて観察した。

【0125】

結果

骨髓間質細胞を、細胞接着因子被覆スルフェートイントラサイトに16時間以内に接着させ（図2.3）、増殖させて、最初に粒状生体適合物質の表面を覆い、次いで細胞、生体適合物質及び細胞外マトリクス成分の巨視的クラスターに凝集させた。カルセインAM染色は、4日後の物質表面に接着細胞群を示したのに対して（図2.4）、ピクロシリウスレッドは、培養7日後にコラーゲンマトリクスの沈着を示した（図2.5）。免疫細胞化学では、フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト上に培養された骨髓間質細胞の標本内でのI型コラーゲンの生成が10日後に示された（図2.6）。コラーゲンIIの生成の形跡は観察されなかった（図2.7）。

【0126】

ウシ胎児血清から吸着された細胞接着因子で被覆されたスルフェートイントラサイト上でのウシの新生軟骨細胞の付着及び成長

方法

アスコルビン酸2リン酸（最終25 μ g/ml；Sigma）をDMEM中に溶解し（Sigma）、濾過滅菌し（0.2 μ m；Sartorius）、ペニシリン、ストレプトマイシン、非必須アミノ酸、L-グルタミン及び10%ウシ胎児血清を補足したDMEM（DMEM/10% FCS/ASCP）に添加した。

スルフェートイントラサイトゲル（4.125 mg）を、ウシ胎児血清から吸着された細胞付着因子で被覆した。直径3.5 mmの骨軟骨栓の骨部からウシの新生軟骨細胞を得た。細胞及び被覆ゲルをDMEM/10% FCS/ASCP（20 ml）中で合わせ、5% CO₂の加湿雰囲気下、37 $^{\circ}$ Cで27日間までインキュベートした。培養物を、最初の2

10

20

30

40

50

時間時々混合して植え付けをより均一にした。

【0127】

細胞を植え付けた材料をMTT (1mg/ml; Sigma) と2時間インキュベートし、リン酸緩衝ホルマリンで試料を固定して(2ml; 15分)、細胞生存度を確認した。管をPBSで洗浄し(2×5分; 10ml; 2500rpmで遠心分離; 5分)、サフラニン O (0.1%水性1ml) を2.5時間添加した。PBSで試料を3回洗浄し、PBS中に4℃で16時間保管して、非特異的に結合した染料を溶離させた。試料をPBS中で2回洗浄し、顕微鏡スライドに移し、Leica顕微鏡を用いて観察した。スポットカメラを用いて撮像した。組織染料ピクロシリウスレッドを用いてコラーゲンマトリクスの沈着を評価した。細胞を植え付けた生体適合物質の試料(200μl)をリン酸緩衝ホルマリンで固定し、PBSで洗浄し(2×3ml)、ピクロシリウスレッドで染色した(1ml、30分; 100ml飽和水性ピクリン酸中0.1gシリウスレッド; Sigma)。試料をPBS中で16時間繰り返し洗浄し、非特異的に結合している染料を除去し、顕微鏡法により観察した。

【0128】

I型、II型及びVI型コラーゲンの生成を免疫細胞化学により評価した。軟骨細胞を植え付けた、被覆スルフェートイントラサイトをPBS中で3回洗浄し、試料をメタノール中で固定し(-20℃; 10分)、標本をPBS中で3回洗浄して、II型コラーゲンの生成を評価した。次いで、BSA (PBS中3% w/v; 10ml) を管に37℃で1時間添加した。ゲルをPBS中で3回洗浄し、37℃で1時間、マウス抗ウシII型コラーゲン抗体(PBS中、200中1希釈; 500μl; Neomarkers) 又は同濃度の非免疫マウスイムノグロブリン(100中1希釈; 500μl; Dako) のいずれかで処理した。管をPBS中で3回洗浄し、ビオチニル化ウサギ抗マウスイムノグロブリンを添加した(PBS中、100中1希釈; 500μl; Dako)。管をPBS中で3回洗浄し、「Dead cell stain」(2μl; Molecular Probes) を加えたストレプトアビジンFITC (PBS中、100中1; 500μl; Amersham) を30分間添加した。試料をPBSで3回洗浄し、Leica顕微鏡及びスポットカメラを用いて観察した。

【0129】

軟骨細胞を植え付けた被覆スルフェートイントラサイトをPBSで3回洗浄し、材をBSAに分散させて(PBS中3% w/v; 10ml; 1時間; Sigma) ブロッキングすることにより、VI型コラーゲンの生成を実証した。材をPBS中で3回洗浄し、上澄み除去して、ウサギ抗ヒトコラーゲンVI (PBS中、50中1希釈; Abcam) 又は同濃度の非免疫ウサギIgG (PBS中、1000中1; Dako) のいずれかで試料を37℃で1時間インキュベートした。試料をPBSで3回洗浄し、FITC標識ブタ抗ウサギイムノグロブリン(100中1希釈; 1時間; 37℃; Dako) 中でインキュベートした。試料をPBS中で3回洗浄し、共焦点顕微鏡で観察した。

【0130】

軟骨細胞を植え付けた被覆スルフェートイントラサイトをPBS中で3回洗浄し、試料をメタノール中で固定して(-20℃; 10分)、標本をPBS中で3回洗浄して、I型コラーゲンの生成を評価した。次いで、BSA (PBS中3% w/v; 10ml) を管に37℃で1時間添加した。ゲルをPBS中で3回洗浄し、37℃で1時間、ウサギ抗ウシI型コラーゲン抗体(PBSで10中1希釈; 200μl; Biogenesis) 又は同濃度の非免疫ウサギイムノグロブリン(PBSで2000中1希釈; 200μl; Biogenesis) のいずれかで処理した。管をPBS中で3回洗浄し、37℃で1時間、EtBrHD (2μl; Molecular probes) を加えたFITC標識ブタ抗ウサギイムノグロブリン(PBS中に100中1希釈; Dako) 中でインキュベートした。試料をPBS中で3回洗浄し、Leica顕微鏡及びスポットカメラを用いて観察した。

【0131】

結果

軟骨始原細胞は、被覆スルフェートイントラサイト粒子に接着し、粒子上で増殖して、細胞、生体適合物質及び細胞外マトリクス成分の凝集体を形成した。軟骨細胞により形成された凝集体は、肉眼で見ると間質細胞により形成されたものよりも大きく、それらが多くのマトリクスを合成していたことを示している。MTT染色は、材粒子の表面上及びそれらの間の空間の両方で、凝集体全体にわたる生存細胞を示した（図2. 8）。ピクロシリウスレッドは、細胞が凝集体内にコラーゲンマトリクスを沈殿させたことを示した（図2. 9 a）。凝集体内の細胞は、軟骨細胞表現型の保持率と一致する完全な形態学を持っていた。

【0132】

免疫細胞化学は、軟骨特定形のコラーゲンであるII型コラーゲンを軟骨細胞が発現したことを示した（図2. 9 b）。この知見は、被覆生体適合物質上で成長する細胞が軟骨細胞表現型を培養物内で保持していることを立証した。免疫細胞化学は、軟骨細胞が、その細胞周囲マトリクスにVIコラーゲンを分泌していたことをさらに示した（図2. 10）。この分子は、成熟軟骨細胞を直接囲む周囲の重要成分であり、細胞をマトリクスに結びつけると考えられる。

重要なことであるが、免疫細胞化学は、軟骨細胞が培養27日後もコラーゲンIを生成していなかったことを示した（図2. 11）。この知見は、培養の初期段階（細胞が急速に増殖していた時）又は後の時点のいずれかの間、軟骨細胞が脱分化していなかったことを示した。

【0133】

FCS前処理済スルフェートイントラサイト及びFCS前処理済DxS上でのヒツジ軟骨細胞の増殖速度の定量

スルフェートイントラサイトゲル（100mg）又はデキストランスルフェートビーズ（100mg；DxS；Sigma）をPBS（15.38ml）で再水和し、オートクレーブで滅菌した（121℃；15分）。コラゲナーゼを用いて、新鮮な軟骨からヒツジの関節軟骨を単離した（DMEM／10％FCS中0.2％WorthingtonタイプI）。

無菌ゲル／ビーズ懸濁液に渦を作り、Falcon 50ml遠心管にアリコートし（10ml）、PBSで40mlに希釈した。管を遠心分離し（2500rpm、5分）、上澄み30mlを破棄した。PBS洗浄工程を繰り返し、ウシ胎児血清15ml（多価アニオン結合細胞付着糖タンパク質の源、例えばフィブロネクチン及びビトロネクチン）をゲル／ビーズに添加して、管を2時間インキュベートした。次いで、血清前処理済懸濁液をDMEM／10％FCSで40mlに希釈し、遠心分離し（2500rpm、5分）、更なるアリコートのDMEM／10％FCS（30ml）で洗浄し、再遠心分離して、上澄み30mlを除去した。

【0134】

血清前処理済スルフェートイントラサイトゲル、血清前処理済DxSビーズ又はDMEM／FCS（10ml）のみを含むFalcon管に、新たに単離したヒツジの軟骨細胞（10ml DMEM／10％FCS中 2.5×10^6 細胞）を添加し、培養物を時々混合しながら37℃で2時間インキュベートした。次いで、細胞を植え付けた粒子を10個のFalcon管の群にアリコートし（2ml）、アスコルビン酸2リン酸（25μg/ml）を含む23mlのDMEM／10％FCSを各管に添加した。培養物にフィルタ蓋をかぶせ、5％CO₂の加湿雰囲気下、37℃で3日、10日及び16日間改質Spirarack上でインキュベートした。

【0135】

インキュベーション期間の終わりに、MTT（PBS中5mg/ml；400μl）を管に添加し、ヒツジの軟骨細胞の標準曲線に、培養物を90分間インキュベートした。培養物を次いで遠心分離し（3000rpm；5min）、PBSで3回洗浄し、上澄みを除去して、最終量を400μlとした。酸イソプロパノール（4％1MHCl含有イソ

10

20

30

40

50

プロパノール；1.6 ml)を各管に添加し、培養物を2時間混合した。次いで、3つの200 μ lアリコート各管から回収し、96ウェルプレートのウェルに移し、655 nmの基準に対する570 nmの吸収度を読み取った。

結果

データは、ヒツジの軟骨細胞が、最初の10日間に最も急速に増殖して、インキュベーション期間の間に14.4倍に増殖したことを示した(図2.12参照)。血清前処理済DXSビーズ上に成長する培養物又は懸濁液培養物中に成長する軟骨細胞では、低い成長率が観察された。

【0136】

二層構造のための培養装置及び概略方法

二層構造は、(i)骨髄間質細胞を植え付けたフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト、及び(ii)軟骨細胞を植え付けた被覆スルフェートイントラサイトをスカホールドに順次的に遠心分離して、二層線維強化細胞/生体適合物質構造を形成することにより形成される。用いた装置及び方法の概要を図2.13に示す。

【0137】

図2.13のパネル(1)に示す管は、遠心分離中にスカホールドを支える空隙充填塞栓(2.1)；層状構造物を形成するために細胞を植え付けた粒子を遠心分離する機械的に頑強なスカホールド(2.2)；管内の正確な位置にスカホールドを維持する「不均整環」(2.3)；ならびに多量の培養培地(2.4)及びガスを交換させる0~2 μ mフィルターを備えた蓋(2.5)を含む。パネル2は、骨髄間質細胞を植え付けたフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト(2.6)の培地への導入を示す。管の遠心分離は、骨髄間質細胞を植え付けたフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトを、構造物の関節表面付近の圧縮層に沈降させる(パネル3、(2.7))。軟骨細胞を植え付けたFCS被覆スルフェートイントラサイトの次の添加(2.8)をパネル(3)に示す。管を再遠心分離して、軟骨細胞を植え付けたFCS被覆スルフェートイントラサイト(2.9)を、骨髄間質細胞を植え付けたフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトの層(2.7)の上に沈降させ、スカホールド内に細胞材料の二重層を形成する(パネル4(2.9))。得られた構造物を環と一緒に管から除き、環から外し、逆さにして軟骨欠損部位に埋め込む。構造物の重要な特徴、すなわち、スカホールド/構造物の関節表面5(2.10)；軟骨始原細胞の豊富な表層5(2.11)；成熟軟骨細胞で占められた中間層及び深層5(2.12)及び装置の骨対向面5(2.13)をパネル5の拡大図に示す。

【0138】

パネル6は、鋭く切除した局所関節軟骨欠損への装置の埋め込みを示す(6(2.14))。パネル6(2.5)は、関節の関節表面；6(2.7)関節軟骨；6(2.16)肋軟骨下骨板の上面を示す。

実験目的のため、スカホールドを、70 μ mナイロンメッシュに接着したプラスチック環からなる「かご(basket)」と取り替えてもよい。これは沈殿した細胞/材のペレットを回収し、コントロールとして使用可能である。

「不均整環」は、管内の正しい位置にスカホールドを維持し、細胞を植え付けた材を遠心分離中にスカホールドに注ぎ込むよう設計されている。細胞を植え付けた生体適合物質の多くは、遠心分離中(すなわち回転子が加速している間)、急速に沈殿することに留意されたい。結果として、細胞/材ペレットは、管の中線から離れて蓄積される。遠心分離機回転子の回転方向及び回転子の放射軸に関連する「不均環」の正しい方向づけを図2.14に示す。

【0139】

染色スルフェートイントラサイトゲルの2つの試料を用いた二層形成の実証

方法

アガロース(PBS中4% w/v；Sigma)をマイクロ波で溶融し、Falcon管の底にアリコートして(5ml)、4℃で凝固させた。「かご」を「不均整環」にはめ

10

20

30

40

50

込み、寒天栓の上に置き、図2. 16に示すように方向づけし、装置を60℃の水浴中に入れた。スルフェートイントラサイト(3.8ml PBS中24.75mg)をサフラニンO(0.1%水性; 1ml)又はトルイジンブルー(PBS中0.01%)のどちらかで30分間4℃で染色した。染色されたゲルを、次いでPBS(25ml)で希釈し、PBSで3回洗浄した。次いで、上澄みを除去し、染色された材料をPBSで6mlに希釈し、60℃の水浴中に入れた。アガロース(PBS中1.5%)をマイクロ波で溶解し、水浴中で60℃に上げた。溶解されたアガロース(22.5ml; 1.5%; 60℃)を不均整環を含む管に添加し、1mlのサフラニンO染色スルフェートイントラサイトゲルを慎重に溶解寒天にピペットで移した。次いで管を封し、遠心分離機回転子内で方向づけ、2500rpmで5分間遠心分離してサフラニンO染色材料を沈殿させた。次いで管を水浴中に戻し、1mlのトルイジンブルー染色スルフェートイントラサイトを慎重に溶解寒天にピペットで移した。管を次いで回転子内で再び方向づけ、再遠心分離して(2500rpm; 5分)青色染色ゲルをオレンジ染色ゲル上に沈殿させた。管の内容物を次に4℃で16時間凝固させた。アガロース及び沈殿された染色スルフェートイントラサイトの栓をかごから切除し、解剖顕微鏡を用いて観察した。

10

【0140】

結果

図2. 15は、この装置及び方法を用いた、染色スルフェートイントラサイトの二層の沈着を示す。サフラニンOで染色されたオレンジの材は図の上層を形成するのに対して、トルイジンブルー染色スルフェートイントラサイトは下層を形成する。(この実験で粒子と一緒に結合する)アガロース栓は、顕微鏡写真の下層で認識できる。

20

【0141】

細胞を植え付けたスルフェートイントラサイトゲルの2つの試料を用いた、二層形成の実証

方法

細胞を植え付けた2つの生体適合物質の試料(すなわち、(i) 骨髄間質細胞を植え付けたフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト及び(ii) 軟骨細胞を植え付けたFCS被覆スルフェートイントラサイト)を遠心分離し(2500rpm; 5分)、試料をPBSで洗浄した(10ml; 2500rpm; 5分)。標本をメタノール中に固定し(-20℃; 10ml; 10分; Fisher)、PBS中で3回洗浄し(10ml; 2500rpm; 5分)、上澄み9mlを管から除去した。骨髄間質細胞を植え付けたフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトをグリーンの核染色ピコグリーンで染色した(10µl; 30分; 4℃; 暗い; Molecular Probes)。軟骨細胞を植え付けたFCS被覆スルフェートイントラサイトをレッド核染色、EtBrHDで染色した(5µl; 30分; 4℃; Molecular Probes)。試料をPBSで3回洗浄し(2500rpm; 5分)、上澄みを除去して試料を60℃の水浴中に入れた。

30

【0142】

アガロース(PBS中4% w/v; Sigma)をマイクロ波で溶解し、Falcon管の底にアリコートして(5ml)、4℃で凝固させた。「かご」を「不均整環」にはめ込み、寒天栓の上に置いて、図2. 14に示すように方向づけし、装置を60℃の水浴に入れた。溶解アガロース(20ml; 1.5%; 60℃)を、不均整環を含む管に添加し、ピコグリーン染色骨髄間質細胞/生体適合物質凝集物をゲルの上にピペットで移した。次いで管を封し、遠心分離機回転子内で方向づけ、遠心分離して(2500rpm; 5分)間質細胞を植え付けた材を「かご」に沈殿させた。EtBrHd染色軟骨細胞/生体適合性物質を次いでアガロースの上にピペットで移し、管を再遠心分離した(2500rpm; 5分)。次いで管の内容物を16時間4℃で凝固させた。アガロースの栓及び沈殿し、染色された、細胞を植え付けたスルフェートイントラサイトをかごから切除し、二等分してLeica顕微鏡を用いて観察した。スポットカメラを用いて撮像した。

40

【0143】

50

結果

図2. 16は (i) ピコグリーンで染色された、骨髄間質細胞を植え付けたフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトの層及び (ii) EtBrHDで染色された、軟骨細胞を植え付けた被覆スルフェートイントラサイトの層からなる、輪郭がはっきりし、よく凝固された二層構造物を、本方法及び装置が生成したことを示す。

【0144】

生存可能な二層構造の生成

細胞を植え付けた2つの生体適合性物質の試料（すなわち、(i) 骨髄間質細胞を植え付けたフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト及び (ii) 軟骨細胞を植え付けたFCS被覆スルフェートイントラサイト）を遠心分離し（2500rpm；5分）、上澄み

10

【0145】

アガロース（DMEM中4% w/v；Sigma）をマイクロ波で溶融し、Falcon管の底にアリコートして（5ml）、4℃で凝固させた。「かご」を「不均整環」にはめ込み、PBS中の60%アセトンに浸漬して滅菌し、寒天栓の上において、図2. 14に示すように方向づけた。DMEM10% FCS（20ml）を管に添加し、骨髄間質細胞を植え付けた、フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトを慎重に管にピペットで移した。次いで、遠心分離機回転子内で装置を方向づけ、遠心分離して（2500rpm；5分）、材の第一層を沈殿させた。次いで、軟骨細胞を植え付けた、FCS被覆スルフェートイントラサイトを、既存の層を妨害することなく慎重にピペットで管に移し、管を再遠心分離した（2500rpm；5分）。「環及びかご」を次いでFalcon管から抜き取り、沈殿した細胞を含む「かご」を「環」から取り外し、5mlのDMEM/10% FCSを含む6ウェルプレートのウェルに細胞/材の凝集物を慎重に移して、5% CO₂ の加湿雰囲気下、培養物を37℃でインキュベートした。

20

【0146】

実施例2. 2のエックスビボ評価

方法

全層関節軟骨の一組のストリップ（5mm×～40mm）をウシの新生蹄の中手指節関節から切除し、メスで横切して、3外植片（それぞれ5mm×10mm）の群を2つ作った。バイオプシーパンチ（直系3.5mm；Stiefel）を用いて、各群の2つの軟骨外植片において円柱状の全層欠損を切り取り、負傷したトロイドの外植片及び負傷していない外植片を、DMEM/10% FCS（8ml）を含む6ウェルプレートのウェルに移した。（i）骨髄間質細胞を植え付けた、フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト及び (ii) 軟骨細胞を植え付けた、FCS被覆スルフェートイントラサイトの試料を遠心分離し（2500rpm；5分）、上澄み

30

【0147】

アガロース（DMEM中4% w/v；Sigma）をマイクロ波で溶融し、Falcon管の底にアリコートし（5ml）、4℃で凝固させた。直径3mmのポリカプロラクトン再強化3Dニットのスカホールド（Culzean）を「不均整環」にはめ込み、PBS中の60%アセトンに浸漬して滅菌し、寒天栓の上に置いて、図2. 14に示すように方向づけた。DMEM/10% FCS（20ml）を管に添加し、骨髄間質細胞を植え付けたフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトを慎重にピペットで管に移した。次いで、遠心分離機回転子内で装置を方向づけ、遠心分離して（2500rpm；5分）、材の第一層をスカホールドの表層に沈殿させた。次いで、軟骨細胞を植え付けたFCS被覆スルフェートイントラサイトを、間質細胞層を邪魔することなくピペットで慎重に管に移し、管を再遠心分離した（2500rpm；5分）。「環及びスカホールド」を次いでFalcon管から取り出し、細胞を植え付けたスカホールドを「環」から取り外して逆さにし、軟骨外植片の直径3mmの欠損に挿入した。

40

【0148】

50

アスコルビン酸 2 リン酸 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を補足した 8 ml の DMEM / 10 % FCS を含む 6 ウェルプレート の 3 つのウェルに、単一の軟骨ストリップの 3 つの外植片群 (すなわち、傷ついていないもの 1 つ、空の欠損を持つもの 1 つ、及び細胞を植え付けた二層構造を含む欠損を持つもの 1 つ) を移し、5 % CO_2 の加湿雰囲気下、培養物を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 0 ~ 14 日間インキュベートした。

インキュベート期間の終わりに、(i) 標本内の生存可能及び生存不能細胞の分布を測定するための生/死染色法 (Molecular Probes)、(ii) 試料の一般的な形態、細胞充実性及びマトリクス成分を視覚化するための組織学ならびに (iii) どの細胞が I I 型コラーゲン (すなわち、正常な表現型の軟骨細胞) 又は I 型コラーゲン (線維芽細胞、始原細胞及び脱分化軟骨細胞) を発現しているか決定するための免疫細胞化学を用いて、試料を分析した。

10

【0149】

生存度測定のため、試料を二等分し、カルセイン AM (0.6 $\mu\text{l}/\text{ml}$; 90 分; Molecular Probes) と EtBrHD (10 μl ; 90 分) を組み合わせて染色し、試料を PBS 中で洗浄し (3 $\times$ 15 分)、切断面の上に置いて、標本の 100 μm の光学断面を共焦点顕微鏡で観察した。

組織学については、培地を取り除き、10 % ホルマール緩衝食塩水中で試料を固定し (0.5 ml; 24 時間)、VIP プロセッサ上で加工し、ろう包埋し、Leica ミクロトームで切断した (5 μm)。組織学的分析のため、標本を脱ろうし、再水和してサフラニン O (0.1 %、6 分)、ピクロシリウスレッド (飽和アルコール性ピクリン酸中 0.1 %、90 分)、トルイジンブルー (0.5 %; 15 秒)、又はヘマトキシリン及びエオシン (Gills haematoxylin、6 分及びアルコール性エオシン、4 分) のいずれかで染色した。Histomount を用いて標本を載せ、Leica 顕微鏡ならびにスポットカメラ及び関連ソフトウェアを用いて撮像した。

20

【0150】

免疫細胞化学分析のため、スライドを脱ろうし、再水和して Dako HMAR (熱媒介抗原回復システム; Dako) にかけた。I 型コラーゲン検出のため、ブタの血清中でスライドをブロックし (2.5 %、室温で 20 分; Dako)、PBS 中で完全に洗浄し、ウサギポリクローナル抗 I コラーゲン抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Biogenesis) 又は同濃度の非免疫ウサギ IgG イムノグロブリン (Dako) のどちらかに 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩浸漬した。スライドを次いで PBS 中で洗浄し、ブタの抗ウサギビオチニル化二次抗体に浸漬し (1:100; 室温で 30 分; Dako)、PBS 中で洗浄し、ストレプトアビジン テキサスレッドに浸漬し (1:100、室温で 30 分; Amersham Pharmacia Biotech)、PBS 中で洗浄して蛍光用に Vectormount を用いて載せ、カバーガラスで覆った。

30

【0151】

I I 型コラーゲン検出のため、ウサギ血清中でスライドをブロックし (2.5 %、室温で 20 分; Dako)、PBS 中で完全に洗浄し、マウスモノクローナル I I コラーゲン一次抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Neomarkers) 又は同濃度の非免疫マウス IgG 免疫グロブリン (Dako) のどちらかに 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩浸漬した。スライドを次いで PBS 中で洗浄し、ウサギ抗マウスビオチニル化二次抗体に浸漬し (1:100; 室温で 30 分; Dako)、PBS 中で完全に洗浄し、ストレプトアビジン FITC に浸漬し (1:100; 室温で 30 分; Amersham Pharmacia Biotech)、PBS 中で完全に洗浄して、蛍光用に Vectormount を用いて載せ、カバーガラスで覆った。

40

【0152】

結果及び考察

欠損のない外植片は、分散している死細胞を外植片の鉍化底部で、そして限られた数の死細胞を表層面に沿って示したことを除いては、生存細胞を組織全体にわたって示した。マトリクスは、サフラニン O 及びトルイジンブルーで強度のメタクロマチック染色 (グリ

50

コサミノグリカンリッチなマトリクスの存在を示す)、ピクロシリウスレッドで赤染色(コラーゲンの存在を示す)及びH+Eで形態学的に正常な軟骨の様相を示した。

空の欠損を持つ試料は、輪郭のはっきりした、広帯域の細胞死を創縁に沿って示した。H+E染色は、この層で核が縮んだ形態学的壊死細胞を示したのに対して、サフラニンO及びピクロシリウスレッドは、傷の端部付近のマトリクス染色の損失を示した。少数の標本において、約6日間培養後、欠損の底部の鈣化組織から軟骨の切断表面にわたって細胞が移動するのが観察された。これらの移動細胞は、剥離関節形成術、外科的微小骨折又は肋軟骨下骨板の穿孔の後に、軟骨欠損を埋める細胞と同類である可能性がある。

【0153】

インプラントを含む試料は、インプラント及び周辺軟骨の中間／深層内の軟骨細胞によるコラーゲンIIの産生に加えて、装置の表層内での限られた量のコラーゲンI染色を示した。周辺軟骨組織よりはかなり低レベルではあったが、組織学的染料でコラーゲンとグリコサミノグリカンの双方を染色されたインプラント中のマトリクスは、周辺軟骨組織で確認された。形態学的データは、生存細胞が創縁上に成長していたことを示したが、これらの細胞が外植片の底部から発生したのか又はこれら実験のインプラントから発生したのかを断定的に述べることはできなかった。さらに、細胞死の層が減少し、マトリクス損失の程度が低下したように思われた。全般的に言えば、結果は、これらの方法を用いて生成された層状スカホールド強化インプラントが局所全層軟骨損傷に移植され、軟骨修復を促進するのに使用できるという仮説と一致する。

【0154】

実施例2.3

序文

この実施例の目的は、層状インプラントを生成するのに、選択された材への表層軟骨始原細胞の早期の結合速度がどのように使用されるかを示すことである。インプラントの層の1つは軟骨始原細胞が豊富であるのに対して、残りの層は涸渇している。この実施例では、高い割合の早期結合表層軟骨始原細胞が付着するが、成熟軟骨細胞の大半は許容時間中に付着できないような限られた時間のあいだ、フィブロンекチンで被覆された線維スカホールドに細胞の混合群(すなわち表層、中間層及び深層)を植えつける。その時間内に付着しない細胞(すなわち、成熟細胞)は別のフェルトに植えつけ、接着させる。次いで2つのスカホールドをまとめて、2層培養物を形成する。最初のフェルトは、表層軟骨始原細胞が豊富である。表層軟骨始原細胞は、N1の免疫染色により同定される。

【0155】

実験

針フェルト(needle-felt)の被覆

1mM $MgCl_2$ 及び1mM $CaCl_2$ を有するダルベッコのPBS中の血漿フィブロンекチン $10\mu g/ml$ で、密度 $62mg/cc$ の、厚さ $0.5mm$ 直径 $10mm$ のPET針フェルト(バッチ番号ET216/200/4/1)を $4^\circ C$ で一晩被覆した。さらに、 $10\% FCS$ を含むD-MEMで、密度が $45mg/cc$ の直径 $10mm$ 、厚さ $2mm$ のPET針フェルト(バッチ番号PS0324/04)を $4^\circ C$ で一晩被覆した。細胞植え付けの前に、 $0.5mm$ の針フェルトを $1\% BSA$ で1時間、 $37^\circ C$ でブロックした。

【0156】

細胞単離

2～3週齢のウシの中足指節関節の関節軟骨から、表層、中間層及び深層の軟骨細胞の混合群を単離した。次いで、 5% ウシ胎児血清(FCS)及び 0.1% プロナーゼ(Merck、 4×10^6 ユニット/g)を含むダルベッコの改質イーグル培地(DMEM)に軟骨の部分を直接入れ、 $37^\circ C$ で3時間インキュベートした。次いで軟骨をPBSで1回洗浄し、 $5\% FCS$ 及び 0.04% コラゲナーゼ(Worthington、 $237U/mg$)を含むDMEM中でインキュベートして、静かに振りながら $37^\circ C$ で一晩インキュベートした。

次いで、 $70\mu m$ 細胞ストレーナー(Falcon)で組織消化物を濾過し、残屑を除去

した。得られた濾液を次いで1000rpmで5分間ペレット細胞に遠心分離した。次いで、細胞ペレットを無血清DMEM中に再懸濁させ、1000rpmで5分間遠心分離し、無血清DMEM中に再懸濁させた。次に細胞数を計数し、細胞を所望の濃度に再懸濁させた。

【0157】

細胞植え付け

0.5mm及び2mmの針フェルトを、それぞれ血漿フィブロネクチン及びFCSで被覆し、上記の通りにブロックした。軟骨細胞の混合群を単離し、 4×10^6 細胞/mlの濃度に再懸濁させた。軌道シェーカーを37℃で一定に攪拌しながら、0.5mmフェルトにこの懸濁液1mlを30分間付けた。この後、フェルトを取り除き、無血清培地で3回洗淨して、未接着細胞を取り除き、10%FCSを含むDMEMに5時間移した。洗淨液をプールし、最初の植え付け細胞懸濁液に添加して、遠心分離によりペレット化し、10%FCSを含むDMEM中に再懸濁させて、上記のように37℃で一晩2mm厚のフェルトに付けた。植え付け過程の後、両方のフェルトをPBSで2回洗淨し、-20℃のメタノールに10分間固定し、0.02%アジ化ナトリウムを含むPBSに移した。免疫染色用に使用するまで、この溶液中にフェルトを4℃で保管した。

実施例2.3のコントロールとして、上記0.5mmのフェルト無しで、FCSで一晩4℃で被覆した2mmのフェルトに、軟骨細胞の混合群を植え付けた。

【0158】

ノッチ1免疫染色

免疫染色のため、フェルトをPBSで3×5分洗淨し、室温で1時間、2.5%正常ウサギ血清でブロックした。次いでフェルトをPBSで3×5分洗淨し、 $10 \mu\text{g/ml}$ ヤギ抗ノッチ1抗体と一晩4℃でインキュベートした。フェルトを次にPBSで3×5分洗淨し、ビオチニル化ウサギ抗ヤギ二次抗体の1:100PBS希釈液と1時間室温でインキュベートした。フェルトを再びPBSで3×5分洗淨し、ストレプトアビジン-FITCの1:100PBS希釈液と室温で1時間インキュベートした。次いで、フェルトをPBSで3×5分洗淨し、次に488nmで励起するArKrレーザーを使用したLeica CM-IRBE倒立共焦点顕微鏡を用いて観察した。フェルトの表面から400μmの深さまで10μm間隔で光学切片を撮影した。Leica TCS-NTソフトウェアMaximum Projection機能を用いて画像を積み重ねると、z軸に沿って最大グレースケール値が示された。画像上の緑蛍光(N1染色)の面積を算出したImage Pro-plusを用いて画像を定量化した。x-及びy-軸の画像のサイズに加えて、光学切片の深さ(z軸; 400μm)がわかっているため、 mm^3 当たりの緑蛍光の量を算出できる。

【0159】

結果

図2.17は、コントロールと比較した、2つのフェルトにおける緑蛍光の定量を示す。フィブロネクチンで被覆され、下のフェルトに軟骨細胞の混合群を植え付ける前に同じ細胞を30分間植え付けた上のフェルトでN1+蛍光の量が多いことがすぐにわかる。

【0160】

【表4】

表2.3: 上及び下の針フェルトのN1蛍光の面積

上フェルト	下フェルト	コントロール
0.8876±0.382248	0.018998±0.012973	0.035932±0.038209

【0161】

結論

この研究は、成熟軟骨細胞を含む別のフェルトに層状化される軟骨始原細胞結合材として

のフィブロネクチン被覆フェルトの使用を実証した。層状に植えつけられたインプラントはこのように生成される。

【0162】

実施例 2. 4

序文

この実施例の目的は、層状インプラントを生成するのに、表層軟骨始原細胞の選択された材への早期結合速度がどのように使用され得るかを実証することである。インプラントの層の1つは軟骨始原細胞が豊富であるが、残りは潤滑している。この実施例では、層は単一のスカホールド内で生成される。繊維スカホールドの選択層をフィブロネクチンで被覆し、次いで、細胞の混合群（すなわち、表層、中間層、及び深層）を限られた時間植え付ける。この時間は、早期結合表層軟骨始原細胞が高い割合でフィブロネクチン被覆層に付着する一方で、成熟軟骨細胞の大半は付着できないような時間である。この時間内に付着しない細胞（すなわち、成熟細胞）を回収し、結合材と一緒にスカホールドに再導入して、スカホールド全体に接着させる。表層軟骨始原細胞は、ノッチ1の免疫染色により同定される。

【0163】

実験

針フェルトの被覆

密度が 45 mg/cc の、厚さ 2 mm 、直径 10 mm の PET 針フェルトの上面を、 1 mM MgCl_2 及び 1 mM CaCl_2 (Sigma) を有するダルベッコの PBS 中 $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度の血漿フィブロネクチン (Sigma) で被覆した。フェルトを 4°C で一晚被覆した。 1 mM MgCl_2 及び 1 mM CaCl_2 のみを有するダルベッコの PBS 中で、コントロールを一晚被覆した。細胞植え付けの前に、 37°C で1時間、フェルトを $1\% \text{ BSA}$ でブロックした。

【0164】

細胞単離

2～3週齢のウシの中足指節関節の関節軟骨から、表層、中間層及び深層軟骨細胞の混合群を単離した。次いで、 $5\% \text{ U}$ シ胎児血清 (FCS) 及び $0.1\% \text{ P}$ ロナーゼ (Merck、 $4 \times 10^6 \text{ ユニット/g}$) を含むダルベッコ改質イーグル培地 (DMEM) に軟骨の部分を直接入れて、 37°C で3時間インキュベートした。軟骨を次いで PBS で1回洗浄し、 $5\% \text{ FCS}$ 及び $0.04\% \text{ C}$ ラゲナーゼ (Worthington、 237 U/mg) を含む DMEM 中でインキュベートし、静かに振りながら 37°C で一晚インキュベートした。

次いで、組織消化物を $70 \mu\text{m}$ 細胞ストレーナー (Falcon) で濾過し、残屑を除去した。得られた濾液を次いで 1000 rpm で5分間ペレット細胞に遠心分離した。細胞ペレットを次いで無血清 DMEM 中に再懸濁させ、 1000 rpm で5分間遠心分離して、無血清 DMEM 中に再懸濁させた。次に細胞数を計数し、所望の濃度に細胞を再懸濁した。

【0165】

針フェルトを $10 \mu\text{g/ml}$ の血漿フィブロネクチンで被覆し、 37°C で1時間 $1\% \text{ BSA}$ でブロックした。軟骨細胞の混合群を単離し、 $4 \times 10^6 \text{ 細胞/ml}$ の濃度に再懸濁した。軌道シェーカーを 37°C で一定に攪拌しながら、この懸濁液 1 ml をフェルトに30分間付けた。細胞を植え付けたフェルトを次いで無血清培地で 2×10 分洗浄し、非接着細胞を取り除いて、洗浄液をプールし、遠心分離によりペレット化し、 $10\% \text{ FCS}$ を含む 1 ml DMEM 中に再懸濁した。次いで、 $10\% \text{ FCS}$ を含む DMEM に植え付けフェルトを移した。プールされた非接着細胞及び植え付けフェルトを 37°C で一晚インキュベートした。

プールされた細胞を次いで対応するフェルトに植え戻した。次いで、軌道シェーカーを 37°C で一定に攪拌しながら細胞懸濁液中で約7時間フェルトをインキュベートした。この後、フェルトを PBS で2回洗浄し、 -20°C のメタノールで10分間固定し、 0.02

%アジ化ナトリウムを含むPBSに移した。免疫染色に使用するまで、この溶液中にフェルトを4℃で保管した。

【0166】

N1免疫染色

免疫染色のため、フェルトをPBSで3×5分洗浄し、室温で1時間、2.5%正常ウサギ血清でブロックした。次いでフェルトをPBSで3×5分洗浄し、10μg/mlヤギ抗ノッチ1抗体(Santa Cruz)と一晩4℃でインキュベートした。フェルトを次いでPBSで3×5分洗浄し、室温で1時間ビオチニル化ウサギ抗ヤギ二次抗体の1:100PBS希釈液とインキュベートした。フェルトをPBSで3×5分再洗浄し、室温で1時間ストレプトアビジン-FITCの1:100PBS希釈液とインキュベートした。次いで、フェルトをPBSで3×5分洗浄し、488nmで励起するArKrレーザーを使用したLeica DM-IRBE倒立共焦点顕微鏡を用いて観察した。フェルトの表面から400μmの深さまで、10μm間隔で光学切片を撮影した。Leica TCS-NTソフトウェアMaximum Projection機能を用いて画像を積み重ねると、z軸に沿って最大グレースケール値が示された。被覆フェルトの表面、被覆フェルトの下側(すなわち、非被覆領域)ならびに非被覆フェルトの上面及び下面の画像を撮影した。

10

【0167】

画像上の緑蛍光(N1染色)の面積を算出したImage Pro-plusを用いて画像を定量化した。x-及びy軸の画像のサイズに加えて(1000μm×1000μm)、光学切片の深さ(z軸; 400μm)がわかっているため、mm³当たりの緑蛍光の量を算出できる。結果

20

【0168】

【表5】

表2.4 被覆及び非被覆フェルトの上面及び下面のN1蛍光の面積

被覆フェルトの 上面	被覆フェルトの 下面	非被覆フェルトの 上面	非被覆フェルトの 下面
10380±1557	1456±517	1716±1155	1744±513

30

【0169】

図2.18は、様々な層における緑蛍光の定量を示す。上面をフィブロネクチンで被覆されたフェルトの上面にN1+蛍光量が多いことがすぐにわかる。

結論

この研究は、層状に植え付けられた生体適合性物質、すなわち、上面に軟骨始原細胞及び下方領域に成熟細胞を有する生体適合性物質を産生するための、軟骨始原細胞結合材としてのフィブロネクチンの使用を実証した。

【0170】

実施例2.4のエキスピボ評価

序文

実施例2.4は、表層軟骨始原細胞の早期結合速度を選択された材に用いて、層状インプラントを生成する。インプラントの層の1つは軟骨始原細胞が豊富であるのに対して、残りは涸渇している。線維スカホールドの選択層をフィブロネクチンで被覆し、次いで細胞の混合群(すなわち、表層、中間層、及び深層)を限られた時間植え付ける。この時間は、早期結合表層軟骨始原細胞が高い割合でフィブロネクチン被覆層に付着する一方で、成熟軟骨細胞の大半は付着できないような時間である。この時間内に付着しない細胞(すなわち、成熟細胞)を回収し、結合材と一緒にスカホールドに再導入して、スカホールド全体に接着させる。

40

50

【0171】

方法

PET針フェルト（直径3.5mm×厚さ3mm；45mg/cc）の上面を、4℃で16時間、血漿フィブロネクチン（ダルベッコのPBS中10μg/ml；Sigma）又はPBSのいずれかで被覆し、37℃で1時間、フェルトを1%BSAでブロックした。2～3週齢のウシの中足指節関節の全層関節軟骨の外植片を、5%のウシ胎児血清（FCS）及び0.1%プロナーゼ（Merck、 4×10^6 ユニット/g）を含むダルベッコ改質イーグル培地（DMEM）中に直接入れ、37℃で3時間インキュベートした。軟骨を次いでPBSで1回洗浄し、5%FCS及び0.04%コラゲナーゼ（Worthington、237U/mg）を含むDMEM中でインキュベートし、静かに振りながら37℃で一晩インキュベートした。組織消化物を70μm細胞ストレーナー（Falcon）で濾過して、組織残屑を除去し、得られた濾液を遠心分離し（1000rpm；5分）、細胞をペレット化した。細胞ペレットを無血清DMEM中に再懸濁し、遠心分離して（1000rpm；5分）、無血清DMEM中に再懸濁した。

【0172】

混合軟骨細胞懸濁液（750,000細胞/ml；1ml）を、軌道シェーカを37℃で一定に攪拌しながらフェルトに30分間付けた。細胞を植え付けたフェルトを次いで無血清培地で洗浄して（2×10分）、非接着細胞を取り除き、洗浄液をプールし、遠心分離（1000rpm；5分）によりペレット化して、DMEM/10%FCS（1ml）中に再懸濁した。次いで、10%FCSを含むDMEM中で植え付けフェルトを37℃で16時間インキュベートした。プールされた非接着細胞を次いでフェルトに植え戻し、軌道シェーカを37℃で一定に攪拌しながら培養物を16時間インキュベートした。次いで、10%FCSを含む新鮮なDMEMに植え付けフェルトを移し、7日間培養した。

【0173】

2～3週齢のウシの中足指節関節から軟骨のストリップ（約30mm×5mm）を得て、片に切断し（～5mm×5mm四方）、直径3.5mmのAcufex円筒形のみを用いて、軟骨外植片の中心から直径3.5mmの穴を全層にわたって切除して欠損を作った。欠損を：

- [1] 細胞を植え付けた層状構造物
- [2] 細胞を植え付けたコントロール構造物（すなわち、フィブロネクチン非被覆）
- [3] 細胞を植え付けていない構造物
- [4] 最初に切り出された円盤状切片の代替物
- [5] 欠損を空のままにしておく

で充填して、5つの実験群を作成した。

次いで実験群を7日間培養し、その後、エチジウムホモダイマーとインキュベートし（90分）、（i）10%NBFSで固定し、ろう包埋し、切除して、従来の組織学的染料、例えばH&E及びサフラニン Oで染色するか、又は（ii）脱ろうし、蛍光光学のもとに検査して、細胞死を評価した。

【0174】

結果

未充填欠損は、創縁で死細胞の一団及びマトリクスの質の低下を示した。細胞死の量は、軟骨の栓が欠損部位に戻された試料、特に2つの切除軟骨表面間の近接領域で減少した。細胞を植え付けていない構築物は、軟骨外植片の基部から発生する可能性のある少量の遊走細胞を除いては、7日間のインキュベート期間空のままであった。遊走細胞の多くは切除軟骨表面に付着したままであった。コントロール及び層状植え付け構築物は、生存細胞をインプラント全体に示し、軟骨の創縁上の細胞数を上昇させた。これらの結果は、層状植え付け構築物が、軟骨修復を促進するためのインプラントとして使用できることを示唆している。

【0175】

実施例 3. 1：発明の第一及び第二観点の実施例

10

20

30

40

50

インプラントの製造

本発明のインプラントは、以下の方法に従って作製されたスカホールドからなる：三次元のPETニット織物（厚さ2mm、十字形スペーサー布構造及び直径1～2mmの孔を含むマクロ孔質骨対向面を有する、Culzean Fabrics社製）を、121℃で15分間熱硬化し、一对の電動「ニップローラ」を用いて熔融ポリカプロラクトン（PCL）のプールに布地を引き出すことによりPCLで補強する。三次元のニット織物内の一組の隣り合うスペーサー布線維を交差させ、PCLですぐに橋かけされる底広の「X」を形成し、それによって、補強された布の強度を最大化する。同様に、3D編み物の上面及び下面の密集した線維をPCLで頻繁に橋かけして、縫合を維持するのに十分頑強な、強く熱硬化可能な表面を形成する。

10

【0176】

材を再膨張させ、冷却して、1.8MPaの圧縮率及び75%以上の空隙率を持つスカホールド層を生成した。

圧縮率が極めて低く（～0.02MPa）、空隙率が90%以上で厚さ1mmの適合性不織PGA針フェルトを、三次元補強3Dのニット織物の片面に接合させた。熱及びポリマー溶液を用いて接合を行った。三次元ニット織物の厚さ20%の深さ（複合インプラントの厚さの13.3%）まで、補強されたニット織物の第二（上部、関節）表面を軟骨始原細胞結合材、この場合フィブロネクチンで被覆する。ニット織物の下方領域及び不織PGAフェルトは、軟骨始原細胞結合材で被覆しない。

【0177】

20

インプラント生成／細胞の植え付け

スカホールドを徐々に加熱してポリカプロラクトンを軟化し（40～60℃）、移植部位の輪郭に成型した。得られたスカホールドは、機能的付加に耐えるように十分に頑強であると同時に、欠損部位内の細胞移動を可能にするのに十分に多孔質な構造を保持している。

患者のバイオプシー／モザイク形成外植片から抽出された自己細胞からなる関節軟骨細胞及び軟骨始原細胞の源（骨髄間質線維芽細胞）を直径50～250μmのマイクロ担体ビーズに植え付け、インビトロで増殖させた。欠損部位への埋め込みの前に、ニット織物の空所に沈降させて、得られた細胞被覆生体適合性材料粒子を導入する（ $\geq 1 \times 10^6$ 細胞/cm² 移植面積とする）。粒状担体材料によって軟骨細胞を培養物内で増殖させ、トリプシン処理及び再付着工程の必要なしに装置の本体に導入する。

30

【0178】

埋め込み

肋軟骨下骨を露出し、削るために、埋め込み部位の基部を機械的に創傷清拭して、さらに、鋭利器具を用いて欠損の辺縁を健康な軟骨まで切除した。次いで、欠損部位に装置を圧入し、縫合糸及び／又は生体再吸収性釘で正しい位置に固定した。擦過肋軟骨下骨由来間葉細胞は不織フェルトに移動し、埋め込みから数週間後のインプラントの固定に寄与する。

【0179】

実施例3.2：軟骨始原細胞を精製するための軟骨始原細胞結合材の使用

40

フィブロネクチンを35mmペトリ皿に被覆した（10μg/ml；Sigma）。プロナーゼ及びコラゲナーゼ中で表層軟骨を消化し、放出された細胞を無血清培地DMEM中に懸濁させて軟骨細胞を生成した（4000表層細胞/ml；Sigma）。単離細胞をフィブロネクチン被覆皿に40分間添加した。次いで、被覆ペトリ皿を無血清培地DMEMで洗浄し、非接着細胞を取り除いて、新鮮な培養皿に移した。コロニー形成効率（10日間のインキュベーション期間、分裂して、コロニーを形成できる細胞の%）は、非接着細胞よりもフィブロネクチン接着細胞の方がはるかに高いことがわかった（ $p < 0.001$ ）。フローサイトメトリーは、接着細胞が、フィブロネクチンへの細胞結合に関係するの知られている細胞表面マーカーである、インテグリンβ₁を高いレベルで発現することを示した。

50

【0180】

実施例3：軟骨始原細胞に選択的に結合するか、又は成熟軟骨細胞に結合する材料の同定
軟骨始原細胞又は成熟軟骨細胞いずれかを優先的に結合する材は、(i) SZC、MZC及びDZCの、組織培養プラスチックを被覆する細胞結合材候補物への接着率を比較し、(ii)被覆培養プラスチック上で成長する表層細胞間のコロニー形成効率の差を測定し、(iii)「結合材」-被覆粒状生体材料(例えば、フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト)の、コロニー形成SZC及びコロニー形成骨髄間質細胞を結合する能力を実証することにより同定された。

【0181】

方法

細胞単離

慎重な切除に続いてプロナーゼ/コラゲナーゼ連続消化(3.17 IU ml^{-1} プロナーゼ 37°C で3時間; $5\% \text{ FCS}$ 、 $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ゲンタマイシン、 $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ アスコルビン酸を含むDMEM/F12中 37°C で16時間 0.12 IU ml^{-1} I型コラゲナーゼ)を行うことにより、ウシの新生関節軟骨の表層、中間層及び深層由来軟骨細胞を中足指節関節から単離した。細胞を遠心分離し、DMEM/F12中に再懸濁し、血球計測器を用いて計数し、無血清培地中に再懸濁させた。

無血清MG-63調整培地(40 ml ; 80% 融合細胞から48時間にわたって回収)を、 10 ml h^{-1} の流速で抗FN-EDA(Oxford Biotech)抗体被覆免疫アフィニティカラムの中で16時間 4°C で循環させた。溶離液を、Perkin-Elmer Lambda 2分光光度計を用いて、吸光度 $A_{280 \text{ nm}}$ で吸光度がゼロになるまで10分ごとに測定した。次いで、溶離緩衝剤(20 mM CAPS 、 150 mM NaCl 、 10 mM EDTA 、 $\text{pH } 11$)を用いてFN-EDAをカラムから溶離し、吸光度がゼロに戻るまでフラクションを10分ごとに回収した。

【0182】

フラクションを含むFN-EDAをプールし、 $10,000 \text{ MWCO}$ 透析膜(Pierce)を用いて、4Lの透析緩衝剤(10 mM CAPS 、 150 mM NaCl 、 1 mM CaCl_2 、 $\text{pH } 11$)に対して 4°C で一晩透析した。FN-EDAを透析膜から除き、Micro-BCAアッセイによりタンパク質濃度を測定した。溶離FN-EDA、非結合FN-EDA及び非分画MG-63培地のプールされたフラクションをELISAにより試験した。 $4\sim 12\%$ のビス-アクリルアミドゲル(NOVEX)上に、 $1 \mu\text{g}$ の精製FN-EDAを $1 \mu\text{g}$ の血漿及び細胞フィブロネクチンと一緒に流すことによりSDS-PAGEも行った。両方の試験で高純度のFN-EDAが確認された。

【0183】

組織培養プラスチックを被覆した細胞結合材候補への表層、中間層及び深層軟骨細胞の接着力の評価

マルチウェルプレートを、一晩 4°C で、候補材($10 \mu\text{g/ml}$)又はコントロール物質($10\% \text{ FCS}$ 、陽性コントロール; $10\% \text{ BSA}$ 陰性コントロール)で被覆した。プレートをBSAでブロックし(1% ; 37°C で1時間)、表層、中間層又は深層のウシの新生軟骨細胞の懸濁液を添加した(0.5 ml ; 1 ml につき 1000 細胞)。

$5\% \text{ CO}_2$ の加湿雰囲気下、 37°C で20分間、150分間、1日間又は4日間培養物をインキュベートし、PBSで洗浄し、次いでDMEM/ $10\% \text{ FCS}$ 中で1.5時間インキュベートして、細胞接着を安定させた。次いで、プレートをPBS中で洗浄し、メタノールで固定し(-20°C ; 30分)、蒸留水でゆすいで、空気乾燥させた(固定されたプレートは、試験前に1ヶ月間 4°C で保管してもよい)。

分析のため、細胞をPBSで洗浄し、エチジウムホモダイマーで染色し(1000 中1希釈; 37°C ; Molecular Probes)、蛍光顕微鏡を用いて計数した。結果を結合細胞の%として表し、分類して、特定の細胞群を優先的に結合する材を同定した。

【0184】

軟骨始原細胞接着アッセイ：識別接着及びコロニー形成効率

24ウェルプレートのウェルを、4℃で16時間、細胞外マトリクス成分（フィブロネクチン、酸可溶性I型コラーゲン、酸可溶性II型コラーゲン、酸可溶性IV型コラーゲン、ラミニン又はテンサシン；1mM CaCl_2 及び1mM MgCl_2 を含むPBS中27nM；「PBS+」）で被覆した。プレートをPBS+中で洗浄し、SZC又はDZCを植え付け（700細胞 ml^{-1} ；DMEM/F12、1ml）、5% CO_2 の加湿雰囲気下、37℃で20分間インキュベートした。

4時間後、位相差顕微鏡を用いて接着細胞／ウェルの総数を数えた。4日後、位相差顕微鏡を用いて1皿当たりのコロニー数（4以上の軟骨細胞のクラスターとして定義される）を計数し、コロニー形成効率（CFE）を以下のとおり算出した：

【0185】

【数1】

$$\text{CFE} = \frac{\text{4日目のコロニーの数}}{\text{初期の接着細胞数}}$$

【0186】

実験を繰り返して血漿フィブロネクチン（Sigma）と細胞フィブロネクチン（Sigma）又はアフィニティ精製フィブロネクチン-E DAの活性を比較した。

【0187】

コロニー形成SZC及びコロニー形成骨髄間質細胞の接着因子被覆スルフェートイントラサイトへの接着：「コロニー欠乏アッセイ」

少数のBMSC及びSZCは、DMEM/10% FCS中の組織培養プラスチックにそれぞれ4及び6日間培養されると、16細胞より多いコロニーを形成する。これらのコロニー形成細胞を前駆細胞とみなす。スルフェートイントラサイトを、4℃で2時間、血漿フィブロネクチン、細胞フィブロネクチン、コラーゲンIV、ポリリジン、ラミニン（全て60 $\mu\text{g/ml}$ ）又は2.5ml DMEM中のPBSで被覆した。被覆生体適合性材を、骨髄間質細胞又はSZC懸濁液（無血清培地中に125k細胞 ml^{-1} ）と37℃で3時間インキュベートし、懸濁液を1000倍に希釈して、12ウェルプレートのウェルにアコートした（4ml）。次いで、ウシの胎児血清（0.4ml）を各ウェルに添加し、培養物をさらに16～24時間インキュベートした。次いで、ウェルをPBSで洗浄し、DMEM/10% FCS（2ml）中で培養物をさらに4～6日間インキュベートした。コロニー（細胞が16より多い個々のクラスター）を位相差顕微鏡で視覚化し、ブラインドを数えた。結果を、接着因子前処理済スルフェートイントラサイトに暴露された細胞懸濁液により形成されたコロニーの数／PBS前処理済スルフェートイントラサイトに暴露された細胞により形成されたウェル当たりのコロニーの数として定義される「コロニー欠乏スコア」として表した。 ≤ 0.5 のコロニー欠乏スコアは、コロニー形成細胞結合の優先値として定義されたのに対して、 ≤ 0.8 の値は、許容できるコロニー形成細胞結合の閾値として定義された。

【0188】

結果

組織培養プラスチックを被覆する細胞結合材候補に対する表層、中間層及び深層軟骨細胞の接着評価

データは、インキュベート期間の最初の20分間、表層細胞が、中間又は深層細胞より多くフィブロネクチン被覆培養プラスチックに結合したことを示した（表3.1）。VIコラーゲン及びピーナツアグルチニンも、この初期時点で表層細胞を優先的に結合したが、細胞接着の大きさは最小であった（表3.1）。

対照的に、150分間のインキュベート後、I型コラーゲン、II型コラーゲン、VI型コラーゲン及びビトロネクチンは、表層細胞よりも、中間層及び深層細胞をより多く結合した（表3.2）。

【0189】

10

20

30

40

50

軟骨始原細胞接着アッセイ：識別接着及びコロニー形成効率

20分以内にフィブロネクチンに接着したSZCのコロニー形成効率は、他のどの処置群で観察されたものよりも著しく高かった ($p < 0.05$) (図3.6)。統計的に有意差は他になかった (全てにおいて $p > 0.05$)。

血漿フィブロネクチン、細胞フィブロネクチン及びフィブロネクチン-E DAの有効度の有意差は、(i) SZC又はMZCの初期接着 (ii) 細胞のコロニー形成効率又は (iii) 形成されたコロニーの大きさのいずれについても観察されなかった。

【0190】

コロニー形成表層細胞及びコロニー形成骨髄間質細胞の、接着因子被覆スルフェートイントラサイトへの接着：「コロニー欠乏アッセイ」

これらの実験において、被覆スルフェートイントラサイト粒子に付着しない細胞は、培養プラスチックに付着し、その後コロニーを形成できる。スルフェートイントラサイト粒子に結合する細胞を、洗浄工程中に取り除いた。したがって、被覆スルフェートイントラサイトへのコロニー形成細胞の接着は、培養プラスチック上に形成されたコロニー数の減少により示された。最初の3時間のインキュベート後の細胞及び粒子の希釈懸濁液の顕微鏡検査は、未付着細胞と共に、(いくつかは接着細胞を持つ) 粒子のまばらな分布を示した。ウシの胎児血清の、これらの培養物への16~24時間の添加は、生体材料粒子に付着しなかった細胞を、組織培養プラスチックに接着させた。次の洗浄工程で、培養プラスチックに接着した細胞だけを残して、粒子及び粒子に接着した細胞を除去した。結果は、表層細胞が血漿フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトにさらされた時、1ウェル当たり 21.0 ± 1.39 コロニーが存在したのに比べて、表層軟骨細胞がPBS前処理済スルフェートイントラサイトとインキュベートされた時、1ウェル当たり 46.8 ± 3.76 のコロニーが存在したことを示した (すなわち、0.45のコロニー欠乏指数； $p < 0.001$ ；図3.7参照)。同様に、接着因子被覆スルフェートイントラサイトとインキュベートされた骨髄間質細胞は、血漿フィブロネクチン0.49、I Vコラーゲン0.67、細胞フィブロネクチン0.8、ポリリシン0.88、及びラミニン1.26のコロニー欠乏指数を示した (図3.8参照)。

【0191】

考察

ここまでの結果は、N1陽性フィブロネクチン-E DA分泌、強インテグリン β_1 陽性、コロニー形成軟骨始原細胞の群が、新生関節軟骨の表層内に存在することを示した。(i) これら始原細胞の特定の特徴を用いて、軟骨始原細胞又は成熟軟骨細胞のいずれかを選択的に結合する生体材料を開発でき、かつ(ii) 軟骨始原細胞が関節表面付近に層を形成する一方、成熟軟骨細胞がインプラントの深層で結合される層状インプラントを形成するように、そのような生体材料に細胞を植え付け、凝集させることができるという仮説が立てられた。

【0192】

これらの結果は、(i) SZCがフィブロネクチン被覆表面に迅速に結合し、(ii) 「迅速なフィブロネクチン結合」SZCが、フィブロネクチン被覆表面上で成長した時、高いコロニー形成効率を有し、かつ(iii) 微粒子生体材料「フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト」が、表層軟骨及び骨髄間質両方の双方からコロニー形成細胞を結合することを示す。これは、フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトが、提案された層状組織工学軟骨インプラントの表層内で使用するのに適した材料であることを示唆している。異なる形態のフィブロネクチン (たとえば、血漿フィブロネクチン、細胞フィブロネクチン及びフィブロネクチン-E DA) は、これらのアッセイシステムにおいてほぼ類似した結果を示し、全てこの目的のために使用できることを示唆している。

【0193】

結果は、コラーゲンI Vが、SZCを選択的に結合することも、コロニー形成表層細胞の接着及び増殖を支持することもないことを示す。しかし、コラーゲンI Vは、粒状ポリアニオン生体材料に吸着されて、骨髄間質からコロニー形成細胞を結合する表面を有する材

10

20

30

40

50

料を生じる。骨髄間質中のコロニー形成細胞は、骨、軟骨、脂肪及び線維組織を形成できる初期間葉細胞であるので、コラーゲン I V は、新生関節軟骨の表層でよく発生するコロニー形成細胞よりも、より原始的な間葉前駆体群を結合することができる。

対照的に、150 分間のインキュベート後、I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、VI 型コラーゲン及びビトロネクチンは全て、表層細胞よりも中間層及び深層細胞を多く結合した。したがって、これらの細胞外マトリクス成分を利用して、成熟軟骨細胞を粒状生体材料に結合させてもよい。このような細胞を植え付けた材料は、層状組織工学軟骨インプラントの中間層及び／又は深層を形成するのに使用できるであろう。

【0194】

【表6】

10

表 3.1 : 20 分間のインキュベート後の、フィブロネクチン、コラーゲン VI 及び
ピーナッツアグルチニン被覆組織培養プラスチックに接着する SZC、MZC 及び DZC
の%

結合材	SZC	MZC	DZC
フィブロネクチン	23.2	13.8	13.6
コラーゲン IV	4.8	2	2
ピーナッツアグルチニン	3.6	2	2

20

【0195】

【表7】

表 3.2 : 150 分間のインキュベート後の、I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、VI
型コラーゲン及びビトロネクチン被覆組織培養プラスチックに接着する SZC、
MZC 及び DZC の%

結合材	SZC	MZC	DZC
I 型コラーゲン	13.2	21	20.4
II 型コラーゲン	8.8	17.2	23
VI 型コラーゲン	7.8	17.8	22
ビトロネクチン	11.2	19.2	21.4

30

【0196】

細胞分離方法

細胞の均質な群、例を挙げると、例えば表層軟骨始原細胞のような軟骨始原細胞を、他の方法によって分離してもよい。細胞の均質な群を、(i) 細胞の浮遊密度又は沈降速度（フィコール勾配又は向流懸濁分離法）、(ii)（蛍光細胞分類、磁気ビーズへの結合又は補足的な媒介細胞溶解を介する）特定の細胞表面エピトープへの抗体結合、(iii) 特定基質への識別接着、(iv) 別のものではなく 1 つの細胞型の成長を支持する選択的な培養培地又は培養条件、(v) 細胞の他の物理特性、例えば、大きさ、粒状度又は電気キャパシタンスなどに基づく技術範囲を用いて強化したり、又は異種細胞混合物から分離してもよい。

40

これらの技法は、本発明のインプラントを生成するのに使用してもよい。

【0197】

スルフェートイントラサイト

本発明の異なる観点において、本発明は、損傷した軟骨の代わり、より詳しくは、半月及び関節軟骨のような荷重軟骨組織の代わりとなる合成インプラントに関する。本発明はさらに、スカホールド手段に細胞を植え付ける方法；その方法で使用するのに適したバイオリアクター；バイオリアクターを特に用いてスカホールド手段に植え付けする方法ならび

50

にスカホールド手段及びその内部で分散される細胞被覆微粒子からなるハイブリッドインプラントに関する。最後に、本発明は、本発明の合成インプラント又はハイブリッドインプラントを外科的に埋め込む工程からなる治療方法にも関する。

【0198】

関節軟骨欠損の治療に一般的な現在の手法には、（主として欧州で行われる）高度な脛骨切骨及び関節の生体力学と負荷を変える筋肉弛緩；胃洗浄及び骨増殖体や軟骨の原繊維からなる領域を除く創面切除ならびに出血や血塊の形成を誘発する肋軟骨下骨の穿孔と透過が含まれる。しかし、これらの技術は、いずれも関節軟骨の構造、組成、機械的特性又は耐久性を二倍にする組織の再生には至っていない。

最も一般的な技術は、フィブリン血塊及び繊維組織を形成する肋軟骨下ドリルの技術である。約75%の患者では初期の結果は十分なものであるが、手術から2年後には、依然として無症状の患者はわずか12%である。この手法の限界は、臨床結果の質と持続を予測し難く、長期的にみて、この手法がしばしば患者を悪化状態にすることである。他方、肋軟骨下ドリルと創面切除は、症状の緩和と1～3年ごとの膝関節全体を置換する必要性を延期する点で一般的に成功している。

【0199】

多くの外科医は、痛みを予測どおりに緩和し、機能を回復させ、優れた固定を実現することができ、長期間、例えば少なくとも10～15年以上持続可能な耐久性を有する合成軟骨修復生成物を重要な目的とみなしている。

上記の目的に合致するよう試みられている現在利用可能な製品は、炭素繊維のロッドからなる：軟骨損傷又は他の欠損は清浄にされて、肋軟骨下骨に摘出され、そこにつくられた穴に炭素繊維ロッドが挿入される。修復は、ロッドの上部周囲でのコラーゲンの島細胞の沈着で開始する。これらの島細胞群の成長はすぐに大きくなって完全に欠損を充たし、ロッドが欠損での修復組織用の固定源となる。この製品に伴う顕著な問題は、滑液腔でみられる炭素繊維磨耗残がいであり、これは剥離の問題を生ずる可能性がある。

【0200】

検討されている別の手法は、ニット織物からなるインプラントの使用である。これは、構造上の安定性を生じ、中に接種された細胞を支持するための膨張性ハイドロゲルを含む。このインプラントは軟骨の損傷に配置され、ハイドロゲルの膨張から生じる圧力の増加によって軟骨の成長を促進することを目的とする。この種のインプラントの使用に伴う問題は、インプラントとその真下の組織、特に肋軟骨下骨との統合が弱いことである。

【0201】

軟骨修復用装置を製造するための組織工学的手法は、細胞及び生体材料の組み合わせを用いるが、生体材料は、上記の通り合成修復生成物の形態であってもよい。製造された装置は、（患者自身の細胞に由来する）自己細胞又は組織もしくは（提供された組織に由来する細胞を用いる）同種異系の細胞又は組織を含んでもよい。自己由来の手法は、提供された組織の使用に伴う疾患伝染の危険性を最小限にするが、装置に使用される組織を回収する操作と、装置を製造したらすぐに外科的に導入する操作の2つの操作が必要になる欠点がある。同種異系細胞を用いた組織工学的手法は、自己細胞の使用に伴う問題を回避し、1回の操作手順で軟骨欠損の修復に使用できる規格品の軟骨インプラントを製造することを目的としている。この手法にも問題が無いわけではない。当面の問題には、ドナー組織調達に伴う法的及び倫理的問題、ならびに病原菌、ウイルス又はプリオンの伝染を防ぐためのドナー材料のスクリーニングが含まれている。

【0202】

同種異系細胞又は自己細胞の使用に特有の問題に加えて、機械的に適当なマトリクス設計するために細胞を培養する工程は、構造物の中心に栄養を拡散する問題をもたらす。最初、細胞複製は、構造物全体に均一に細胞数を増す。細胞数が増え、細胞外マトリクスの沈着が始まるにつれて、構造物周辺の細胞が、装置内に拡散している栄養素をより高い割合で消費し、それによって構造物の中心の細胞を飢えさせて、その成長を妨げる。最終的に、構造物の中心の細胞は死に、薄く、生存可能な表面を持つが、壊死性液化コアを有する

構造物が生ずる。この作用を回避する軟骨修復用装置の製造法は、現存の技術に勝る有意な改良となるであろう。

【0203】

軟骨修復に用いられる現在の合成軟骨修復生成物及び組織工学装置もまた、機械的弾性エネルギーと側方統合の対立する要件に合致できない。細胞を植え付けたインプラント又は細胞が移動した合成インプラントが、機械的負荷に耐えられるほど十分に頑強な構造を有する場合は、伝統的に、細胞はマトリクス内に閉じ込められ、周辺組織に移動することができなくなるため、側方統合に寄与できない。反対に、インプラントが細胞移動及び側方統合に十分透過性であれば、一般的には弱すぎて機械的負荷に耐えることができない。したがって、機械的に頑強であるものの、インプラント内での細胞の移動も可能にするインプラントの提供が望まれている。 10

【0204】

本発明の目的は、この種の従来技術製品に伴う問題を回避する合成軟骨修復製品を提供することである。とりわけ、特に肋軟骨下骨に接した組織との統合を改善する合成軟骨修復生成物を提供することが目的である。

本発明のもう1つの目的は、機械的に頑強であるが、インプラント内での細胞の移動を可能にする合成軟骨修復製品を提供することである。

さらに本発明の別の観点は、インプラント内部の細胞への不十分な栄養素の拡散の問題を回避する組織工学軟骨インプラントの培養法を提供することである。

本発明のさらなる目的は、以下の記載を読むことで明らかになるであろう。 20

【0205】

1つの観点では、本発明は、骨-軟骨界面又はその近くに位置するのに適した第一表面と暴露された関節表面に接触して、又はその近くに位置するのに適した第二表面を有し、

a. 生体適合性スカホールド、及び

b. それに結合して、又はその中に含まれる、第一表面から第二表面に伸びる適合性領域

からなる、軟骨欠損修復用合成インプラントからなる。

ここで、物質が「生体適合性」とあるというとき、それは、物質が哺乳動物の生体に外科的に導入される際、擬似外科手術のみの結果として生じることに加えて、臨床上著しい急性又は慢性的な副作用反応が本質的にないことを意味する。 30

【0206】

用語「スカホールド」は、三次元の少なくとも部分的に多孔性の構造物を吹くと解釈すべきであり、その孔度は細胞が浸透でき、インプラントの暴露部分（内外双方）は、細胞の増殖と細胞外マトリクス（ECM）の生成が生じ、組織がつくられるように、細胞を接着させ、成長させることができることを目的とする。

ここで、用語「適合性領域」という記載は、層とその層が接触する全ての材（肋軟骨下骨又は軟骨のような組織）との間隙を埋めるため、埋め込み時に変形する層を意味し、圧縮率が1.0 MPa未満の層を含むと解釈されるべきである。

【0207】

適合性領域の利点は、埋め込み時に接触して配置される組織よりもはるかに低い圧縮率を有し、それにより、埋め込み部位周囲組織の摩滅の問題を回避し得ることである。適合性領域は、埋め込み時に変形して、合成インプラントの第一表面と、それが接触する組織（一般に、肋軟骨下骨又は軟骨）との間隙を埋める。これにより、骨形成細胞が合成インプラントの下側に移動し、新しい骨を蓄積し、その結果、合成インプラントを欠損部位に結合させることができる。 40

本発明の一つの観点の好ましい形態において、合成インプラントの圧縮率は第一表面から第二表面に移動する方向で増加する。この発明による増加は、連続的であってもよく、又は1回以上の不連続な増加であってもよく、前者の場合、増加の勾配は一定か、もしくはそれ自体が増加又は減少してもよい。

【0208】

上記の理由により、適合性領域の圧縮率は1.0 MPa未満であってもよい。好ましくは、適合性領域は0.5 MPa以下の圧縮率を有する。より好ましくは、適合性領域の圧縮率は0.1 MPa以下である。最も好ましくは、適合性領域の圧縮率は0.05 MPa以下である。領域内の圧縮率が一定でなくとも、全領域の圧縮率はそれぞれの基準を満たさなければならない。

【0209】

本発明の一つの観点の別の好ましい形態において、合成インプラントは、1.0 MPa以上の圧縮率を持ち、第二表面から第一表面に伸びる関節領域を含む。この剛性関節領域は、内部の細胞を、関節などの埋め込み部位に存在し得る厳しい機械的条件から保護し、更に、関節領域への細胞移動及び細胞外マトリクス（ECM）の沈着を可能にする。他方、関節層は通常、一般に圧縮率が5 MPaより高い軟骨や骨のような周辺組織よりも低い圧縮率を有するであろう。この結果、外科医がインプラントを誤って埋め込み、その場で正しい位置に操作する必要があるがあっても、この操作のあいだに変形するのはインプラントであって、周辺組織ではなく、組織変形及び摩滅により生じる問題が最小限とされる。

10

【0210】

好ましくは、関節領域は1.8 MPa以上の圧縮率を有する。より好ましくは、関節領域は3.0 MPa以上の圧縮率を有する。層内の圧縮率が一定でなくとも、領域全体の圧縮率はそれぞれの基準を満たさなければならない。

既述のとおり、合成インプラントは上記に定義するスカホールドを含む。本発明のスカホールドは、適合性領域及び／又は関節領域とは異なる別個のものであってもよい。あるいは、適合性領域及び関節領域の1つ又は両方が、用語「スカホールド」に関して上記したように三次元の少なくとも部分的に多孔性の構造を含む際には、スカホールド自体が適合性領域及び／又は関節領域を導入しても良い。

20

本発明のスカホールドは、例えば三次元の織物又はニット織物（すなわち、スパーサー織物）、フリース（すなわち不織）材、スポンジ、発泡体、微粒子又はこれら材料のいかなる組み合わせを含んでもよい。

【0211】

「微粒子」という用語は、細胞接着を支持可能な10～2000 µm、好ましくは、100～600 µmの大きさの材料を含むと解釈すべきである。本発明による微粒子は、架橋タンパク質、多糖類、変性（derivatized）多糖類及びスカホールドの製造について後述されるような合成生体適合性ポリマーを含んでもよい。市販の微粒子は、Pharmacia（CYTOPRETM及びCYTODEXTM）ならびにSigma（再びCYTODEXTM）から得られるであろう。

30

スカホールドは1以上の層を含むことができる。スカホールドが複数の層を含む際には、これらの層はすべて同一の材からなってもよい。あるいは、各層は、他のいくつかの層又は他の全ての層と異なる材料からなってもよい。

【0212】

本発明のスカホールドが、三次元の織物又はニット織物の少なくとも1層を含む場合には、層を熱硬化するのが好ましい。この工程は、線維中の分子を線維上に設置した方向に再配置し、織物を幾分収縮させる。いずれの作用も、織物をより安定にするのに役立つ。熱硬化は、当業者にとって公知の温度及び時間で行われ、当該材料に左右される。

40

スカホールドの単層又は複層は、生体再吸収性又は非生体再吸収性材料からなってもよい。

材が生体再吸収性であるというとき、それは、材が化学／生物学的作用によって時間をかけて崩壊することを意味し、用語「再吸収」ならびに「再吸収する」は、それに応じて解釈される。好ましくは、完全な再吸収は約5年以内に、より好ましくは約3年以内に生じる。生体再吸収材を用いる利点は、後に材を除く外科手術が不要であるように、それらが崩壊して、完全に組織を修復し、欠損部位を充填できることである。

【0213】

ある生体再吸収材を用いる場合、好ましい選択基準は、組織が移植後に材の内部でつくら

50

れるあいだは、材が有意に再吸収しないという条件である。この条件を満たすことにより、内生生物組織がその形及び機械的完全性を引き継げるようになるまで、インプラントがこれらの機能を本質的に保持することが確実になる。数字の観点では、生体再吸収材を12週間インビポで移植する際、重量損失が5%未満であることが好ましい。より好ましくは、同一時間中、重量損失は2%未満である。他方、スカホールドが2以上の生体再吸収材からなる際には、インプラントを構造上完全にするため、生体再吸収材の少なくとも1つがこの基準を満たすことが好ましい。

【0214】

インビポでの再吸収時間が異なる、広範囲な生体再吸収材が知られている。材によって再吸収時間が変化するのはのみならず、1つの材自体の再吸収時間は分子量及び構造の配置で著しく変化することができる。最後に、異なる生体再吸収材をブレンド及び／又は共重合して、及び／又は成分の分子量もしくは結晶度を変えることによって、要求に対する生体再吸収材の再吸収時間を、近い将来、正確に調整できるものと思われる。

上記の点に留意すれば、本発明による生体再吸収材は、以下のモノマー又はポリマー混合物及び／又はそれによって形成されるコポリマーからなる生体再吸収ポリマー又はコポリマーからなってもよい：ヒドロキシ酸、特に乳酸、グリコール酸；カプロラクトン；ヒドロキシブチレート；ジオキサノン；オルトエステル；オルトカーボネート；アミノカーボネート。

【0215】

この発明による生体再吸収材は、コラーゲン、セルロース、フィブリン、ヒアルロン酸、フィブロネクチン、キトサン又はこれらの2以上の材の混合物のような天然の材からなってもよい。生体再吸収材は、誘導化された異種移植片及び／又は誘導化された同種移植片からなってもよい。

生体再吸収性セラミックが、スカホールド内に含まれてもよい。この発明により使用される生体再吸収性セラミックは、モノー、ジー、オクター、 α -トリー、 β -トリー及びテトラカルシウムリン酸、ヒドロキシアパタイト、フルオロアパタイト、硫酸カルシウム、フッ化カルシウム、酸化カルシウム又はこれらの2以上の材の混合物である。

【0216】

この発明による好ましい生体再吸収材は、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリジオキサノン、ポリカプロラクトン、ポリヒドロキシブチレート及びポリ（トリメチレンカーボネート）又はその混合物からなる。

特に、ポリ（乳酸）を用いることが好ましい。この材は、良好な機械的強度を有し、あまり迅速に再吸収せず、その結果、修復された組織が荷重のかかった機能を引き継ぐ時点で組織修復に十分な時間のあいだ、その機械的特性を保持できる利点を有する：A. G. A. Coombes 及び M. C. Meikle, 'Resorbable Synthetic Polymers as Replacements for Bone Graft', Clinical Materials 17, (1994), pp 35-67 を参照すると、ポリ（乳酸）の試料は、12週間の試験に対しわずか1~2%の重量を損失しているにすぎないことが示されている。

【0217】

この発明による適当な非一生体再吸収材には、ポリエステル、特に芳香族ポリエステル、例えばポリエチレンテレフタレート（PET）及びポリブチレンテレフタレートのようなポリアルキレンテレフタレート；ポリアミド；ポリエチレン及びポリプロピレンのようなポリアルケン；ポリ（フッ化ビニル）ポリテトラフルオロエチレン炭素繊維、シルク（天然又は合成）、炭素繊維、ガラス及びこれらの材の混合物が含まれる。さらに、非再吸収セラミックを用いてもよい。そのような材の例は、純粋なヒドロキシアパタイト、ジルコニア及びアルミナである。非生体再吸収材の利点は、それらが本質的にその当初の機械特性つまり、強度が時間中に低減しないような特性を保持していることである。したがって、それらは、長期にわたって修復組織に機械的な支持を提供し得る。

【0218】

適合性領域は、フリース（すなわち、不織）材料、スポンジ、発泡体、微粒子、ゲル又はこれら材料の組み合わせを含んでもよく、生体再吸収材又は非生体再吸収材を含んでもよい。スカホールドに関して挙げた生体再吸収材又は非生体再吸収材は、圧縮率条件が満たされる限り、いずれも使用できる。適合層がゲルを含む際には、組織を内生させるように機能することを条件として、それはプラスに荷電したゲル、マイナスに荷電したゲル又は中性ゲルであってよい。適合性領域は少なくとも1つの薄層を含み、複数の薄層を含んでもよい。適合性領域が複数の薄層を含む際には、これらは全て、同一の材からなってもよい。あるいは、各薄層は他のいくつかの薄層又は全ての薄層と異なる材料からなってもよい。

【0219】

関節領域は、三次元の織物又はニット織物（すなわちスパーサー織物）、フリース（すなわち、不織）材料、スポンジ、発泡体、微粒子又はこれら材の組み合わせを含んでもよく、生体再吸収材もしくは非生体再吸収材を含んでもよい。スカホールドに関して挙げた生体再吸収材又は非生体再吸収材はいずれも使用できるが、圧縮率条件が満たされていることを条件とする。関節領域は、少なくとも1つの薄層を含み、複数の薄層を含んでもよい。関節領域が複数の薄層を含めば、これらは全て同一の材料を含んでもよい。あるいは、各薄層は他のいくつかの薄層又は全ての薄層と異なる材料を含んでもよい。

関節領域の圧縮率は、内部に含まれる材料の種類及び構造の固有の性質であってもよい。あるいは、関節領域は補強されてもよい。補強は、機械的負荷に耐えるのを補助するように、補強成分を構造内に包含することにより達成され得る。

【0220】

存在する際には、補強成分は、スカホールドの製造について上記した種類の生体再吸収性ポリマー又は非生体再吸収性ポリマーを含んでもよい。補強成分は、関節領域内に強化ブリッジを形成するために添加される、溶融熱硬化ポリマー又は熱硬化性リマー液を含むことが好ましい。さらに、ポリマーは、体温のすぐ上、すなわち60℃未満で熱硬化するものがより好ましい。関節領域が線維材料（織物、不織物又はニットなど）を含む際には、溶融補強材は、その中に隣接するストランドを結合し、それによってその圧縮率を増加させる。最も好ましくは、補強成分はポリカプロラクトンを含む。なぜなら、この材料は、体温より少し高い融解温度を持ち、生体適合性かつ生体再吸収性で、インプラントを成型可能にするからである。

【0221】

上記補強材を提供するひとつの方法は、2つの「ニップ」ローラー間で織物を圧縮し、その上に溶融又は溶解した補強ポリマーのプールを供給することである。ローラー間で織物が圧縮され、引き出されるにつれて、少量の補強ポリマーがそれとともに運ばれ、これが、片側のローラーで織物が再度拡張した際に織物に取り込まれ、それにより織物をコーティングする。

本発明の一つの観点の特に好ましい形態において、合成インプラントは、それ自体が適合性領域と関節領域からなるスカホールドからなる。有利には、関節領域は、第二表面から第一表面に向かって伸びて、第一表面から第二表面に向かって伸びる適合性領域に合う。好ましくは、関節領域は、ポリ（乳酸）〔生体再吸収性〕及び／又はPET〔非生体再吸収性〕線維からなる三次元のニット織物からなり、それは、溶融ポリカプロラクトン補強成分の添加により補強される。適合性領域は、有利には、ポリ（グリコール酸）及び／又はPET線維からなるフェルト（不織）からなる。

【0222】

本発明の一つの観点の好ましい形態によると、合成インプラントは、埋め込まれる組織の受容力、及びその組織への統合を改善するために、ある付加成分を含んでもよい。

インプラントに有利に添加できる付加成分の1群は、生物活性材料である。本発明によるインプラントのあらゆる部分にも導入可能な生物活性材料は、成長因子、例えば、TGFβを含むトランスフォーミング成長因子βスーパーファミリー、骨形態発生タンパク質BMP（例えば、BMP2、BMP4）、軟骨由来形態発生タンパク質CDMP（例え

10

20

30

40

50

ば、CDMP-1、CDMP-2)及び成長分化因子(例えば、GDF5)；血小板由来細胞成長因子(PD-ECGF)；血小板由来成長因子(PDGF)；表皮成長因子ファミリー、例えばEGF、トランスフォーミング成長因子 α TGF α ；血小板由来成長因子、例えばPDGF-A、PDGF-B、PDGF-BB；繊維芽細胞成長因子、例えばBFGF；肝細胞成長因子(HGF)；インシュリン様成長因子、例えばIGF-1、IGF-II；成長ホルモン(GH)；インターロイキン(例えば、IL-1、IL-11)；連結組織成長因子(CTGF)；甲状腺ホルモン関連タンパク質(PTHrp)及びこれら材の少なくとも2つの混合物などを含む。

【0223】

上記のほかに、脈管形成因子(アンジオゲニン)及び血管内皮成長因子(VEGF)をインプラントの適合性領域に有利に添加することができる。 10

本発明の合成インプラントは、埋め込み前に細胞を植え付けてもよい。あるいは、それらを細胞なしに埋め込んだり、細胞を埋め込み後のあらゆる時点で注入してもよいし、あるいは細胞群及び細胞付着が細胞内植だけによって生じるよう、全く細胞なしに埋め込んでよい。

本発明のインプラントに植え付けてもよい細胞は、軟骨細胞、軟骨始原細胞及び間葉幹細胞などの軟骨細胞に分化できる細胞ならびに、他の細胞を軟骨細胞に分化させる細胞である。始原間葉前駆細胞の適当な源には、軟骨膜、骨膜、骨髄及びワルトンゼリーが含まれる。

【0224】

本発明のインプラントに細胞が植え付けられれば、インプラントの第一表面から適合層を介してインプラントの第二表面の方へ伸びる(しかし、届かない)穿孔をインプラントに提供するのが好ましい。穿孔は直径2.5mmまでであってもよく、好ましくは直径0.6~2.5mm、より好ましくは直径1.6~2.2mmである。穿孔は、インプラントの第一表面の面積の5~35%、好ましくはその表面の16~30%に及ぶのが有利である。定義された範囲内のパラメータを持つこのような穿孔の存在は、効率的な細胞植え付けを容易にする。

本発明の別の観点によると、細胞が微粒子の表面に接着するように細胞を微粒子に接触させ、次いで、細胞被覆微粒子をスカホールド手段に導入する工程からなる、細胞をスカホールド手段に植え付ける方法が示される。 30

【0225】

「スカホールド手段」というここでの記載は、上記に定義されるようにスカホールドを含むあらゆる装置を意味する。本発明の一観点による合成インプラントは、特に「スカホールド手段」という用語の範囲内に含まれる。

微粒子は、細胞を本質的に結合できるもの、又は細胞を結合できる材料で被覆されてもよいもの、もしくはその両方であってもよい。微粒子を被覆し得る適当な細胞結合材料には、コラーゲンI、II及びIV、フィブロネクチン及びフィブロネクチンスプライス変異体、ゼラチン、ラミニン、ビトロネクチン、ポリカチオンポリマーならびにポリアニオンポリマーを含む。

好ましくは、細胞は、スカホールド手段に導入される前に栄養溶液中で微粒子上でインキュベートされて、細胞を成長させ、細胞外マトリクスを発生させる。より好ましくは、インキュベートは6週間の期間まで行われる。最も好ましくは、インキュベートは1~3週間の間の期間である。 40

【0226】

細胞被覆微粒子は、沈降によりスカホールド手段に導入されてもよいが、一般に、重力だけよりも強い力が必要とされる。細胞被覆微粒子は、ポンプ圧の利用又は遠心分離によりスカホールド手段に押し入れられるのが有利である。好ましくは、細胞被覆微粒子は、遠心分離によりスカホールド手段に導入される。

この植え付け方法の利点は、従来技術の方法に伴う問題、すなわちインビトロ細胞成長段階中の構造物の中心へ拡散される栄養が不十分であるという問題を回避することである一 50

序文参照。これは、本方法による細胞成長が、スカホールド手段に導入される前に、一定量の培地中に分散される微粒子上で起こってもよいからである。インビボにすれば、インプラントは、栄養素を出し入れする組織に対する周期性圧縮応力に助けられて、肋軟骨下骨内の血管により栄養素を提供される。

【0227】

本発明の別の観点によると、本発明の前述の実施態様の方法での使用に適したバイオリアクターが提供される。本発明の一実施態様のバイオリアクターは、細胞接種微粒子のインキュベートに適したインキュベーションチャンバーとスカホールド手段の支持に適した直径 d_1 のスカホールド支持チャンバーからなり、a) $d_2 = d_1$ の時点でスカホールド支持チャンバーに合うよう、インキュベーションチャンバーの直径 d_2 がスカホールド支持チャンバーに接近するにつれて減じるか、又はb) インキュベーションチャンバーとスカホールド支持チャンバーが、インキュベーションチャンバーと接触する端部で直径 d_2 を有し、スカホールド支持チャンバーと接触する端部における直径 d_1 に細くなる、ろうと手段で接続される。

【0228】

本発明の一実施態様のインキュベートチェンバーは、例えば、球形、円錐形又は管状であってもよい。それは、管状であるのが有利である。

インキュベートチェンバーは、スカホールド支持チェンバーより大きいか、それと同じサイズ又はそれより小さくてもよいが、スカホールド支持チェンバーより小さいのが好ましい。

本発明の有利な代替例において、ろうと手段及びスカホールド支持チェンバーは、バイオリアクターへの挿入に適した挿入手段内に一体的に含めてもよい。あるいは、バイオリアクターは管を含むのが有利である。

【0229】

本発明の更に別の観点によると、本発明の一実施態様によるバイオリアクターを用いて細胞接種微粒子をスカホールド手段に植え付ける方法が提供される。本発明の一実施態様の方法は、以下の工程：

- ・ バイオリアクターのスカホールド支持チャンバー内にスカホールド手段を配置し、
- ・ バイオリアクターのインキュベーションチャンバーに細胞接種微粒子を導入し、
- ・ 十分なインキュベーション作用を行うのに適当な期間のあいだ、温度、湿度、pH及び栄養素などの適当な条件下でバイオリアクターを攪拌し、
- ・ バイオリアクターを遠心分離して、スカホールドを有する細胞接種微粒子を集め、
- ・ バイオリアクターのスカホールド支持チャンバーから細胞接種微粒子からなるスカホールド手段を除くこと

からなる。

【0230】

上記のとおり、「十分なインキュベーション作用を行うのに適当な期間のあいだ」という表現は、細胞を成長させ、細胞外マトリクスを生じさせるため、細胞が栄養溶液中でインキュベートされることを意味する。好ましくは、このインキュベートは、6週間まで行われる。より好ましくは、インキュベートは、1～3週間の間の期間である。

本発明の別の実施態様によると、スカホールド手段及び細胞被覆微粒子からなるハイブリッドインプラントが示される。

さらに本発明によると、合成インプラント又はハイブリッドインプラントを欠損に外科的に埋め込むことからなる、哺乳動物の軟骨欠損の治療方法が示される。

【0231】

応用例の図が参照として示されるが、これらは制限的ではない。

図4. 1は、本発明の実施態様の合成インプラントを示す。

図4. 2は、本発明のバイオリアクターに挿入するための挿入手段を示す。

図4. 3は、細胞接種及び微粒子のインキュベート段階中の本発明の実施態様のバイオリアクターを示す。

10

20

30

40

50

図 4. 4 は、細胞－接種微粒子を図 3 の合成インプラントに遠心分離した直後の、本発明の実施態様のバイオリアクター内に設置したハイブリッドインプラントを示す。

図 4. 5 は、顕微鏡でのサルフェート材の外観を示す。

【0232】

図 4. 6 は、改質及び非改質材の代表的なスペクトルを示す。

図 4. 7 は、サルフェートイントラサイト^{T M}に結合する血漿フィブロネクチン、細胞フィブロネクチン及びフィブロネクチン－E D Aを示す。

図 4. 8 は、サルフェートイントラサイト^{T M}に結合するコラーゲン V Iを示す。

図 4. 9 は、F C Sからの吸収後に、サルフェートイントラサイト^{T M}に結合するフィブロネクチン及びビロトネクチンを示す。

図 4. 10 は、サルフェート及び非サルフェートイントラサイト^{T M}への細胞の植え付けを示す。

【0233】

実施例 4. 1

合成インプラントの製造

関節層を形成するために、三次元でニットの P E T 織物を、表 4. 1 に示すパターンに従って、ダブルベッドラッセルたて編み織機上で製造した：

【0234】

【表 8】

表 4.1：マルチフィラメント表面を持つ PET モノフィラメントスパーサー。ダブルベッドラッセルたて編み織機上、24 ゲージ、6 案内棒で編んだ

棒： 糸：	柄だしチェーン：	説明：
1 2/44/27 PET	22/20/44/46	4 針飛んで編む (Lay-in over 4 needles)
2 2/44/27 PET	00/02/22/20	チェーンステッチ
3 0.09mm Dia PET モノフィラメント	10 8/64/20/46	V 字型、3 針幅
4 0.09mm Dia PET モノフィラメント	20/46/10 8/64	V 字型、3 針幅
5 2/44/27 PET	02/22/20/00	チェーンステッチ
6 2/44/27 PET	20/44/46/22	4 針飛んで編む

【0235】

布は、十字形スパーサー線維構造を有する厚さ 3 mm のものであった。布を 60℃ の精製水で洗浄し、高純度のプロパン－2－オール中で更に洗浄し、次いで乾燥させ、121℃ で 15 分間オートクレーブ内で熱硬化した。次いで、内部加熱された 1 組のニップローラを用い、ポリカプロラクトン (PCL)、Solvay 製 CAPA 686 と熔融含浸させてそれを補強した。ニップの間隙及び圧力を調節して、被覆物の均一性及び重量を調整した。布 1 グラム当たり 0.80 グラム PCL の被覆物の重量を得た。三次元のニットのモノフィラメントスパーサー線維は互いに交差して、重なった「X」を形成する。それらが互いに交差する所を PCL で接着し、それによって含浸布の完全性及び圧縮率を高める。同様に、3D ニットの上面及び下面のマルチフィラメント線維を、PCL によりすぐに含浸させ、縫合糸を保持するのに十分頑強な、強い、熱硬化可能な表面を形成した。この被覆重量で、モノフィラメントスパーサー線維をしっかりと接着したが、布のニット表面にいくらかの孔が残った。

【0236】

被覆ニップを残すと同時に、0.02 MPa の圧縮率及び 75% より大きい空隙率を持つ

厚さ 0.75 mm の不織針フェルトを、3Dニットの編物片面上の溶融CAPAにより接着し、適合性領域を形成した。

材を再膨張させ、冷却させて、1.8 MPa の圧縮率及び75%より大きい空隙率を持つ関節層(3D-ニット)をつくった。次いで、組成物を冷却させ、固めた。

液圧プレス内で打抜機を用いて、強化布を8mm円盤型合成インプラントに切断した。先端が鋭い加熱プローブを用いて、これらインプラントの第一表面を穿孔し、そこを通して、3Dニットの織物に永久開口部(7×直径1.8mm)を形成し、布の中心へのアクセス経路を生じた。開口部は、インプラントの第二表面までは及ばなかった。

図4.1は、第一表面(4.1)、第二表面(4.2)、不織フェルトからなる適合性領域(4.3)、3Dニットからなる関節層(4.4)、及びインプラントの内部へのアクセス経路を提供する適合性領域への開口部(4.5)からなる本発明の合成インプラントを示す。 10

【0237】

微粒子の合成

部分的な架橋サルフェートカルボキシメチルセルロース(CMC)微粒子を以下のとおりに製造した。すべてのガラス製品、金属製品及び部分的な架橋CMC粉末(Akzo X181TM)を、オーブン内で乾燥させた(110℃、一晚)。Akzo X181TM粉末(4g)及びジメチルホルムアミド(DMF、20ml)をフラスコ内に置き、不活性雰囲気下、三酸化硫黄-DMF複合体(18.4g)を添加した。乾燥した不活性雰囲気下、混合物を50℃で約4時間機械的に攪拌した。冷却後、重炭酸ナトリウムを十分に 20
添加して、反応を止め、余分な三酸化硫黄-DMF複合体(最小限の水中に約20g)を中和した。反応混合物を透析管に移し、蒸留水に対して約48時間透析した。次いで、管の固体内容物を、プフナー器具で濾過して回収し、水で洗浄した。生成物を乾燥させ(45℃の減圧下)、中央の長さが150µm(最短長さ25µm、最長長さ500µm)の楕円形微粒子を得た。

【0238】

培養装置

管A: 0.45µmのフィルターカートリッジ(Eppendorf 0030099176TM)及び0.2µmフィルタ(Fisher FDP 954 050XTM)を支えるねじぶたを有する50ml円錐底遠心分離管。凍結乾燥したコラゲナーゼ(24mg 30
; 276U/ml)を、4.5mmフィルタの上の管内に粉末状で供給した。

管B: 標準50ml円錐底遠心分離管(例えば、Falcon 352074TM)

バイオリアクター: 0.2µmフィルタを支えるねじぶた(Falcon 3107TM)を有する15ml Fisherbrand円錐底遠心分離管(Fisherbrand 05-539-5TM)、又はあるいは50ml円錐底遠心分離管(Falcon 352074TM)と0.2µmフィルタを支えるねじぶた(Fisher FDP 954 050XTM)のどちらかの管を使用した。

【0239】

バイオリアクターの基部を、DMEM(Sigma D6429TM)中の溶融4%アガロース溶液(Sigma A-9045TM)で充填した。2mlアガロース溶液を15 40
ml管と使用し、5ml溶液を50ml管と使用した。寒天を冷却させ、固定して、垂直に保持された管で栓を形成した。この栓は、栄養素及び老廃物質を交換するための材料を提供する利点を持つ任意の特徴一扁平容器の底がなすことのできない機能である。

高密度ポリエチレンを転化した、ろうと手段及びスカホールド支持チェンバー両方からなる挿入手段は、バイオリアクターに挿入される。図4.2は、例えば: a = 13.5mm; b = 7.5mm; c = 4mm; d = 3mm(より大きい管に使用される挿入手段の寸法もそれに従って拡大してよい)の15ml管状バイオリアクターと使用される挿入手段をを図示する。

上記のように製造される合成インプラントを、挿入手段のスカホールド支持チェンバーに挿入し(一番上に適合性不織層)、スカホールド/挿入手段集合体を、アガロース層の上 50

に載るようにバイオリアクターに滑り込ませた。粒状充填材料（部分的な架橋サルフェート CMC；スカホールド内容量 1 ml 当たり 350 mg；より小さい管と使用される直径 8 mm のスカホールドには 70 mg）を、インキュベートチェンバー（挿入手段の上）に添加し、バイオリアクターに蓋をした。

【0240】

細胞分離

DMEM（12 ml）を管 A に添加して、コラゲナーゼを再組成した。ヒト自己血清（4.8 ml）及び DMEM（2.2 ml）を、バイオリアクターに添加して、微粒子を再水和し、血清から細胞付着因子を吸収させた。

4 mm 軟骨バイオブシーを、関節の無負荷部分から得て、メスで薄く切って管 A に添加した。次いで、5% CO₂ の加湿雰囲気下、管を、37℃で 16～24 時間インキュベートした（ふた内の 0.2 µm フィルタはガス交換を可能にすると同時に、無菌性を確保する）。細胞を備える 4.5 µm フィルタカートリッジ及びコラゲナーゼの一部を次いで管 B に移し、遠心分離して（1000 rpm；5 分）、分離細胞をコラゲナーゼ溶液から分離した。

分離細胞を DMEM（1 ml）中で再懸濁し、バイオリアクターに移した。

【0241】

バイオリアクターを、ゆっくりと回転するミキサー上に置いて、5% CO₂ 加湿雰囲気下、37℃で 7～10 日間インキュベートした。図 4.3 は、本方法のこの段階を図示する：バイオリアクター（4.6）は、スカホールド支持チェンバー内に保持されたスカホールド（4.8）がそこに位置する挿入手段（4.7）を含む。挿入手段の上は、DMEM 中に懸濁した細胞（図示せず）及び細胞が接着する微粒子（4.9）を含むインキュベートチェンバーである。注：寒天栓（4.10）は合成インプラントの下に示す。培養期間の終わりに、バイオリアクターを遠心分離し（500 rpm；5 分）、細胞被覆粒状材料を合成インプラントの空隙に凝集させて、図 4.4 に示すハイブリッドインプラント（4.11）を生成した。

【0242】

埋め込み

埋め込み部位の基部を機械的に創傷清拭して、肋軟骨下骨を露出させて削り、凹部を作って、更に、欠損の軟骨周辺を、鋭利器具を用いて健康な軟骨まで切除した。次いで、培地をバイオリアクターから吸引し、挿入手段及びハイブリッドインプラントを取り出し、ハイブリッドインプラントを挿入手段からはずして、逆さにした。骨膜弁を脛骨から回収し、関節層（3D 強化ニット）の頑強な上面の上に縫合して、軟骨始原細胞及びより滑らかな関節表面の源を提供した。ハイブリッドインプラントを、次いで欠損部位に圧入し、周辺軟骨と面一にした。ハイブリッド軟骨を、縫合糸及び生体再吸収性釘で正しい位置に固定した。

【0243】

実施例 4.2：スルフェートイントラサイト

スルフェートイントラサイトゲル（SX-CMC ゲル）の合成及び滅菌

方法

イントラサイト粉末（2 g；110℃でオープン乾燥；16 時間；Smith and Nephew）、ジメチルホルムアミド（DMF、10 ml；Aldrich）及び三酸化硫黄-ピリジン複合体（9.2 g；Aldrich）を、50℃で 4 時間機械的に攪拌した。反応混合物を冷却し、重炭酸ナトリウム（最小限の水中に約 10 g）を添加して、余分な三酸化硫黄-ピリジン複合体を中和した。生成物を、蒸留水に対して透析し（2～7 日間）、凍結乾燥させて、4℃で保管した。材料を PBS（100 mg；6.5 mg/ml）中に再懸濁し、121℃で 15 分間、オートクレーブで処理して滅菌した。

【0244】

結果

反応は、一般に 1 g のサルフェート物質をもたらした。顕微鏡で見ると、凍結乾燥スルフ

10

20

30

40

50

ェートイントラサイトは、綿状で、やや線維質の白い材料であった。凍結乾燥スルフェートイントラサイトは、PBS中ですぐに再水和し、半透明の懸濁液を形成した。重力下、粒子を沈殿させて、ゲル及び透明な上澄みの層を生成した。顕微鏡で見た材料の外観を図4. 5に示す。

【0245】

スルフェートイントラサイトの分析

方法

改質ポリマーの化学的性質を、Raman分光法（Renishaw Raman顕微鏡）又は赤外分光法（Perkin-Elmer 1750又はMattson Galaxy FTIRs）により調査し、得られたスペクトルを、公開された基準のスペクトルに対して比較した。硫黄含量を、公認の実験室（Butterworth）で、元素分析により測定した。粒子サイズの分布をCoulter Particleサイズアナライザーを用いて測定した。

アルシアンブルー〔Alcian Blue〕（臨界電解質濃度染料）を、変性（derivatized）ポリマーを視覚化するのに使用した。アルシアンブルー（0.2 Mアセテート緩衝剤 pH 5.8 中 0.05 g に加えて 0.06 M, 0.3 M, 0.5 M, 0.7 M又は0.9 Mの $MgCl_2$ ）を、ポリマーと室温で16時間インキュベートし、サンプルをPBS中で洗浄して、肉眼と位相差顕微鏡の両方で観察した。

【0246】

結果

図4. 6は、改質及び非改質材料の代表的なスペクトルを示す。1280 μm で、はっきりとしたピークが出現したこと及び非改質材料の<0.3 Mと比較して、アルシアンブルーが0.9 M $MgCl_2$ の存在下で改質物質へ結合したことより、硫酸化が確認された。粒子サイズ分析は、材料の80%が直径162~923 μm の粒子からなることを示唆するが、この数字は、粒子のクランピングにより不自然に増加した可能性がある。アルシアンブルーCECは、非改質イントラサイトが、0.3 M未満の $MgCl_2$ 濃度（弱アニオン物質と一致する）でアルシアンブルーを結合するのに対して、スルフェートイントラサイトは、0.9 Mを含む、使用された全ての $MgCl_2$ 濃度でアルシアンブルーを結合したことを示した。この知見は、改質材料が、成功した硫酸化と矛盾しない、非常に強いアニオン性であることを示す。

【0247】

スルフェートイントラサイトの常套分析

方法

オートクレーブ処理したスルフェートイントラサイトのポリアニオン性質を、100 μl 材料をPBS（900 μl ）と希釈し、組織学的染料サフラニンOを添加して（0.1%；20 μl ；30分）、通常どおり確認した。混合物をPBSで20 mlに希釈して、遠心分離し（2500 rpm；5分）、上澄みを破棄して、染色材料を20 ml PBS中に再懸濁した。

結果

ポリアニオンスルフェートイントラサイトは、濃いオレンジ色に染色した。非改質又は手順を終了した（expired）材料は、薄いピンクに染色した。

【0248】

細胞付着蛋白質の、スルフェートイントラサイトへの吸着

方法

細胞付着蛋白質の、スルフェートイントラサイト粒子への吸着を、免疫細胞化学により確認した。スルフェートイントラサイト（1 ml；PBS中6.5 mg/ml）を、PBS中で3回洗浄し（10 ml；2500 rpm遠心分離；5分）、（i）精製／組み換え細胞接着因子の60 $\mu g/ml$ 溶液〔血漿フィブロネクチン（Sigma）、細胞フィブロネクチン（Sigma）、フィブロネクチン-EDA（アフィニティ精製）、コラーゲン VI（Chemicon International）（すべてPBS中2 ml）〕又

は (i i) P B S 中 6 0 % ウシ胎児血清 (H e l e n a B i o s c i e n c e s) のいずれかの中でインキュベートした (1 6 時間; 4 °C; 一定に攪拌)。B S A (2 m l P B S 中 6 0 μ g / m l) を対照として使用した。血清中のフィブロネクチンの濃度は、約 1 0 0 μ g / m l である。結果として、6 0 % 希釈液は、約 6 0 μ g / m l のフィブロネクチンを生じる。

【0 2 4 9】

被覆材料を P B S で 3 回洗浄し、B S A (P B S 中 3 % w / v ; 1 時間; 室温 S i g m a) 中でインキュベートして、ブロックした。次いで、ゲルを 3 回洗浄し、3 7 °C で 1 時間、関連する結合材料に対して生じた一次抗体と 1 m l P B S 中でインキュベートした。使用した抗体は、マウス抗フィブロネクチン-E D A 抗体 (5 0 μ g / m l ; O x f o r d B i o t e c h n o l o g i e s) 、ウサギ抗フィブロネクチン抗体 (5 0 μ g / m l ; D a k o) 、ウサギ抗ビトロネクチン抗体 (5 0 μ g / m l ; B i o g e n e s i s) 及びウサギ抗コラーゲン V I 抗体 (2 0 μ g / m l ; A b c a m) であった。非免疫ウサギ I g G フラクション (5 0 μ g / m l ; D a k o) を対照として使用した。 10

【0 2 5 0】

次いで、試料を P B S 中で 3 回洗浄した。ウサギ抗体標識試料を視覚化するために、標本を、F I T C 複合ブタ抗ウサギ二次抗体 (P B S 中 1 : 1 0 0 希釈; 3 7 °C で 1 時間; D a k o) とインキュベートした。マウス抗フィブロネクチン-E D A 抗体の検出のため、ビオチニル化ウサギ抗マウス二次抗体 (D a k o) を使用し、続いて洗浄し (P B S 中で 3 回)、3 7 °C で 1 時間、P B S 中の 1 : 1 0 0 希釈液で、ストレプトアビジン-F I T C 複合体 (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) を用いて検出した。次いで、ゲルを P B S で 3 回洗浄した。少量のアリコートをし、次いでガラススライドに移し、カバーガラスで覆って、4 8 8 n m で励起する A r K r レーザを用いた L e i c a D M - R E 共焦点顕微鏡を使用して観察した。 20

【0 2 5 1】

結果

試験されたすべての細胞接着因子は、スルフェートイントラサイトゲルに結合するのが立証できた。図 4 . 7 は、スルフェートイントラサイトに結合する血漿フィブロネクチン、細胞フィブロネクチン及びフィブロネクチン-E D A を図示する。図 4 . 8 は、コラーゲン V I 結合を図示する。図 4 . 9 は、F C S からの吸収に後の、フィブロネクチン及びビトロネクチン結合を図示する。染色は、B S A で被覆された対照ゲル及び非免疫ウサギ I g G とインキュベートされたゲルでは起こらなかった。 30

【0 2 5 2】

スルフェートイントラサイト及び非改質イントラサイトへの細胞付着

方法

D M E M (5 0 0 m l) 、ペニシリン及びストレプトマイシン (S i g m a ; 5 m l) 、非必須アミノ酸 (S i g m a 5 m l) ならびに L - グルタミン (S i g m a ; 5 m l) を混合して、無血清 D M E M を調製した。

サルフェート及び非改質イントラサイトを、P B S 中に再懸濁し (6 . 5 m l / m l) 、1 2 1 °C で 1 5 分間、オートクレーブで処理して、滅菌した。オートクレーブで処理された材料を、P B S で 3 回洗浄し (2 5 0 0 r p m 遠心分離; 5 分)、P B S 又は 6 0 % ウシ胎児血清 (P B S 中; H e l e n a B i o s c i e n c e s) のいずれかの中に 4 °C で 2 時間再懸濁させた。 40

次いで、試料を P B S 中で 2 回洗浄し、無血清 D M E M 中に再懸濁させた。

【0 2 5 3】

骨髓間質細胞の融合 T 1 7 5 フラスコを P B S 中ですすぎ、トリプシン処理した (S i g m a) 。懸濁した骨髓間質細胞 (7 5 0 k 細胞)、P B S 又は F C S 前処理済スルフェートイントラサイトもしくは未処理イントラサイトを、2 0 m l の無血清 D M E M 中で混合し、培養物を、5 % C O ₂ の加湿雰囲気下、3 7 °C で 1 時間 ~ 1 4 日間インキュベートした。あらゆる生存接着細胞を視覚化するために、培養物をカルセイン A M で処理し (0 . 50

6 μ l ; 1 mg / ml ; 90 分 ; Molecular Probes) 、 Leica 共焦点顕微鏡を用いて観察した。

【0254】

結果

PBS 又はウシ胎児血清 (60%) で前処理されたかどうかにかかわらず、ごくわずかな細胞しか、非改質イントラサイトゲルに接着しなかった。同様に、PBS だけで前処理したスルフェートイントラサイトに接着する細胞はほとんどなかった。対照的に、細胞は、60% FCS 前処理済スルフェートイントラサイトにすぐに接着し、その表面上で拡散した。図4. 10は、FCS 前処理済非改質イントラサイトへの細胞付着を、FCS 前処理済スルフェートイントラサイトへの細胞付着と比較したものである。

10

結論

血清からスルフェートイントラサイトの表面上に吸収された細胞接着因子は、この生体材料への細胞付着を支持できるであろうという結論が下された。

【0255】

(以前は「p-トリシルクロライド」として知られていた) p-トリエンシルホニルクロライドを用いた、スルフェートイントラサイトへの抗体の付着

異なる細胞タイプは、特定の組の細胞表面分子 (例えば、シグナルレセプター、酵素、構成成分又は表層結合シグナル分子) により特性付けされる。これらの表面マーカーに対して生成された特異的抗体を、1つの細胞タイプを選択的に結合させ、それを混合群から分離するのに使用してもよい。以下の方法は、軟骨始原細胞結合材料を生成するために、抗ノッチー1抗体又は抗インテグリン β_1 (表層軟骨始原細胞により発現されたエピトープを認識する抗体) が、いかにしてスルフェートイントラサイトに結合され得るかを記載する。この方法は、これら抗体に特異的ではなく、異なる抗体を粒状生体材料に付着させるのに使用できるであろう。

20

【0256】

スルフェートイントラサイト T^M を乾燥ピリピリジン (35% w/w) 中に懸濁し、わずかにモルが余分なトリシルクロライド (10% w/w) と混合し、不活性雰囲気下、8°C で16時間攪拌した。活性ゲルを濾過により回収し、完全に洗浄して、1~2時間材料をボルテックスし、均質な懸濁液を調製した。抗ノッチー1抗体 (5 μ g ; Santa Cruz) 又は抗 β_1 インテグリンを添加して、1~2分、懸濁液をボルテックスした。BSA (0.5% w/v 最終濃度) を添加して、反応を終わらせる前に、懸濁液を、傾むけてゆっくりと回転させながら37°Cで10分間インキュベートした。次いで、反応混合物を回転子に戻し、37°Cで更に16~24時間インキュベートした。

30

抗体変性スルフェートイントラサイト T^M を、アセテート緩衝剤中で2回洗浄し (0.1 M ; pH 4.0 ; 4°Cで5分)、37°Cで4時間、0.1% BSAを含むPBS中で1回洗浄した。材料をアセテート緩衝剤中で洗浄し (5分 ; 4°C)、4°Cで保管した。

【0257】

細胞付着因子を結合し、細胞接着を支持するための代替ポリアニオン、ポリサッカリド材の使用

(細胞又はタンパク質を結合しない) 架橋ポリサッカリド材「セファロース」からなるヘパリンセファロースビーズ (Pharmacia) を、生分解性ポリアニオン材のヘパリンに共有結合させた。このようなビーズは、生物学的分子の混合物からタンパク質を精製するために生化学で広く使用される。これらは一般的に、細胞培養には使用されない。ヘパリンセファロースビーズは、細胞を直接結合しないが、細胞接着因子を結合し、細胞接着因子で被覆されると、細胞付着を支持するであろうと仮定された。

40

【0258】

方法

ヘパリンセファロースビーズ (200 mg ; Pharmacia) を、PBSで再水和し (40 ml ; 37°Cで15分)、PBSで2回洗浄し、110°Cで30分間、オートクレーブで処理して滅菌した。ヘパリンセファロースビーズ (10 mg) を、20 mg / m

50

1 BSA、80 mg/ml BSA、10% FCS、40% FCS又はPBSのみ(20 ml 総量)のいずれかで前処理した。ビーズを15分間沈殿させ、上澄み15 mlを除去して、無血清DMEM(15 ml)中の 400×10^3 個の骨髄間質細胞で取り替えた。培養物を混合し、37℃で30分～3時間インキュベートした。非組織培養処理96ウェルプレート(Greiner)のウェルに試料(100 μ l)を移し、倒立位相差顕微鏡で観察した。

【0259】

コラーゲンIV(2.5及び10 μ g/ml)及びウシ胎児血清(40%)を用いて実験を繰り返し、ヘパリンセファロースビーズ(25 mg)を被覆した。5%CO₂の加湿雰囲気下、37℃で6時間インキュベートした後、細胞を植え付けた被覆ビーズの4つの試料を位相差顕微鏡で観察し、1ビーズ当たりの接着細胞数を計数した。

10

さらに、骨髄間質細胞を植え付けたFCS前処理済ヘパリンセファロースビーズの試料を上記のとおり予備調製し、DMEM/10% FCS中で1～22日間培養して、位相差顕微鏡で観察した。

【0260】

結果及び考察

30分後、細胞接着は、すべてのBSA又はヘパリンセファロースビーズのFCS前処理済試料でほとんどもしくは全く観察されなかった。しかし、3時間後、細胞接着及び細胞拡散が、40% FCS処理ヘパリンセファロースビーズ上で起こったが、BSA処理試料、10% FCS前処理試料又はPBSのみで前処理した試料では、どれにも起こらなかった。いくつかの細胞クラumpingが、非付着細胞の中で観察され、非付着細胞が、BSA被覆ビーズ、10% FCS被覆ビーズ又はPBSのみにさらされたビーズに接着しなかったが、互いに接着可能であったことが示された。

20

【0261】

PBS、コラーゲンIV及びFCS前処理済ヘパリンセファロースビーズに付着した細胞の計数は、1ビーズ当たりの結合細胞の数が(平均 $\pm$ SEM): 1ビーズ当たりPBS前処理済 0.51 ± 0.09 細胞; 1ビーズ当たりコラーゲンIV(2.5 μ g/ml)前処理済 3.45 ± 0.19 細胞($p < 0.001$); 1ビーズ当たりコラーゲンIV(10 μ g/ml)前処理済 3.23 ± 0.22 細胞($p < 0.001$); 及び1ビーズ当たり40% FCS前処理済 3.17 ± 0.42 細胞($p < 0.001$)であることを示した。ヘパリンセファロースビーズは、FCS中に存在するコラーゲンIV又は細胞接着分子を吸収し、その後、細胞接着を支持できるであろうという結論が下された。これはタンパク質に特異的な性質である。なぜなら、BSAはビーズを被覆できないし、細胞接着も支持できないからである。

30

【0262】

細胞の試料及びFCS前処理済ヘパリンセファロースビーズを6～10日間培養すると、それらは、細胞、ビーズ及び細胞外マトリクス成分の肉眼的凝集体を形成した。細胞-接種凝集体を長期間(すなわち14～22日間)培養すると、細胞/材料凝集体は収縮し、ビーズを放出して、小さな細胞クラスターを残すことが観察された。サフラニンOでの組織学的染色は、この染色が、ヘパリン被覆が劣化した時に起こったことを示した。これは、推測するに、この染色が非細胞接着セファロースを露出させ、細胞付着因子を放出し、それによってビーズへの細胞付着を終わらせるからである。この観察は、「切り替え可能」細胞結合材料への経路を示唆したが、軟骨インプラントの理想的な性質ではないと判断された。共有連鎖アニオン官能基を持つ、ゆっくりと劣化するポリサッカリド材料又は非生分解性のポリサッカリド材料は、ヘパリンセファロースに好ましいであろうという結論が下された。

40

【0263】

デキストランビーズを着けた(dextran beaded)サルフェートビーズ(Sigma)は、共有結合アニオン基を持つ、球形の架橋ポリサッカリド粒状材料である。材料を細胞接着因子で被覆し、細胞付着及び成長を支持する能力を評価した。

50

デキストランサルフェートビーズ (667 mg; Sigma) を、26.7 ml の PBS 中で30分間再水和し、オートクレーブで処理して (121℃; 15分)、冷却させた。無菌材料を PBS で3回洗浄し、次いで、Denley ミキサー上で、37℃で2時間、60% FCS (総量66.7 ml 中) 又は PBS (66.7 ml) のいずれか中でインキュベートした。ビーズを沈降させ、無血清 DMEM 中で3回洗浄して、~17 ml の 40 mg/ml 60% FCS 前処理済デキストランサルフェートビーズを生成した。

【0264】

60% FCS 前処理済デキストランサルフェートビーズ (30 mg) 又は PBS 前処理済デキストランサルフェートビーズ (30 mg) を、Hams F-12 (10%)、FCS (10%) 及びアスコルビン酸二リン酸 (50 µg/ml; 5 ml) を補足した DMEM 中で、骨髓間質細胞 (200k 細胞) と混合した。培養物を 37℃で0~22日間インキュベートした。 10

結果

骨髓間質細胞は、60% FCS 前処理済デキストランサルフェートビーズの表面にすぐに接着したが、PBS 前処理済デキストランサルフェートビーズの表面には付着しなかった。

【図面の簡単な説明】

【図1. 1】N1 (ノッチ-1) の免疫学的局在性を示す。N1を発現しない新生ウシ関節軟骨細胞の表層の上部の2~3細胞層にほぼ完全に制限されていることが分かっている。N1発現 (緑、1. 11) は、ヨウ化プロピジウムによって対比染色される (赤、1. 10)。矢印1. 13は、関節表面を示す。 20

【図1. 2】図1. 1の拡大図である。

【図1. 3】Fibronectin-EDAの免疫学的局在性を示す。Fibronectin-EDA発現は細胞結合性で、関節軟骨の外表面にほぼ完全に制限されている (緑、1. 31)。Fibronectin-EDAを発現しない細胞は、ヨウ化プロピジウムによって対比染色される (赤、1. 32)。矢印 (1. 33) は、関節表面を示す。

【図1. 4】中央層でのFibronectin-EDAについて最小限の免疫学的局在性を示す。

【図1. 5】図1. 4のコントロールを示す; コントロール区分、緑染色がないことに注意。 30

【図1. 6】N1免疫学的局在性を示す。

【図1. 7】Fibronectin-EDAの免疫学的局在性の図である。

【図1. 8】未成熟なウシ軟骨におけるN1とFibronectin-EDAの同時局在を示す。N1免疫局在 (緑、1. 81)、フィブロネクチン-EDA免疫局在 (赤、1. 82) の重層。矢印は、関節表面を示す。これは、N1発現細胞もフィブロネクチン-EDAを発現することを示している。

【図1. 9】「早期-フィブロネクチン結合」表層のコロニー形成効率が、他の軟骨細胞群に見られるよりも著しく高かったグラフを示している ($p < 0.01$)。

【図1. 10】「早期-フィブロネクチン結合」表層細胞によって形成されるコロニーの顕微鏡写真である。 40

【図1. 11】軟骨細胞単離直後のノッチ標識を示す。FACS分析を用いる軟骨細胞による特異なN1発現の分析。約75%の表層、10%の中央層及び25%の深層の細胞が、組織からの単離直後のN1に陽性であった。

【図1. 12】ノッチ陽性細胞の磁気ビーズ分離を用いて6日目のコロニー形成効率についてのN1陽性選択の作用を示す。N1陽性の中央層及び深層の細胞のものより、N1陽性表層細胞由来のコロニーが著しく多かった ($p < 0.001$)。

【図1. 13】FACSを用いる表層軟骨細胞による特異なインテグリン発現の分析である。

【図1. 14】表層、中央層及び深層の軟骨細胞の平均細胞径のグラフである (平均± 50

S E M)。表層、中央層及び深層の軟骨細胞の平均細胞サイズの測定。S Z C (表層軟骨細胞)とM Z C (中央層軟骨細胞) ($p < 0.05$) ならびにS Z CとD Z C (深層軟骨細胞) ($p < 0.005$) との直径には有意差がある。

【図1. 15】図1. 15 a、b、cは、相対比光学を用いてそれぞれ視覚化されたS Z C、M Z C及びD Z Cの代表写真である(倍率 $\times 200$)。

【図1. 16】ペレット培養の組織学的研究を示す。「早期-結合」表層軟骨細胞ペレットのH+E染色は、試料図1. 16 a (7日; S Z C; H+E; $\times 500$ b j) 及び図1. 16 b (7日; S Z C エッジ; H+E; $\times 200$ b j) 全体に形態学的に正常で生存力ある細胞の存在を示した。

【図1. 17】ペレット培養の組織学的研究を示す。ピクロシリウスレッドは、特に細胞 10
を取巻く領域のマトリクスでコラーゲンの沈着を示した(21日; $\times 200$ b j)。

【図1. 18】ペレット培養の組織学的研究を示す。グリコサミノグリカンのサフラニンO染色は、細胞によって産生される細胞外マトリクスの濃い暗橙色染色を呈し、細胞がプロテオグリカン-リッチなマトリクスを分泌することを示した(21日; S Z C; $\times 500$ b j)。

【図1. 19】ペレット培養の免疫細胞化学研究を示す。免疫化学は、細胞がペレット培養で軟骨特異的なマトリクス成分を合成していたことを示した。ペレット中の細胞外マトリクスは、I I型コラーゲンを含んだ(14日; S Z C; $\times 200$ b j)。

【図1. 20】ペレット培養の免疫細胞化学研究を示す。I型コラーゲンの不在は、細胞 20
が分化して軟骨細胞を形成し、脱分化が生じていないことを示す(14日; S Z C; $\times 200$ b j)。

【図1. 21】ペレット培養のマトリクスにおけるコンドロイチン4スルフェートの存在を示す。

【図1. 22】ペレット培養のマトリクスにおけるコンドロイチン6スルフェートの存在を示す。

【図1. 23】ペレット培養中の関連結合タンパク質の分布を示す蛍光画像である(10日; $\times 1260$ b j)。

【図1. 24】部分的に厚みのある軟骨欠損に移植された表層、中央層及び深層の軟骨細胞のペレット培養を示す。

【図1. 25】発達中の軟骨、例えば耳の盂状窩を含む胚のC F D A S E 標識細胞域を用いるインオボの軟骨始原細胞追跡を示す。 30

【図1. 26】H&H 段階30-32のニワトリ胚の軟結合組織におけるC y 3-接合第二抗体で局在化されるウシM H C 1陽性細胞を示す(倍率 $\times 126$)。

【図1. 27】H&H 段階30-32のトルイジンブルー染色したニワトリ胚を示す。ひよこの翼のウシ異所性軟骨は、注入された表層軟骨細胞から生じた。

A. 崩壊した異所性軟骨のメタ染色性顆粒染色。

B. 周囲の繊維組織。

【図2. 1および2. 2】培養物の「層状化」領域の潜在的な形態とプロフィールを示す。

【図2. 3】細胞接合因子被覆スルフェートに結合した骨髄間質細胞を示す。16時間以内のイントラサイトと増殖。 40

【図2. 4】4日後の材表面上の接着細胞群を示すカルセインA M染色を示す。

【図2. 5】ピクロシリウスレッドで示される培養物中の7日後のコラーゲンマトリクスの沈着を示す。

【図2. 6】10日後のフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトで培養される骨髄間質細胞の試料におけるI型コラーゲンの産生を示す免疫化学を示す。

【図2. 7】コラーゲンI Iの産生の証拠が認められないことを示している。

【図2. 8】材粒子表面上とそれらの間の空間の双方における、凝集物全体にわたる生存力ある細胞を示すM T T染色を示す。

【図2. 9】図2. 9 aは、細胞が、ピクロシリウスレッドで染色された凝集物内に膠原マトリクスを沈積していることを示し、また軟骨細胞が特異的な軟骨形態のコラーゲン、 50

I I 型コラーゲンを発現したことを免疫細胞化学的に示している (図 2. 9 b)。

【図 2. 10】細胞表面マトリクスへ軟骨細胞がコラーゲン V I を分泌していることを免疫細胞化学により示している。

【図 2. 11】培養中 27 日後ですら、軟骨細胞がコラーゲン I を産生していないことを免疫細胞化学により示している。

【図 2. 12】ウシの軟骨細胞が、最初の 10 日間に生じるかなり迅速な発生を伴って培養期間中 14. 4 倍に増すことを示すグラフである。

【図 2. 13】二層の繊維補強細胞／生態適合性構築物を形成するためのスカホールドに (I) 骨髄間質細胞を接種したフィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイト及び (I I) 軟骨細胞－接種被覆スルフェートイントラサイトを連続的に遠心分離することによる、二層構築物の形成に用いられる使用装置及び方法の概要を示す。 10

【図 2. 14】遠心分離回転の回転方向に対する「非対称カラー」の好ましい方向とローターの根軸を示す。

【図 2. 15】着色したスルフェートイントラサイトの二分子層の沈着を示す。

【図 2. 16】 (I) ピコグリーン染色した骨髄間質細胞を接種した、フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトの層及び (I I) Et Br HD 染色した軟骨細胞を接種した、被覆スルフェートイントラサイトの層からなる二分子層構築物を示す。

【図 2. 17】コントロールに比較した、2つのフェルトにおける緑蛍光の定量を示す。直接的な外観では、下部のフェルトを同一細胞群で接種する前の 30 分間、フィブロネクチンで被覆され、軟骨細胞混合群で接種された上部のフェルトに多量の N I + 蛍光がある。 20

【図 2. 18】種々の層における緑蛍光の定量を示す。直接的な外観では、フィブロネクチンで被覆した上部表面を有するフェルトの上部表面に多量のノッチ 1 + 蛍光がある。

【図 3. 1】図 3. 1 a ~ 3. 1 d は、この発明によるインプラントを示す。

【図 3. 2】図 3. 2 a ~ 3. 2 c は、多層インプラントを製造するための、細胞結合特性及び浮遊密度／沈降速度が異なる被覆マイクロビーズの使用を例示している。沈降速度の異なる 2 種のマイクロビーズ (微粒子体) を軟骨細胞懸濁液に混合し (図 3. 2 a)、凝集させる (図 3. 2 b)。マイクロビーズ型の 1 つは、軟骨始原細胞を選択的に結合する材で被覆されるが、他方のマイクロビーズ型は、別の細胞種 (例えば下方の軟骨細胞系に見られる多くの成熟軟骨細胞) に選択的に結合する。細胞の接着後、細胞被覆マイクロビーズが沈降されて、多層沈着物を形成する (図 3. 2 c)。次いで、沈着物が一緒になって、元の場所で硬化する結合材 (例えばアルギネートゲル) を用いてインプラントを形成する。 30

【図 3. 3】図 3. 3 a ~ 3. 3 c は、沈降速度の異なる 2 種以上のマイクロビーズと組み合わせさせた、3D-ユニットであり得るスカホールド材を用いる多層インプラントの製造を例示する。図 3. 2 にあるように、あるマイクロビーズ型を軟骨始原芽細胞結合材で被覆し；別の型を別の細胞種 (例えば下方の軟骨細胞系に見られる多くの成熟軟骨細胞系) を選択的に結合する材で被覆する。図 3. 2 にあるように、マイクロビーズを軟骨細胞の懸濁液と混合し (図 3. 3 a)、懸濁液中の細胞と相互作用させ (図 3. 3 b)、生体適合性スカホールドの空のスペースに沈降させて多層インプラントを形成する (図 3. 3 c) 。 40

【図 3. 4】図 3. 4 a ~ 3. 4 c は、均質なる紙として役立つことを目的とした、3D-ユニットであり得る、大きさ、細胞結合親和性及び生体スカホールド材の異なる 2 種以上のマイクロビーズとの組み合わせを用いる多層インプラントの製造を例示する。前記の図にあるように、あるマイクロビーズ型は軟骨始原細胞結合材で被覆され；他方は、下方の軟骨細胞系に見られる別の細胞種に選択的に結合する材で被覆される。細胞結合粒子と軟骨細胞 (示さず) を混合し (図 3. 4 a)、細胞をある又は別の群のビーズに選択的に結合させた (図 3. 4 b)。細胞被覆マイクロビーズを均質なる紙に出す。別の型のマイクロビーズよりもさらに小さいマイクロビーズ (ある細胞型で被覆) をさらにろ紙に出し、 (細胞型が異なるので)、それにより層状化装置を生ずる。

【図 3. 5】本発明によるインプラントの概略図である。

【図 3. 6】種々のリガンドへの最初の結合から 4 日後の表面と D Z C のコロニー形成効率を示す (F N、フィブロネクチン; C 1、コラーゲン I; C I I、コラーゲン I I; B S A、ウシ血清アルブミン; C I V、コラーゲン I V; L M、ラミニン; T N、テンサシン (t e n s a c i n))。合計した 3 実験の平均 ($\pm$ s e m)、n = 4 ディッシュ/リガンド/実験。

【図 3. 7】P B S 被覆スルフェートイントラサイトに比較される、フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトへの表層細胞結合を形成する多くのコロニーを示すコロニー涸渇アッセイの使用を示す。結果は、4 個の複製マルチウェルプレートの 1 2 ウェルそれぞれで形成されるコロニー数である。

10

【図 3. 8】P B S、血漿フィブロネクチン、細胞性フィブロネクチン、コラーゲン I V、ラミニン又はポリリジンで被覆したスルフェートイントラサイトへのコロニー形成骨髄間質細胞結合を比較するコロニー涸渇アッセイの使用を示す。血漿フィブロネクチン被覆スルフェートイントラサイトは、コロニー形成細胞に最も高い親和性を有するが、コラーゲン I V 被覆イントラサイトは、コロニー形成細胞結合について高いレベルを示す。

【図 4. 1】本発明の実施態様の合成インプラントを示す。

【図 4. 2】本発明のバイオリアクターに挿入するための挿入手段を示す。

【図 4. 3】細胞接種及び微粒子のインキュベート段階中の本発明の実施態様のバイオリアクターを示す。

【図 4. 4】細胞-接種微粒子を図 3 の合成インプラントに遠心分離した直後の、本発明の実施態様のバイオリアクター内に設置したハイブリッドインプラントを示す。

20

【図 4. 5】顕微鏡でのサルフェート材の外観を示す。

【図 4. 6】改質及び非改質材の代表的なスペクトルを示す。

【図 4. 7】スルフェートイントラサイト^{T M}に結合する血漿フィブロネクチン、細胞フィブロネクチン及びフィブロネクチン-E D A を示す。

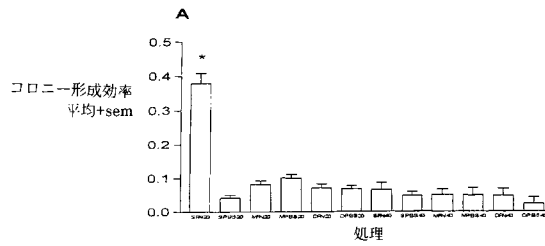
【図 4. 8】スルフェートイントラサイト^{T M}に結合するコラーゲン V I を示す。

【図 4. 9】F C S からの吸収後に、スルフェートイントラサイト^{T M}に結合するフィブロネクチン及びピロトネクチンを示す。

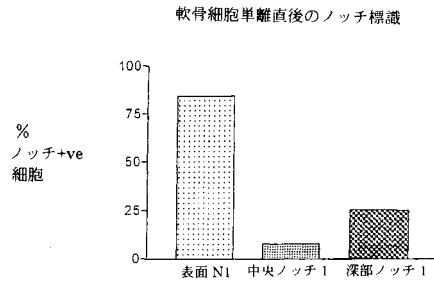
【図 4. 10】サルフェート及び非サルフェートイントラサイト^{T M}への細胞の植え付けを示す。

30

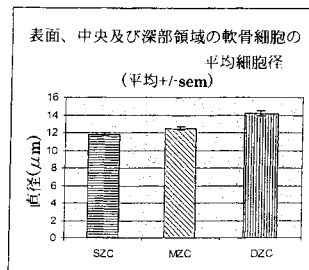
【図 1. 9】



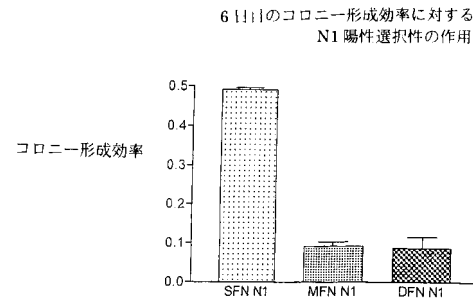
【図 1. 11】



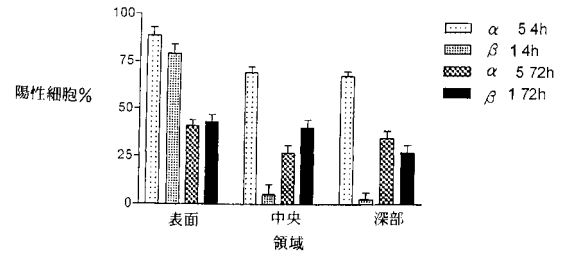
【図 1. 14】



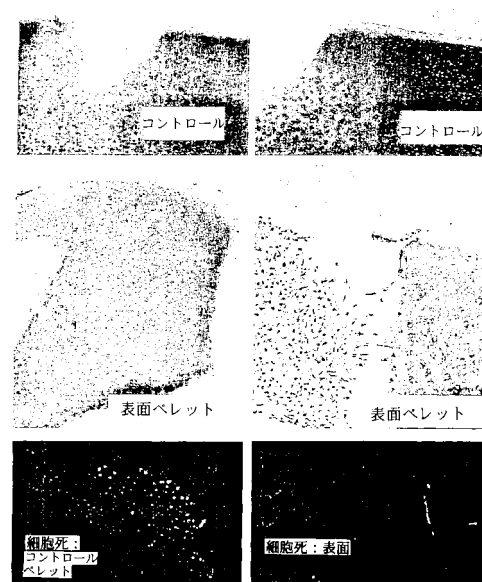
【図 1. 12】



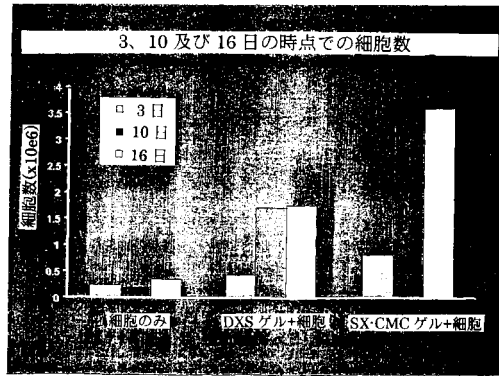
【図 1. 13】



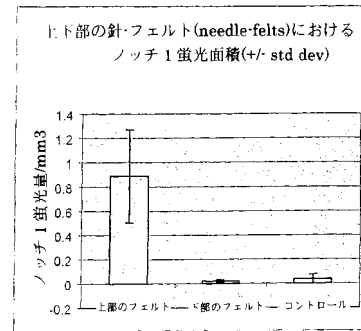
【図 1. 24】



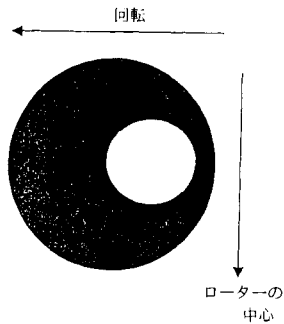
【図 2. 12】



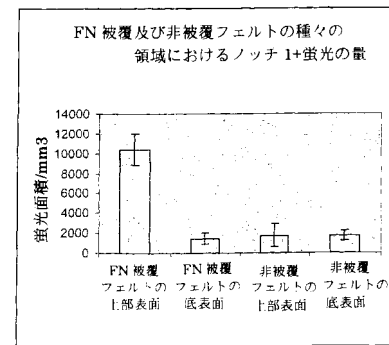
【図 2. 17】



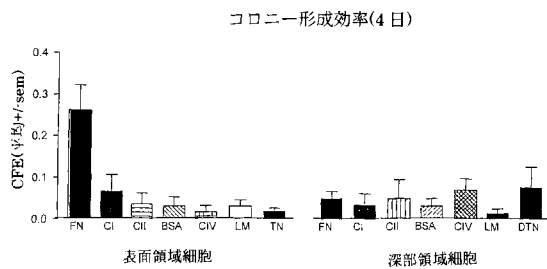
【図 2. 14】



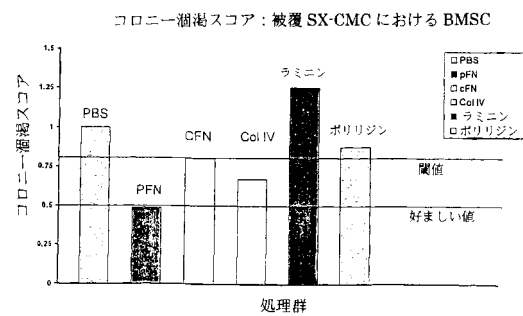
【図 2. 18】



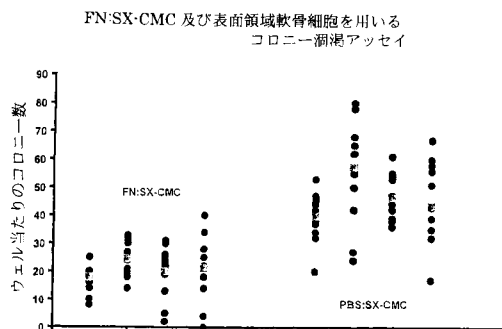
【図 3. 6】



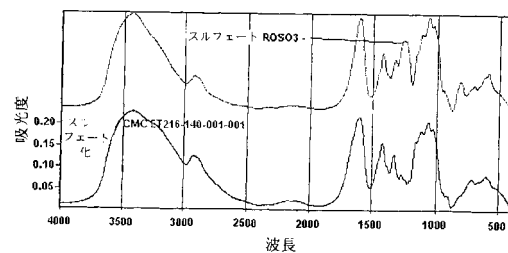
【図 3. 8】



【図 3. 7】



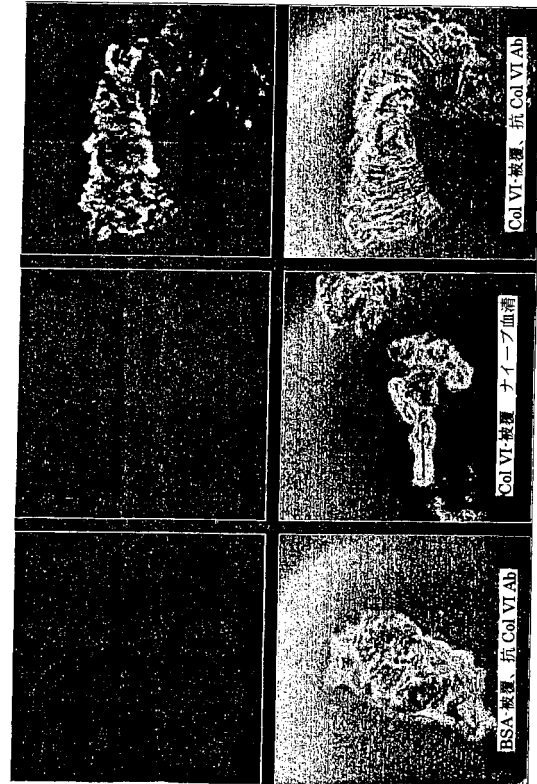
【図 4. 6】



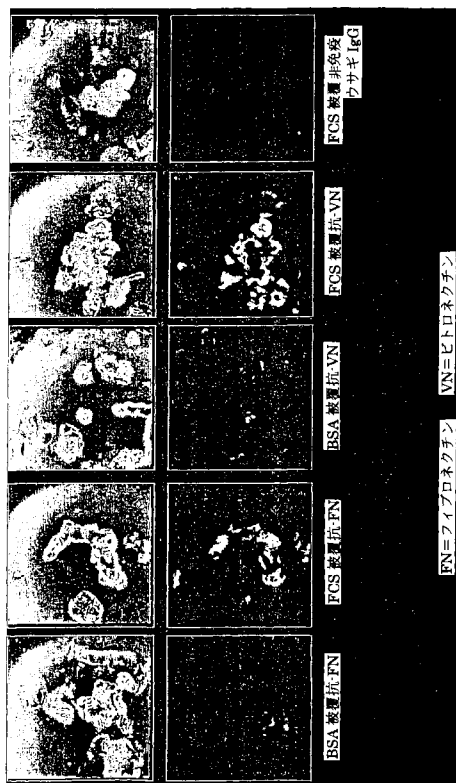
【図 4. 7】



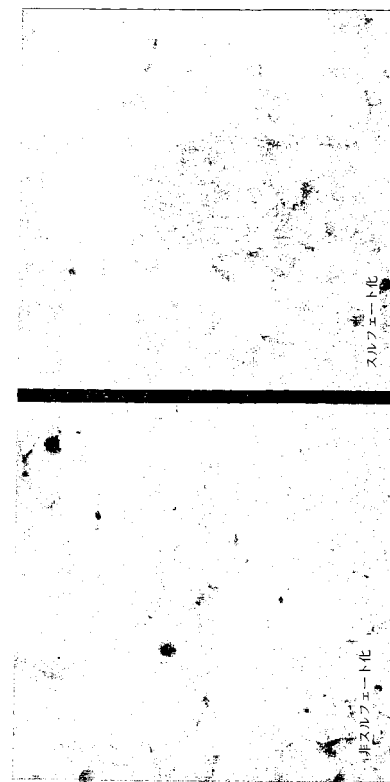
【図 4. 8】



【図 4. 9】



【図 4. 10】



【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
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/10348 A2

(51) International Patent Classification: C12N 5/06, Craig-Yr-Hellfan Farm, The Common, Glyn Taf, Mid Glamorgan CF37 4LX (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB01/03463 (74) Agent: DRAGGETT, Peter, T.; Group Patents & Trade Marks Department, Smith & Nephew Group Research Centre, York Science Park, Heslington, York YO10 5DF (GB).

(22) International Filing Date: 30 July 2001 (30.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0018583.5 29 July 2000 (29.07.2000) GB
0025939.0 24 October 2000 (24.10.2000) GB
0116885.5 11 July 2001 (11.07.2001) GB
0116886.3 11 July 2001 (11.07.2001) GB
0116888.9 11 July 2001 (11.07.2001) GB

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, 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, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, 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, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): SMITH & NEPHEW PLC [GB/GB]; Heron House, 15 Adam Street, London WC2N 6LA (GB).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): THOMSON, Brian, Mark [GB/GB]; 33 Bumby Lane, Pocklington, York YO42 2QE (GB). SMITH, Mark, Frederick [GB/GB]; Chapman House, Main Street, Huby, York YO61 1HS (GB). ARCHER, Charles, William [GB/GB]; Fairfield House, Brondeg Terrace, Aberdare, Mid Glamorgan CF44 7PL (GB). DOWNTHWAITTE, Gary, Paul [GB/GB];Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

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

WO 02/10348 A2

(54) Title: TISSUE IMPLANT

(57) Abstract: The invention relates to a medicament and method of treating cartilage defect. The invention also relates to an implant for treating cartilage defect.

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

Tissue Implant

The invention relates to an implant for the replacement of damaged cartilage and more particularly for the replacement of load-bearing cartilaginous tissue, such as the meniscus and articular cartilage. It also relates to a method of treatment comprising the step of surgically implanting an implant according to the invention and to a method of selectively concentrating chondroprogenitor cells present as a small proportion of a mixture of cells in a selected zone of the scaffold.

Popular current procedures for the treatment of articular cartilage defects include high tibial osteotomy (primarily performed in Europe) and muscle release to alter joint biomechanics and loading; lavage and debridement to remove osteophytes and fibrillated areas of cartilage and perforation and penetration of the subchondral bone to induce bleeding and clot formation. It has been established, however, that none of these techniques leads to successful regeneration of the tissue that duplicate the structure, composition, mechanical properties or durability of articular cartilage.

The most common technique is that of subchondral drilling which results in the creation of a fibrin clot and a fibrous tissue. In about 75% of patients there is a satisfactory result, but two years after the operation, only 12% of patients remain free of symptoms. Limitations of this approach are the difficulty in predicting the quality and duration of the clinical outcome and, in the long term, this procedure often leaves the patient in a worse condition. On the other hand, subchondral drilling and debridement are generally successful in alleviating symptoms and in postponing the requirement for total knee replacement by between one and three years.

Alternative allogenic tissue-engineered solutions to this technique involve only a single surgical procedure, but necessitate the production of implantable tissue-engineered grafts via a long and complex manufacturing process which is fraught with practical and regulatory difficulties.

A cartilage repair product which could predictably alleviate pain, restore function, achieve good fixation and which has a durability enabling it to last at least ten to fifteen years or more is seen as an important objective by many surgeons.

One currently available product which attempts to meet the above objectives comprises carbon fibre rods: the cartilage lesions are cleaned and excised down to the subchondral bone and the carbon fibre rods are inserted into holes made therein. Repair begins with the deposition of collagen around the top of the rods. These islands of growth soon enlarge to completely fill the defect, the rods providing anchorage for the repair tissue in the defect. A significant problem associated with this product is the production of carbon fibre wear debris found in the synovial cavity, which may give rise to problems of abrasion.

Another approach which has been considered is to use an areal implant comprising a knitted fabric, which provides structural stability, and a swellable hydrogel for containing and supporting cells seeded within it. This implant is placed in a cartilage lesion and is intended to promote cartilage growth by means of the increased pressure derived from the swelling hydrogel.

Despite the advancements described above, there are currently no satisfactory treatments for focal, full-thickness lesions of articular

cartilage: available methods are generally regarded as being insufficiently effective, excessively expensive or have other problems associated with them.

5 The approach of the present inventors has also been to consider, in detail, the structure of cartilage, particularly of articular cartilage. Articular cartilage forms a layer at the surface of joints. Whilst this tissue may, at first, appear to be homogenous in structure and composition, it actually comprises a number of zones. Three zones
10 have been identified, being the superficial, middle (or intermediate), and deep zones of the tissue. The superficial zone comprises flattened cells orientated parallel with the cartilage surface. By comparison, the cells in the intermediate and deep zones tend to be more spherical and arranged either at random or in columns oriented perpendicular to the
15 articular surface. These characteristic zone-specific cellular and structural properties are absent from the repair tissues, tissue-engineered constructs and products produced using current techniques.

20 While not wishing to be bound by any theory, it is considered now, for the first time, that the superficial zone cells are enriched in cartilage-forming chondroprogenitor cells. This is because (i) the cells in this zone are more metabolically and synthetically active than the cells of the deeper zones; (ii) they form colonies *in vitro*, (a widely recognised
25 feature of highly proliferative precursor cells); (iii) they possess signalling systems that are characteristic of precursor cells and (iv) the kinetics of the uptake of metabolic labels is consistent with the existence of a pool of early chondroprogenitor cells. The superficial zone also comprises a number of extracellular matrix (ECM)
30 components which are absent from deeper regions of the tissue. Whilst some of these components may have a purely structural or

mechanical role within the tissue, other superficial zone ECM components may additionally serve to provide an appropriate biochemical environment for the chondroprogenitor cells, (a so-called 'stem cell niche'). In addition, it is considered that certain ECM components found in the intermediate and deep zones may contribute to the formation and maintenance of structure and composition of those zones. Whilst not wishing to be bound by any theory, it is believed for the first time, that the cells in the superficial zone play an important part in cartilage formation and repair.

10

An improved approach to cartilage repair would aim to restore at least some of the layered tissue structure and composition which has been identified. In particular, it has now been identified that an improved approach to cartilage repair should restore a layer of chondroprogenitor cells similar to that which is present in the superficial zone of healthy articular cartilage.

In addition, current tissue-engineered approaches to the repair of focal articular cartilage defects are unable to meet the conflicting requirements of mechanical resilience and lateral integration. If a cell-seeded implant has a sufficiently robust extracellular matrix that it can withstand mechanical loading, then its cells are trapped within the matrix, unable to migrate into the surrounding tissue and therefore unable to contribute to lateral integration. Conversely, if the extracellular matrix in a tissue engineered articular cartilage graft is sufficiently permeable to permit cell migration and lateral integration, it is too weak to withstand mechanical loading.

It is recognised in the literature that chondrocytes proliferate but de-differentiate if grown as a monolayer of flattened cells upon a rigid substrate whereas they retain their functional phenotype but do not

divide if maintained in conditions that allow them to adopt a rounded morphology, (e.g. within alginate gels), especially in conditions of high cell density. Existing scaffolds do not provide the required combination of environmental stimuli to produce large numbers of functional chondrocytes from limited initial numbers of cells.

A first object of the present invention is to provide a medicament for treating diseases or conditions characterised by cartilage defects.

A second object of the present invention to provide a tissue implant which can be flush-fitted into a cartilage defect, particularly a defect in articular cartilage, and which promotes rapid healing and tissue regeneration.

A further object of the present invention is to provide a tissue implant which can restore the cellular and structural properties of the superficial zone of cartilage, particularly articular cartilage.

A further object of the present invention is to provide a tissue implant which can restore the cellular and structural properties of cartilage, particularly articular cartilage, located below the superficial zone.

A further object of the present invention is to provide a tissue implant which can withstand mechanical loading, but is also sufficiently permeable to permit cell migration and lateral integration.

It is also an object of the present invention to provide chondroprogenic binding materials.

A further object still of the present invention is to provide an alternative scaffold suitable to carry cells e.g. chondroprogenic cells.

Cells

According to a first aspect of the invention there is provided an
5 isolated population of superficial zone chondroprogenic cells.

By the term 'superficial zone chondroprogenic cells' we mean
chondroprogenic cells found within the superficial zone of healthy
articular cartilage. These chondroprogenic cells have a specific tissue
10 location (i.e. within the superficial zone), different control systems to
neighbouring chondrocytes, (e.g. the signalling receptor Notch is
present) and a distinctive extracellular matrix that includes the
fibronectin splice-variant Fibronectin-EDA..

15 Preferably the cells will be mammalian cells, suitably human.

The isolating of a population of superficial zone chondroprogenic
cells may be by obtaining any enriched population of superficial zone
chondroprogenic cells from superficial zone of cartilage of the joint of a
20 mammalian e.g. a human.

These cells could then be grown in vitro before being
administered to a patient. Administration of the live cells may be with,
or without, a suitable carrier e.g. a scaffold on an implant.

25 Surprisingly the superficial zone chondroprogenic cells are able to
correct cartilage defect in the body by simply being administered to the
body.

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

7

It was previously the view in the technical field that these superficial zone chondroprogenic cells had no role to play in or cartilage repair.

5 It was previously believed that the superficial zone chondroprogenic cells being of a flat appearance had only mechanical function, involved in matrix function.

10 It is generally accepted that articular cartilage tissue does not contribute to the cellular source of healing of articular cartilage lesions (Mankin HJ The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. Part I N Engl. J Med. 1974; 291: 1286, Mankin HJ The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. Part II N Engl. J Med. 1974; 241: 1335, Operative Arthroscopy Editor-in-Chief John B
15 McGinty).

It was commonly believed in the art that under normal circumstances, chondrocytes in mature articular cartilage rarely, if ever, divide, and the cell numerical density of cartilage, particularly in the
20 superficial layer, declines with age. (Ref: Stockwell R A: The cell density of human articular and costal cartilage. J Anat 1967; 101: 753-763, Stockwell R A, Meachion G: The chondrocytes, in Freeman MAR (ed): Adult Articular Cartilage, ed 2, Tunbridge Wells, Pitman Medical, 1979, pp69-144).

25 These age-related decreases in cell density and cell synthetic function may limit the ability of the cells to restore a damaged matrix. (American Academy of Orthopaedic Surgeons Symposium- Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues; Chapter 9, Chondrocytes
30 paragraph; pp 414 to 416).

In fact it was believed in the art that the procedure to repair cartilage was by the technique of making multiple small drill holes into subchondral bone. The repair tissue would grow from the drill holes and spread over the exposed bone. (Articular Cartilage and Knee Joint
5 Function, Basic Science and Arthroscopy, Perforation or Abrasion of Subchondral Bone paragraph; pp44, A symposium Organized by the arthroscopy Association of North America and sponsored by Bristol-Myers/Zimmer, edited by J Whit Ewing).

10 Surprisingly chondroprogenic cells e.g., superficial zone chondroprogenic cells, can promote differentiation of other chondroprogenic cells and can also promote chondrogenesis.

15 Surprisingly chondroprogenic cells, e.g. superficial zone chondroprogenic cells can promote cartilage repair and in particular can promote articular cartilage repair.

Live superficial zone chondroprogenic cells may therefore be used in a medicament or composition or implant to treat diseases or
20 conditions characterised by cartilage defect.

According to one aspect of the invention there is provided a method for the treatment of diseases or clinical conditions characterised by cartilage deficiency, the method comprising
25 administering live superficial zone chondroprogenic cells.

According to another aspect of the present invention there is provided an implant suitable for repair of a cartilage defect comprising a first surface suitable to be located at, or near, a bone-cartilage
30 interface and a second surface suitable for locating contiguous with or

near to an-exposed articular surface such that the implant further comprises superficial zone chondroprogenic cells.

Layered Structure

5

According to another aspect of the present invention there is provided an implant suitable for repair of a cartilage defect comprising a first surface suitable to be located at, or near, a bone-cartilage interface and a second surface suitable for locating contiguous with or
10 near to an exposed articular surface such that the implant further comprises a higher concentration of immature chondroprogenic cells at or near to the articular surface than at the bone-cartilage interface.

The chondroprogenic cells near to, or at, the bone-cartilage
15 interface tend to be more mature chondroprogenic cells than the cells near to, or at, the articular surface of the cartilage. The present invention in certain embodiments reflects this arrangement.

Suitably the immature cells are superficial zone chondroprogenic
20 cells.

Having the immature chondroprogenic cells, e.g. the superficial zone chondroprogenic cells and the more mature chondroprogenic cells arranged in the same or similar structure as found in cartilage is
25 beneficial to the cartilage growth and repair. The importance of having the immature chondroprogenic cells, e.g. the superficial zone chondroprogenic cells and the more mature chondroprogenic cells arranged in the same or similar structure as found in cartilage was not previously known.

30

As mentioned before, it was widely believed that these cells could not differentiate (or had limited capacity to differentiate) and had nothing to do with cartilage growth or repair. This was believed to be the case due to the cells flattened appearance and their distance from the cartilage-bone interface.

Suitably the implant of the present invention in which the distance between the first and second surfaces is d_1 comprises a greater concentration of immature chondroprogenic cells, e.g. superficial zone chondroprogenic cells, to a depth of d_2 from the second surface, than in the remaining depth of the implant, where $d_2/d_1 < 1$, but also in which $d_2/d_1 < 0.5$, < 0.3 or < 0.2 .

A suitable biocompatible scaffold may be used within the implant to carry the chondroprogenic cells, e.g. superficial zone chondroprogenic cells. Any suitable material to act as a scaffold or carrier may be used e.g. sulphated Intrasite gel.

The implant may be in the form of a single layer, a multiple of layers, microbeads or any other suitable shape to enable the working of the invention.

The implant may also have a reinforcing component to aid strength of the implant. Preferably the implant will comprise bioresorbable material.

Also according to the present invention there is also provided a method of producing an implant comprising the steps: locating or positioning immature chondroprogenic cells, e.g. superficial zone chondroprogenic cells, in a higher concentration near to a second surface of the implant than to a first surface of an implant, in which the

first surface of the implant is suitable to be located at, or near, a bone-cartilage interface and the second is suitable for locate contiguous with, or near, an exposed articular surface.

5 Also according to the present invention there is provided a method of promoting chondrogenesis, by positioning a cell near to, or in contact with or in communication with, an implant of the present invention. Suitably the cell for which chondrogenesis to be promoted, will be a chondroprogenic cell or a chondrocyte.

10

Similarly according to the present invention there is provided a method of promoting differentiation of chondroprogenic cells by positioning the chondroprogenic cell near to, or in contact with, or in communication with an implant of the present invention.

15

The communication means may be any means by which the superficial zone chondroprogenic cells can cause differentiation or chondrogenesis.

20 Binding Material

According to an alternative aspect of the invention, an implant for repair of a cartilage defect is presented, the implant having a first surface suitable to be located at or near a bone-cartilage interface and a second surface suitable for location contiguous with or near to an exposed articular surface, such that the distance between the first and second surfaces is d_1 , wherein the implant comprises a biocompatible scaffold and a chondroprogenitor cell-binding material to a depth, d_2 , from the second surface of the implant, where $d_2/d_1 < 1$.

30

According to a further aspect of the invention, an implant for repair of a cartilage defect is presented, the implant having a first surface suitable to be located at or near a bone-cartilage interface and a second surface suitable for location contiguous with or near to an exposed articular surface, such that the distance between the first and second surfaces is d_1 , wherein the implant comprises a biocompatible scaffold and a substance capable of absorbing a chondroprogenitor-cell binding material to a depth, d_2 , from the second surface of the implant, where $d_2/d_1 < 1$.

As stated in the introduction, an aim of the present invention in one embodiment is to restore at least some of the layered tissue structure and composition identified in natural cartilage, particularly articular cartilage. Importantly in some embodiments of the present invention it is desired to restore structure and composition of the superficial zone. By incorporating a chondroprogenitor cell-binding material or a substance capable of absorbing a chondroprogenitor-cell binding material into a region depending from the second surface (the surface suitable for location contiguous with or near to an exposed surface, i.e. the surface from which the superficial zone depends), chondroprogenitor cells may be attracted to and bound to this region of the implant, thereby helping to achieve the stated aim.

Reference herein to a material being 'biocompatible' means that there is essentially no clinically significant acute or chronic adverse response when the material is surgically introduced into a mammalian organism over and above that which would occur as a result of sham surgery alone.

Reference herein to a 'scaffold' is to a three dimensional, at least partially porous structure, the porosity being sufficient to allow cell

infiltration, the exposed parts of the scaffold (both internal and external) allowing cell adhesion and growth such that cell proliferation and extracellular matrix (ECM) generation can occur and tissue can be laid down.

5

Reference herein to 'chondroprogenitor cells' means cells, such as mesenchymal stem cells, which are at or towards the start of the chondrocytic lineage and typically have a high capacity to proliferate.

10

Reference herein to the 'chondrocytic lineage' is to the pathway whereby mesenchymal stem cells mature ultimately to give rise to terminally differentiated post mitotic chondrocytes.

Reference herein to a 'chondroprogenitor cell-binding material' is to a material which preferentially binds cells at or towards the start of the chondrocytic lineage, such as mesenchymal stem cells, over cells towards the end of the lineage.

15

Reference herein to a 'substance capable of absorbing a chondroprogenitor-binding material' means a material which can physically adsorb (i.e. non-covalently bind), or chemically bind (i.e. via the action of a covalent cross-linker) a chondroprogenitor cell-binding material, as defined above, thereby forming a complex, itself having an enhanced affinity to bind chondroprogenitor cells.

20

The scaffold according to the present invention may comprise one layer or it may comprise a plurality of layers. The or each layer comprises a three dimensional, at least partially porous structure, as defined above. The or each layer may, for example, comprise a three dimensional woven or knitted fabric (i.e. a spacer fabric), a fleece (i.e. non-woven) material, a sponge, a foam, microcarrier beads or a

25

30

combination of these materials. If the scaffold comprises a plurality of layers, these layers may all comprise an identical material. Alternatively, each layer may comprise material which is different from some or all of the other layers.

5

In the event that the scaffold according to the invention comprises at least one layer of three-dimensional woven or knitted fabric, it is preferred to heat set the layer(s). This step causes the molecules in the fibres to re-align to the orientation imposed upon the fibres and causes the fabric to shrink somewhat. Both effects serve to render the fabric more stable. Heat setting is carried out at a temperature and for a time known to the skilled man in this field and depends upon the material in question.

10

15

In a preferred form the scaffold according to the invention comprises two layers. Advantageously, one layer comprises a three-dimensional knitted structure and the other layer comprises a non-woven (felt) material affixed thereto. These two layers may be fixed to one another by a variety of methods, such as stitching, needling, heat bonding (by incorporating thermosetting fibres into one or both of the knitted and felt layers) or by means of an adhesive or polymer solution.

20

As used herein, the term 'microcarrier beads' means any particulate material capable of supporting cell adhesion or possessing a cell-binding surface layer. Such particulates may be in the size range 25 – 2000µm and are preferably in the range 100 – 250µm. Examples of materials from which such beads may be constructed are cross-linked proteins, polysaccharides, derivatised polysaccharides and synthetic biocompatible polymers, such as those listed below for manufacture of the scaffold. Commercially available microcarrier beads are supplied by Pharmacia and Sigma.

25

30

The scaffold layer or layers may comprise bioresorbable or non-bioresorbable materials.

5 Reference herein to a material being bioresorbable means that it breaks down over time due to chemical/biological action and the terms 'resorption' and 'resorb' are to be interpreted accordingly. Preferably, complete resorption occurs within about 5 years, more preferably within about 3 years. An advantage of using bioresorbable materials is that
10 they break down allowing repair tissue completely to fill the defect site such that further surgery to remove them is not necessary.

 If a single bioresorbable material is employed, then a preferred selection criterion for it is that it does not significantly resorb during the
15 period of time that tissue is being laid down within it. Fulfilment of this condition ensures generation of an implant comprising living cells, which also essentially retains its shape and mechanical integrity. In numerical terms, it is preferred that there be less than a 5% loss of weight when the bioresorbable material is implanted *in vivo* for a 12
20 week period. More preferably, there is less than a 2% loss of weight during the same period. If, on the other hand, there are two or more bioresorbable materials, then it is preferred that at least one of the bioresorbable materials fulfils this criterion in order to provide structural integrity to the implant.

25 A wide range of bioresorbable materials is known, with differing *in vivo* resorption times. Not only does the resorption time vary according to the material, but the resorption time of a single material itself can also vary significantly with molecular weight and structural disposition.
30 Finally, it can readily be appreciated that by blending and/or copolymerising different bioresorbable materials and/or by modifying

the molecular weights or crystallinity of the components, it is possible precisely to tailor the resorption time of the bioresorbable material to the requirement at hand.

- 5 With the above in mind, the bioresorbable materials according to the invention may comprise bioresorbable polymers or copolymers comprising the following monomers or mixtures of polymers and/or copolymers formed thereby: hydroxy acids, particularly lactic acid, glycolic acid; caprolactone; hydroxybutyrate; dioxanone; orthoesters;
10 orthocarbonates; aminocarbonates.

- The bioresorbable materials according to the invention may also comprise natural materials such as collagen, cellulose, fibrin, hyaluronic acid, fibronectin, chitosan or mixtures of two or more of
15 these materials. The bioresorbable materials may also comprise devitalised xenograft and/or devitalised allograft.

- Bioresorbable ceramics may also be included within the scaffold. Bioresorbable ceramics which may be used according to the invention
20 are mono-, di-, octa-, α -tri-, β -tri and tetra-calcium phosphate, hydroxyapatite, fluoroapatite, calcium sulphate, calcium fluoride, calcium oxide or mixtures of two or more of these materials.

- Preferred bioresorbable materials according to the invention
25 comprise poly(lactic acid), poly(glycolic acid), polydioxanone, polycaprolactone, polyhydroxybutyrate and poly(trimethylene carbonate) or mixtures thereof.

- It is particularly preferred to use poly(lactic acid). This material
30 has the advantage that it has good mechanical strength and does not resorb too quickly, thus allowing its mechanical properties to be

retained for a sufficient time for tissue repair to occur at which point the repaired tissue can take over load-bearing functions: with reference to A.G.A. Coombes and M.C. Meikle, 'Resorbable Synthetic Polymers as Replacements for Bone Graft', Clinical Materials 17, (1994), pp 35-67
5 samples of poly(lactic acid) have been shown to lose only one or two percent of their weight over a 12 week trial.

Appropriate non-bioresorbable materials according to the invention include polyesters, particularly aromatic polyesters, such as
10 polyalkylene terephthalates, like polyethylene terephthalate (PET) and polybutylene terephthalates; polyamides; polyalkenes such as polyethylene and polypropylene; poly(vinyl fluoride), polytetrafluoroethylene carbon fibres, silk (natural or synthetic), carbon fibre, glass and mixtures of these materials. In addition, non-
15 resorbable ceramics may be employed. Examples of such materials are pure hydroxyapatite, zirconia and alumina. An advantage of non-bioresorbable materials is that they essentially retain their initial mechanical properties – i.e. properties such as strength do not reduce over time. They may therefore provide long-term mechanical support
20 to the repair tissue.

In the advantageous case in which the scaffold according to the invention comprises two layers - a knitted layer affixed to a felt layer, as defined above, then it is particularly advantageous to manufacture the
25 knitted layer so that it comprises poly(lactic acid) or PET and the felt layer so that it comprises poly(glycolic acid).

According to a preferred form of the first aspect of the invention, the scaffold may be reinforced by inclusion of a reinforcing component
30 within the structure to assist in withstanding mechanical loading. If the scaffold comprises a plurality of layers, then from one to all of the

layers may be reinforced. The reinforcing component may comprise a bioresorbable or non-bioresorbable polymer of the types listed above for manufacture of the scaffold. Preferably, the reinforcing component comprises a molten thermosetting polymer or a solution of a thermosetting polymer which is added to the scaffold in a fashion such that it connects adjacent strands within the scaffold, thereby improving its compressive modulus. More preferably, the reinforcing component comprises polycaprolactone.

One method of providing the above-mentioned reinforcement is to compress the fabric between two 'nip' rollers over which is supplied a pool of molten or dissolved reinforcing polymer. As the fabric is compressed and forced between the rollers a small quantity of reinforcing polymer is carried with it and this is drawn into the fabric when it re-expands on the other side of the rollers, thereby coating the fibres.

The implant according to the invention advantageously comprises at least one layer which has a compressive modulus of greater than or equal to 1MPa. Preferably, the compressive modulus of the layer or layers is in the range 1-3 MPa and more preferably still, it is in the range 1-2MPa. The compressive modulus of the layer or layers may be an inherent property or may result from a reinforcement step, such as described above.

Chondroprogenitor cell-binding materials which may be used according to the invention include fibronectin, type IV collagen, anti-notch antibody, anti-integrin β_1 antibody and combinations of these materials.

Fibronectin is an extracellular-matrix glycoprotein encoded by a single gene, but with significant protein heterogeneity introduced through alternative RNA splicing and post-translational modifications. Reference herein to 'fibronectin' includes fibronectin; binding splice-
5 variants of fibronectin, such as FIBRONECTIN-EDA, or fibronectin extra-domain A (also called EIIIA or EDI), FIBRONECTIN-EDB (also called EDIIB or EDII) and FIBRONECTIN-IIICS (also called V, or variable); the domains themselves, such as EDA, EDB; homologues of fibronectin or its component domains (greater than 75% of sequence
10 equivalence), or modified variants of fibronectin or its domains, such as an EDA sequence coupled to a linker sequence and/or a biomaterial binding sequence, such as polyHIS.

In a preferred form of the first aspect of the invention, the
15 chondroprogenitor-binding material comprises FIBRONECTIN-EDA, the EDA domain on its own and/or the EDA domain coupled to a linker that allows it to be attached to the surface of a biomaterial. Splice variants of fibronectin, such as FIBRONECTIN-EDA, are known to be concentrated in the superficial zone of natural articular cartilage.
20 Binding the materials listed to the superficial region of the implant may increase the selectivity of chondroprogenitor cell attachment to the surface of the device.

Substances capable of absorbing a chondroprogenitor-cell
25 binding material according to the invention are polyanions including heparin, sulphated Intrasite™ and tetrahydrofurfuryl. If these materials are comprised within the implant according to the invention, they may absorb naturally occurring chondroprogenitor cell-binding materials, such as those listed above, from the surrounding tissue, following
30 implantation. Alternatively, chondroprogenitor cell-binding materials may be added to the implant before or after implantation.

As stated above, the implant according to the invention comprises a chondroprogenitor-cell binding material or a substance capable of absorbing a chondroprogenitor-cell binding material. This material or substance may be comprised within a layer coated on the second surface of the scaffold, or it may be comprised within the scaffold itself, or both.

As also stated, if the distance between the first and second surfaces of the implant is d_1 , the implant comprises the chondroprogenitor-cell binding material or the substance capable of absorbing a chondroprogenitor-cell binding material to a depth, d_2 , from second surface of the implant such that $d_2/d_1 < 1$. Preferably, $d_2/d_1 < 0.5$, more preferably, $d_2/d_1 < 0.3$ and most preferably, $d_2/d_1 < 0.2$.

The chondroprogenitor-cell binding material or the substance capable of absorbing a chondroprogenitor-cell binding material disposed within the implant may be present in a constant concentration, as a continuous concentration gradient, or as a concentration gradient comprising a series of discrete steps. If present as a either type of concentration gradient, the concentration may increase in the direction moving from the first surface to the second surface or moving from the second surface to the first surface, but it is preferred that the concentration increase in the direction moving from the first to the second surface, since the highest concentration and thus the greatest degree of binding advantageously occurs towards the second surface of the scaffold.

Typically, the thickness of the region comprising chondroprogenitor-cell binding material or the substance capable of absorbing a chondroprogenitor-cell binding material, i.e. the depth d_2

from the second surface, is in the range 0.05mm-8mm, or more preferably 0.2mm-8mm.

As stated in the introduction, it is considered that certain ECM components found in zones other than the superficial zone may contribute to the formation and maintenance of structure and composition of those zones. In a preferred form of the first aspect of the invention, the implant additionally comprises a further cell-binding material capable of binding cells found in zones other than the superficial zone of cartilage, particularly articular cartilage, such as type I collagen, type II collagen, type VI collagen or vitronectin. These materials are comprised within the implant to a depth, d_3 , from the first surface of the implant, such that $d_3/d_1 < 0.8$. Preferably, $d_3/d_1 < 0.7$ and more preferably, $d_3/d_1 < 0.5$.

As will be evident from the preceding discussion, it is the intention that the implant according to the invention become populated with cells. This may be achieved by allowing a sterile implant to become populated with cells migrating from the surrounding host tissue into the implant. Such a migration-process may be assisted, for example by incorporating matrix degrading enzymes or chemotactic factors in and around the implant.

Alternatively, autologous or allogenic chondroprogenitor cells may be added to the implant. Suitable sources of chondroprogenitor cells include any source of undifferentiated mesenchymal cells, (e.g. bone marrow, purified or enriched populations of bone marrow stromal cells, pericytes, periosteum, perichondrium, adipose or cells derived from the cambrial layer of periosteum or perichondrium). These cells may be added either before or after implantation.

According to another aspect of the invention a method of treatment of a cartilage defect in a mammalian organism is presented, the method of treatment comprising the step of surgically implanting an implant as above defined.

5

According to another aspect of the invention, a method is presented of selectively concentrating chondroprogenitor cells present as a small proportion of a mixture of cells, comprising the step of attaching a chondroprogenitor cell-binding material to a support matrix and passing the mixture of cells therethrough or thereover or allowing it to rest thereupon, thus allowing the chondroprogenitor cells to adhere to said chondroprogenitor cell-binding material, followed by the step of washing to remove contaminant cells.

15 In the method according to a particular aspect of the invention, the mixture of cells comprising the chondroprogenitor cells may, for example, be derived from cartilaginous and non-cartilaginous sources of early mesenchymal precursor cells, such as Whartons jelly, bone marrow, the superficial zone of articular cartilage, periosteum or perichondrium.

20 The support matrix according to one embodiment of the invention may be a Petri dish or an affinity column and attachment may be physical or chemical. The last step may, for example, comprise a gentle washing with culture medium.

Reference is made to the figures of the application:

30 Fig. 1.1 shows immunolocalisation of N1 (Notch-1). N1 expression (green, 1.11) shown to be almost entirely confined to the upper 2-3 cell layers of the superficial zone of neonatal bovine articular

cartilage cells that do not express N1 are counterstained (red, 1.10) by propidium iodide. Arrows 1.13 indicate the articular surface.

Fig. 1.2 is a higher magnification of Fig. 1.1.

5

Fig. 1.3 shows immunolocalisation of Fibronectin-EDA. Fibronectin-EDA expression is cell associated and almost entirely confined to the superficial zone of articular cartilage (green, 1.31). Cells that do not express Fibronectin-EDA are counterstained (red, 1.32) by propidium iodide. Arrows (1.33) indicate the articular surface.

10

Fig. 1.4 shows minimal immunolocalisation of Fibronectin-EDA in the mid zone.

15

Fig. 1.5 shows the control of Fig. 1.4; Control section, note absence of green stain.

Fig. 1.6 shows N1 immunolocalisation.

20

Fig. 1.7 is a picture of Fibronectin-EDA immunolocalisation.

Fig. 1.8 shows co-localisation of N1 and Fibronectin-EDA in immature bovine cartilage. Overlay of N1 immunolocalisation (green, 1.81), fibronectin-EDA immunolocalisation (red, 1.82). Arrows illustrate the articular surface. This illustrates that the cells expressing N1 also express fibronectin-EDA.

25

Fig. 1.9 shows the graph that the colony forming efficiency of the 'fast-fibronectin binding' superficial zone was significantly higher than that observed amongst the other groups of chondrocytes, ($p < 0.01$).

30

Fig. 1.10 is a photomicrograph of colonies formed by the 'fast-fibronectin binding' superficial zone cells.

Fig. 1.11 represents Notch labelling immediately after chondrocyte isolation. Analysis of differential N1 expression by chondrocytes using FACS analysis. Approximately 75% of surface zone, 10% of middle and 25% of deep zone cells were positive for N1 immediately after isolation from the tissue.

Fig. 1.12 shows the effect of N1 positive selection on colony forming efficiency at 6 days using magnetic bead separation of Notch positive cells. There were significantly ($p < 0.001$) more colonies from N1 positive surface zone cells than from N1 positive middle and deep zone cells.

Fig. 1.13 is an analysis of differential integrin expression by superficial zone chondrocytes using FACS.

Fig. 1.14 is a graph of average cell diameter of superficial, mid and deep zone chondrocytes (means $\pm$ SEM). Measurement of average cell size of superficial, mid and deep zone chondrocytes. There are a significant difference in diameters between both SZC (superficial zone chondrocytes) and MZC (middle zone chondrocytes) ($p < 0.05$) and SZC and DZC (deep zone chondrocytes) ($p < 0.005$).

Fig. 1.15 a, b, c are representative photographs of a SZC, MZC and DZC respectively viewed using phase contrast optics (magnification x200).

Fig. 1.16 shows the histological investigation of pellet cultures. H+E staining of 'fast-binding' superficial zone chondrocyte pellets

showed the presence of morphologically normal and viable cells throughout the specimens Fig. 1.16a (7 day; SZC; H+E; x5obj) and Fig. 1.16b (7day; SZC edge; H+E; x20obj).

5 Fig. 1.17 shows histological investigation of pellet cultures. Picrosirius red showed collagen deposition especially in the territorial matrix surrounding the cells (21 day; x20obj).

Fig. 1.18 shows histological investigation of pellet cultures.
10 Safranin O staining for glycosaminoglycans showed intense dark orange staining of the extracellular matrix produced by the cells, indicating that the cells had secreted a proteoglycans-rich matrix (21 day; SZC; x5obj).

15 Fig. 1.19 shows immunocytochemical investigation of pellet cultures. Immunocytochemistry showed that the cells were synthesising cartilage specific matrix components in pellet culture. The extracellular matrix in the pellet contained collagen type II (14 day; SZC; x20obj).

20 Fig. 1.20 shows immunocytochemical investigation of pellet cultures. Absence of collagen type I, indicates that the cells had differentiated to form chondrocytes and that de-differentiation had not occurred (14 day; SZC; x20obj).

25 Fig. 1.21 shows the presence of chondroitin 4 sulphate in the matrix of the pellet cultures.

Fig. 1.22 shows the presence of chondroitin 6 sulphate in the matrix of the pellet cultures.

Fig. 1.23 is a fluorescence image showing distribution of link binding protein in pellets cultures (10 day; x126obj).

Fig. 1.24 shows pellet cultures of superficial, mid and deep zone
5 chondrocytes transplanted onto partial thickness cartilage defects.

Fig. 1.25 shows *in ovo* chondroprogenitor cell tracings using CFDA SE labelled cells areas of the embryo containing developing cartilage, e.g. the otic cup.
10

Fig. 1.26 shows bovine MHC1 possitive cells localised with Cy3-conjugated secondary antibody in soft connective tissue of chick embryos at H&H stage 30-32 (magnification x 126).

Fig. 1.27 Toluidine blue stained chick embryos at H&H stage 30-32. Bovine ectopic cartilage in chick wing formed from injected surface zone chondrocytes.
15

- A. Metachromatic staining of disorganised ectopic cartilage.
- B. Surrounding fibrous tissue.

20

Fig. 2.1 and 2.2 show possible forms and profiles of 'zoned' areas of the culture.

Fig. 2.3 represents bone marrow stromal cells adhered to cell-adhesion factor coated sulphated. Intrasite within 16 hours, and proliferated.
25

Fig. 2.4 shows calcein AM staining revealed a population of
30 adherent cells upon the surface of the material after 4 days.

Fig. 2.5 represents the deposition of a collagenous matrix after 7 days in culture shown by picrosirius red.

Fig. 2.6 depicts immunochemistry showed type I collagen production in specimens of bone marrow stromal cells cultured on fibronectin coated sulphated Intrasite after 10 days.

Fig. 2.7 show no evidence of collagen II production was observed.

Fig. 2.8 depicts MTT staining showed viable cells throughout the aggregates, both upon the surface of the material particles and in the spaces between them.

Fig. 2.9a shows that the cells has deposited a collagenous matrix within the aggregates as stained by picrosirius red and also shows immunocytochemically that the chondrocytes expressed the cartilage specific form of collagen, collagen type II, (Fig. 2.9b).

Fig. 2.10 shows by immunocytochemistry that the chondrocytes secrete collagen VI into their pericellular matrix.

Fig. 2.11 by immunocytochemistry this shows that the chondrocytes were not producing collagen I, even after 27 days in culture.

Fig. 2.12 is a graph showing that the ovine chondrocytes had increased in number 14.4 fold over the incubation period with the most rapid occurring during the first 10 days.

Fig. 2.13 show an outline of the equipment used and method used to form a bilayered construct by sequentially centrifuging (I) bone marrow stromal cell-seeded, fibronectin coated sulphated Intrasite and

(II) chondrocyte-seeded coated sulphated Intracite into a scaffold to form a two layered, fibre re-enforced cell/biomaterial construct.

Fig. 2.14 shows a preferred orientation of the 'asymmetric collar' relative to the direction of rotation of the centrifuge rotor and the radical axis of the rotor.

Fig. 2.15 shows the deposition of a bilayer of dyed sulphated Intracite.

Fig. 2.16 shows a bilayered construct consisting of (I) a layer of pico green stained bone marrow stromal cell-seeded, fibronectin coated sulphated Intracite and (II) a layer of EtBrHD stained chondrocyte-seeded coated sulphated Intracite.

Fig. 2.17 shows the quantification of green fluorescence in the two felts compared to the control. Immediately apparent is the greater amount of N1+ fluorescence in the upper felt that was coated with fibronectin and seeded with the mixed population of chondrocytes for 30 minutes prior to the seeding of the lower felt with the same cell population.

Fig. 2.18 shows the quantification of green fluorescence in the various zones. Immediately apparent is the greater amount of Notch 1+ fluorescence in the upper surface of the felts which had had the upper surface coated with fibronectin.

Figs. 3.1a – 3.1d illustrate implants according to the invention.

Figs. 3.2a – 3.2c illustrate the use of coated microbeads with different cell-binding properties and buoyant densities/sedimentation

velocities to produce a multi-layered implant. Two types of microbeads (particulate materials) with differing sedimentation velocities are mixed with a suspension of chondrocytes (Fig. 3.2a), and allowed to aggregate (Fig. 3.2b). One of the microbead-types is coated with a material which preferentially binds chondroprogenitor cells, while the other microbead type preferentially binds another cell-type (such as more mature chondrocytes found lower down the chondrocytic lineage). After cell attachment, the cell-covered microbeads are allowed to sediment to form a multi-layered deposit (Fig. 3.2c). The deposit can then be bound together to form an implant using a binding agent which sets *in situ* (e.g. alginate gel).

Figs. 3.3a – 3.3c illustrate production of a multilayered implant using a scaffold material, which may be a 3D-knit, in combination with two or more types of microbeads with differing sedimentation velocities. As in Fig. 3.2, one of the types of microbeads is coated with a chondroprogenitor cell binding-material; the other type is coated with a material which preferentially binds another cell-type (such as more mature chondrocytes found lower down the chondrocytic lineage). As in Fig. 3.2, the microbeads are mixed with a suspension of chondrocytes, (Fig. 3.3a), allowed to interact with the cells in suspension, (Fig. 3.3b) and sedimented into the void spaces of a biomaterial scaffold to form a multilayered implant (Fig. 3.3c).

Figs. 3.4a – 3.4c illustrate production of a multilayered implant using a combination with two or more types of microbeads with differing sizes and cell binding affinities and a biomaterial scaffold-material, which may be a 3D-knit, designed to serve as a graded filter. As in the previous figures, one of the microbead-types is coated with a chondroprogenitor-cell binding material; the other is coated with a material which preferentially bind another cell-type found lower down

the chondrocytic lineage. The cell-binding particles and chondrocytes, (not shown), are mixed, (Fig. 3.4a) and the cells allowed to bind preferentially to one or other class of bead, (Fig. 3.4b). The cell-covered microbeads are then drawn into a graded-filter. Smaller
5 microbeads, (coated with one type of cell) are generally drawn further into the filter than the other type of microbead, (carrying a different cell type), thereby producing a layered device.

Fig. 3.5 is a schematic illustration of an implant according to the
10 invention.

Fig. 3.6 shows colony forming efficiency of superficial and DZC 4 days after initial adhesion to various ligands. (FN, fibronectin; C1, collagen I; CII, Collagen II; BSA, bovine serum albumin; CIV, collagen
15 IV; LM, laminin; TN, tensacin). Combined means ($\pm$ sem) of 3 experiments, n=4 dishes per ligand per experiment.

Fig. 3.7 shows the use of colony depletion assay to show enhanced colony forming superficial zone cell attachment to fibronectin coated sulphated Intrasite compared to PBS coated sulphated Intrasite.
20 Results are the number of colonies formed in each of the 12 wells in 4 replicate multiwell plates.

Fig. 3.8 shows the use of colony depletion assay to compare
25 colony forming, bone marrow stromal cell adhesion to sulphated Intrasite coated with either PBS, plasma fibronectin, cellular fibronectin, collagen IV, laminin or polylysine. Plasma fibronectin-coated sulphated Intrasite has the highest affinity for the colony forming cells but collagen IV coated Intrasite also shows a high level of colony forming cell
30 binding.

Preferred embodiments of the invention will now be described in more detail with reference to these figures:

Fig. 3.1 shows four possible embodiments of this type of device:

5

Fig. 3.1a shows an implant comprising a single layer scaffold, itself comprising a non-woven polymeric felt. A portion of the scaffold extending down from its upper (articular) surface (3.2) comprises a chondroprogenitor cell-binding material (e.g. fibronectin). The lower (bone-contacting) surface (3.1) does not comprise chondroprogenitor cell-binding material.

Fig. 3.1b shows an implant comprising a single layer scaffold, itself comprising a three-dimensional knitted fabric, the implant having an upper (articulating) surface (3.2) covered with a coating comprising chondroprogenitor cell-binding material (e.g. fibronectin). Again, the lower (bone-contacting) surface (3.1) does not comprise chondroprogenitor cell-binding material.

Fig. 3.1c shows an implant comprising a single layer scaffold, the scaffold itself comprising a three-dimensional knitted fabric with a chondroprogenitor cell-binding material (e.g. fibronectin) being located therein. There is a concentration gradient of chondroprogenitor cell-binding material with the concentration decreasing with distance from the upper (articular) surface (3.4), such that this surface has a greater affinity for chondroprogenitor cells than the deeper regions of the implant, particularly the lower surface (3.3).

Fig. 3.1d shows an implant comprising a two-layer scaffold, incorporating an upper (articular) layer of three-dimensional knitted fabric and a lower (bone-contacting) layer of highly conformable, non-

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

32

woven material. A chondroprogenitor cell-binding material (e.g. fibronectin) is comprised within the device such that the upper (articular) surface (3.6) of the device has a higher affinity for chondroprogenitor cells than the deeper bone interface layer (3.5).

- 5 Chondroprogenitor cell-binding material may extend down into the lower layer or may be confined to the upper layer, depending on the layer thicknesses.

Implant comprising a scaffold comprising microbeads coated with chondroprogenitor cell binding material.

- 10 An implant according to the invention may comprise microbeads coated with chondroprogenitor cell-binding material. In such a case, the scaffold may also comprise uncoated-beads and the beads are then arranged so that the coated ones are located down a depth, d_2 , from the second surface of the scaffold. Such an arrangement may be achieved by a number of methods, such as by giving one type of bead a different size or density from the other type.

- 20 Taking this concept a step further, it is possible to coat some beads with chondroprogenitor cell-binding material and other beads with a material which binds other cells, such as more mature chondrocytes (those lower down the chondrocytic lineage) typically found in the intermediate and deep zones of cartilage, particularly articular cartilage. In Figs. 3.2a - 3.2c, 3.3a - 3.3c and 3.4a - 3.4c, the two different cell-types are represented by the following symbols:



- 30 An example of a chondroprogenitor cell-binding material is fibronectin-EDA in this case, and an example of the binding material for

the deeper zones is collagen VI. The fibronectin-EDA and the collagen VI are coated onto two different types of particulate biomaterial, such as microcarrier beads, with differing sizes, densities and/or sedimentation velocities. In Figs. 3.2a - 3.2c, 3.3a - 3.3c and 3.4a - 3.4c, the two different bead-types are represented by the following symbols:



The microcarrier beads are sedimented to form a multilayered deposit, which may be aggregated with a binding agent, such as alginate or pluronic gel to produce an implant in which each of the two binding agents is essentially confined to its appropriate zone (see Figs. 3.2a - 3.2c). Alternatively the coated beads may be allowed to sediment onto a scaffold material and then used with or without subsequent application of a binding agent (see Figs. 3.3a - 3.3c). Alternatively again, if the two types of beads differ in size, they can be separated by entrapping them in a scaffold that serves as a graded filter (see Figs. 3.4a - 3.4c - cells not shown), whereby the smaller particles are drawn further into the filter than the larger ones (carrying a different cell type) thus producing a layered device.

With reference to Fig. 3.5, a schematic illustration of an implant (3.7) according to the invention is shown. This implant has a first, lower surface (3.8), suitable to be located at or near a bone-cartilage interface and a second, upper surface (3.9), suitable to be placed contiguous with or near to an exposed, articular surface. The distance between the first and second surfaces is d_1 . To a depth, d_2 , from the second surface (3.9), the implant comprises chondroprogenitor cell-binding material. To a depth, d_3 , from the first surface (3.8), the implant comprises a further cell-binding material, such as collagen VI, capable

of binding cells found in zones other than the superficial zones of cartilage.

According to yet another aspect of the invention there is provided an
5 implant for the repair of a cartilage defect which comprises a mature
chondrocyte cell-binding material. Suitably the mature chondrocyte cell-
binding material is type I collagen, type II collagen, type VI collagen or
vitronectin.

10 **Example 1: Characteristics of superficial zone chondroprogenitor
cells**

Summary

15 Our examples demonstrate that a layer of chondroprogenitor cells
exist within the superficial zone of healthy articular cartilage:

1. Immunocytochemical analysis of intact cartilage shows that the
chondroprogenitor cells have a specific tissue location, (i.e. within
the superficial zone), different control systems to neighbouring
20 chondrocytes, (e.g. the signalling receptor N), and a distinctive
extracellular matrix, (including the fibronectin splice-variant
Fibronectin-EDA).
2. *In vitro* analysis shows the cells rapidly bind fibronectin, have a
high colony forming efficiency, (the 'gold standard' test for
progenitor cells), a distinct pattern of integrin expression and a
25 smaller than average cell size. *In vitro* analysis also shows that
the cells may be enriched using anti-Notch antibody-coated
magnetic beads and that the Notch positive cells have enhanced
colony forming activity.

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

35

3. Pellet culture of the cells indicates that the superficial zone progenitor cells can form cartilage, confirming that they are part of the chondrogenic family of cells.
4. Incubation of the progenitor cells in contact with wounded cartilage reduces cell death and matrix breakdown in the injured cartilage, indicating that the progenitor cells maybe able to promote cartilage wound repair.
5. If injected intravascularly, *in ovo*, the cells localise to developing cartilaginous tissues, suggesting that they are chondroprogenitor cells rather than a more undifferentiated mesenchymal precursors.

Cells with the above combination of properties are not observed in mid or deep zone cartilage. Superficial zone chondroprogenitors cells also differ from early mesenchymal cells obtained from marrow stroma, because stromal cell colonies are fibroblastic and form within 4 days whereas the superficial zone chondrocytes form rounded cell colonies over a longer time period, (typically 6 days).

Taken together these results indicate that superficial zone cells constitute a distinct precursor cell stage within the chondrocytic branch of the mesenchymal family of cell lineages. Whilst the detailed pattern of marker expression may differ between species, with aging and disease or during wound repair, the existence of this progenitor cell layer is likely to be a recurring feature of articular cartilage development, maintenance and repair.

Example 1.1: Immunocytochemical evidence of chondroprogenitor cells within the superficial zone of neonatal bovine articular cartilage

Methods

Preparation of frozen cartilage sections. Strips of full thickness articular cartilage, (approx 30mm x 3mm), were removed from 2-3 week old bovine metatarsophalangeal joints, embedded in OCT (Gurr) and frozen using a liquid nitrogen cooled iso-pentane slush. Sections, (7µm), were cut from the specimen using a Leica Jung CM3000 cryostat and placed on poly-lysine coated slides (Sigma). Sections were fixed by immersion in acetone for 10 minutes at room temperature and air dried. Slides were stored at -20°C until used.

Immunolocalisation of N1. Sections were washed in PBS, (2 x 10 minutes; Oxoid) and blocked with 2.5% normal rabbit serum (Dako) in PBS for 20 minutes at room temperature. The blocking solution was wicked-off using a paper tissue and the sections incubated with polyclonal goat anti-human N1 (C-terminal) antibody, (20µg/ml in PBS; Santa Cruz), or an equivalent concentration of non-immune goat IgG (Dako) for 1 hour at room temperature. Sections were washed with PBS, (3 x 10 minutes) and incubated with a 1:100 dilution in PBS of rabbit anti-goat-FITC conjugate for 45 minutes at room temperature followed by washing in PBS for 3 x 10 minutes. Sections were mounted with Vectashield (Vector) containing propidium iodide, coverslipped and viewed using a Leica DM-RE confocal microscope using an ArKr laser exciting at 488nm and 568nm.

Immunolocalisation of Fibronectin-EDA. Frozen sections of neonatal bovine articular cartilage were digested with hyaluronidase (5µg/ml, 37°C, 1 hour; Sigma) to expose the pericellular matrix, washed in PBS, (2 x 10 minutes) and blocked with 2.5% normal rabbit serum (DAKO) in PBS for 20 minutes. The blocking solution was wicked-off using a paper tissue and the sections incubated with mouse

monoclonal anti-fibronectin-EDA antibody (50µg/ml in PBS; Oxford Biotechnologies) or an equivalent concentration of non-immune mouse IgG 1 (Dako), overnight at 4°C. The specimens were washed three times with PBS, incubated with biotinylated rabbit anti-mouse secondary antibody (1:100 dilution in PBS; Dako), washed three times in PBS and treated with streptavidin-FITC conjugate, (1:100 dilution in PBS; 60 minutes; Amersham). The sections were washed three times in PBS and viewed by confocal microscopy.

10 *Co-localisation of N1 and Fibronectin-EDA in immature bovine cartilage.* Sections were blocked and the two primary antibody incubations combined, (as described above). Detection was carried out using a rabbit anti-goat-FITC conjugated secondary antibody (Dako) for N1 and a biotinylated rabbit anti-mouse secondary antibody
15 followed by a streptavidin-Texas Red conjugate (Amersham Pharmacia) for fibronectin-EDA.

Results

20 *Immunolocalisation of N1.* N1 expression, (green), was shown to be almost entirely confined to the upper 2-3 cell layers of the superficial zone of neonatal bovine articular cartilage (Figs. 1.1 and 1.2). Cells that do not expressed N1 are counterstained red by propidium iodide. Arrows indicate the articular surface.

25 *Immunolocalisation of Fibronectin-EDA.* Results showed that fibronectin-EDA expression is cell associated and almost entirely confined to the superficial zone of the articular cartilage, (Fig. 1.3). Small amounts of fluorescence can be seen in the mid zone, (Fig. 1.4),
30 although this was also seen on the control sections, (Fig. 1.5), and so maybe non-specific staining. Cells that do not expressed Fibronectin-

EDA are counterstained red by propidium iodide. Arrows indicate the articular surface.

5 *Co-localisation of N1 and Fibronectin-EDA in immature bovine cartilage.* Figs. 1.6, 1.7 and 1.8 show N1 immunolocalisation, fibronectin-EDA immunolocalisation and an overlay of the two images respectively. Arrows illustrate the articular surface. The overlay illustrates that the cells expressing N1 also express fibronectin-EDA. Control images showed no fluorescence (images not shown).

10

Discussion

These results are consistent with the hypothesis that a population of Notch positive and fibronectin-EDA positive chondroprogenitor cells exists within the superficial zone of healthy articular cartilage. Notch and fibronectin-EDA have been previously recognised as markers for precursor cells in non cartilaginous tissues. The Notch receptor forms part of a signalling system that alters transcription factor expression within a cell, preventing it from differentiating. Fibronectin-EDA has been described as the 'onco-foetal' form of fibronectin because it is produced in situations where precursor cells or undifferentiated cells abound, (e.g. embryonic development, wound repair and tumour formation). It is possible that fibronectin-EDA may be a component of a 'stem-cell niche', a region of specialised extracellular matrix that supports early progenitor cells. The co-localisation experiment showed that the two markers were expressed simultaneously by cells within the superficial zone and that there was no discernable pattern of singly labelled cells. This is inconsistent with the hypothesis that Notch and fibronectin-EDA label two distinct or overlapping stages in chondrocyte differentiation and instead indicate that superficial zone

chondroprogenitor cells are a largely homogeneous population of cells exist within the superficial zone.

Example 1.2: In vitro characterisation of superficial zone

5 chondrocytes

Methods

Isolation of superficial, intermediate and deep zone cells from
10 *bovine articular cartilage.* Superficial, mid and deep zone cartilage were dissected from neonatal bovine metatarsophalangeal joints and the chondrocytes released by sequential digestion in pronase (0.1% in DMEM/5% FCS; 3 hours; Merck, 4×10^6 units/g) and collagenase, (0.04% in DMEM/ 5% FCS; 16 hours with gentle shaking; Worthington,
15 237U/mg). Tissue digests were strained, (70 μ m cell strainer; Falcon), centrifuged, (1000rpm; 5 min), washed with serum free DMEM, (10ml), re-centrifuged and resuspended in serum free DMEM.

Production of fibronectin-coated culture plastic. 24 well culture
20 plates and 35mm Petri dishes were coated with bovine plasma fibronectin, (10 μ gml⁻¹ in Dulbecco's PBS with 1mM MgCl₂ and 1mM CaCl₂; 16h; 4°C) or vehicle, and blocked with 1% BSA.

Cell adhesion to fibronectin and PBS-coated dishes. Superficial,
25 mid and deep zone articular chondrocytes, (4000 cells/ Petri dish) were seeded onto fibronectin (FIBRONECTIN, 10 μ gml⁻¹) or PBS-coated 35mm dishes for 20 minutes. The non-adherent cells were removed and placed onto fresh FIBRONECTIN or PBS coated-dishes for a further 40 minutes before the non-adherent cells were once again
30 removed.

Colony forming efficiency of surface, middle and deep zone chondrocytes subjected to differential adhesion on fibronectin for 20 and 40 minutes. Superficial, mid and deep zone articular chondrocytes (4000 cells/ Petri dish) were seeded onto fibronectin (FIBRONECTIN, 5 10 μ gml⁻¹) or PBS coated dishes for 20 minutes and non-adherent cells removed and seeded onto similarly treated dishes for 40 minutes before removal of non-adherent cells. The number of colonies formed, (> 4 cells), was assessed after 6 and 10 days in culture and expressed as the 'colony forming efficiency', (i.e. number of colonies/ initial 10 number of adherent cells).

Analysis of differential Integrin and N1 expression by superficial zone chondrocytes using fluorescent activated cell sorter (FACS) analysis. Petri dishes (35mm) were coated with 10 μ g ml⁻¹ bovine 15 fibronectin (Sigma, UK) in PBS containing 1mM MgCl₂ and 1mM CaCl₂ (PBS+) overnight at 4°C. Dishes were blocked with 1% BSA in PBS+ before chondrocytes were added. Control dishes were treated with PBS+ overnight at 4°C. Chondrocytes were isolated from the surface, middle and deep zone articular cartilage of 7 day old calves as 20 previously described. After isolation, chondrocytes (4,000ml⁻¹) were seeded onto 35mm plastic dishes at 37°C for 20 minutes in DMEM containing 0.1% Gentamycin. After 20 minutes, media (and non-adherent cells) was removed and placed in a second dish for 40 minutes at 37°C before this media (and non-adherent cells) was 25 removed and placed in a third dish. After removal of media at 20 and 40 minutes, fresh DMEM containing gentamycin and 1% FCS was added to the remaining adherent cells which were maintained in culture for up to 10 days.

30 Immediately following sequential pronase/collagenase isolation and at various time points after differential adhesion, chondrocytes

were removed from dishes non-enzymatically and resuspended at 1×10^5 cells ml^{-1} in PBS. 2×10^5 cells were incubated for 3 hours with antibodies to $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrin subunits and N1 at room temperature. Cells were centrifuged at 2,500rpm, supernatants removed and cells
 5 washed three times in PBS with centrifugation between each wash. Cells were then incubated with relevant FITC conjugated secondary antibodies for 1 hour at room temperature and washed three times in PBS as described above. Finally, labelled cells were resuspended in 200 μl PBS and subjected to single channel FACS analysis.

10

Measurement of average cell size of superficial, mid and deep zone chondrocytes. Superficial (SZC), middle (MZC) and deep zone chondrocytes (DZC) were isolated from the articular cartilage of 1-3 week old bovine metatarsophalangeal joints using fine dissection and
 15 sequential pronase/collagenase digestion. Aliquots of the isolated cell suspensions were pipetted onto a haemocytometer and coverslipped. Cells were viewed using an inverted Olympus CK40 microscope and photographed at $\times 100$ magnification ensuring sufficient cells were present in the image ($n > 120$). Image analysis using Image-Pro plus
 20 software calibrated with a graticule was carried out to determine the average diameter of cells present in the image.

Results

25 *Colony formation by 'fast-fibronectin binding', superficial zone chondrocytes.* Initial cell-adhesion to fibronectin-coated tissue culture plastic, expressed as the percentage of cells added that were bound after 3-4 hours, is shown in table 1.

Adhesion Time	Surface. FIBRONE CTIN	Surface. PBS	Mid. FIBRONE CTIN	Mid. PBS	Deep. FIBRONE CTIN	Deep. PBS
---------------	-----------------------	--------------	-------------------	----------	--------------------	-----------

20 minutes	9.05% +/- 0.44 * ***	3.83% +/- 0.27	14.53% +/- 0.86 ** A AA	3.94% +/- 0.19	3.59% +/- 0.22	3.68% +/- 0.23
40 minutes	4.89% +/- 0.43	4.12% +/- 0.34	10.85% +/- 0.51 ***	4.2% +/- 0.19	3.95% +/- 0.30	4.21% +/- 0.36

Table 1. 1. Superficial, mid and deep zone chondrocyte adhesion to fibronectin and PBS coated tissue culture plastic. *, $p < 0.001$ compared with 40 minutes; **, $p < 0.01$ compared with 40 minutes; ***, $p < 0.001$ compared with PBS control; ^ $p < 0.01$ compared with surface FIBRONECTIN 20; ^^, $p < 0.001$ compared with deep FIBRONECTIN 20.

The number of colonies, (> 4 cells), formed by the adherent cells was assessed after 6 and 10 days in culture and expressed as the 'colony forming efficiency', (i.e. number of colonies/ initial number of adherent cells). The colony forming efficiency of the 'fast-fibronectin binding', superficial zone cells were significantly higher than that observed amongst the other groups of chondrocytes, (see Fig. 1.9. * = $p < 0.01$). Fig. 1.10 shows a photomicrograph of colonies formed by the 'fast-fibronectin binding' superficial zone cells.

Analysis of differential Notch-1 expression by chondrocytes using FACS analysis. Chondrocytes were isolated from surface, middle and deep zone articular cartilage from 7 day old calves using sequential pronase/collagenase digestion overnight at 37°C, washed in PBS and subjected to FACS analysis using anti-N1 polyclonal antibody. Approximately 75% of surface zone, 10% of middle and 25% of deep zone cells were positive for N1 immediately after isolation from the tissue, (Fig. 1.11).

Magnetic bead separation of Notch positive cells. N1 immunopositive SZC, MZC and DZC were isolated using anti-N1 antibody coated magnetic Dynabeads, cultured for 6 days and colony forming efficiency assessed. There were significantly ($p < 0.001$) more colonies from N1 positive surface zone cells than from N1 positive middle and deep zone cells (Fig. 1.12).

Analysis of differential Integrin expression by SZC using FACS. After differential adhesion, SZC, MZC and DZC expressed $\alpha 5$ and $\beta 1$ subunits at all time points analysed regardless of substrate although differences in labelling intensity and the number of labelled cells were noted. Using flow cytometry immediately after isolation and 4 hours after differential adhesion, $\beta 1$ subunits were shown to be preferentially expressed by SZC (79% +ve) compared with MZC (5%) and DZC (2.5%). No difference in $\alpha 5$ subunit expression was detected in chondrocytes and levels of expression ranged from 88 to 67% from surface to deep. Following differential adhesion to fibronectin and culture for 72 hours, no difference in chondrocyte $\alpha 5$ and $\beta 1$ subunit expression was detected regardless of tissue depth. The overall expression of $\alpha 5$ and $\beta 1$ subunits was however decreased in chondrocytes from all tissue depths relative to expression 4 hours after differential adhesion, (Fig 1.13).

	Alpha 5 4 hours	Beta 1 4 hours	Alpha 5 72 hours	Beta 1 72 hours
Surface	88.64 +/- 4.30	76.16+/-4.8	40.95+/-2.9	43.01+/-3.8
Middle	69.02+/-3.2	5.16+/-5.2	26.68+/-4.1	40+/-4.2
Deep	67.32+/-2.4	2.52+/-3.7	34.46+/-3.9	27.12+/-

Table 2

Measurement of average cell size of SZC, MZC and DZC. Fig. 1.14 illustrates the average cell diameter of superficial (n=124), middle (n=275) and deep zone (n=182) chondrocytes. There was a significant difference in diameters between both SZC and MZC ($p>0.05$) and SZC and DZC ($p>0.005$). This data demonstrates that cells from the superficial zone of immature bovine cartilage have, on average, a smaller diameter than mid and deep zone cells. Figs. 1.15a, 1.15b and 1.15c are representative photographs of a superficial zone cell, middle zone cell and deep zone cell respectively viewed using phase contrast optics (magnification x200).

Discussion

These results show that a population of colony forming chondrocytes exists within the superficial zone of articular cartilage. Colony formation *in vitro* is the definitive test for a progenitor cells because it proves that the cells have a high capacity for repeated cell division, (i.e. they are self-renewing). These results therefore show that there are progenitor cells within the superficial zone. The colony forming superficial zone cells were shown to have a high affinity for fibronectin, an observation that was presumed to be related to the expression of high levels of $\alpha_5\beta_1$ integrin within the superficial zone. The difference in β_1 integrin expression between the superficial and mid/deep zones was particularly striking. FACS analysis confirmed that Notch expression was concentrated amongst superficial zone cells, whilst morphological analysis indicated that the superficial zone cells were smaller than other chondrocytes. Together these results show that the superficial zone cells are a distinct population of cells with different characteristics to other chondrocytes.

Importantly, the results show that anti-Notch antibodies could be used to selectively bind the Notch positive cells to the surface of a biomaterial, thereby concentrating the colony forming, progenitor cells on the surface of a particulate material. Likewise, anti-integrin β_1 antibody could be used to selectively bind chondroprogenitor cells to the surface of a biomaterial. The high affinity of the colony forming cells for fibronectin suggests that fibronectin could also be used to bind the colony forming chondroprogenitor cells to the surface of a biomaterial. Such selective affinity between cells and biomaterial could be applied in the formation of a cartilage implant in which chondroprogenitor cells were concentrated in the same anatomical position as occurs within normal cartilage.

Example 1.3: *In vitro* cartilage formation by pellet cultures of SZC with a high affinity for fibronectin

Methods

Pellet culture of 'fast-fibronectin binding' SZC. Pellet culture is an established method that allows chondrogenic cells to form cartilage *in vitro* (Nishimura et al, 1999).

Superficial zone and middle zone articular cartilage were obtained from 1-3 week old bovine metatarsophalangeal joints by fine dissection. Cartilage shavings were digested in pronase (0.1% in DMEM/5%FCS; 37°C for 3 hours; Merck, 4x10 units/g), washed in PBS, and suspensions of superficial zone and middle zone cells isolated using collagenase, (0.04% in DMEM/5%FCS; 16 hours at 37°C with gentle shaking; Worthington type II, 237U/mg). The released cells were strained through a 70 μ m cell strainer (Falcon), centrifuged, (1000rpm; 5

minutes), washed in serum free DMEM, counted using a haemocytometer and diluted to 1×10^6 cells/ml.

The wells of a 6 well plate were coated with bovine plasma fibronectin, ($10\mu\text{g/ml}$ in Dulbecco's PBS with 1mM MgCl_2 and 1mM CaCl_2 ; 16 hours at 4°C ; Sigma). The fibronectin solution was aspirated and the plates blocked with BSA (1% w/v; 1 hour).

SZC or MZC, (2×10^6 cells in serum free DMEM; 2ml) were seeded onto the fibronectin-coated wells and incubated at 37°C for 20 minutes. The media was then gently swirled and discarded, and the adherent, 'fast-binding' cells incubated in DMEM/10% FCS at 37°C in an atmosphere of 5% humidified CO_2 for 96 hours. The 'fast-binding' superficial and mid zone cells were trypsinised and aliquoted, (500k cells), to sterile 2ml round bottomed centrifuge tubes, (Eppendorf), in 0.5ml DMEM supplemented with pyruvate (Sigma); ITS, (1% ; Sigma); ascorbate-2-phosphate, ($100\mu\text{M}$; Sigma); dexamethasone. (10^{-7}M ; Sigma), HEPES, ($20\mu\text{l/ml}$; 1M ; Sigma) and transforming growth factor $\beta 1$, (10ng/ml ; R+D systems). The tubes were centrifuged, (2500rpm; 10 minutes), and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 for 7, 14 and 21 days with a media change every 2 days.

Histological analysis. At the end of the incubation period, the medium was removed and the samples fixed in 10% formal buffered saline, (0.5ml; 24 hours), processed on the VIP processor, wax embedded, sectioned on a Leica microtome ($5\mu\text{m}$). For histological analysis, specimens were dewaxed, rehydrated and stained with either Safranin O, (0.1% , 6 minutes), Picrosirius Red (0.1% in saturated alcoholic picric acid, 90 minutes), Toluidine Blue, (0.5% ; 15 seconds), or Haematoxylin and Eosin (Gills haematoxylin, 6 min and alcoholic eosin, 4 min). Specimens were mounted using Histomount and images

captured using the Leica microscope and SPOT camera and related software.

Immunocytochemical analysis. The slides were dewaxed, rehydrated and subjected to Dako HMAR (heat mediated antigen retrieval system; Dako). For collagen type I detection, the slides were blocked in swine serum (2.5%, 20 min at room temperature; Dako), washed thoroughly in PBS and immersed in either rabbit polyclonal anti-collagen I antibody (10µg/ml; Biogenesis) or an equivalent concentration of non-immune rabbit IgG immunoglobulin (Dako), overnight at 4°C. The slides were then washed in PBS, immersed in swine anti-rabbit biotinylated secondary antibody (1:100; room temperature for 30 min; Dako), washed in PBS, immersed in Streptavidin Texas Red (1:100, room temperature for 30 min; Amersham Pharmacia Biotech), washed in PBS, mounted using Vectormount for fluorescence and coverslipped.

For collagen type II detection, the slides were blocked in rabbit serum (2.5%, 20 min at room temperature; Dako), washed thoroughly in PBS and immersed in either mouse monoclonal collagen II primary antibody (1µg/ml; Neomarkers) or an equivalent concentration of non-immune mouse IgG immunoglobulin (Dako) overnight at 4°C. The slides were then washed in PBS, immersed in rabbit anti-mouse biotinylated secondary antibody (1:100; room temperature for 30 min; Dako), washed thoroughly in PBS, immersed in Streptavidin FITC (1:100; room temperature for 30 min; Amersham Pharmacia Biotech), washed thoroughly in PBS, mounted using Vectormount for fluorescence and coverslipped.

For the detection of the glycosaminoglycan epitopes chondroitin 4 sulphate, chondroitin 6 sulphate and dermatan sulphate, the sections

were wetted with PBS containing 0.1% Tween 20 (Sigma), digested with either (i) chondroitinase AC (0.25u/ml), (ii) chondroitinase ABC (0.25u/ml) or (iii) chondroitinase ABC (0.25u/ml) for 1 hour at 37°C, washed with PBS/Tween 20 and incubated with the appropriate
5 blocking serum for 30 minutes at room temperature. The blocking serum was then wicked off and the sections incubated in either (i) antibody 2B6, (1 in 500; recognizes chondroitin 4 sulphate GAG stubs after chondroitinase AC treatment; Caterson et al., 1985); (ii) antibody 2B6, (1 in 500; recognises dermatan sulphate GAG stubs after
10 chondroitinase ABC treatment; Caterson et al., 1985), or (iii) antibody 3B3+, (1 in 500; recognises chondroitin 6 sulphate stubs after chondroitinase ABC treatment; Couchman et al., 1984). The slides were washed in PBS/Tween 20 and antibody binding detected using a relevant fluorescent conjugated antibody diluted with PBS containing
15 20% FCS for 1 hour at room temperature and then washed with PBS.

For the detection of Link protein, the sections were wetted with PBS containing 0.1% Tween 20 (Sigma), digested with chondroitinase AC (0.25u/ml) plus chondroitinase ABC (0.25u/ml) for 1 hour at 37°C,
20 washed with PBS/Tween 20 and incubated in blocking serum for 30 minutes at room temperature. The blocking was serum wicked off and the sections incubated in either polyclonal anti-link protein antibody, (1 in 30) or an equivalent concentration of non-immune serum. The slides were washed in PBS/Tween 20 and antibody binding detected using a
25 relevant fluorescent conjugated antibody diluted with PBS containing 20% FCS for 1 hour at room temperature and then washed with PBS.

The slides were viewed and images captured using the Leica microscope with the Spot camera and related software.
30

Results and discussion

Histological investigation. H+E staining of 'fast-binding' superficial zone chondrocyte pellets showed the presence of morphologically normal and viable cells throughout the specimens (Fig. 1.16). Picrosirius red showed collagen deposition, especially in the territorial matrix surrounding the cells, (Fig. 1.17). Safranin O staining for glycosaminoglycans showed intense dark orange staining of the extracellular matrix produced by the cells, indicating that the cells had secreted a proteoglycan-rich matrix, (Fig. 1.18). This result was confirmed by the toluidine blue stained specimens, in which the matrix was stained purple/ blue, again indicative of glycosaminoglycan production. Taken together these results indicate that pellet cultures of 'fast-binding' superficial zone cells secrete a matrix with the histological features of normal cartilage.

Immunocytochemical investigation. Immunocytochemistry showed that the cells were synthesising cartilage specific matrix components in pellet culture. The extracellular matrix in the pellets contained collagen type II (Fig. 1.19), but not collagen type I, (Fig. 1.20), indicating that the cells had differentiated to form chondrocytes and that de-differentiation had not occurred.

Immunostaining showed the presence of chondroitin 4 sulphate and chondroitin 6 sulphate in the matrix of the pellet cultures (Figs. 1.21 and 1.22). Taken together with the results from the safranin O and toluidine blue histochemical staining, these data show that the cells are secreting significant quantities of cartilage-matrix-like proteoglycans. This is confirmed by the presence of link protein, (Fig. 1.23), a component of the major cartilage structural component aggrecan.

Overall these results indicate that fast fibronectin binding superficial zone cells grown in pellet culture produce the two major structural components of articular cartilage, collagen II and aggrecan.

- 5 This indicates that fast fibronectin binding superficial zone cells are chondrogenic.

- 10 Taken together with the results from Examples 1.1 and 1.2, these results indicate that a population of chondrogenic, colony forming chondroprogenitor cells exist within the superficial zone of articular cartilage and that these cells will bind rapidly/selectively to a biomaterial coated with either (i) fibronectin and/or (ii) anti-N1 antibody and/or (iii) anti-integrin β_1 antibody. Such selective cell binding could be used to create a zoned implant in which the precursor cells and
- 15 more mature chondrocytes are in their correct anatomical positions.

- Generalising from these results, we predicted that any extracellular matrix component or antibody that will selectively bind either chondroprogenitor cells or other chondrogenic mesenchymal precursor cells could be attached to the surface of a biocompatible implant material and be used to (i) bind chondroprogenitor cells and (ii) localise them to selected regions of an implant designed for use in cartilage repair.
- 20

- 25 **Example 1.4: Effect of transplanting chondrocytes pellets onto wounded articular cartilage**

Method

- 30 Pellets of superficial zone chondrocytes with a high affinity for fibronectin and pellets of mid and deep zone chondrocytes were

cultured for 7 days and implanted into bovine cartilage explants containing a partial depth wound. After a further 7 days, explants were incubated with ethidium homodimer, (90 min), and either (i) fixed with 10% NBFS, wax embedded, sectioned and stained with Safranin O or
5 (ii) dewaxed and examined under fluorescence optics to assess cell death.

Results and discussion

10 Control explants, (which received no pellet), and explants which received pellets from mid and deep zone cartilage exhibited a distinct loss of matrix from both the wound margin and the articular surface. Cell death was also evident along the wound margin and the articular surface in control samples and those receiving mid and deep zone
15 pellets. In contrast, explants receiving a pellet derived from surface zone articular cartilage showed reduced loss of matrix from the wound margin and reduced cell death. It was concluded that N1 positive, colony forming superficial zone cells may play an important role in chondrocyte formation and repair.

20
Example 1.5: Chondroprogenitor cells injected into chick embryos: In ovo chondroprogenitor cell tracing using CFDA SE

Materials and Methods

25 SZC and DZC were isolated from 7 day old bovine articular cartilage using sequential pronase/collagenase digestion and 5×10^6 cells subjected to differential adhesion to FIBRONECTIN in 60 mm dishes for 20 minutes. Cells then labelled with 20 μ M CFDA-SE
30 (molecular probes; www.probes.com) in PBS for 30 minutes at 37°C in 5%CO₂. Cells were washed with Serum free DMEM/F12 for 30

minutes and then incubated in 10%FCS DMEM/F12 for 48 hours. Labelled cells were trypsinised, pooled and counted and resuspended at 1st expt 1×10^5 cells $100\mu\text{l}^{-1}$ and 2nd expt 2.5×10^5 cells $100\mu\text{l}^{-1}$ in DMEM/F12 containing no additives whatsoever. 100 μl cell suspension
5 were injected into the extraembryonic vessels of windowed 4 day old chick embryos. After sealing the windows with sellotape embryos were incubated for up to 6 days. Embryos were killed by cervical dislocation 3 and 6 days after injection and either fixed in 10% NBFS and wax embedded or chilled by precipitate immersion in n-hexane at -70°C .

10

Sections were examined using fluorescent microscopy for the presence of labelled cells.

Results

15

Labelled cells were observed in areas of the embryo containing developing cartilage, e.g. the otic cup, (see Fig. 1.25). Lower levels of stained cells were observed in developing tendon. These results suggest that the superficial zone cells will bind to developing cartilage.
20 More sensitive detection of the injected cells showed clusters of the cells and the formation of ectopic cartilaginous tissue within the developing embryos. These results suggest that superficial zone cells can form cartilaginous tissue in vivo, (figs. 1.26 and 1.27).

Example 2: Creation of Zoned Cultures

Our examples shown there to be a population of chondroprogenitor cells in the superficial zone of immature bovine articular cartilage. These cells have been identified on the basis of
30 their high affinity to fibronectin and colony forming efficiency. The cells have also been shown to express N1 and Fibronectin-EDA

Current tissue engineering approaches make no attempt to recreate the zonal architecture of native articular cartilage. These examples show some methods for how tissue engineered cartilage constructs with distinct zonal architectures can be produced. They show examples of where differential binding materials (e.g. fibronectin) are used to produce biomaterials with chondroprogenitor cells localised to specific regions

Our examples further show that the layered structure of the present invention improves cartilage repair/growth over controls.

Example 2.1: Layered Structures – Range of Options

The 'zoned' area of the culture could take on many possible forms and profiles.

One of the ideas is to recreate the structure that cartilage has at the foetal or neonatal stage as it is known that such cartilage has greater potential to heal when compared to cartilage in mature subjects. The change in chondroprogenitor concentration at the boundary zone could be either be a single step change or it could be profiled, i.e. superficial zone enriched with chondroprogenitor cells and remainder filled with mixed, mature chondrocytes. Fig. 2.1.

However it is suspected that the chondroprogenitors are much more effective at integrating implanted tissue with the native cartilage and reducing cell death around the wound margin. Lack of integration is a major factor in implant failure. Hence have designed an implant with enriched zones of chondroprogenitors around the sides as well as on the outer surface. Fig. 2.2.

Overview of the Exemplification Options.

OPTION	CHONDROPROGENITOR CELLS	MATURE CHONDROCYTES	CELL SELECTION	SCAFFOLD
1	BMSC	Cartilage	Tissue dissection	separate parts for each zone
2	SZCs	Cartilage	CBM	separate parts for each zone
3	SZCs	Cartilage	CBM	Single scaffold internally zoned

5

BMSC: bone marrow stromal cells
 SZC: superficial zone chondroprogenitors
 CBM: chondroprogenitor binding material.

10 **Example 2.2**Introduction

This embodiment combines a fibrous scaffold, two classes of
 15 coated-particulate biomaterials and cells harvested from an autologous
 osteochondral plug to form a layered, fibre-reinforced cartilage implant,
 (~1.5cm diameter and 4mm thick), in which (i) a layer of
 chondroprogenitor cells are concentrated near the articular surface of
 the device, (i.e. within the superficial zone) and (ii) a layer of more
 20 mature chondrocytes are concentrated closer to the sub-chondral
 bone, (i.e. in the mid and deep zones; see Fig. 2.16). The method
 produces a construct with a volume 18.4 fold greater than that of the
 original harvested tissue.

Bone marrow stromal cell isolationMethod

5 Neonatal bovine metatarsophalangeal joints were opened aseptically and a 3.5mm diameter x 5mm deep osteochondral plug extracted manually from the articular surface using an Acufex cylindrical chisel. Bone marrow stromal cells were obtained from the osseous portion of the osteochondral plug. The bone was separated
10 from the cartilage with a scalpel, fragmented into 0.08% collagenase, (Worthington type II), in DMEM/5%FCS (3ml), agitated vigorously and incubated at 37°C for 90 minutes to release a bone marrow cell suspension. The bone fragments were then re-agitated, the supernatant collected and combined with 3 PBS washings of the bone
15 fragments. The pooled, collected marrow cells were centrifuged, (1000rpm; 5 min), washed in PBS, re-centrifuged, (1000rpm; 5 min) and the cell pellets re-suspended in DMEM/10% FCS (5ml). The released cells were incubated in the well of a 6 well plate at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ until the adherent cells became
20 confluent, (typically 6 days). The adherent fibroblastic cells were washed with PBS to remove the non-adherent haematopoietic cells and debris and the fibroblastic cells harvested using trypsin.

The harvested, ('first passage'), bone marrow stromal cells
25 obtained from a single osteochondral plug were used to seed 4.125 mg of cell-adhesion factor coated-sulphated Intrasite, sufficient to produce one layer of a bilayered construct.

Results

30 The freshly plated marrow cell isolates consisted of large numbers of red blood cells, non-adherent haematopoietic cells, debris and

occasional adherent fibroblastic and macrophage-like cells. When cultured on tissue culture plastic the adherent fibroblastic cells proliferated rapidly, thereby increasing the number of available chondroprogenitor cells. A typical culture derived from a 3.5mm
5 osteochondral plug produced a confluent 10cm² monolayer of bone marrow stromal cells after ~ 6 days. (Generally 500, 000 - 750, 000 harvested cells).

Isolation of neonatal bovine chondrocytes

10

Method

Neonatal bovine metatarsophalangeal joints were opened aseptically and a 3.5mm diameter x 5mm deep osteochondral plug
15 extracted manually from the articular surface using an Acufex cylindrical chisel. Chondrocytes were obtained from the upper, cartilaginous portion of the plug. The cartilage was cut from the bone, sliced and transferred to a bijoux containing collagenase, (0.1%; 3ml; Worthington class II), in DMEM supplemented with penicillin,
20 streptomycin, non-essential amino acids, L-glutamine, (Sigma, as above) and 5% foetal calf serum, (Sigma; DMEM/5%FCS). The tissue was digested for 16 hours at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ with gentle mixing to release a suspension of chondrocytes. The released cells were filtered through a 70µm nylon mesh, (Falcon),
25 diluted to 10ml with DMEM/10% FCS, centrifuged, (1000rpm; 5 min), the supernatant discarded and the washing step repeated.

The chondrocytes obtained from the cartilage of a single osteochondral plug were used to seed 4.125mg of cell-adhesion factor
30 coated-sulphated Intrasite, sufficient to produce one layer of a bilayered construct.

Results

3.5mm diameter cartilage plugs released $668 \pm 85 \times 10^3$ chondrocytes. (Typically 500 - 900 $\times 10^3$ cells per explant).

5

Preparation and coating of sulphated Intrasite with plasma fibronectin or mixtures of cell attachment molecules adsorbed from FCS

10 Sulphated Intrasite gel (4.125mg per layer of construct; 6.5mg/ml in PBS) was prepared and sterilised as described in Example 4. Serum free DMEM was prepared by mixing DMEM, (500ml), penicillin and streptomycin (Sigma; 5ml); non essential amino acids, (Sigma 5ml) and L-glutamine, (Sigma; 5ml).

15 Autoclaved sulphated Intrasite was diluted to 40ml with PBS, centrifuged, (2500rpm; 5 min), 30ml supernatant removed and 30ml serum-free DMEM added. The tubes were centrifuged, (2500 rpm; 5 min) and the supernatant removed to leave the biomaterial in 2.5ml of liquid. Cell attachment factors, (e.g. plasma fibronectin; 60 μ g/ml), PBS
20 vehicle or foetal calf serum (10%) was added and the tubes mixed vigorously for 2 hours at 4°C.

Bone marrow stromal cell attachment and growth upon plasma fibronectin coated sulphated Intrasite

25

Method

Ascorbate 2 phosphate (25 μ g/ml final; Sigma) was dissolved in DMEM, (Sigma), filter sterilised, (0.2 μ m; Sartorius) and added to
30 DMEM supplemented with, penicillin, streptomycin, non-essential

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

58

amino acids, L-glutamine and 10% foetal calf serum (DMEM/10%FCS/ASCP).

5 The trypsinised bone marrow stromal cells obtained from a 3.5mm diameter osteochondral plug were added to plasma fibronectin-coated sulphated Intrasite gel, (4.125mg), in DMEM/10%FCS/ASCP (20ml). The cultures were mixed occasionally for the first 2 hours to produce more even seeding and then incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5%CO₂ for 10 days.

10

The viability of bone marrow stromal cells growing upon fibronectin coated sulphated Intrasite was assessed by adding MTT (1mg/ml; Sigma) to the culture media for 2.5 hours, washing the samples in PBS and viewing the cells by phase contrast microscopy.

15 Additionally, cell viability was determined by adding calcein AM, (0.6µl/ml; 1mg ml; 90 min; Molecular Probes), washing the cells in PBS and viewing the specimens using a Leica confocal microscope.

20 The deposition of a collagenous matrix was assessed using the histological stain picro sirius red. Samples of the cell seeded biomaterial, (200µl) were fixed with phosphate buffered formalin, washed with PBS, (2 x 3ml) and stained with picrosirius red, (1ml, 30 min; 0.1g sirius red in 100ml saturated aqueous picric acid; Sigma). Samples were washed repeatedly for 16 hours in PBS to remove non

25 specifically bound stain and viewed by microscopy.

Collagen type I and collagen type II production was determined by immunocytochemistry. Bone marrow stromal cell seeded, fibronectin coated sulphated Intrasite was incubated in 20ml

30 DMEM/10%FCS/ASCP for 10 days, washed 3 times in PBS, (10ml; centrifuged 2500rpm; 5 min) and fixed in methanol, (-20°C; 10 min).

The samples were washed twice with PBS, (10ml; centrifuged 2500rpm; 5 min), blocked with BSA, (3%w/v in PBS; 5ml; 1 hour at 37°C) and washed 3 times in PBS. The specimens were then incubated with anti collagen antibodies or equivalent concentrations and volumes of non immune immunoglobulins for 1 hour at 37°C, (i.e. either rabbit anti type I collagen antibody, (20µl diluted 1 in 10 with PBS; 200µl; Biogenesis); non immune rabbit serum control, (diluted 1 in 2000 with PBS; 200µl; Dako); mouse anti type II collagen antibody, (diluted 1 in 200; 500µl; New Markers) or non immune mouse serum, (diluted 1 in 100; 500 µl; Dako). The specimens were then washed 3 times in PBS. Anti collagen type I antibodies were visualised by incubating the specimens and their controls with swine anti-rabbit immunoglobulin FITC, (10µl in 1ml PBS; Dako), plus 'Dead cell stain', (2µl; Molecular Probes), for 1 hour at 37°C.

Anti collagen type II antibodies were visualised by incubating the specimens or their controls with biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin, (1 in 100 in PBS; Dako), for 30 minutes at 37°C, washing 3 times in PBS and incubating in streptavidin FITC, (diluted 1 in 100 in PBS; Amersham) plus 'Dead cell stain', (2µl; Molecular Probes), for 30 minutes at 37°C.

Samples were washed 3 times in PBS and viewed using a Leica microscope and Spot camera.

25

Results

Bone marrow stromal cells adhered to cell-adhesion factor coated sulphated Intracite within 16 hours, (Fig. 2.3) and proliferated, to first cover the surface of the particulate biomaterial and then to aggregate it into macroscopic clusters of cells, biomaterial and extracellular matrix

30

components. Calcein AM staining revealed a population of adherent cells upon the surface of the material after 4 days, (Fig. 2.4), whilst picro sirius red showed the deposition of a collagenous matrix after 7 days in culture, (Fig. 2.5).

5

Immunocytochemistry showed type I collagen production in specimens of bone marrow stromal cells cultured on fibronectin coated sulphated Intracite after 10 days, (Fig. 2.6). No evidence of collagen II production was observed, (Fig. 2.7).

10

Neonatal bovine chondrocyte attachment and growth upon sulphated Intracite coated with cell adhesion factors adsorbed from foetal calf serum.

15 Method

Ascorbate 2 phosphate (25µg/ml final; Sigma) was dissolved in DMEM, (Sigma), filter sterilised, (0.2µm; Sartorius) and added to DMEM supplemented with, penicillin, streptomycin, non-essential amino acids, L-glutamine and 10% foetal calf serum (DMEM/10%FCS/ASCP).

Sulphated Intracite gel, (4.125mg), was coated with cell attachment factors adsorbed from foetal calf serum. Bovine neonatal chondrocytes were obtained from the cartilaginous portion of a 3.5mm diameter osteochondral plug. The cells and coated gel were combined in DMEM/10%FCS/ASCP (20ml) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5%CO₂ for up to 27 days. The cultures were mixed occasionally for the first 2 hours to produce more even seeding.

30

Cell viability was confirmed by incubating the cell seeded material with MTT (1mg/ml; Sigma), for 2 hours, and fixing the samples with phosphate buffered formalin, (2ml; 15 min). The tubes were washed with PBS, (2 x 5 min; 10ml; centrifuged 2500rpm; 5 min) and Safranin O, (0.1% aqueous 1ml) added for 2.5 hours. The samples were washed three times with PBS and stored for 16 hours in PBS at 4°C to allow non-specifically bound dye to elute. The samples were washed twice in PBS, transferred to microscope slides and viewed using the Leica microscope. Images were grabbed using the Spot camera.

The deposition of a collagenous matrix was assessed using the histological stain picro sirius red. Samples of the cell seeded biomaterial, (200µl) were fixed with phosphate buffered formalin, washed with PBS, (2 x 3ml) and stained with picrosirius red, (1ml, 30 min; 0.1g sirius red in 100ml saturated aqueous picric acid; Sigma). Samples were washed repeatedly for 16 hours in PBS to remove non specifically bound stain and viewed by microscopy.

Collagen types I, II and VI production were assessed by immunocytochemistry.

Collagen type II production was assessed by washing chondrocyte seeded, coated sulphated Intrasite three times in PBS, fixing the samples in methanol, (-20°C; 10 min), and washing the specimens three times in PBS. BSA, (3% w/v in PBS; 10ml) was then added to the tubes for 1 hour at 37°C. The gels were washed three times in PBS and treated with either mouse anti bovine type II collagen antibody, (1 in 200 dilution in PBS; 500µl; Neomarkers) or an equivalent concentration of non immune mouse immunoglobulins, (1 in 100 dilution; 500µl; Dako) for 1 hour at 37°C. The tubes were washed three times in PBS and biotinylated rabbit anti mouse immunoglobulins

added, (1 in 100 dilution in PBS; 500µl; Dako). The tubes were washed in PBS three times and streptavidin FITC (1 in 100 in PBS; 500µl; Amersham), plus 'dead cell stain', (2µl; Molecular probes) added for 30 minutes. Samples were washed three times with PBS and
5 viewed using the Leica microscope and spot camera.

Collagen type VI production was demonstrated by washing chondrocyte seeded, coated sulphated Intrasite three times with PBS and blocking by dispersing the material into BSA, (3% w/v in PBS; 10ml; 1 hour; Sigma). The material was washed three times in PBS, the supernatant removed and the samples incubated in either rabbit anti human collagen VI (1 in 50 dilution in PBS; Abcam) or an equivalent concentration of non immune rabbit IgG (1 in 1000 in PBS; Dako) for 1 hour at 37°C. The samples were washed three times with
10 PBS and incubated in FITC-labelled swine anti-rabbit immunoglobulin, (1 in 100 dilution; 1 hour; 37°C; Dako). The samples were washed three times in PBS and viewed by confocal microscopy.

Collagen type I production was assessed by washing chondrocyte seeded, coated sulphated Intrasite three times in PBS, fixing the samples in methanol, (-20°C; 10 min), and washing the specimens three times in PBS. BSA, (3% w/v in PBS; 10ml) was then added to the tubes for 1 hour at 37°C. The gels were washed three times in PBS and treated with either rabbit anti bovine type I collagen antibody, (diluted 1 in 10 with PBS; 200µl; Biogenesis) or an equivalent
20 concentration of non-immune rabbit immunoglobulin, (diluted 1 in 2000 with PBS; 200µl; Dako) for 1 hour at 37°C. The tubes were washed three times in PBS and incubated in FITC labelled swine anti rabbit immunoglobulin, (1 in 100 dilution in PBS; Dako) plus EtBrHD, (2µl; Molecular probes) for 1 hour at 37°C. The samples were washed three
25 times in PBS and viewed using a Leica microscope and Spot camera.

Results

Chondrocytes adhered to the coated sulphated Intrasite particles and proliferated upon them to form aggregates of cells, biomaterial and extracellular matrix components. Macroscopically, the aggregates formed by the chondrocytes were larger than those formed by the stromal cells, suggesting that they were synthesising more matrix. MTT staining showed viable cells throughout the aggregates, both upon the surface of the material particles and in the spaces between them (Fig. 2.8). Picro sirius red showed that the cells had deposited a collagenous matrix within the aggregates (Fig. 2.9a). The cells within the aggregates had a rounded morphology, consistent with the retention of chondrocytic phenotype.

Immunocytochemistry revealed that the chondrocytes expressed the cartilage specific form of collagen, collagen type II, (Fig. 2.9b). This finding confirmed that the cells growing upon the coated biomaterial had retained their chondrocytic phenotype in culture. Immunocytochemistry also revealed that the chondrocytes were secreting collagen VI into their pericellular matrix, (Fig. 2.10). This molecule is an important component of a mature chondrocytes immediate surroundings and is thought to link the cell to the matrix.

Importantly, immunocytochemistry showed that the chondrocytes were not producing collagen I, even after 27 days in culture, (Fig. 2.11). This finding indicated that the chondrocytes were not de-differentiating during either the early stages of culture (when the cells were proliferating rapidly) or at later time points.

Quantification of ovine chondrocyte growth rates upon FCS pre-treated sulphated Intrasite and FCS pre-treated DxS

- Sulphated Intrasite gel (100mg) or Dextran sulphate beads
- 5 (100mg; DxS; Sigma) were rehydrated with PBS (15.38ml) and sterilised by autoclaving, (121°C; 15 min). Ovine articular chondrocytes were isolated from fresh cartilage using collagenase, (0.2% Worthington's type II in DMEM/10%FCS).
- 10 The sterile gel/bead suspensions were swirled, aliquoted (10ml) to Falcon 50ml centrifuge tubes and diluted to 40ml with PBS. The tubes were centrifuged, (2500rpm, 5 min) and 30ml supernatant discarded. The PBS washing step was repeated and 15ml foetal calf serum, (a source of polyanion-binding, cell-attachment glycoproteins, e.g.
- 15 fibronectin and vitronectin) added to the gels/beads and the tubes incubated for 2 hours. The serum pre-treated suspensions were then diluted to 40ml with DMEM/10%FCS, centrifuged, (2500rpm, 5 min), washed with a further aliquot of DMEM/10%FCS (30ml), re-centrifuged and 30ml supernatant removed.
- 20 Freshly isolated ovine chondrocytes, (2.5×10^6 cells in 10ml DMEM/10%FCS), were added to the serum pre-treated sulphated Intrasite gel, serum pre-treated DxS beads or Falcon tubes containing DMEM/FCS alone (10ml) and the cultures incubated at 37°C for 2
- 25 hours with occasional mixing. The cell-seeded particles were then aliquoted (2ml) to groups of 10 Falcon tubes and 23ml of DMEM/10%FCS containing ascorbate 2 phosphate (25µg/ml) added to each tube. The cultures were capped with filter-tops and incubated on a modified Spirarack at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for
- 30 3, 10 and 16 days.

At the end of the incubation period MTT (5mg/ml in PBS; 400 μ l) was added the tubes and to a standard curve of ovine chondrocytes and the cultures incubated for 90 minutes. The cultures were then centrifuged, (3000 rpm; 5 min), washed three times with PBS, and the supernatant removed to leave a final volume of 400 μ l. Acid isopropanol, (isopropanol containing 4% 1M HCl; 1.6ml) was added to each tube and the cultures mixed for 2 hours. Triplicate 200 μ l aliquots were then collected from each tube, transferred to the wells of a 96 well plate and the absorbance read at 570nm against a reference of 655nm.

Results

Data showed that the ovine chondrocytes had increased in number 14.4 fold over the incubation period with the most rapid growth occurring during the first 10 days, (see Fig. 2.12). Lower rates of growth were observed in the cultures growing on serum pre-treated DxS beads or amongst chondrocytes growing in suspension culture.

Culture equipment and out line method for bilayer construction

The bilayered construct is formed by sequentially centrifuging (i) bone marrow stromal cell seeded, fibronectin coated sulphated Intrasite and (ii) chondrocyte seeded coated sulphated Intrasite into a scaffold to form a two layered, fibre re-enforced cell/biomaterial construct. The equipment used and outline of the method is shown in Fig. 2.13.

The tube shown in Fig. 2.13, panel (1) contains of a void-filling agar plug (2.1), which supports the scaffold during centrifugation; a mechanically robust scaffold (2.2) into which the cell seeded particulates are centrifuged to form the layered construct; an 'asymmetric collar', (2.3) which holds the scaffold in the correct position

within the tube; and a quantity of culture medium (2.4) and a cap with a 0.2µm filter to allow gas exchange (2.5). Panel 2 shows the introduction of the bone marrow stromal cell seeded, fibronectin coated sulphated Intrasite (2.6) into the culture medium. Centrifugation of the tube sediments the bone marrow stromal cell seeded, fibronectin coated sulphated Intrasite into a compact layer near the articular surface of the construct (panel 3, (2.7)). The subsequent addition of the chondrocyte-seeded, FCS coated sulphated Intrasite (2.8) is shown in panel (3). Re-centrifugation of the tube sediments the chondrocyte-seeded, FCS-coated, sulphated Intrasite (2.9) onto the layer of bone marrow stromal cell seeded, fibronectin coated sulphated Intrasite (2.7) to form a bilayer of cellular material within the scaffold, (panel 4 (2.9)). The resulting construct is removed from the tube with its collar, detached from the collar and inverted prior to implantation in a cartilage defect site. The key features of the construct are shown in an enlarged view in panel 5, namely, the articular face of the scaffold/ construct; 5(2.10); the superficial zone enriched with chondroprogenitor cells, 5(2.11); the mid and deep zones populated with mature chondrocytes, 5(2.12) and the bone-facing surface of the device, 5(2.13).

Panel 6 shows the implantation of the device into a sharp-debrided, focal articular cartilage defect (6(2.14)). Panel 6(2.5) indicates the articular surface of the joint; 6(2.7) the articular cartilage; 6(2.16) the upper surface of the subchondral bone plate.

For experimental purposes the scaffold may be replaced with a 'basket' consisting of a plastic ring bonded to a 70µm nylon mesh. This collects the sedimented cells/ material pellet and maybe used as a control.

The 'asymmetric collar' is designed to hold the scaffold in the correct position within the tube and to funnel the cell-seeded material into the scaffold during centrifugation. It should be noted that much of the cell-seeded biomaterial sediments rapidly during centrifugation, (i.e. whilst the rotor is accelerating). As a consequence, the cell/material pellet is deposited away from the mid-line of the tube. The correct orientation of the 'asymmetric collar' relative to the direction of rotation of the centrifuge rotor and the radial axis of the rotor is shown in Fig. 2.14.

Demonstration of bilayer formation using two samples of dyed sulphated Intrasite gel

Method

Agarose, (4% w/v in PBS; Sigma) was melted by microwaving, aliquoted (5ml) to the base of Falcon tubes and allowed to set at 4°C. A 'basket' was fitted into an 'asymmetric collar', placed upon the agar plug, and orientated as shown in Fig. 2.16 and the apparatus placed in a 60°C water bath. sulphated Intrasite (24.75mg in 3.8ml PBS) was dyed with either Safranin O, (0.1% aqueous; 1ml) or toluidine blue, (0.01% in PBS) at 4°C for 30 minutes. The dyed gel was then diluted with PBS (25ml) and washed three times with PBS. The supernatant was then removed, the dyed material diluted to 6ml with PBS and placed in a 60°C water bath. Agarose, (1.5% in PBS), was melted by microwaving and brought to 60°C in a water bath. Melted agarose, (22.5ml; 1.5%; 60°C), was added to the tube containing the asymmetric collar and 1ml of Safranin O stained sulphated Intrasite gel carefully pipetted onto the molten agar. The tube was then capped, orientated within the centrifuge rotor and centrifuged at 2500rpm for 5 minutes to sediment the Safranin O dyed material. The tube was then returned to

the water bath and 1ml of toluidine blue stained sulphated Intrasite carefully pipetted onto the molten agar. The tube was then re-orientated within the rotor and re-centrifuged, (2500rpm; 5 min), to sediment the blue stained gel onto the orange stained gel. The contents of the tube were then allowed to set at 4°C for 16 hours. The plug of agarose and sedimented, dyed-sulphated Intrasite was dissected from the basket, bisected and viewed using a dissecting microscope.

10 Results

Fig. 2.15 shows the deposition of a bilayer of dyed sulphated Intrasite using this apparatus and method. The orange, Safranin O dyed material forms the upper layer in the figure whilst the toluidine blue stained sulphated Intrasite forms the lower layer. The agarose plug, (which binds the particles together in this experiment), is visible in the lower portion of the photomicrograph.

20 Demonstration of bilayer formation using two samples of cell-seeded sulphated Intrasite gel

Method

Samples of the two cell-seeded biomaterials, (i.e. (i) bone marrow stromal cell seeded, fibronectin-coated, sulphated Intrasite and (ii) chondrocyte-seeded, FCS-coated sulphated Intrasite), were centrifuged, (2500rpm; 5 min), and the samples washed with PBS, (10ml; 2500rpm; 5 min). The specimens were fixed in methanol, (-20°C; 10ml; 10 min; Fisher), washed three times in PBS, (10ml; 2500rpm; 5 min), and 9ml supernatant was removed from the tubes. The bone marrow stromal cell-seeded, fibronectin-coated sulphated

Intrasite was stained with the green nuclear dye pico green, (10µl; 30 minutes; 4°C; Dark; Molecular Probes). The chondrocyte-seeded, FCS-coated sulphated Intrasite was stained with the red nuclear dye, EtBrHD, (5µl; 30 min; 4°C; Molecular Probes). The samples were
5 washed three times with PBS, (2500rpm; 5 min), the supernatant removed and the samples placed in a 60°C water bath.

Agarose, (4% w/v in PBS; Sigma) was melted by microwaving, aliquoted (5ml) to the base of Falcon tubes and allowed to set at 4°C.
10 A 'basket' was fitted into an 'asymmetric collar', placed upon the agar plug, orientated as shown in Fig. 2.14 and the apparatus placed in a 60°C water bath. Melted agarose, (20ml; 1.5%; 60°C), was added to the tube containing the asymmetric collar and the pico green stained bone marrow stromal cell/biomaterial aggregates pipetted onto the gel.
15 The tube was then capped, orientated within the centrifuge rotor and centrifuged, (2500rpm; 5 min) to sediment the stromal cell-seeded material into the 'basket'. The EtBrHD stained chondrocyte/biomaterial aggregates were then pipetted onto the agarose and the tube re-centrifuged (2500rpm; 5min). The contents of the tube were then
20 allowed to set at 4°C for 16 hours. The plug of agarose and sedimented, dyed, cell-seeded sulphated Intrasite was dissected from the basket, bisected and viewed using a Leica microscope. Images were grabbed using a Spot camera.

25 Results

Fig. 2.16 shows that the method and apparatus produced a clearly defined, well consolidated, bilayered construct consisting of (i) a layer of pico green stained bone marrow stromal cell seeded,
30 fibronectin coated sulphated Intrasite and (ii) a layer of EtBrHD stained chondrocyte seeded coated sulphated Intrasite.

Production of a viable bilayered construct

- Samples of the two cell-seeded biomaterials, (i.e. (i) bone marrow
5 stromal cell seeded, fibronectin coated sulphated Intrasite and (ii)
chondrocyte seeded, FCS coated sulphated Intrasite), were
centrifuged, (2500rpm; 5 min), and the supernatant removed to leave
the seeded biomaterial in approximately 1ml of medium.
- 10 Agarose, (4% w/v in DMEM; Sigma) was melted by microwaving,
aliquoted (5ml) to the base of Falcon tubes and allowed to set at 4°C.
A 'basket' was fitted into an 'asymmetric collar', sterilised by immersion
in 60% acetone in PBS, placed upon the agar plug and orientated as
shown Fig. 2.14. DMEM/10% FCS, (20ml) was added to the tube and
15 the bone marrow stromal cell-seeded, fibronectin-coated sulphated
Intrasite carefully pipetted into the tube. The apparatus was then
orientated within the centrifuge rotor and centrifuged, (2500rpm; 5 min)
to sediment the first layer of material. Chondrocyte-seeded, FCS-
coated sulphated Intrasite was then carefully pipetted into the tube
20 without disturbing the existing layer and the tube re-centrifuged,
(2500rpm; 5 min). The 'collar and basket' were then extracted from the
Falcon tube, the 'basket' containing the sedimented cells removed from
the 'collar' and the cell/material aggregate carefully transferred to the
well of a 6 well plate containing 5ml of DMEM/10% FCS and the culture
25 incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Ex vivo evaluation of Example 2.2Method

Pairs of full-thickness articular cartilage strips, (5mm x ~ 40mm), were dissected from the metacarpophalangeal joints of neonatal calf hooves and transected with a scalpel to give two groups of 3 explants, (each 5mm x 10mm). A cylindrical, full-thickness defect was cut in two
5 of the cartilage explants from each group using a biopsy punch, (3.5mm diameter; Stiefel), and the injured toroidal explants and the uninjured explant transferred to the wells of a 6 well plate containing DMEM/10%FCS (8ml).

10 Samples of (i) bone marrow stromal cell seeded, fibronectin coated sulphated Intrasite and (ii) chondrocyte-seeded, FCS coated sulphated Intrasite were centrifuged, (2500rpm; 5 min), and the supernatant removed to leave the seeded biomaterial in approximately 1ml of medium.

15 Agarose, (4% w/v in DMEM; Sigma) was melted by microwaving, aliquoted (5ml) to the base of Falcon tubes and allowed to set at 4°C. A 3mm diameter polycaprolactone re-enforced, 3D knitted scaffold, (Culzean), was fitted into an 'asymmetric collar', sterilised by immersion
20 in 60% acetone in PBS, placed upon the agar plug and orientated as shown in Fig. 2.14. DMEM/10% FCS, (20ml) was added to the tube and the bone marrow stromal cell-seeded, fibronectin-coated sulphated Intrasite carefully pipetted into the tube. The apparatus was then orientated within the centrifuge rotor and centrifuged, (2500rpm; 5 min)
25 to sediment the first layer of material into the superficial zone of the scaffold. Chondrocyte-seeded, FCS-coated sulphated Intrasite was then carefully pipetted into the tube without disturbing the stromal cell layer and the tube re-centrifuged, (2500rpm; 5 min). The 'collar and scaffold' were then extracted from the Falcon tube, the cell-seeded
30 scaffold removed from the 'collar', inverted and inserted into the 3mm diameter defect in a cartilage explant.

Groups of three explants from a single cartilage strip, (i.e. one unwounded, one with an empty defect and one with a defect containing a bilayered cell-seeded construct), were transferred to three wells of a
5 6 well plate containing 8ml of DMEM/10% FCS supplemented with ascorbate 2 phosphate (25µg/ml) and the cultures incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 0 - 14 days.

At the end of the incubation period, samples were analysed using
10 (i) live/dead stain, (Molecular Probes), to determine the distribution of viable and non viable cells within the specimens, (ii) histology to visualise the general morphology, cellularity and matrix composition of the sample and (iii) immunocytochemistry to determine which cells
15 were expressing type II collagen (i.e. phenotypically normal chondrocytes) or type I collagen, (fibroblasts, progenitor cells and de-differentiated chondrocytes).

For viability measurements the samples were bisected, stained with a combination of calcein AM, (0.6µl/ml; 90 min; Molecular Probes)
20 plus EtBrHD, (10µl; 90 min), the samples washed in PBS, (3 x 15 min), placed upon their cut surfaces and optic sections 100µm into the specimen viewed by confocal microscopy.

For histology, the medium was removed and the samples fixed in
25 10% formal buffered saline, (0.5ml; 24 hours), processed on the VIP processor, wax embedded, sectioned on a Leica microtome (5µm). For histological analysis, specimens were dewaxed, rehydrated and stained with either Safranin O, (0.1%, 6 min), Picrosirius Red (0.1% in saturated alcoholic picric acid, 90 min), Toluidine Blue, (0.5%; 15 sec),
30 or Haematoxylin and Eosin (Gills haematoxylin, 6 min and alcoholic eosin, 4 min). Specimens were mounted using Histomount and images

captured using the Leica microscope and SPOT camera and related software.

For immunocytochemical analysis, the slides were dewaxed,
5 rehydrated and subjected to Dako HMAR (heat mediated antigen
retrieval system; Dako). For collagen type I detection, the slides were
blocked in swine serum (2.5%, 20 min at room temperature; Dako),
washed thoroughly in PBS and immersed in either rabbit polyclonal
anti-collagen I antibody (10µg/ml; Biogenesis) or an equivalent
10 concentration of non-immune rabbit IgG immunoglobulin (Dako),
overnight at 4°C. The slides were then washed in PBS, immersed in
swine anti-rabbit biotinylated secondary antibody (1:100; room
temperature for 30 min; Dako), washed in PBS, immersed in
Streptavidin Texas Red (1:100, room temperature for 30 min;
15 Amersham Pharmacia Biotech), washed in PBS, mounted using
Vectormount for fluorescence and coverslipped.

For collagen type II detection, the slides were blocked in rabbit
serum (2.5%, 20 min at room temperature; Dako), washed thoroughly
20 in PBS and immersed in either mouse monoclonal collagen II primary
antibody (1µg/ml; Neomarkers) or an equivalent concentration of non-
immune mouse IgG immunoglobulin (Dako) overnight at 4°C. The
slides were then washed in PBS, immersed in rabbit anti-mouse
biotinylated secondary antibody (1:100; room temperature for 30 min;
25 Dako), washed thoroughly in PBS, immersed in Streptavidin FITC
(1:100; room temperature for 30 minutes; Amersham Pharmacia
Biotech), washed thoroughly in PBS, mounted using Vectormount for
fluorescence and coverslipped.

30 Results and discussion.

Explants without defects showed viable cells throughout the tissue except for a scattering of dead cells at the mineralised base of the explant and a limited number of dead cells along the superficial surface. The matrix showed intense metachromatic staining with
5 Safranin O and toluidine blue, (indicative of the presence of a glycosaminoglycan-rich matrix), red staining with picrosirius red, (indicative of the presence of collagen) and a morphologically normal cartilaginous appearance with H+E.

10 Samples with empty defects showed a clearly defined, broad band of cell death along the margin of the wound. H+E staining showed morphologically necrotic cells with shrunken nuclei in this zone, whilst Safranin O and picrosirius red showed a loss of matrix staining near the wound edge. In a minority of specimens, cells were observed migrating
15 from the mineralised tissue at the base of the defect over the cut surface of the cartilage, after about 6 days in culture. These migrating cells could be similar to those that fill cartilage defects following abrasion arthroplasty, surgical microfracture or drilling of the subchondral bone plate.

20 Samples containing implants showed collagen II production by the chondrocytes in the mid/deep zones of the implant and the surrounding cartilage, together with limited amounts of collagen I staining within the superficial zone of the device. The matrix in the implant stained for
25 both collagen and glycosaminoglycans with the histological dyes, but to a much lower level than was observed in the surrounding cartilage tissue. Morphological data showed that viable cells were growing upon the wound margin, although it was not possible to categorically state whether these cells had arisen from the base of the explant or the
30 implants in these experiments. It also appeared that the zone of cell death was diminished and the extent of matrix loss reduced. Overall

the results were consistent with the hypothesis that the layered, scaffold re-enforced implant produced using these methods could be implanted into a focal, full thickness cartilage wound and used to promote cartilage repair.

5

Example 2.3

Introduction

10 The objective of this example is to show how the fast binding rate of superficial zone chondroprogenitors to selected materials can be used to produce a zoned implant. One of the implant's zones being enriched with chondroprogenitors whilst the remainder is depleted. In this example a fibrous scaffold, coated with fibronectin, is seeded with
15 a mixed population of cells (i.e. superficial, middle and deep zone) for a limited time such that a high proportion of the fast binding superficial zone chondroprogenitor cells will attach but the majority of mature chondrocytes will fail to attach during the time allowed. The cells which do not attach in that time (i.e. the more mature cells) will be seeded
20 onto a second felt and allowed to adhere. The two scaffolds are then brought together to form a bilayered culture. The first felt being enriched with superficial zone chondroprogenitors. Identification of the superficial zone chondroprogenitors is by immuno-staining for N1.

25 Experimental

Coating of needle-felts

0.5mm thickness, 10mm diameter PET needle-felts with a density
30 of 62mg/cc (Batch No. ET216/200/4/1) were coated with 10µg/ml plasma fibronectin in Dulbecco's PBS with 1mM MgCl₂ and 1mM CaCl₂

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

76

overnight at 4°C. In addition, 10mm diameter PET needle-felts (Batch No. PS0324/04), 2mm thick, with a density of 45mg/cc were coated overnight at 4°C with D-MEM containing 10% FCS. 0.5mm needle-felts were blocked with 1% BSA for 1 hour at 37°C prior to cell seeding.

5

Cell Isolation

Mixed populations of superficial, middle and deep zone chondrocytes were isolated from the articular cartilage of 2-3 week old bovine metatarsophalangeal joints. The portions of cartilage were then placed directly into Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 5% foetal calf serum (FCS) and 0.1% pronase (Merck, 4x10⁶ units/g) and incubated at 37°C for 3 hours. Cartilage was then washed once with PBS and incubated in DMEM containing 5% FCS and 0.04% collagenase (Worthington, 237U/mg) and incubated overnight at 37°C with gentle shaking.

Tissue digests were then strained through a 70µm cell strainer (Falcon) to remove debris. The resultant filtrate was then centrifuged at 1000rpm for 5 minutes to pellet cells. Cell pellet was then resuspended in serum-free DMEM, centrifuged at 1000rpm for 5 minutes and resuspended in serum-free DMEM. Cell number was then counted and cells resuspended to the desired concentration.

25 Cell seeding

0.5mm and 2mm needle felts were coated with plasma fibronectin and FCS respectively and blocked as described above. A mixed population of chondrocytes was isolated and resuspended to a concentration of 4 x 10⁶ cells/ml. 0.5mm felts were seeded with 1ml of this suspension for 30 minutes with constant agitation on an orbital

shaker at 37°C. After this time, the felt was removed and washed 3x with serum-free media to remove non-adherent cells and the felt was transferred to DMEM containing 10% FCS for 5 hours. Washes were pooled, added to the original seeding cell suspension, pelleted by centrifugation, resuspended in DMEM containing 10% FCS and seeded onto the 2mm felts as described above, overnight at 37°C. After the seeding periods, both felts were washed twice with PBS, fixed in -20°C methanol for 10 minutes and transferred to PBS containing 0.02% sodium azide. Felts were stored in this solution at 4°C until used for immunostaining.

2mm felts coated overnight with FCS at 4°C were seeded, without the preceding 0.5mm felt, with a mixed population of chondrocytes as a control for Example 2.3.

Notch1 Immunostaining

For immunostaining, felts were washed 3 x 5 mins with PBS and blocked with 2.5% normal rabbit serum for 1 hour at room temperature. Felts were then washed 3 x 5 mins with PBS, incubated with 10µg/ml goat anti-notch1 antibody overnight at 4°C. Felts were then washed 3 x 5 mins with PBS and incubated with a 1:100 dilution of biotinylated rabbit anti-goat secondary antibody in PBS for 1 hour at room temperature. Felts were washed again for 3 x 5 mins with PBS and incubated with a 1:100 dilution of Streptavidin-FITC in PBS for 1 hour at room temperature. Felts were then washed 3 x 5 mins with PBS then viewed using the Leica DM-IRBE inverted confocal microscope using an ArKr laser exciting at 488nm. Optical sections were taken at 10µm intervals from the surface of the felt to a depth of 400µm. Using the Leica TCS-NT software Maximum Projection function the images were stacked displaying the maximum grey scale value along the z-

axis. Images were quantified using Image Pro-plus that calculated the area of green fluorescence (N1 stain) on the image. As the size of the image in the x- and y-axis is known (1000 μ m x 1000 μ m), together with the depth of the optical sections (z-axis; 400 μ m) is known, then the amount of green fluorescence per mm³ can be calculated.

Results

Fig. 2.17 shows the quantification of green fluorescence in the two felts compared to the control. Immediately apparent is the greater amount of N1+ fluorescence in the upper felt that was coated with fibronectin and seeded with the mixed population of chondrocytes for 30 minutes prior to the seeding of the lower felt with the same cell population.

Table 2.3: Area of N1 fluorescence in upper and lower needle felts.

Upper felt	Lower felt	Control
0.8876 $\pm$ 0.382248	0.018998 $\pm$ 0.012973	0.035932 $\pm$ 0.038209

Conclusion

This study has demonstrated the use of a fibronectin coated felt as a chondroprogenitor binding material which would then be layered onto a second felt that contains the more mature chondrocytes. Thus creating a zonally seeded implant.

Example 2.4

Introduction

The objective of this example is to demonstrate how the fast binding rate of superficial zone chondroprogenitors to selected materials can be used to produce a zoned implant. One of the implant's zones being enriched with chondroprogenitors whilst the remainder is depleted. In this example the zones are created within a single scaffold. A selected zone of a fibrous scaffold is coated with fibronectin and then seeded with a mixed population of cells (i.e. superficial, middle and deep zone) for a limited time such that a high proportion of the fast binding superficial zone chondroprogenitor cells will attach to the fibronectin coated zone but the majority of mature chondrocytes will fail to attach during the time allowed. The cells which do not attach in that time (i.e. the more mature cells) are collected and reintroduced to the scaffold along with binding materials and allowed to adhere throughout the scaffold. Identification of the superficial zone chondroprogenitors is by immuno-staining for Notch1.

Experimental

20 Coating of needle-felts

The upper surface of 10mm diameter PET needle-felts, 2mm thick, with a density of 45mg/cc were coated with plasma fibronectin (Sigma) at a concentration of 10µg/ml in Dulbecco's PBS with 1mM MgCl₂ and 1mM CaCl₂ (Sigma). Felts were coated overnight at 4°C. Controls were coated overnight in Dulbecco's PBS with 1mM MgCl₂ and 1mM CaCl₂ alone. Felts were blocked with 1% BSA for 1 hour at 37°C prior to cell seeding.

30 Cell Isolation

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

80

Mixed populations of superficial, middle and deep zone chondrocytes were isolated from the articular cartilage of 2-3 week old bovine metatarsophalangeal joints. The portions of cartilage were then placed directly into Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 5% foetal calf serum (FCS) and 0.1% pronase (Merck, 4×10^6 units/g) and incubated at 37°C for 3 hours. Cartilage was then washed once with PBS and incubated in DMEM containing 5% FCS and 0.04% collagenase (Worthington, 237U/mg) and incubated overnight at 37°C with gentle shaking.

10

Tissue digests were then strained through a $70\mu\text{m}$ cell strainer (Falcon) to remove debris. The resultant filtrate was then centrifuged at 1000rpm for 5 minutes to pellet cells. Cell pellet was then resuspended in serum-free DMEM, centrifuged at 1000rpm for 5 minutes and resuspended in serum-free DMEM. Cell number was then counted and cells resuspended to the desired concentration.

Needle felts were coated with $10\mu\text{g/ml}$ plasma fibronectin and blocked with 1% BSA for 1 hour at 37°C . A mixed population of chondrocytes was isolated and resuspended to a concentration of 4×10^6 cells/ml. Felts were seeded with 1ml of this suspension for 30 minutes with constant agitation on an orbital shaker at 37°C . The cell-seeded felt was then washed 2 x 10 min with serum-free media to remove non-adherent cells and the washes were pooled, pelleted by centrifugation and resuspended in 1ml DMEM containing 10% FCS. Seeded felts were then transferred to DMEM containing 10% FCS. Pooled non-adherent cells and seeded felts were incubated at 37°C overnight.

Pooled cells were then seeded back into the corresponding felt. The felt was then incubated in the cell suspension for approximately 7

hours with constant agitation on an orbital shaker at 37°C. After this time, felts were washed twice with PBS, fixed in -20°C methanol for 10 minutes and transferred to PBS containing 0.02% sodium azide. Felts were stored in this solution at 4°C until used for immunostaining.

5

N1 Immunostaining

For immunostaining, felts were washed 3 x 5 min with PBS and blocked with 2.5% normal rabbit serum for 1 hour at room temperature.

10 Felts were then washed 3 x 5 min with PBS, incubated with 10µg/ml goat anti-notch1 antibody (Santa Cruz) overnight at 4°C. Felts were then washed 3 x 5 min with PBS and incubated with a 1:100 dilution of biotinylated rabbit anti-goat secondary antibody in PBS for 1 hour at room temperature. Felts were washed again for 3 x 5 min with PBS
15 and incubated with a 1:100 dilution of Streptavidin-FITC in PBS for 1 hour at room temperature. Felts were then washed 3 x 5 min with PBS then viewed using the Leica DM-IRBE inverted confocal microscope using an ArKr laser exciting at 488nm. Optical sections were taken at 10µm intervals from the surface of the felt to a depth of 400µm. Using
20 the Leica TCS-NT software Maximum Projection function the images were stacked displaying the maximum grey scale value along the z-axis. Images were taken of the surface of coated felts, the underside of coated felts (i.e. non-coated region) and the upper and lower surfaces of non-coated felts.

25

Images were quantified using Image Pro-plus that calculated the area of green fluorescence (N1 stain) on the image. As the size of the image in the x- and y-axis is known (1000µm x 1000µm), together with the depth of the optical sections (z-axis; 400µm) is known, then the
30 amount of green fluorescence per mm³ can be calculated.

Results

Table 2.4. Area of NI fluorescence in upper and lower surfaces of coated and uncoated felts.

5

Upper surface of coated felt	Lower surface of coated felt	Upper surface of non-coated felt	Lower surface of non-coated felt
10380 $\pm$ 1557	1456 $\pm$ 517	1716 $\pm$ 1155	1744 $\pm$ 513

Fig. 2.18 shows the quantification of green fluorescence in the various zones. Immediately apparent is the greater amount of N1+ fluorescence in the upper surface of the felts which had had the upper surface coated with fibronectin.

10

Conclusion

This study has demonstrated the use of fibronectin as a chondroprogenitor binding material to produce zonally seeded biomaterials i.e. a biomaterial with chondroprogenitors on the upper surface and more mature cells in the lower regions.

15

Ex vivo Evaluation of Example 2.4

20

Introduction

Example 2.4 uses the fast binding rate of superficial zone chondroprogenitors to selected materials to produce a zoned implant. One of the implant's zones being enriched with chondroprogenitors whilst the remainder is depleted. A selected zone of a fibrous scaffold is coated with fibronectin and then seeded with a mixed population of cells (i.e. superficial, middle and deep zone) for a limited time such that

25

a high proportion of the fast binding superficial zone chondroprogenitor cells attach to the fibronectin coated zone whereas the majority of mature chondrocytes will fail to attach during the time allowed. The cells which do not attach in that time (i.e. the more mature cells) are
5 collected and reintroduced to the scaffold along with binding materials and allowed to adhere throughout the scaffold.

Method.

10 The upper surface of PET needle-felts, (3.5mm diameter x 3mm thick; 45mg/cc), were coated with either plasma fibronectin (10µg/ml in Dulbecco's PBS; Sigma) or PBS, for 16 hours at 4°C and the felts were blocked for 1 hour at 37°C with 1% BSA.

15 Explants of full thickness articular cartilage from 2-3 week old bovine metatarsophalangeal joints were placed directly into Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 5% foetal calf serum (FCS) and 0.1% pronase (Merck, 4x10⁶ units/g) and incubated at 37°C for 3 hours. Cartilage was then washed once with PBS and incubated in
20 DMEM containing 5% FCS and 0.04% collagenase (Worthington, 237U/mg) and incubated overnight at 37°C with gentle shaking. The tissue digests were strained through a 70µm cell strainer (Falcon) to remove tissue debris and the resultant filtrate centrifuged, (1000rpm; 5 min) to pellet the cells. The cell pellet was resuspended in serum-free
25 DMEM, centrifuged, (1000rpm; 5 min) and resuspended in serum-free DMEM.

A mixed chondrocyte suspension, (750,000 cells/ml; 1ml), was seeded onto the felts for 30 minutes with constant agitation on an
30 orbital shaker at 37°C. The cell-seeded felts were then washed with serum-free media (2 x 10 min) to remove non-adherent cells and the

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

84

washes pooled, pelleted by centrifugation, (1000rpm; 5 min), and resuspended in DMEM/10% FCS (1ml). Seeded felts were then incubated in DMEM containing 10% FCS for 16 hours at 37°C. The pooled non adherent cells were then seeded back onto the felts and the cultures incubated for 16 hours with constant agitation on an orbital shaker at 37°C. The seeded felts were then be transferred to fresh D-MEM containing 10%FCS and cultured for 7 days.

Strips of cartilage (approx 30mm x 5mm) were obtained from 2-3 week old bovine metatarsophalangeal joints, cut into pieces (~ 5mm x 5mm square) and defects created by cutting full thickness holes, 3.5mm in diameter from the centre of the cartilage explants using a 3.5mm diameter Acufex cylindrical chisel. Five experimental groups were produced by filling the defects with:

- [1] Zonally cell-seeded constructs.
- [2] Control cell-seeded constructs (i.e. non-fibronectin coated).
- [3] Non cell-seeded construct.
- [4] Replacement of the disc that was originally cut out.
- [5] Defect left unfilled

Experimental groups were then be cultured for 7 days after which they were incubated with ethidium homodimer, (90 min), and either (i) fixed with 10% NBFS, wax embedded, sectioned and stained with conventional histological stains e.g. H & E and Safranin O or (ii) dewaxed and examined under fluorescence optics to assess cell death.

Results

Unfilled defects showed a band of dead cells and reduced matrix quality at the wound margins. The amount of cell death was reduced in samples where the plug of cartilage was replaced into the defect site,

especially in regions of close apposition between the two cut cartilage surfaces. Unseeded constructs remained empty for the 7 day incubation period, except for a small number of migrating cells which may have arisen from the base of the cartilage explant. Most of the migrating cells remained attached to the cut cartilage surface. Control and zonally seeded constructs showed viable cells throughout the implant and increased numbers of cells upon the cartilage wound margin. These results suggest that the zonally seeded constructs could be used as implants to promote cartilage repair

Example 3.1: Example of the first and second aspects of the invention

Implant manufacture

An implant according to the invention comprises a scaffold made according to the following procedure: a three-dimensional, knitted PET fabric (2mm thick, with a cruciform spacer fabric architecture and a macroporous bone-facing surface comprising pores of 1-2mm diameter, made by Culzean Fabrics) was heat set at 121°C for 15 mins and reinforced with polycaprolactone (PCL) by drawing the fabric through a pool of molten PCL using a pair of motor-driven 'nip rollers'. Pairs of adjacent spacer fabric fibres within the three-dimensional knitted fabric cross to form broad based 'X's' that are readily bridged by the PCL, thereby maximising the strength of the re-inforced fabric. Likewise, the close packed fibres of the upper and lower surfaces of the 3D knit are frequently bridged by PCL to form strong, thermosettable surfaces that are sufficiently robust to hold a suture.

The material was allowed to re-expand and cool to produce a scaffold layer with a compressive modulus of 1.8MPa and a void fraction of greater than 75%.

- 5 Onto one surface of the three-dimensional, reinforced 3D-knitted fabric is bonded a conformable, non-woven PGA needle felt of thickness 1mm, with a very low compressive modulus (~0.02MPa) and a void fraction of greater than 90%. Bonding was achieved using heat and a polymer solution. The second (upper, articular) surface of the re-
 10 enforced, knitted fabric is coated with a chondroprogenitor cell-binding material, fibronectin in this case, to a depth of 20% of the thickness of the three-dimensional knitted fabric (13.3% of the thickness of the combined implant). The lower region of the knitted fabric and the non-woven PGA felt is uncoated with the chondroprogenitor cell-binding
 15 material.

Implant preparation/cell-seeding

- 20 The scaffold may be heated gently to soften the polycaprolactone, (40-60°C), and moulded to the contour of the implant site. The resulting scaffold is sufficiently robust to withstand functional loading whilst retaining a sufficiently porous structure to allow cell-migration within the defect site.

- 25 Articular chondrocytes comprising autologous cells extracted from a patient's biopsy/mosaicplasty explant and a source of chondroprogenitor cells, (marrow stromal fibroblasts), are seeded onto 50-250µm diameter microcarrier beads, and allowed to proliferate *in vitro*. The resulting cell-covered biomaterial particles are introduced by
 30 sedimentation into the void spaces of the knitted fabric prior to implantation into the defect site (to give $\geq 1 \times 10^6$ cells/cm² implant

area). The particulate carrier material allows the chondrocytes to be expanded in culture and introduced into the body of the device without the need for a trypsinisation and re-attachment step.

5 Implantation

The base of the implant site is mechanically debrided to expose and abrade the subchondral bone, whilst the periphery of the defect is cut back to healthy cartilage using sharp instruments. The device is then press-fitted into the defect site and secured in position with sutures and/or bioresorbable pegs. Mesenchymal cells from the abraded subchondral bone migrate into the non-woven felt and contribute to implant fixation in the weeks after implantation.

15 Example 3.2: Use of chondroprogenitor binding material to purify chondroprogenitor cells

Fibronectin was coated onto 35mm Petri dishes (10µg/ml; Sigma). Chondrocytes were prepared by digesting superficial zone cartilage in pronase and collagenase and suspending the released cells in serum-free medium DMEM (4000 superficial cells/ml; Sigma). The isolated cells were added to the fibronectin coated dishes for 40 mins. The coated Petri dishes were then washed with serum free medium DMEM to remove the non-adherent cells, which were transferred to fresh culture dishes. Colony forming efficiency, (the percentage of the cells capable of dividing to form a colony over a 10 day incubation period), was found to be much higher amongst the fibronectin adherent cells than the non-adherent cells ($p < 0.001$). Flow cytometry indicated that the adherent cells expressed high levels of integrin β_1 , a cell surface marker known to participate in cell binding to fibronectin.

Example 3: Identification of materials which selectively bind chondroprogenitor cells or move mature chondrocytes

Materials that preferentially bind either chondroprogenitor cells or
5 more mature chondrocytes were identified by, (i) comparing the
adhesion rates of SZC, MZC and DZC to candidate cell-binding
materials coated onto tissue culture plastic, (ii) measuring differences
in colony forming efficiency amongst superficial zone cells grown upon
coated-culture plastic and (iii) demonstrating the ability of 'binding-
10 material'-coated, particulate biomaterials, (e.g. fibronectin-coated,
sulphated Intralene) to bind colony forming SZC and colony forming
bone marrow stromal cells.

Methods

15

Cell Isolation

Chondrocytes from the surface, mid and deep zones of neonatal
bovine articular cartilage were isolated from the metacarpophalangeal
20 joint by careful dissection followed by sequential pronase/collagenase
digestion (3.17IU ml⁻¹ pronase 3h at 37°C; 0.12IU ml⁻¹ collagenase type
I 16h at 37°C in DMEM/F12 containing 5% FCS, 50µg ml⁻¹ Gentamycin,
100µg ml⁻¹ ascorbate). Cells were centrifuged, resuspended in
DMEM/F12, counted using a haemocytometer and resuspended in
25 serum free media.

Serum-free MG-63 conditioned medium (40ml; collected from
80% confluent cells over 48 hours), was circulated through an anti-FN-
EDA, (Oxford Biotech.), antibody-coated immuno-affinity column at a
30 flow rate of 10mlh⁻¹ for 16 hours at 4°C. The A280nm of the eluant was
measured every 10 minutes using a Perkin-Elmer Lambda 2

spectrophotometer until the absorbance reached zero. FN-EDA was then eluted from the column with elution buffer (20mM CAPS, 150mM NaCl, 10mM EDTA, pH11), and fractions collected every 10 minutes until the absorbance returned to zero.

5

FN-EDA containing fractions were pooled and dialysed overnight at 4°C using 10,000 MWCO dialysis membranes (Pierce), against 4L of dialysis buffer (10mM CAPS, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, pH11). FN-EDA was removed from the dialysis membranes and protein concentration determined by Micro-BCA assay. Pooled fractions of eluted FN-EDA, unbound FN-EDA and unfractionated MG-63 media were tested by ELISA. SDS-PAGE was also carried out by running 1µg of purified FN-EDA alongside 1µg of plasma and cellular fibronectin on a 4-12% bis-acrylamide gel (NOVEX). Both tests confirmed a high purity of FN-EDA.

10
15

Evaluation of superficial, mid and deep zone chondrocytes adhesion to candidate cell-binding materials coated onto tissue culture plastic

Multiwell plates were coated with candidate materials, (10µg/ml) or control substances, (10% FCS, positive control; 10% BSA negative control), overnight at 4°C. The plates were blocked with BSA, (1%; 37°C for 1 hour), and suspensions of superficial, mid or deep zone neonatal bovine chondrocytes (0.5ml; 1000 cells per ml) added.

20
25

The cultures were incubated for 20 minutes, 150 minutes, 1 day or 4 days at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, washed with PBS and then incubated in DMEM/10%FCS for 1.5 hours to stabilise cell adhesion. The plates were then washed in PBS, fixed with methanol, (-20°C; 30 min), rinsed with distilled water and air-dried. (The fixed plates maybe stored at 4°C for a month prior to testing).

30

For analysis, the cells were washed with PBS, stained with Ethidium Homodimer, (1 in 1000 dilution; 37°C; Molecular Probes) and counting using a fluorescent microscope. Results were expressed as the percentage of bound cells and ranked to identify materials that preferentially bound particular cell populations.

Chondroprogenitor Adhesion Assays: Differential adhesion and colony forming efficiency

The wells of 24 well plates were coated with extracellular matrix components, (fibronectin, acid soluble type I collagen, acid soluble type II collagen, acid soluble type IV collagen, laminin or tenascin; 27nM in PBS containing 1mM CaCl₂ and 1mM MgCl₂; 'PBS+'), for 16 hours at 4°C. The plates were washed in PBS+, seeded with SZC or DZC, (700 cells ml⁻¹; DMEM/F12, 1ml), and incubated for 20 minutes at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

The total number of adherent cells/well was counted using phase contrast microscopy after 4 hours. The number of colonies (defined as a cluster of 4 or more chondrocytes) per dish were counted using phase contrast microscopy after 4 days and the colony forming efficiency (CFE) was calculated as follows:

$$CFE = \frac{\text{Number of colonies at 4 days}}{\text{Initial number of adherent cells}}$$

The experiments were repeated to compare the activity of plasma fibronectin (Sigma) with cellular fibronectin (Sigma) or affinity purified fibronectin-EDA.

Adhesion of colony forming SZC and colony forming bone marrow stromal cells to adhesion factor-coated, sulphated Intrasite: 'The colony depletion assay'

- 5 A minority of BMSC and SZC form colonies of > 16 cells when cultured on tissue culture plastic in DMEM/10% FCS for 4 and 6 days respectively. We regard these colony-forming cells as progenitor cells. Sulphated Intrasite was coated with plasma fibronectin, cellular fibronectin, collagen IV, polylysine, laminin (all 60µg/ml) or PBS in
- 10 2.5ml DMEM for 2h at 4°C. The coated biomaterial was incubated with bone marrow stromal cells or SZC suspensions (125k cells/ml in serum free medium) for 3h at 37°C, the suspension diluted 1000 fold and aliquoted, (4ml) to the wells of 12 well plates. Foetal calf serum (0.4ml) was then added to each of the wells and the cultures incubated for a
- 15 further 16 - 24 hours. The wells were then washed with PBS, and the cultures incubated for a further 4 - 6 days in DMEM/10% FCS (2ml). Colonies, (discrete clusters of > 16 cells), were visualised by phase contrast microscopy and counted blind. Results were expressed as a 'colony depletion score', defined as the number of colonies formed by
- 20 cell suspensions exposed to adhesion factor pre-treated sulphated Intrasite divided by the number of colonies per well formed by cells exposed to PBS pretreated sulphated Intrasite. A colony depletion score of ≤ 0.5 was defined as the preferential value for colony forming cell-binding, whilst a value of ≤ 0.8 was defined as a threshold value
- 25 for acceptable colony forming cell binding.

Results

- Evaluation of superficial, mid and deep zone chondrocytes adhesion to
- 30 candidate cell-binding materials coated onto tissue culture plastic

Data showed that superficial zone cells bound to fibronectin-coated culture plastic to a greater extent than mid or deep zone cells during the initial 20 minute incubation period, (table 3.1). Collagen VI and peanut agglutinin also preferentially bound superficial zone cells at this early time point, but the magnitude of cell-adhesion was minimal (table 3.1).

In contrast, collagen type I, collagen type II, collagen type VI and vitronectin bound mid and deep zone cells to a higher extent than superficial zone cells after a 150 minute incubation, (table 3.2).

Chondroprogenitor Adhesion Assays: Differential adhesion and colony forming efficiency

The colony forming efficiency of SZC that adhered to fibronectin within 20 minutes was significantly higher ($p < 0.05$) than that observed in any of the other treatment groups (Fig. 3.6). There were no other statistically significant differences ($p > 0.05$ in all cases).

No significant differences were observed between the efficacy of plasma fibronectin, cellular fibronectin and fibronectin-EDA on either (i) the initial adhesion of SZC or MZC, (ii) the colony forming efficiency of the cells nor (iii) the size of colonies formed.

Adhesion of colony forming superficial zone cells and colony forming bone marrow stromal cells to adhesion factor-coated, sulphated Intrasite: "The colony depletion assay"

In these experiments, cells that do not attach to the coated sulphated Intrasite particles attach to the culture plastic and may subsequently form colonies. Cells that do bind to the sulphated

Intrasite particles are removed during the washing step. Colony forming cell adhesion to coated sulphated Intrasite is therefore reflected by a decrease in the number of colonies formed on the culture plastic. Microscopic examination of the diluted suspensions of cells and particles after the initial 3 hour incubation revealed a sparse distribution of particles, (some with adherent cells), together with unattached cells. Addition of foetal calf serum to these cultures for 16-24 hours allowed the cells that had not attached to the biomaterial particles to adhere to the tissue culture plastic. The subsequent washing step removed the particles and any cells that had adhered to them, leaving only those cells that had adhered to the culture plastic. Results showed that there were 46.8 ± 3.76 colonies per well when superficial zone chondrocytes were incubated with PBS pre-treated sulphated Intrasite compared to 21.0 ± 1.39 colonies per well when superficial zone cells were exposed to plasma fibronectin-coated sulphated Intrasite, (i.e. a colony depletion score of 0.45; $p < 0.001$; see Fig. 3.7). Likewise bone marrow stromal cells incubated with adhesion factor coated sulphated Intrasite gave colony depletion scores of plasma fibronectin, 0.49; collagen IV, 0.67; cellular fibronectin, 0.8; polylysine, 0.88 and laminin 1.26, (see Fig. 3.8).

Discussion

Our previous results showed that a population of N1 positive, fibronectin-EDA secreting, strongly integrin β_1 positive, colony forming chondroprogenitor cells exist within the superficial zone of neonatal articular cartilage. It was hypothesised that (i) the specific features of these progenitor cells could be used to develop biomaterials that would selectively bind either chondroprogenitor cells or more mature chondrocytes and (ii) that such biomaterials could be seeded with cells and agglomerated to form a zonal implant in which chondroprogenitor

cells form a layer near the articular surface whilst more mature chondrocytes are bound in the deeper zones of the implant.

These results show that (i) SZC bind rapidly to fibronectin covered
5 surfaces, (ii) the 'rapid fibronectin-binding' SZC have a high colony
forming efficiency when grown on fibronectin-coated surfaces and that
(iii) the particulate biomaterial, 'fibronectin-coated sulphated Intrasite'
will bind colony forming cells from both superficial zone cartilage and
bone marrow stroma. This suggests that fibronectin-coated sulphated
10 Intrasite is a suitable material for use in the superficial zone of the
proposed layered, tissue engineered cartilage implant. Different forms
of fibronectin, (e.g. plasma fibronectin, cellular fibronectin and
fibronectin-EDA), give broadly similar results in these assay systems,
suggesting that they could all be used for this purpose.

15

Our results also show that collagen IV does not selectively bind
SZC nor support the adhesion and proliferation of colony forming
superficial zone cells. Collagen IV does however adsorb onto
particulate, polyanionic biomaterials to give a material with a surface
20 that will bind colony forming cells from bone marrow stroma. Since the
colony forming cells in bone marrow stroma are early mesenchymal
cells that can form bone, cartilage, fat and fibrous tissues, it is possible
that collagen IV binds a more primitive population of mesenchymal
precursors than the colony forming cells which commonly occur in the
25 superficial zone of neonatal articular cartilage.

In contrast, collagen type I, collagen type II, collagen type VI and
vitronectin all bound mid and deep zone cells to a higher extent than
superficial zone cells after a 150 minute incubation. These
30 extracellular matrix components may therefore be utilised to bind more
mature chondrocytes to particulate biomaterials. Such cell-seeded

materials could be used to form the mid and/ or deep zones of a layered, tissue engineered cartilage implant.

Table 3.1: Percentage of SZC, MZC and DZC adhering to fibronectin, collagen VI and peanut agglutinin-coated tissue culture plastic after a 20 minute incubation.

Binding material	SZC	MZC	DZC
Fibronectin	23.2	13.8	13.6
Collagen IV	4.8	2	2
Peanut agglutinin	3.6	2	2

Table 3.2: Percentage of SZC, MZC and DZC adhering to collagen type I, collagen type II, collagen type VI and vitronectin-coated tissue culture plastic after a 150 minute incubation.

Binding material	SZC	MZC	DZC
Collagen type I	13.2	21	20.4
Collagen type II	8.8	17.2	23
Collagen type VI	7.8	17.8	22
Vitronectin	11.2	19.2	21.4

Cell separation methods

15

Homogeneous populations of cells, for instance chondroprogenitor cells e.g. superficial zone chondroprogenitor cells may be separated by other methods. Homogeneous populations of cells may be enriched or isolated from heterogeneous cell mixtures using a range of techniques based upon, (i) the cells' buoyant density or sedimentation rate, (Ficol gradients or counter current elutriation); (ii) antibody binding to specific cell-surface epitopes, (via fluorescent cell

20

sorting, attachment to magnetic beads or complement mediated cell lysis); (iii) differential adhesion to particular substrates; (iv) selective culture media or culture conditions which favour the growth of one cell type rather than another, (v) other physical properties of the cells, e.g. their size, granularity or electrical capacitance.

These techniques may also be used to produce an implant according to the present invention.

10 Sulphated Intrasite

In a separate aspect of the present invention the invention relates to a synthetic implant for the replacement of damaged cartilage and more particularly for the replacement of load-bearing cartilaginous tissue, such as the meniscus and articular cartilage. The invention also relates to a method of seeding a scaffold means with cells; to a bioreactor suitable for use in that method; to a method of seeding scaffold means specifically using the bioreactor and to a hybrid implant comprising a scaffold means and cell-coated particulates dispersed within it. Finally, the invention also relates to a method of treatment comprising the step of surgically implanting a synthetic implant or a hybrid implant according to the invention.

Popular current procedures for the treatment of articular cartilage defects include high tibial osteotomy (primarily performed in Europe) and muscle release to alter joint biomechanics and loading; lavage and debridement to remove osteophytes and fibrillated areas of cartilage and perforation and penetration of the subchondral bone to induce bleeding and clot formation. It has been established, however, that none of these techniques leads to successful regeneration of the tissue

that duplicate the structure, composition, mechanical properties or durability of articular cartilage.

5 The most common technique is that of subchondral drilling which results in the creation of a fibrin clot and a fibrous tissue. In about 75% of patients there is a satisfactory initial result, but two years after the operation, only 12% of patients remain free of symptoms. Limitations of this approach are the difficulty in predicting the quality and duration of the clinical outcome and, in the long term, this procedure often
10 leaves the patient in a worse condition. On the other hand, subchondral drilling and debridement are generally successful in alleviating symptoms and in postponing the requirement for total knee replacement by between one and three years.

15 A synthetic cartilage repair product which could predictably alleviate pain, restore function, achieve good fixation and which has a durability enabling it to last longer, for example at least ten to fifteen years or more is seen as an important objective by many surgeons.

20 One currently available product which attempts to meet the above objectives consists of carbon fibre rods: the cartilage lesions or other defects are cleaned and excised down to the subchondral bone and the carbon fibre rods are inserted into holes made therein. Repair begins with the deposition of collagen in islands around the top of the rods.
25 These islands of growth soon enlarge to completely fill the defects, the rods providing anchorage for the repair tissue in the defect. A significant problem associated with this product is carbon fibre wear debris found in the synovial cavity, which may give rise to problems of abrasion.

30

Another approach, which has been considered, is to use an implant constructed of a knitted fabric, which provides structural stability, and containing a swellable hydrogel for supporting cells seeded within it. This implant is placed in a cartilage lesion and to
5 promote cartilage growth by means of the increased pressure derived from the swelling hydrogel. A problem associated with the use of implants of this type has been poor integration between the implant and the tissue beneath it, particularly the subchondral bone.

10 Tissue-engineered approaches to producing devices for cartilage repair employ combinations of cells and biomaterials, which biomaterials may be in the form of synthetic repair products, as described above. The device produced may comprise autologous cells or tissue (derived from the patient's own cells), or allogenic cells or
15 tissue (using cells derived from donated tissues). The autologous approach minimises the risk of disease transmission that accompanies the use of donated tissue, but has the disadvantage that two operations are needed - one to harvest the tissue used in the device, the other to surgically introduce the device once it has been produced. Tissue-
20 engineered approaches using allogenic cells avoid the problems associated with the use of autogenic cells and aim to produce an off-the-shelf cartilage implant which could be used to repair cartilage defects with a single operative procedure. This approach is not without
25 problems either - difficulties encountered include regulatory and ethical ones associated with obtaining donor tissues as well as screening the donor material to prevent the transmission of pathogenic bacteria, viruses or prions.

In addition to the problems specific to the use of allogenic or
30 autogenic cells, the step of culturing cells to engineer a mechanically competent matrix creates problems with nutrient diffusion into the

centre of the construct. At first, cell replication increases cell numbers evenly throughout the construct. As the cell numbers increase and extracellular matrix deposition commences, the cells at the periphery of the construct consume a greater proportion of the nutrients diffusing
5 into the device, thereby starving the cells in the centre of the construct and preventing their growth. Eventually the cells in the centre of the construct die, resulting in a construct with a thin viable surface but a necrotic, liquefied core. A method of manufacturing a device for cartilage repair, which avoids this effect, would be a significant
10 improvement over existing techniques.

Current synthetic cartilage repair products and tissue-engineered devices for use in cartilage repair are also unable to meet the conflicting requirements of mechanical resilience and lateral
15 integration. If a cell-seeded implant or a synthetic implant into which cells have migrated has a sufficiently robust structure that it can withstand mechanical loading, then, traditionally, its cells have become trapped within the matrix, unable to migrate into the surrounding tissue and therefore unable to contribute to lateral integration. Conversely, if
20 the implant is sufficiently permeable to permit cell migration and lateral integration, it has traditionally been too weak to withstand mechanical loading. It would therefore be desirable to provide implants that are mechanically robust but which also permit cell mobility within the implant.

25

It is an object of the present invention to provide a synthetic cartilage repair product which avoids the problems associated with prior art products of this type. In particular it is an object to provide a synthetic cartilage repair product which exhibits improved integration
30 with the tissue with which it is in contact, particularly the subchondral bone.

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

100

It is another object of the present invention to provide a synthetic cartilage repair product which is mechanically robust but which also permits cells to move within the implant.

5

It is another aspect still of the present invention to provide a method for culturing a tissue-engineered cartilage implant, which avoids the problem of inadequate nutrient diffusion to cells at the interior of the implant.

10

Further objects of the present invention will become apparent from a reading of the following description.

In one aspect, the invention comprises a synthetic implant for repair of a cartilage defect, the implant having a first surface suitable for location at or near a bone-cartilage interface and a second surface suitable for location contiguous with or near to an exposed articular surface, wherein the implant comprises:

- 15 (a) a biocompatible scaffold and, linked thereto or comprised therewithin,
- 20 (b) a conformable zone extending from the first surface towards the second surface.

Reference herein to a material being 'biocompatible' means that there is essentially no clinically significant acute or chronic adverse response when the material is surgically introduced into a mammalian organism over and above that which would occur as a result of sham surgery alone.

30 The term 'scaffold' should be taken to include a three dimensional, at least partially porous structure, the porosity intended to

allow cell infiltration, the exposed parts of the implant (both internal and external) allowing cell adhesion and growth such that cell proliferation and extracellular matrix (ECM) generation can occur and tissue can be laid down.

5

Reference herein to the term 'conformable zone' is to a zone which deforms on implantation to fill the gaps between it and any material with which it is in contact (tissue such as subchondral bone or cartilage) and should be taken to include a zone having a compressive modulus of less than 1.0MPa.

10

An advantage of the conformable zone is that it may be have a much lower compressive modulus than the tissue it is intended to be placed in contact with on implantation and thus may avoid problems of abrasion of the tissue surrounding the implant site. The conformable zone deforms on implantation to fill the gaps between the first surface of the synthetic implant and the tissue with which it is in contact (subchondral bone or cartilage, in general). This allows bone forming cells to migrate into the underside of the synthetic implant and deposit new bone, thereby binding the synthetic implant into the defect site.

15

20

In a preferred form of the one aspect of the invention, the compressive modulus of the synthetic implant increases in a direction moving from the first to the second surface. The increase according to the invention may be continual or there may be one or more discrete increases and, in the former case, the gradient of the increase may be constant, or it may itself increase or decrease.

25

For the reasons given above, the compressive modulus of the conformable zone may be less than 1.0MPa. Preferably the conformable zone has a compressive modulus of 0.5MPa or less.

30

More preferably, the compressive modulus of the conformable zone is 0.1MPa or less. Most preferably, the compressive modulus of the conformable zone is 0.05MPa or less. If the compressive modulus within the zone is non-constant, then the compressive modulus of the entire zone must nevertheless fulfil the respective criterion.

In another preferred form of the one aspect of the invention, the synthetic implant comprises an articular zone extending from the second surface towards the first surface, wherein the articular zone has a compressive modulus of 1.0MPa or more. This rigid articular zone protects cells within it from severe mechanical conditions that may be present at the implant site, such as a joint, while allowing cell migration into the articular zone and extracellular matrix (ECM) deposition. On the other hand, the articular layer will typically have a lower compressive modulus than the surrounding tissue, such as cartilage and bone, which typically has a compressive modulus above 5MPa. As a result, if a surgeon puts the implant in incorrectly and needs to manipulate it into the correct position *in situ*, it is the implant that will deform during this operation and not the surrounding tissue, thus minimising problems caused by tissue deformation and abrasion.

Preferably, the articular zone has a compressive modulus of 1.8MPa or more. More preferably, the articular zone has a compressive modulus of 3.0MPa or more. If the compressive modulus within the zone is non-constant, then the compressive modulus of the entire zone must nevertheless fulfil the respective criterion.

As stated, the synthetic implant comprises a scaffold, as defined above. The scaffold according to the invention may be separate and distinct from the conformable zone and/or the articular zone. Alternatively, if one or both of the conformable zone and the articular

zone comprises a three dimensional, at least partially porous structure, as defined above in relation to the term 'scaffold', then the scaffold itself may incorporate the conformable zone and/or the articular zone.

5 The scaffold according to the invention may, for example, comprise a three dimensional woven or knitted fabric (i.e. a spacer fabric), a fleece (i.e. non-woven) material, a sponge, a foam, particulates or any combination of these materials.

10 The term 'particulate' should be taken to include materials in the size range 10 – 2000µm and preferably in the range 100 - 600µm capable of supporting cell adhesion. Particulates according to the invention may comprise cross-linked proteins, polysaccharides, derivatised polysaccharides and synthetic biocompatible polymers,
15 such as those listed below for manufacture of the scaffold. Commercially available particulates may be obtained from Pharmacia (CYTOPORE™, and CYTODEX™) and Sigma (CYTODEX™ again).

20 The scaffold may comprise one or more layers. If the scaffold comprises a plurality of layers, these layers may all comprise an identical material. Alternatively, each layer may comprise material which is different from some or all of the other layers.

25 In the event that the scaffold according to the invention comprises at least one layer of three-dimensional woven or knitted fabric, it is preferred to heat set the layer(s). This step causes the molecules in the fibres to re-align to the orientation imposed upon the fibres and causes the fabric to shrink somewhat. Both effects serve to render the fabric more stable. Heat setting is carried out at a temperature and for a
30 time known to the skilled man in this field and depends upon the material in question.

The scaffold layer or layers may comprise bioresorbable or non-bioresorbable materials.

5 Reference herein to a material being bioresorbable means that it breaks down over time due to chemical/biological action and the terms 'resorption' and 'resorb' are to be interpreted accordingly. Preferably, complete resorption occurs within about 5 years, more preferably within about 3 years. An advantage of using bioresorbable materials is that
10 they break down allowing repair tissue completely to fill the defect site such that further surgery to remove them is not necessary.

If a single bioresorbable material is employed, then a preferred selection criterion for it is that it does not significantly resorb during the
15 period of time that tissue is being laid down within it after implantation. Fulfilment of this condition ensures that the implant essentially retains its shape and mechanical integrity until ingrown biological tissue can take over these functions. In numerical terms, it is preferred that there be less than a 5% loss of weight when the bioresorbable material is
20 implanted *in vivo* for a 12 week period. More preferably, there is less than a 2% loss of weight during the same period. If, on the other hand, the scaffold comprises two or more bioresorbable materials, then it is preferred that at least one of the bioresorbable materials fulfils this criterion in order to provide structural integrity to the implant.

25 A wide range of bioresorbable materials is known, with differing *in vivo* resorption times. Not only does the resorption time vary according to the material, but the resorption time of a single material itself can also vary significantly with molecular weight and structural disposition.
30 Finally, it can readily be appreciated that by blending and/or copolymerising different bioresorbable materials and/or by modifying

the molecular weights or crystallinity of the components, it is possible precisely to tailor the resorption time of the bioresorbable material to the requirement at hand.

- 5 With the above in mind, the bioresorbable materials according to the invention may comprise bioresorbable polymers or copolymers comprising the following monomers or mixtures of polymers and/or copolymers formed thereby: hydroxy acids, particularly lactic acid, glycolic acid; caprolactone; hydroxybutyrate; dioxanone; orthoesters;
10 orthocarbonates; aminocarbonates.

- The bioresorbable materials according to the invention may also comprise natural materials such as collagen, cellulose, fibrin, hyaluronic acid, fibronectin, chitosan or mixtures of two or more of
15 these materials. The bioresorbable materials may also comprise devitalised xenograft and/or devitalised allograft.

- Bioresorbable ceramics may also be included within the scaffold. Bioresorbable ceramics which may be used according to the invention
20 are mono-, di-, octa-, α -tri-, β -tri and tetra-calcium phosphate, hydroxyapatite, fluoroapatite, calcium sulphate, calcium fluoride, calcium oxide or mixtures of two or more of these materials.

- Preferred bioresorbable materials according to the invention
25 comprise poly(lactic acid), poly(glycolic acid), polydioxanone, polycaprolactone, polyhydroxybutyrate and poly(trimethylene carbonate) or mixtures thereof.

- It is particularly preferred to use poly(lactic acid). This material
30 has the advantage that it has good mechanical strength and does not resorb too quickly, thus allowing its mechanical properties to be

retained for a sufficient time for tissue repair to occur at which point the repaired tissue can take over load-bearing functions: with reference to A.G.A. Coombes and M.C. Meikle, 'Resorbable Synthetic Polymers as Replacements for Bone Graft', Clinical Materials 17, (1994), pp 35-67

5 samples of poly(lactic acid) have been shown to lose only one or two percent of their weight over a 12 week trial.

Appropriate non-bioresorbable materials according to the invention include polyesters, particularly aromatic polyesters, such as

10 polyalkylene terephthalates, like polyethylene terephthalate (PET) and polybutylene terephthalates; polyamides; polyalkenes such as polyethylene and polypropylene; poly(vinyl fluoride), polytetrafluoroethylene carbon fibres, silk (natural or synthetic), carbon fibre, glass and mixtures of these materials. In addition, non-resorbable

15 ceramics may be employed. Examples of such materials are pure hydroxyapatite, zirconia and alumina. An advantage of non-bioresorbable materials is that they essentially retain their initial mechanical properties – i.e. properties such as strength do not reduce over time. They may therefore provide long-term mechanical support

20 to the repair tissue.

The conformable zone may comprise a fleece (i.e. non-woven) material, a sponge, a foam, particulates, a gel or a combination of these materials and may comprise bioresorbable or non-bioresorbable

25 material. Any of the bioresorbable or non-bioresorbable materials listed in relation to the scaffold may be used, providing that the compressive modulus condition is fulfilled. If the conformable layer comprises a gel, it may be a positively charged, negatively charged or neutral gel, provided that it functions to allow tissue ingrowth. The

30 conformable zone comprises at least one stratum and may comprise a plurality of strata. If the conformable zone comprises a plurality of

strata, these may all comprise an identical material. Alternatively, each stratum may comprise material which is different from some or all of the other strata.

- 5 The articular zone may comprise a three dimensional woven or knitted fabric (i.e. a spacer fabric), a fleece (i.e. non-woven) material, a sponge, a foam, particulates or a combination of these materials and may comprise bioresorbable or non-bioresorbable material. Any of the bioresorbable or non-bioresorbable materials listed in relation to the
- 10 scaffold may be used, providing that the compressive modulus condition is fulfilled. The articular zone comprises at least one stratum and may comprise a plurality of strata. If the articular zone comprises a plurality of strata, these may all comprise an identical material. Alternatively, each stratum may comprise material which is different
- 15 from some or all of the other strata.

- The compressive modulus of the articular zone may be an inherent property of the type and structure of the material comprised within it. Alternatively, the articular zone may be reinforced.
- 20 Reinforcement may be achieved by inclusion of a reinforcing component within the structure to assist in withstanding mechanical loading.

- If present, the reinforcing component may comprise a
- 25 bioresorbable or non-bioresorbable polymer of the types listed above for manufacture of the scaffold. Preferably, the reinforcing component comprises a molten thermosetting polymer or a solution of a thermosetting polymer which is added so as to form strengthening bridges within the articular zone. More preferably still, the polymer is
- 30 one which thermosets at just above body temperature, that is below 60°C. If the articular zone comprises a fabric material (such as a

woven, non-woven or knitted material) the molten reinforcing material connects adjacent strands therewithin, thereby increasing its compressive modulus. Most preferably, the reinforcing component comprises polycaprolactone, because this material has a melting
5 temperature slightly above body temperature, is biocompatible, bioresorbable and renders the implant mouldable.

In the case in which the articular zone comprises a fabric material, one method of providing the above-mentioned reinforcement is to
10 compress the fabric between two 'nip' rollers over which is supplied a pool of molten or dissolved reinforcing polymer. As the fabric is compressed and forced between the rollers a small quantity of reinforcing polymer is carried with it and this is drawn into the fabric when it re-expands on the other side of the rollers, thereby coating the
15 fibres.

In a particularly preferred form of one aspect of the invention, the synthetic implant comprises a scaffold which itself comprises both the conformable zone and the articular zone. Advantageously, the articular
20 zone extends from the second surface towards the first surface to meet the conformable zone, which extends from the first surface towards the second surface. Preferably, the articular zone comprises a three-dimensional, knitted structure comprising poly(lactic acid) [bioresorbable] and/or PET [non-bioresorbable] fibres, which has been
25 reinforced by addition of a molten polycaprolactone reinforcing component. The conformable zone advantageously comprises a felt (non-woven) comprising poly(glycolic acid) and/or PET fibres.

According to a preferred form of one aspect of the invention, the
30 synthetic implant may comprise certain additional components to

improve its acceptance by the tissue into which it is to be implanted and its integration into that tissue.

One class of additional component which may advantageously be added to the implant is bioactive materials. Bioactive components which may be incorporated to any part of the implant according to the invention comprises growth factors, for example the Transforming Growth Factor β superfamily including TGF β s, Bone Morphogenetic Proteins BMPs (e.g. BMP2, BMP4), Cartilage Derived Morphogenic Proteins CDMPs (e.g. CDMP-1, CDMP-2) and Growth Differentiation Factors (e.g. GDF5); platelet-derived cell growth factor (PD-ECGF), Platelet Derived Growth Factors (PDGF); Epidermal Growth Factor family, e.g. EGF, Transforming Growth Factor AlphaTGF α ; Platelet Derived Growth Factors, e.g. PDGF-A, PDGF-B, PDGF-BB; Fibroblast Growth Factors, e.g. BFGF; Hepatocyte Growth Factors (HGF); Insulin-like Growth Factors, e.g. IGF-1, IGF-II; Growth Hormones (GH); Interleukins (e.g. IL-1, IL-11); Connective Tissue Growth Factors (CTGF); Parathyroid Hormone Related Proteins (PTHrp) and mixtures of at least two of these materials.

20

In addition to the above, angiogenic factors (angiogenin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) can advantageously be added to the conformable zone of the implant.

25

Synthetic implants according to the invention may be seeded with cells prior to implantation. Alternatively, they may be implanted without cells and cells may be injected at any time after implantation or they may be implanted without any cells so that cell population and attachment occurs by cellular ingrowth only.

30

Cells with which the implant according to the invention may be seeded are chondrocytes; cells that can differentiate into chondrocytes; such as chondroprogenitor cells and mesenchymal stem cells and cells that can induce other cells to differentiate into chondrocytes. Suitable
5 sources of primitive mesenchymal precursor cells include perichondrium, periosteum, bone marrow and Wharton's Jelly.

If the implant according to the invention is seeded with cells, perforations are preferably provided in the implant extending from the
10 first surface through the conformable layer towards (but not extending to) the second surface of the implant. The perforations may be up to 2.5mm in diameter, are preferably 0.6 to 2.5mm in diameter and more preferably 1.6 to 2.2mm in diameter. The perforations advantageously
15 cover from 5 to 35% of the area of the first surface of the implant and preferably 16-30% of that surface. The presence of such perforations with parameters in the ranges defined facilitates efficient cell seeding.

According to another aspect of the invention, a method of seeding scaffold means with cells is presented, the method comprising the
20 steps of bringing the cells into contact with particulates such that cells adhere to the surface of the particulates, then introducing cell-coated particulates into the scaffold means.

Reference herein to 'scaffold means' is to any device comprising
25 a scaffold, as defined hereinabove. Synthetic implants according to one aspect of the invention are expressly included within the scope of the term 'scaffold means'.

The particulates may inherently be able to bind cells or may be
30 coated with a material capable of binding cells or both. Suitable cell-binding materials with which the particulates may be coated include

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

111

collagen I, II and IV, fibronectin and fibronectin splice variants, gelatin, laminin, vitronectin, polycationic polymers and polyanionic polymers.

Preferably, the cells are incubated on the particulates in a nutrient solution prior to introduction into the scaffold means to cause them to grow and generate extracellular matrix. More preferably, incubation is carried out for a period of up to 6 weeks. Most preferably, incubation is for a period of between 1 and 3 weeks.

The cell-coated particulates may be introduced into the scaffold means by sedimentation but, in general, a stronger force is required than gravity alone. Advantageously, the cell-coated particulates are forced into the scaffold means by application of a pumping pressure or by centrifugation. Preferably, the cell-coated particulates are introduced into the scaffold means by centrifugation.

An advantage of the present seeding method is that it avoids the problems associated with prior art methods, that is of insufficient nutrient diffusion into the centre of the construct during the phase of *in vitro* cell growth ~ see introduction. This is because according to the present method cell growth may take place on the particulates which are distributed in a volume of medium prior to their introduction into the scaffold means. Once *in vivo*, the implant is provided with nutrients by the blood vessels in the subchondral bone aided by the cyclical compressive stresses on the tissue which draw nutrients in and out of it.

According to another aspect of the invention, a bioreactor is provided which is suitable for use in the method according to the previously mentioned embodiments of the invention. The bioreactor according to one embodiment of the invention comprises an incubation

chamber suitable for incubating cell-seeded particulates and a scaffold support chamber suitable for supporting scaffold means, of diameter d_1 , wherein either (a) the diameter of the incubation chamber, d_2 , diminishes as it approaches the scaffold support chamber so that it
5 meets the scaffold support chamber at a point where $d_2 = d_1$, or (b) the incubation chamber and the scaffold support chamber are connected by funnel means which has diameter, d_2 , at the end contiguous with the incubation chamber, diminishing to diameter, d_1 , at the end contiguous with the scaffold support chamber.

10

The incubation chamber according to one embodiment of the invention may, for example, be spherical, conical or tubular. Advantageously, it is tubular.

15

The incubation chamber may be larger, the same size as or smaller than the scaffold support chamber, but is preferably smaller than the scaffold support chamber.

20

In an advantageous alternative of the invention, the funnel means and scaffold support chamber may be integrally comprised within insert means, suitable for insertion into the bioreactor. Advantageously, according to this alternative, the bioreactor comprises a tube.

25

According to yet another aspect of the invention, a method of seeding scaffold means with cell-seeded particulates using a bioreactor according to one embodiment of the invention is provided. The method according to one embodiment of the invention comprises the following steps:

30

- disposing scaffold means within the scaffold support chamber of the bioreactor;

- introducing cell-seeded particulates into the incubation chamber of the bioreactor;
- agitating the bioreactor under appropriate conditions, such as temperature, humidity, pH and nutrients, for an appropriate period of time to effect sufficient incubation;
- centrifuging the bioreactor to aggregate the cell-seeded particulates within the scaffold means;
- removing the scaffold means comprising the cell-seeded particulates from the scaffold support chamber of the bioreactor.

As discussed above, the phrase 'for an appropriate period of time to effect sufficient incubation' means that the cells are incubated in a nutrient solution to cause them to grow and generate extracellular matrix. Preferably, this incubation is carried out for a period of up to 6 weeks. More preferably, the incubation is for a period of between 1 and 3 weeks.

According to another embodiment of the invention, a hybrid implant is presented, comprising scaffold means and cell-coated particulates.

Also according to the invention, a method of treatment of a cartilage defect in a mammalian organism is presented, the method comprising surgically implanting a synthetic implant or a hybrid implant into the defect.

Reference is made to the figures of the application, which are intended to be non-limiting:

Fig. 4.1 illustrates a synthetic implant according to an embodiment of the invention.

Fig. 4.2 illustrates insert means for insertion into bioreactors according to the invention.

5 Fig. 4.3 illustrates a bioreactor according to an embodiment of the invention during the phase of cell seeding and incubation of the particulates.

10 Fig. 4.4 illustrates a hybrid implant located within a bioreactor according to an embodiment of the invention immediately after centrifugation of cell-seeded particulates into the synthetic implant of Fig.3.

15 Fig. 4.5 shows the microscopic appearance of the sulphated material.

Fig. 4.6 shows representative spectra for the modified and unmodified materials.

20 Fig. 4.7 illustrates plasma fibronectin, cellular fibronectin and fibronectin-EDA binding to sulphated Intrasite™.

Fig. 4.8 illustrate collagen VI binding to sulphated Intrasite™.

25 Fig. 4.9 illustrate fibronectin and vitronectin binding to sulphated Intrasite™ following absorption from FCS.

30 Fig. 4.10 shows seeding of cells on sulphated and non sulphated Intrasite™.

Working Example 4.1**Preparation of a synthetic implant**

- 5 To form the articular zone, a three-dimensional, knitted, PET fabric was produced on a double bed raschel warp knitting loom according to the pattern given in Table 4.1:

Table 4.1. PET Monofilament spacer with multi filament surfaces.

- 10 **Knitted on a double bed raschel warp knitting machine, 6 guide bars at 24 gauge.**

Bar:	Yarn:	Pattern Chain:	Description:
1	2/44/27 PET	22/20/44/46	Lay-in over 4 needles
2	2/44/27 PET	00/02/22/20	Chain stitch
3	0.09mm Dia PET Monofilament	10 8/64/20/46	V-Shape, 3 needles wide
4	0.09mm Dia PET Monofilament	20/46/10 8/64	V-Shape, 3 needles wide
5	2/44/27 PET	02/22/20/00	Chain stitch
6	2/44/27 PET	20/44/46/22	Lay-in over 4 needles

- 15 The fabric was 3mm thick with a cruciform spacer fibre architecture. The fabric was washed in purified water at 60°C followed by a further wash in high purity propan-2-ol then dried and heat set in an autoclave at 121°C for 15 minutes. It was then reinforced by melt impregnation with polycaprolactone (PCL), CAPA 686 manufactured by Solvay using a pair of internally heated nip rollers. The nip gap and pressure were adjusted to control the uniformity and weight of the coating. A coating weight of 0.80 gram PCL per gram of fabric was attained. The monofilament spacer fibres within the three-dimensional
- 20

knitted fabric cross one another to form overlapping 'X's'. Where they crossover each other they are bonded by the PCL, thereby increasing the integrity and compressive modulus of the impregnated fabric. Likewise, the multifilament fibres of the upper and lower surfaces of the 3D knit are readily impregnated by the PCL to form strong, thermosettable surfaces that are sufficiently robust to hold a suture. At this coating weight the monofilament spacer fibres were securely bonded whilst there remained some porosity in the knitted surfaces of the fabric.

10

On leaving the coating nip, a non-woven needle felt of thickness 0.75mm with a modulus of 0.02MPa and a void fraction of greater than 75% was bonded by the molten CAPA onto one surface of the 3D-knitted fabric to form the conformable zone.

15

The material was allowed to re-expand and cool to produce an articular zone (3D-knit) with a compressive modulus of 1.8MPa and a void fraction of greater than 75%. The composite was then allowed to cool and stiffen.

20

The reinforced fabric was cut into 8mm disc-shaped synthetic implants using a die cutter in a hydraulic press. The first surface of these implants was perforated using a fine tipped, heated probe to create permanent openings (7 x 1.8mm diameter) therethrough and into the reinforced 3D-knitted fabric, hence providing an access route to the centre of the fabric. The openings did not extend through the second surface of the implant.

25

Fig. 4.1 illustrates a synthetic implant according to the invention comprising a first surface (4.1), a second surface (4.2), a conformable zone (4.3) comprising non-woven felt, an articular zone (4.4),

30

comprising a 3D knit and openings (4.5) into the conformable zone providing access to the interior of the implant.

Particulate Synthesis

5

Partially cross-linked, sulphated carboxymethylcellulose (CMC) particulates were prepared as follows. All glassware, metal ware and partially crosslinked CMC powder (Akzo X181™) were dried in an oven (110°C; overnight). Akzo X181™ powder (4g), and dimethylformamide (DMF, 20ml) were placed in a flask, and sulphur trioxide-DMF complex (18.4g), added under an inert atmosphere. The mixture was stirred mechanically under a dry, inert atmosphere for approximately 4 hours at 50°C. After cooling, the reaction was quenched by adding of sufficient sodium bicarbonate to neutralise the excess sulphur trioxide-DMF complex (approx 20g in minimum water). The reaction mixture was transferred to dialysis tubing and dialysed against distilled water for approximately 48 hours. The solid contents of the tubing were then collected by filtration over Buchner apparatus and washed with water. The product was dried (under reduced pressure at 45°C) to give oval particulates with a median length of 150µm (shortest length 25µm; longest 500µm).

Culture equipment

25

Tube A: a 50 ml conical bottomed centrifuge tube with a 0.45µm filter cartridge (Eppendorf 0030099176™) and a screw cap bearing a 0.2µm filter (Fisher FDP 954 050X™). Freeze dried collagenase, (24mg; 276 U/ml) is supplied as a powder inside the tube on top of the 4.5mm filter.

30

Tube B: a standard 50ml conical bottomed centrifuge tube, (e.g. Falcon 352074™).

Bioreactor: a tube is employed being either a 15ml Fisherbrand
5 conical bottomed centrifuge tube, (Fisherbrand 05-539-5™), with a screw cap bearing a 0.2µm filter, (Falcon 3107™) or alternatively a 50ml conical bottomed centrifuge tube, (Falcon 352074™), and a screw cap bearing a 0.2µm filter, (Fisher FDP 954 050X™).

10 The base of the bioreactor is filled with a molten 4% agarose solution, (Sigma A-9045™) in DMEM, (Sigma D6429™). 2ml agarose solution was used with the 15ml tubes and 5ml with the 50ml tubes. The agar is allowed to cool and set to form a plug with the tubes held vertically. This plug is an optional feature which has the advantage of
15 providing material with which to exchange nutrients and waste products – a function which a flat container bottom cannot perform.

Insert means, comprising both funnel means and a scaffold support chamber, turned from high density polyethylene are inserted
20 into the bioreactor. Fig. 4.2 illustrates insert means which may be employed with the 15ml tubular bioreactor, in which, for example: a = 13.5mm; b = 7.5mm; c = 4mm; d = 3mm (the dimensions of the insert means used in larger tubes may be scaled accordingly).

25 A synthetic implant manufactured as described above was inserted (with conformable, non-woven layer uppermost) into the scaffold support chamber of the insert means and the scaffold/insert means assembly slid into the bioreactor such that it rested upon the agarose layer. The particulate filler material, (partially cross-linked, sulphated CMC; 350mg per ml of scaffold internal volume; 70mg for
30 the 8mm diameter scaffolds used with the smaller tubes), was added to

the incubation chamber (above the insert) and the bioreactor was capped.

Cell isolation

5

DMEM (12ml) was added to Tube A to reconstitute the collagenase. Autologous human serum, (4.8ml) and DMEM, (2.2ml) was added to the bioreactor to rehydrate the particulates and allow them to absorb cell attachment factors from the serum.

10

A 4mm cartilage biopsy was obtained from a non-load bearing portion of the joint, sliced with a scalpel and added to Tube A. The tube was then incubated for 16-24 hours at 37°C in a humidified atmosphere of 5%CO₂ (the 0.2µm filter in the lid permits gas exchange whilst ensuring sterility). The 4.5µm filter cartridge with the cells and a portion of the collagenase was then transferred to Tube B and centrifuged, (1000rpm; 5 min), to separate the isolated cells from the collagenase solution.

15

20

The isolated cells were resuspended in DMEM, (1ml) and transferred to the bioreactor.

25

The bioreactor was placed upon a slowly rotating mixer and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5%CO₂ for 7-10 days. Fig. 4.3 illustrates this phase of the method: the bioreactor (4.6) comprises insert means (4.7), within which is located a scaffold (4.8) held in the scaffold support chamber. Above the insert is the incubation chamber comprising cells suspended in DMEM (not shown) and particulates (4.9) to which the cells are to adhere. Note: the agar plug (4.10) is shown below the synthetic implant.

30

At the end of the culture period, the bioreactor was centrifuged, (500rpm; 5 min), aggregating the cell-covered particulate material into the void spaces of the synthetic implant to generate a hybrid implant (4.11), shown in Fig. 4.4.

5

Implantation

The base of the implant site was mechanically debrided to expose, abrade and recess the subchondral bone, whilst the cartilaginous periphery of the defect is cut back to healthy cartilage using sharp instruments. The medium was then aspirated from the bioreactor, the insert means and hybrid implant lifted out, the hybrid implant removed from the insert means and inverted. A periosteal flap was harvested from the tibia and sutured onto the robust upper surface of the articular zone (reinforced 3D knit) to provide a source of chondroprogenitor cells and a more lubricious articular surface. The hybrid implant was then press fitted into the defect site, flush with the surrounding cartilage. It was secured in position with sutures and bioresorbable pegs.

20

Example 4.2: Sulphated Intrasite

Synthesis and sterilisation of sulphated Intrasite gel (SX-CMC gel)

25 Methods

Intrasite powder (2g; oven dried, 110°C; 16 hours; Smith and Nephew), dimethylformamide (DMF, 10 ml; Aldrich) and sulphur trioxide-pyridine complex (9.2g; Aldrich), were stirred mechanically for 4 hours at 50°C. The reaction mixture was cooled and sodium bicarbonate (approx 10g in minimum water) added to neutralise the

30

excess sulphur trioxide-pyridine complex. The products were dialysed against distilled water, (2-7 days), freeze-dried and stored at 4°C. The material was resuspended in PBS, (100mg; 6.5 mg/ml), and sterilised by autoclaving at 121°C for 15 mins.

5

Results

The reaction typically yielded 1g sulphated material. Macroscopically the freeze-dried sulphated Intrasite was a flocculent, somewhat fibrous white material. It rehydrated readily in PBS to form a translucent suspension. The particles sedimented under gravity to produce a layer of gel and a clear supernatant. The microscopic appearance of the material is shown in Fig. 4.5.

15 Analysis of sulphated Intrasite

Methods

The chemical nature of the modified polymer was investigated by Raman spectroscopy, (Renishaw Raman microscope) or infrared spectroscopy, (Perkin-Elmer 1750 or Mattson Galaxy FTIRs) and the resulting spectra compared against published reference spectra. Sulphur content was determined by elemental analysis at an accredited laboratory, (Butterworth). The particle size distribution was determined using a Coulter Particle size analyser.

Alcian Blue (critical electrolyte concentration stain) was used to visualise the derivatised polymer. Alcian blue, (0.05g in 0.2M acetate buffer pH 5.8 plus MgCl₂ at 0.06M, 0.3M, 0.5M, 0.7M or 0.9M) was incubated with the polymer for 16 hours at room temperature, the

30

samples washed in PBS and viewed both macroscopically and by phase contrast microscopy.

Results

5

Fig. 4.6 shows representative spectra for the modified and unmodified materials. Sulphation was confirmed by the appearance of a distinct peak at 1280 μ m and by binding of alcian blue to the modified material in the presence of 0.9M MgCl₂ compared to < 0.3 M for the unmodified material. Particle size analysis suggested that 80% of the material consisted of particles between 162 and 923 μ m diameter, although this figure may have been artificially increased by particle clumping. Alcian blue CEC showed that whereas the unmodified Intracite bound alcian blue at MgCl₂ concentrations below 0.3M, (consistent with a weakly anionic material), the sulphated Intracite bound alcian blue at all MgCl₂ concentrations used including 0.9M. This finding indicates that the modified material is very strongly anionic, consistent with successful sulphation.

20 Routine analysis of sulphated Intracite

Method

The polyanionic nature of the autoclaved sulphated Intracite was routinely confirmed by diluting 100 μ l material with PBS, (900 μ l) and adding the histological dye Safranin O (0.1%; 20 μ l; 30 mins). The mixture was diluted to 20ml with PBS, centrifuged, (2500rpm; 5 min), the supernatant discarded and the dyed material resuspended in 20ml PBS.

30

Results

Polyanionic sulphated Intravite stained dark orange. Unmodified or expired material stained pale pink.

5 Adsorption of cell attachment proteins to sulphated Intravite

Method

The adsorption of cell attachment proteins onto sulphated Intravite particles was confirmed by immunocytochemistry. sulphated Intravite, (1ml; 6.5mg/ml in PBS), was washed three times in PBS, (10ml; centrifuged 2500rpm; 5 min), and incubated (16 hours; 4°C; with constant agitation), in either (i) 60µg/ml solutions of purified/recombinant cell adhesion factors, (plasma fibronectin, (Sigma), cellular fibronectin, (Sigma), fibronectin-EDA, (affinity purified), collagen VI (Chemicon International), (all in 2 ml in PBS)), or (ii) 60% foetal calf serum in PBS, (Helena Biosciences). BSA (60µg/ml in 2 ml PBS; Sigma) was used as a control.

20 The concentration of fibronectin in serum is approximately 100µg/ml. Consequently a 60% dilution gives approximately 60µg/ml fibronectin.

25 The coated material was washed three times with PBS and blocked by incubating in BSA (3%w/v in PBS; 1 hour; room temperature Sigma). Gels were then washed three times and incubated with primary antibody raised against the relevant binding material in 1ml PBS for 1 hour at 37°C. The antibodies used were mouse anti-fibronectin-EDA antibody, (50µg/ml; Oxford Biotechnologies), rabbit anti-fibronectin antibody (50µg/ml; Dako), 30 rabbit anti-vitronectin antibody (50µg/ml; Biogenesis), and Rabbit anti-

Collagen VI antibody (20µg/ml; Abcam). Non-immune rabbit IgG fraction (50µg/ml; Dako) was used as a control.

5 Samples were then washed three times in PBS. To visualise the rabbit antibody labelled samples, specimens were incubated with FITC conjugated swine anti-rabbit secondary antibody (1:100 dilution in PBS; 1 hour at 37°C; Dako). For detection of mouse anti-fibronectin-EDA antibodies a biotinylated rabbit anti-mouse secondary antibody was used (Dako), followed by washing, (three times in PBS) and detection using a streptavidin-FITC conjugate (Amersham Pharmacia Biotech), at 10 a 1:100 dilution in PBS for 1 hour at 37°C. Gel was then washed 3x with PBS. Small aliquots were then transferred onto glass slides, coverslipped and viewed using the Leica DM-RE confocal microscope using an ArKr laser exciting at 488nm.

15

Results

All the cell adhesion factors tested could be demonstrated to bind to the sulphated Intravite gel. Fig. 4.7 illustrates plasma fibronectin, 20 cellular fibronectin and fibronectin-EDA binding to sulphated Intravite. Fig. 4.8 illustrates collagen VI binding. Fig. 4.9 illustrates fibronectin and vitronectin binding following absorption from FCS. No staining occurred in control gel coated with BSA and gels incubated with non-immune rabbit IgG.

25

Cell attachment to sulphated Intravite and unmodified Intravite

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

125

Method

Serum-free DMEM was prepared by mixing DMEM, (500ml), penicillin and streptomycin (Sigma; 5ml); non essential amino acids, (Sigma 5ml) and L-glutamine, (Sigma; 5ml).

Sulphated and unmodified Intrasite was re-suspended in PBS, (6.5mg/ml) and sterilised by autoclaving at 121°C for 15 mins. The autoclaved material was washed three times with PBS, (centrifuged 2500rpm; 5 min), and resuspended in either PBS or 60% foetal calf serum (in PBS; Helena Biosciences) for 2 hours at 4°C.

The samples were then washed twice in PBS and resuspended in serum-free DMEM.

A confluent T175 flask of bone marrow stromal cells was rinsed in PBS and trypsinised, (Sigma). Suspended bone marrow stromal cells, (750k cells), PBS or FCS pre-treated sulphated Intrasite or untreated Intrasite were mixed in 20ml of serum-free DMEM and the cultures incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 1 hour to 14 days. To visualise any viable adherent cells, the cultures were treated with calcein AM (0.6µl /ml; 1mg/ml; 90 mins; Molecular Probes) and viewed using a Leica confocal microscope.

Results

Very few cells adhered to unmodified Intrasite gel, irrespective of whether it had been pre-treated with PBS or foetal calf serum (60%). Similarly, few cells adhered to sulphated Intrasite that had been pre-treated with PBS alone. In contrast, cells adhered readily to 60% FCS pre-treated sulphated Intrasite and spread upon its surface. Fig. 4.10

compares cell attachment to FCS pre-treated, unmodified Intrasite with cell attachment to FCS pre-treated sulphated Intrasite.

Conclusion

5

It was concluded that cell adhesion factors absorbed from serum onto the surface of the sulphated Intrasite could support cell attachment to this biomaterial.

10 Attachment of antibodies to sulphated Intrasite using of p-toluenesulphonylchloride (formerly known as 'p-tosyl chloride')

Different cell types are characterized by specific sets of cell surface molecules, (e.g. signal receptors, enzymes, structural components or surface bound signal molecules). Specific antibodies raised against these surface markers may be used to selectively bind one cell type and isolate it from a mixed population. The following methods describe how anti-Notch-1 antibody or anti-integrin β_1 , (antibodies that recognize epitopes expressed by superficial zone chondroprogenitor cells), maybe bound to sulphated Intrasite to create a chondroprogenitor cell binding material. The method is not specific to these antibodies and could be used to attach different antibodies to the particulate biomaterial.

25 Sulphated Intrasite™ was suspended in dry pyridine, (35% w/w), mixed with a slight molar excess of tosyl chloride, (10%w/w) and stirred for 16 hours at 8°C under an inert atmosphere. The activated gel was collected by filtration, washed thoroughly and a homogeneous suspension prepared by vortexing the material for 1-2 minutes. Anti-
30 Notch-1 antibody, (5µg; Santa Cruz) or anti- β_1 integrin, was added and the suspension vortexed for 1-2 minutes. The suspension was

incubated for 10 minutes at 37°C with slow tilt rotation before BSA, (0.5% w/v final concentration) was added to terminate the reaction. The reaction mixture was then returned to the rotator and incubated for a further 16 - 24 hours at 37°C.

5

Wash the antibody derivatised sulphated Intrasite™ was washed twice in acetate buffer, (0.1M; pH 4.0; 5 minutes at 4°C) and once in PBS containing 0.1% BSA for 4 hours at 37°C. The material was washed in acetate buffer, (5 minutes; 4°C), and stored at 4°C.

10

Use of alternative polyanionic, polysaccharide materials to bind cell attachment factors and support cell adhesion

Heparin sepharose beads (Pharmacia) consist of a cross-linked polysaccharide material, 'Sephacrose', (that does not bind cells or proteins), covalently linked to a biodegradable polyanionic material, heparin. Such beads are widely used in biochemistry to purify proteins from mixtures of biological molecules. They are not generally used in cell culture. It was hypothesised that heparin sepharose beads would not bind cells directly, but that they would bind cell adhesion factors and, once coated with cell adhesion factors, would support cell attachment.

Method

25

Heparin sepharose beads, (200mg; Pharmacia) were rehydrated with PBS, (40ml; 15 min at 37°C), washed twice with PBS and sterilised by autoclaving at 110°C for 30 minutes. The heparin sepharose beads, (10mg) were pre-treated with either 20mg/ml BSA, 80mg/ml BSA, 10% FCS, 40% FCS or PBS alone (20ml total volume). The beads were allowed to sediment for 15 minutes, 15ml supernatant removed and

30

replaced with 400×10^3 bone marrow stromal cells in serum-free DMEM (15ml). The cultures were mixed and incubated at 37°C for 30 minutes to 3 hours. Samples (100µl) were transferred to the wells of a non-tissue culture treated 96 well plate (Greiner) and viewed with an
5 inverted phase contrast microscope.

The experiment was repeated using collagen IV, (2.5 and 10µg/ml) and foetal calf serum (40%) to coat the heparin sepharose beads (25mg). Quadruplicate samples of the cell seeded, coated
10 beads were viewed by phase contrast microscopy after a 6 hour incubation at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and the number of adherent cells per bead counted.

In addition, samples of bone marrow stromal cell seeded, FCS
15 pre-treated heparin sepharose beads were pre-pared as above and cultured in DMEM/10% FCS for 1 - 22 days and viewed by phase contrast microscopy.

Results and discussion

20 Little or no cell adhesion was observed with any of the BSA or FCS pre-treated samples of heparin Sepharose beads after 30 minutes. After 3 hours however, cell adhesion and cell spreading had occurred on the 40% FCS treated heparin sepharose beads but not
25 upon either of the BSA treated samples, the 10% FCS pre-treated samples or the samples pre-treated with PBS alone. Some cell clumping was observed amongst the unattached cells, indicating that although they had not adhered to the BSA coated beads, the 10%FCS coated beads or the beads exposed to PBS alone, they were able to
30 adhere to each other.

Counting the number of cells attached to PBS, collagen IV and FCS pre-treated heparin sepharose beads showed that the number of bound cells per bead was (mean $\pm$ SEM): PBS pre-treated 0.51 $\pm$ 0.09 cells per bead; Collagen IV (2.5 μ g/ml) pre-treated 3.45 $\pm$ 0.19 cells per bead (p<0.001); Collagen IV (10 μ g/ml) pre-treated 3.23 $\pm$ 0.22 cells per bead (p<0.001); and 40% FCS pre-treated 3.17 $\pm$ 0.42 cells per bead (p<0.001). It was concluded that heparin sepharose beads could absorb collagen IV or cell adhesion molecules present in FCS and, thereafter, support cell adhesion. This was not a non-specific property of proteins because BSA could not coat the beads nor support cell adhesion.

If samples of cells and FCS pre-treated heparin sepharose beads were cultured for 6-10 days they formed macroscopic aggregates of cells, beads and extracellular matrix components. If the cell-seeded aggregates were cultured for longer periods, (i.e. 14 - 22 days), it was observed that the cell/material aggregates shrank and expelled the beads to leave small cell clusters. Histological staining with Safranin O showed that this occurred when the heparin coating degraded, presumably because this exposed the non-cell adherent sepharose and released the cell attachment factors, thereby terminating cell attachment to the beads. It was decided that whilst this observation suggested a route to a 'switchable' cell-binding material, it was not an ideal property for a cartilage implant. It was concluded that a slowly degrading or non-biodegradable polysaccharide material with covalently linked anionic functional groups would be preferable to heparin sepharose.

Dextran beaded sulphated beads (Sigma) are a spherical, cross-linked polysaccharide particulate materials with covalently bound

anionic groups. The material was coated with cell adhesion factors and its ability to support cell attachment and growth assessed.

Dextran sulphate beads, (667mg; Sigma), were rehydrated in
5 26.7ml PBS for 30 minutes, autoclaved, (121°C; 15 minutes) and
allowed to cool. The sterile material was washed three times with PBS
and then incubated in either 60% FCS, (in 66.7ml total) or PBS,
(66.7ml) for 2 hours at 37°C on the Denley mixer. The beads were
allowed to settle and washed three times in serum free DMEM to
10 produce ~ 17ml of 40mg/ml 60%FCS pre-treated dextran sulphate
beads.

60%FCS pre-treated dextran sulphate beads, (30mg) or PBS pre-
treated dextran sulphate beads (30mg) were mixed with bone marrow
15 stromal cells, (200k cells), in DMEM supplemented with Hams F-12
(10%), FCS (10%), and ascorbate 2 phosphate, (50µg/ml; 5ml).
Cultures were incubated at 37°C for 0 - 22 days.

Results

20

Bone marrow stromal cells adhered readily to the surfaces of
60%FCS pre-treated dextran sulphate beads but did not attach to the
surfaces of PBS pre-treated dextran sulphate beads.

Cell

1. An isolated population of superficial zone chondroprogenitor cells.
2. An isolated population of superficial zone chondroprogenitor cells as claimed in 1 in which the cells are mammalian.
3. An isolated population of superficial zone chondroprogenitor cells as claimed in 1 in which the cells are human.
4. A composition comprising an isolated population of superficial zone chondroprogenitor cells.
5. A process of isolating a population of superficial zone chondroprogenitor cells comprising obtaining an enriched population from the superficial zone of cartilage of a mammal.
6. A process as claimed in claim 5 in which the mammal is human.
7. A method for treating a patient comprising administering superficial zone chondroprogenitor cells.
8. A method for the treatment of diseases or clinical conditions characterised by cartilage deficiency, the method comprising administering live superficial zone chondroprogenitor cells.
9. Superficial zone chondroprogenitor cells for use in treatment of diseases or clinical conditions featuring or characterised by cartilage deficiency.
10. A method of producing a medicament containing live superficial zone chondroprogenitor cells for use in treatment of diseases or clinical conditions featuring or characterised by cartilage deficiency.
11. A method of growing cartilage comprising administering superficial zone chondroprogenitor cells.
12. A method as claimed in claim 7 in which the method is in vitro.

13. A method of repairing cartilage defects by providing superficial zone chondroprogenitor cells which proliferate to repopulate the defect and this differentiate to form mature cartilage forming cells.
14. A method of repairing cartilage defects as claimed in claim 13 in which the mature cartilage forming cells form articular cartilage.

Cell Structure

15. An implant suitable for repair of a cartilage defect comprising a first surface suitable to be located at or near a bone-cartilage interface and a second surface suitable for location contiguous with or near to an exposed articular surface in which the implant further comprises superficial zone chondroprogenitor cells.
16. An implant as claimed in claim 15 in which the implant comprises a biocompatible scaffold.
17. An implant as claimed in claim 15 in which the distance between the first and second surfaces is d_1 , wherein the implant comprises a greater concentration of superficial zone chondroprogenitor cells to a depth of d_2 , from the second surface, than in the remaining depth of implant, where $d_2/d_1 < 1$.
18. An implant as claimed in claim 17 in which $d_2/d_1 < 0.5$.
19. An implant as claimed in claim 17 in which $d_2/d_1 < 0.3$.
20. An implant as claimed in claim 17 in which $d_2/d_1 < 0.2$.
21. An implant as claimed in claim 16 in which the biocompatible scaffold comprises chondroprogenitor binding material.
22. An implant as claimed in claim 17 in which the chondroprogenitor binding material is selected from the group consisting of:
fibronectin, type IV collagen, anti-Notch antibody, anti integrin β_1 antibody.

23. An implant as claimed in claim 22 in which the chondroprogenitor binding material is fibronectin and in which the fibronectin is selected from the group consisting of: cellular fibronectin, plasma fibronectin, cellular fibronectin, fibronectin Extra Domain A (EDA).
24. An implant as claimed in claim 17 in which the superficial zone chondroprogenitor cells are concentrated, to have a greater concentration of superficial zone chondroprogenitor cells to a depth of d_2 .
25. An implant as claimed in claim 25 in which the concentration of the superficial zone chondroprogenitor cells is done by using a range of techniques based upon:
 - (i) the cells' buoyant density or sedimentation rate, (Ficol gradients or counter current elutriation);
 - (ii) antibody binding to specific cell-surface epitopes, (via fluorescent cell sorting, attachment to magnetic beads or complement mediated cell lysis);
 - (iii) differential adhesion to particular substrates;
 - (iv) selective culture media or culture conditions which favour the growth of one cell type rather than another, or
 - (v) other physical properties of the cells, e.g. their size, granularity or electrical capacitance.
26. An implant as claimed in claim 15 or 17 which comprises a poly-anionic particular gel.
27. An implant as claimed in claim 26 in which the poly-anionic particular gel is sulphated Intrasite™.
28. An implant as claimed in claim 15 in which the implant comprises a plurality of layers
29. An implant as claimed in claim 15 in which the implant comprises a microcarrier bead or beads.

30. An implant as claimed in any one of claims 15 to 28 in which the implant comprises bioresorbable materials.
31. An implant as claimed in any one of claims 15 to 28 in which the implant comprises non-resorbable materials.
32. An implant as claimed in any one of claims 15 to 30 in which the implant comprises a reinforcing component.
33. An implant as claimed in claims 21 or 22 in which the chondroprogenitor binding material is at or near to the second surface of the implant.
34. A method of producing an implant comprising the steps of:
locating superficial zone chondroprogenitor cells in a higher concentration near to a second surface of the implant than to a first surface of the implant in which the first surface is at or near a bone-cartilage interface and the second surface is suitable to be located at or near an exposed articular surface.
35. An implant as claimed in claim 33 in which the distance between the first and second surfaces is d_1 wherein the implant comprises the chondroprogenitor binding material to a depth of d_2 from the second surface, where $d_2/d_1 < 1$.

Structure only

36. An implant suitable for repair of a cartilage defect comprising a first surface suitable to be located at, or near, a bone-cartilage interface and a second surface suitable for locating contiguous with or near to an exposed articular surface such that the implant further comprises a higher concentration of immature chondroprogenitor cells at or near to the articular surface than at the bone-cartilage interface.
37. An implant as claimed in claim 36 in which the distance between the first and second surfaces is d_1 , and wherein the implant has a higher

concentration of immature chondroprogenitor cells to a depth of d_2 from the second surface where $d_2/d_1 < 1$.

38. An implant as claimed in claim 36 in which $d_2/d_1 < 0.5$.
39. An implant as claimed in claim 36 in which $d_2/d_1 < 0.3$.
40. An implant as claimed in claim 36 in which $d_2/d_1 < 0.2$.
41. An implant as claimed in any one of claims 36 to 40 in which comprises a biocompatible scaffold.
42. An implant as claimed in any one of claims 36 to 40 in which the immature chondroprogenitor cells comprise bone marrow stromal cells.
43. An implant as claimed in any one of claims 36 to 40 in which the immature chondroprogenitor cells comprise superficial zone chondroprogenitor cells.
44. An implant as claimed in any one of claims 36 to 43 in which comprises a chondroprogenitor binding material.
45. An implant as claimed in claim 44 in which the chondroprogenitor binding material is selected from the group consisting of:
fibronectin, anti-Notch antibody, anti integrin β_1 antibody.
46. An implant as claimed in claim 45 in which the chondroprogenitor binding material is fibronectin and in which the fibronectin is selected from the group: plasma fibronectin, cellular fibronectin, fibronectin-EDA.
47. An implant as claimed in claim 36 in which the implant is a plurality of layers.
48. An implant as claimed in claim 36 in which comprises bioresorbable materials.
49. An implant as claimed in claim 36 in which comprises non-resorbable materials.

50. An implant as claimed in claim 36 in which comprises a reinforcing component.
51. An implant as claimed in claim 36 in which comprises a scaffold.
52. An implant as claimed in claim 51 in which the scaffold is a poly-anionic particulate.
53. An implant as claimed in claim 52 in which the poly-anionic particulate is sulphated Intracite™.
54. A method of repairing cartilage defects by positioning chondroprogenitor cells near to, or in contact with, or in communication with a device comprising a first surface and a second surface, opposite each other in which the device comprises a higher concentration of immature chondroprogenitor cells at or near to the second surface, in which the chondroprogenitor cells proliferate to repopulate the defect and then differentiate to form mature cartilage forming cells.
55. A method as claimed in claim 54 in which the mature cartilage forming cells form articular cartilage.
56. A method of promoting differentiation of chondroprogenitor cells by positioning the chondroprogenitor cells near to, or in contact with, or in communication with a device comprising a first surface and a second surface, opposite each other in which the device comprises a higher concentration of immature chondroprogenitor cells at or near to the second surface.
57. A method of promoting chondrogenesis by positioning a chondroprogenitor cell near to, or in contact with, or in communication with a device comprising a first surface and a second surface opposite each other in which the device comprises a higher concentration of immature chondroprogenitor cells at or near to the second surface.

58. A method as claimed in any one of claims 54 to 57 in which the immature chondroprogenitor cells comprise superficial zone chondroprogenitor cells.
59. A method as claimed in claim 54, 55, 56 or 57 in which the immature chondroprogenitor cells comprise bone marrow stromal cells.
60. A method as claimed in claim 56 or 57 which is in vitro.
61. An implant for repair of a cartilage defect, having a first surface suitable to be located at or near a bone-cartilage interface and a second surface suitable for location contiguous with or near to an exposed articular surface, such that the distance between the first and second surfaces is d_1 , wherein the implant comprises a biocompatible scaffold and a chondroprogenitor cell-binding material to a depth, d_2 , from the second surface of the implant, where $d_2/d_1 < 1$.
62. An implant for repair of a cartilage defect, as claimed in claim 61, wherein the implant comprises a biocompatible scaffold and a substance capable of absorbing a chondroprogenitor cell-binding material to a depth, d_2 , from the second surface of the implant, where $d_2/d_1 < 1$.
63. An implant as claimed in either of claims 61 or 62 in which the chondroprogenitor cell-binding material comprises a material chosen from the group consisting of: fibronectin, anti-Notch antibody or anti integrin β_1 antibody.
64. An implant as claimed in claim 63 in which the chondroprogenitor cell-binding material is fibronectin and in which the fibronectin is selected from the group: plasma fibronectin, cellular fibronectin, fibronectin-EDA.
65. An implant as claimed in any one of claims 61 to 63 in which the chondroprogenitor cell-binding material binds mesenchymal precursor cells.

66. An implant as claimed in any one of claims 61 to 65 in which the chondroprogenitor cell-binding material binds superficial zone chondroprogenitor cells.
67. An implant as claimed in any one of claims 61 to 66 in which the implant comprises one layer.
68. An implant as claimed in any one of claims 61 to 67 in which the implant comprises a plurality of layers.
69. An implant as claimed in any one of claims 61 to 64 in which the implant is in the form of a microcarrier bead or beads.
70. An implant as claimed in any one of claims 61 to 69 in which the implant comprises bioresorbable materials.
71. An implant as claimed in any one of claims 61 to 66 in which the implant comprises non-resorbable materials.
72. An implant as claimed in any one of claims 61 to 71 in which the implant comprises a reinforcing component.
73. An implant as claimed in any one of claim 61 to 71 in which the chondroprogenitor cell-binding material is comprised within a layer coated on the surface of a scaffold, or comprised within the scaffold itself, or both.
74. An implant as claimed in claim 61 in which $d_2/d_1 < 0.5$.
75. An implant as claimed in claim 61 in which $d_2/d_1 < 0.3$.
76. An implant as claimed in claim 61 in which $d_2/d_1 < 0.2$.

Binding Material

77. An implant for repair of a cartilage defect comprising a chondroprogenitor cell-binding material.

78. An implant as claimed in claim 77 in which the chondroprogenitor cell-binding material comprises a material chosen from the group consisting of: fibronectin, type IV collagen, anti-Notch antibody or anti-integrin β_1 antibody.
79. An implant as claimed in claim 77 in which the chondroprogenitor cell-binding material comprises fibronectin and in which the fibronectin is selected from the group: plasma fibronectin, cellular fibronectin, fibronectin-EDA.
80. An implant as claimed in claim 77 or 78 in which the chondroprogenitor cell is a mesenchymal precursor cell.
81. An implant as claimed in claim 77, 78 or 79 in which the chondroprogenitor cell is a superficial zone chondroprogenitor cell.
82. An implant as claimed in any one of claims 77 to 81 in which comprises bioresorbable material.
83. An implant as claimed in any one of claims 77 to 81 in which comprises non-bioresorbable material.
84. An implant as claimed in any one of claims 77 to 82 in which further comprises a reinforcing compound.
85. An implant as claimed in any one of claims 77 to 84 in which the chondroprogenitor cell-binding material is comprised within a coated layer of scaffold, or comprised within the scaffold itself, or both.

Intrasite

86. A synthetic implant for repair of a cartilage defect, the implant having a first surface suitable for location at or near a bone-cartilage interface and a second surface suitable for location contiguous with or near to an exposed articular surface, wherein the implant comprises:
- a. a biocompatible scaffold and, linked thereto or comprised therewithin,

- b. a conformable zone extending from the first surface towards the second surface.
87. A synthetic implant as claimed in claim 86 in which the implant has a lower compressive modulus than the tissue it is intended to be placed in contact with an implantation.
88. A synthetic as claimed in claim 86 in which the compressive modulus of the synthetic implant increases in a direction moving from the first to the second surface.
89. A synthetic implant as claimed in any one of claims 86, 87 or 88 in which the compressive modulus of the conformable zone is less than 1.0MPa.
90. A synthetic implant as claimed in any one of claims 86, 87, 88 or 89 in which further comprises an articular zone extending from the second surface to the first surface.
91. A synthetic as claimed in claim 90 in which the articular zone has a compressive modulus greater than 1.0MPa.
92. A synthetic implant as claimed in any one of claims 86 to 90 in which further comprises a material selected from the group:
3 dimensional woven fabric, 3 dimensional knitted material, a fleece, a sponge, a foam or particulates.
93. A synthetic implant as claimed in any one of claims 86 to 92 which comprises bioresorbable materials.
94. A synthetic implant as claimed in claim 86 in which comprises poly(lactic acid).
95. A synthetic implant as claimed in claim 90 in which the conformable zone and the articular zone are made of different materials.
96. A synthetic implant for repair of a cartilage defect, the implant having a first surface suitable for location at or near a bone-cartilage interface and

- a second surface suitable for location contiguous with or near to an exposed articular surface wherein the implant comprises a scaffold in which the scaffold comprises a conformable zone and an articular zone, in which the articular zone extends from the second surface towards the first surface to meet the conformable zone, which extends from the first surface towards the second surface.
97. A synthetic implant as claimed in claims 86 to 95 in which further comprises a bioactive material.
98. A synthetic implant as claimed in claims 86 to 95 in which is seeded with cells.
99. A synthetic implant as claimed in claim 86 in which comprises a scaffold.
100. A synthetic implant as claimed in claim 99 in which the scaffold is a poly-anionic particulate gel.
101. A synthetic implant as claimed in claim 100 in which the poly-anionic particulate gel is sulphated Intrasite™.
102. A method of manufacturing a cell-seeded synthetic implant in which the implant has a first surface suitable for location at or near a bone-cartilage interface and a second surface suitable for location contiguous with or near to an exposed articular surface wherein the implant comprises a biocompatible scaffold and, linked thereto or comprised therewithin a conformable zone extending from the first surface towards the second surface., comprising the step:
- a. bringing cells into contact with particulates such that cells adhere to the surface of the particulates,
 - b. then introducing cell coated particulates into the scaffold.
103. A method of manufacturing a cell-seeded synthetic implant in which the implant has a first surface suitable for location at or near a bone-cartilage interface and a second surface suitable for location contiguous with or near to an exposed articular surface wherein the implant

comprises a scaffold in which the scaffold comprises a conformable zone and an articular zone, in which the articular zone extends from the second surface towards the first surface to meet the conformable zone, which extends from the first surface towards the second surface comprising the step:

- a. bringing cells into contact with particulates such that cells adhere to the surface of particulates,
- b. then introducing cell coated particulates into the scaffold.

104. A bioreactor comprising an incubation chamber suitable for incubating cell-seeded particulates and a scaffold support chamber suitable for supporting scaffold means, of diameter d_1 , wherein either

- a. the diameter of the incubation chamber, d_2 , diminishes as it approaches the scaffold support chamber so that it meets the scaffold support chamber at a point where $d_2 = d_1$, or
- b. the incubation chamber and the scaffold support chamber are connected by funnel means which has diameter, d_2 , at the end contiguous with the incubation chamber, diminishing to diameter, d_1 , at the end contiguous with scaffold support chamber.

105. A bioreactor as claimed in 104 in which the incubation chamber is tubular in shape.

106. A bioreactor as claimed in claims 104 or 105 in which the funnel means and scaffold support chamber may be integrally comprised within a carrier, the carrier suitable for insertion into the bioreactor.

107. A method for manufacturing a bioreactor having a scaffold with cell-seeded particulates comprising:

- a. disposing the scaffold within a scaffold support chamber of the bioreactor,
- b. introducing cell-seeded particulates into the incubation chamber of the bioreactor,

- c. agitating the bioreactor under appropriate conditions, such as temperature, humidity, pH and nutrients, for an appropriate period of time to effect sufficient incubation,
- d. centrifuging the bioreactor to aggregate the cell-seeded particulates with the scaffold, and
- e. removing the scaffold comprising the cell-seeded particulates from the scaffold support chamber of the bioreactor.

Binding Materials Mature Cells

- 108. An implant for repair of a cartilage defect in which comprises a mature chondroprogenitor cell-binding material.
- 109. An implant as claimed in claim 108 in which the mature chondroprogenitor cell-binding material comprises a material chosen from the group consisting of: type I collagen, type II collagen, type VI collagen, vitronectin.
- 110. An implant as claimed in claims 108 or 109 in which comprises bioresorbable material.
- 111. An implant as claimed in claims 108 or 109 in which comprises non-bioresorbable material.
- 112. An implant as claimed in any one of claims 108 or 111 in which comprises a reinforcing compound.
- 113. An implant as claimed in any one of claims 108 or 111 in which comprises a scaffold.
- 114. An implant as claimed in claim 113 in which the scaffold comprises a poly-anionic particulate gel.
- 115. An implant as claimed in claim 114 in which the poly-anionic particulate gel is sulphated Intrasite gel.

116. An implant as claimed in any one of claims 77 to 82 in which comprises a scaffold.
117. An implant as claimed in claim 116 in which the scaffold comprises a poly-anionic particulate gel.
118. An implant as claimed in claim 117 in which the poly-anionic particulate gel is sulphated Intrasite™.
119. An implant as claimed in any one of claims 116 to 118 in which the scaffold comprises a chondroprogenitor cell-binding material.
120. An implant as claimed in any one of claims 15 to 33 and 35 to 53 in which the implant is housed in a mechanically robust scaffold.
121. An implant as claimed in claim 120 in which the mechanically robust scaffold has a compressive modulus greater than 1.0MPa.
122. An implant as claimed in claims 120 or 121 in which the scaffold is of a weaker material than the surrounding tissue for which it will be implicated in, at or near to.
123. An implant as claimed in any ones of claims 15 to 35, 36 to 53 or 120 to 122 which has a conformable zone.
124. An implant as claimed in claim 37 in which also comprises third and fourth surfaces in which the distance between the third and fourth surfaces is d_3 , and wherein the implant has a higher concentration of immature chondroprogenitor cells to a depth of d_4 from the third surface for at least a partial length of the third surface in which $d_4/d_3 < 1$.
125. An implant as claimed in claim 37 in which also comprises third and fourth surfaces in which the distance between the third and fourth surfaces is d_3 and wherein the implant has a higher concentration of immature chondroprogenitor cells to a depth of d_5 from the fourth surface for at least a partial length of the fourth surface in which $d_5/d_3 < 1$.

126. An implant as claimed in claim 124 or 125 in which the immature chondroprogenitor cells comprise either superficial zone chondroprogenitor cells or bone marrow stromal cells or both.

127. An implant as claimed in claim 124 in which $d_4/d_3 < 0.3$.

128. An implant as claimed in claim 124 in which $d_5/d_3 < 0.3$.

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

1/35

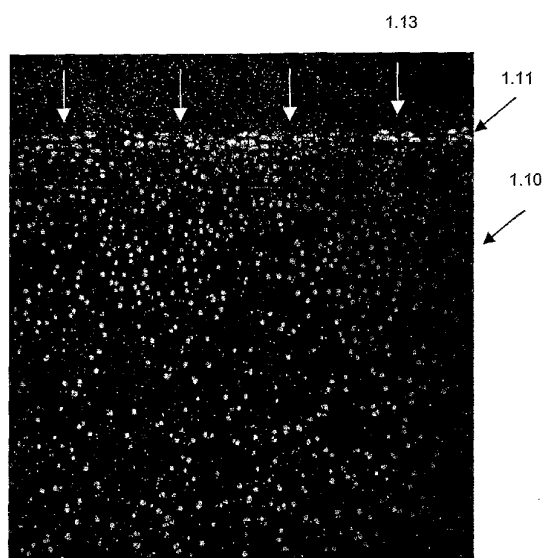


Fig. 1:1

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

2/35

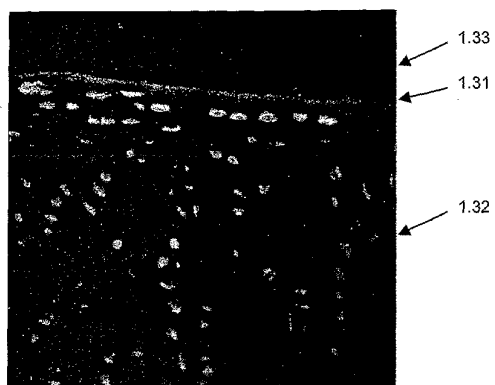


Fig. 1.3

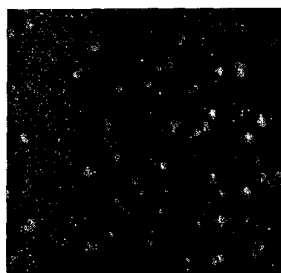


Fig. 1.4

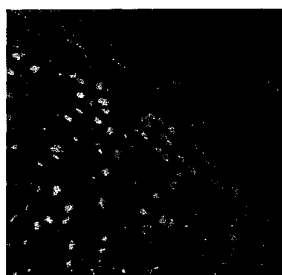


Fig. 1.5

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

3/35

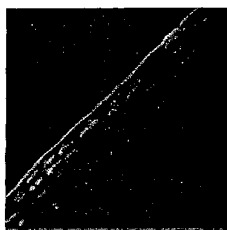


Fig. 1.6

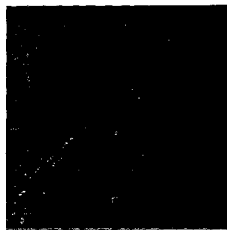


Fig. 1.7

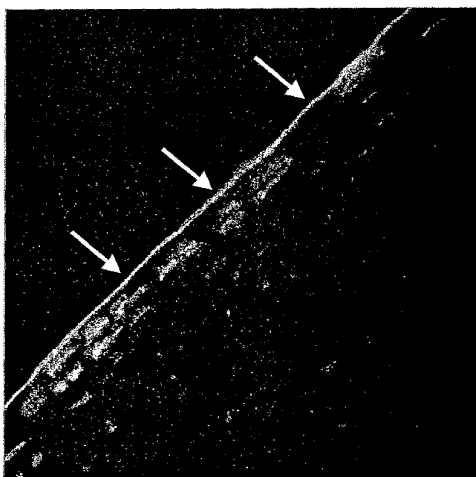


Fig. 1.8

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

4/35

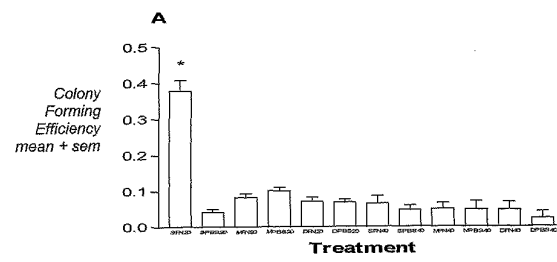


Fig. 1.9

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

5/35

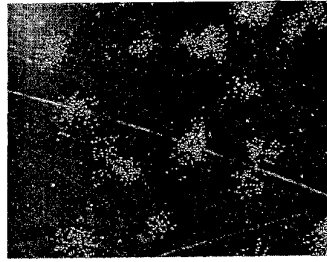


Fig. 1.10

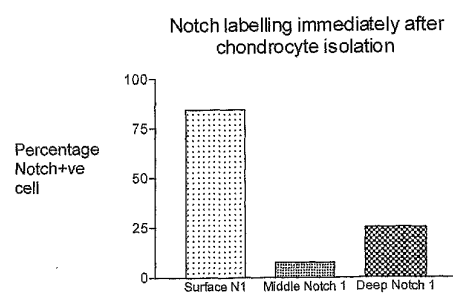


Fig. 1.11

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

6/35

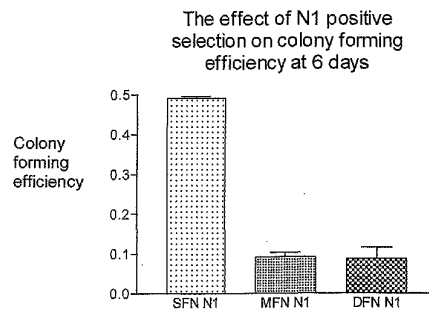


Fig. 1.12

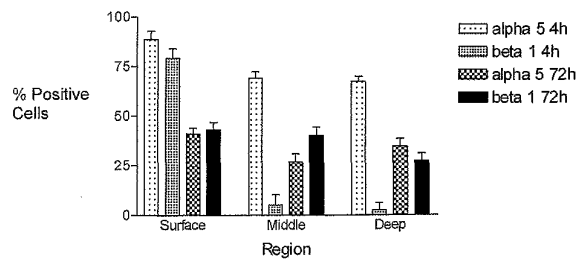


Fig. 1.13

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

7/35

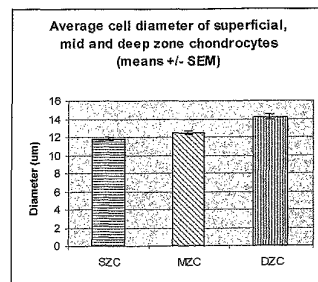


Fig. 1.14

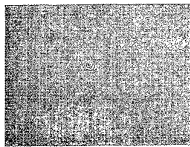


Fig. 1.15a

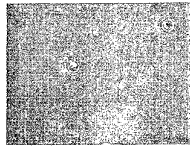


Fig. 1.15b

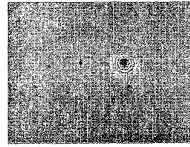


Fig. 1.15c



Fig. 1.16a



Fig. 1.16b

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

8/35

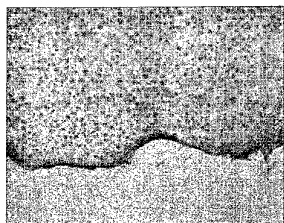


Fig. 1.17

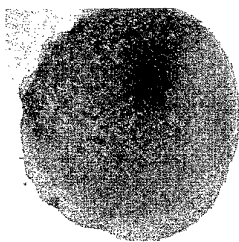


Fig. 1.18

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

9/35

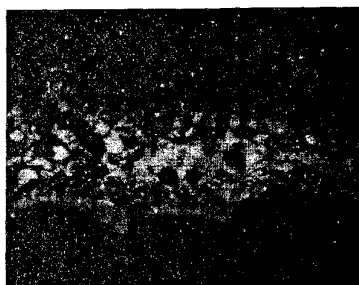


Fig. 1.19



Fig. 1.20

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

10/35

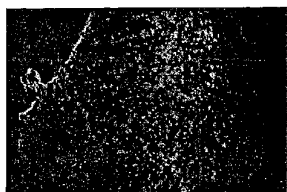


Fig. 1.21

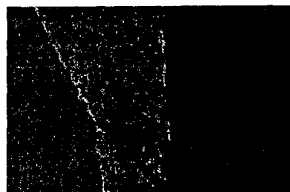


Fig. 1.22

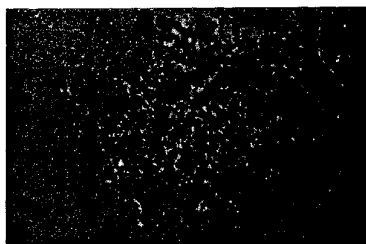


Fig. 1.23

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

11/35

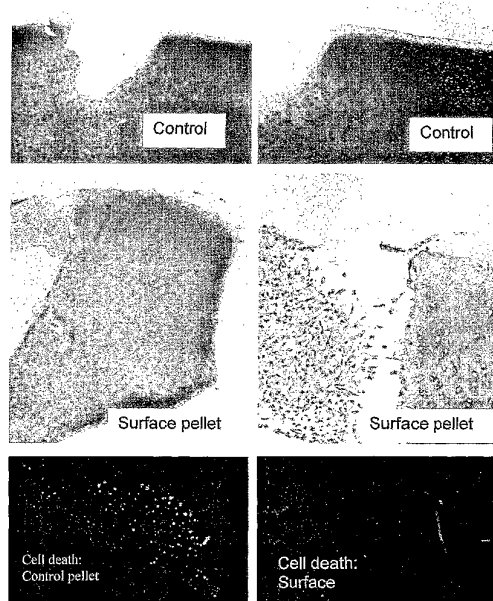


Fig. 1.24

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

12/35

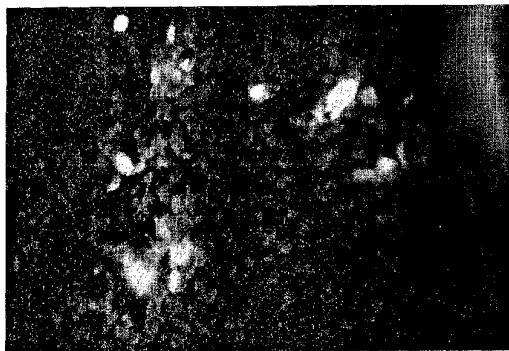


Fig. 1.25

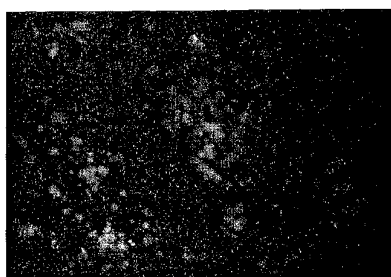


Fig. 1.26

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

13/35

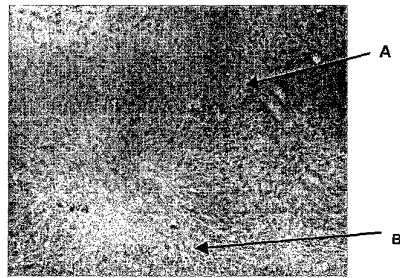


Fig. 1.27

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

14/35



Fig. 2.1



Fig. 2.2

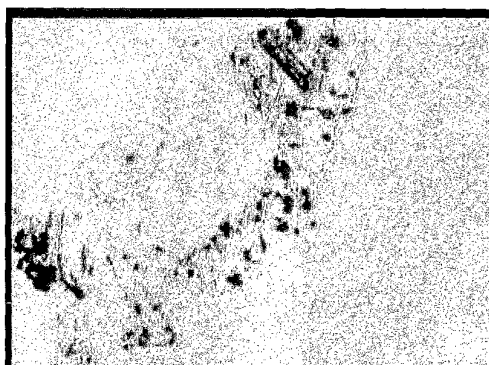


Fig. 2.3

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

15/35

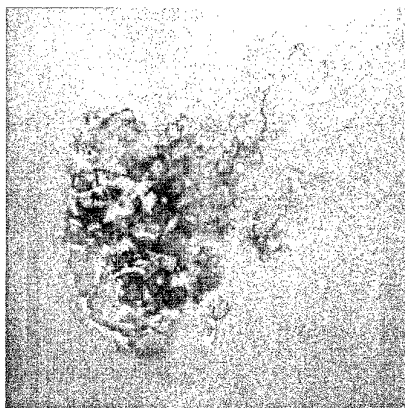


Fig. 2.4

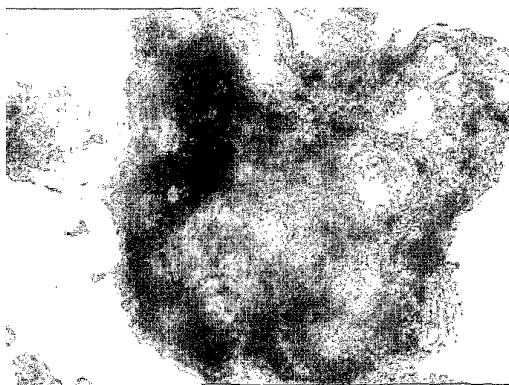


Fig.2.5

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

16/35

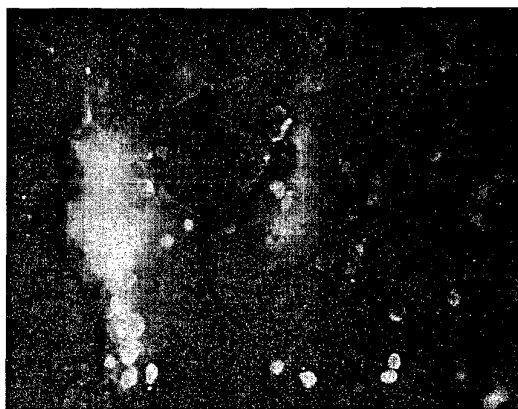


Fig. 2.6



Fig. 2.7

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

17/35

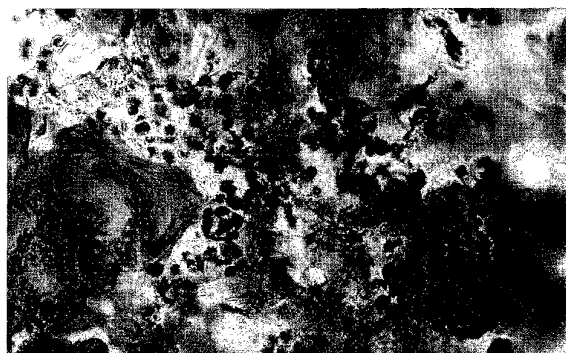


Fig. 2.8

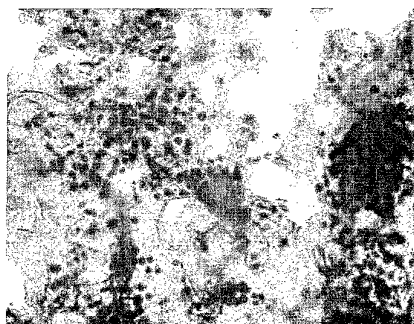


Fig. 2.9a

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

18/35

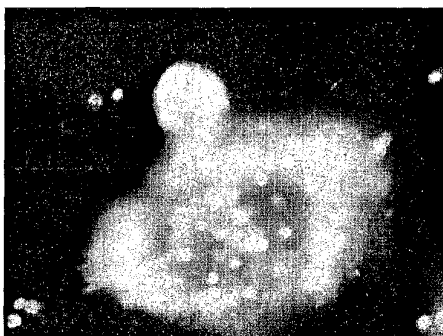


Fig. 2.9b

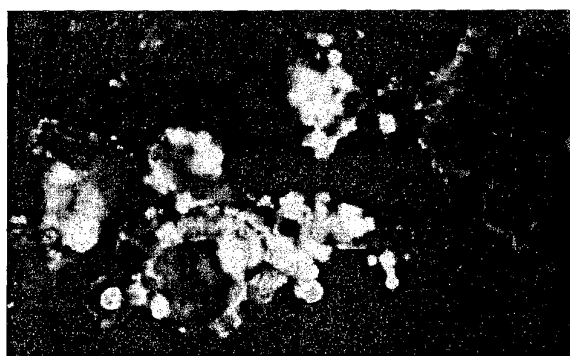


Fig. 2.10

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

19/35

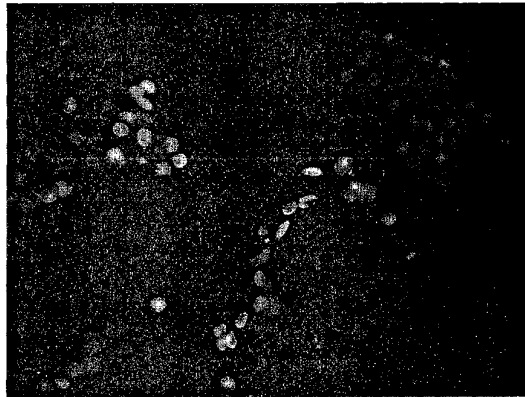


Fig. 2.11

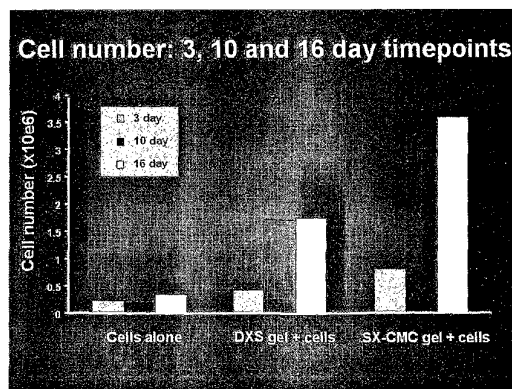


Fig. 2.12

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

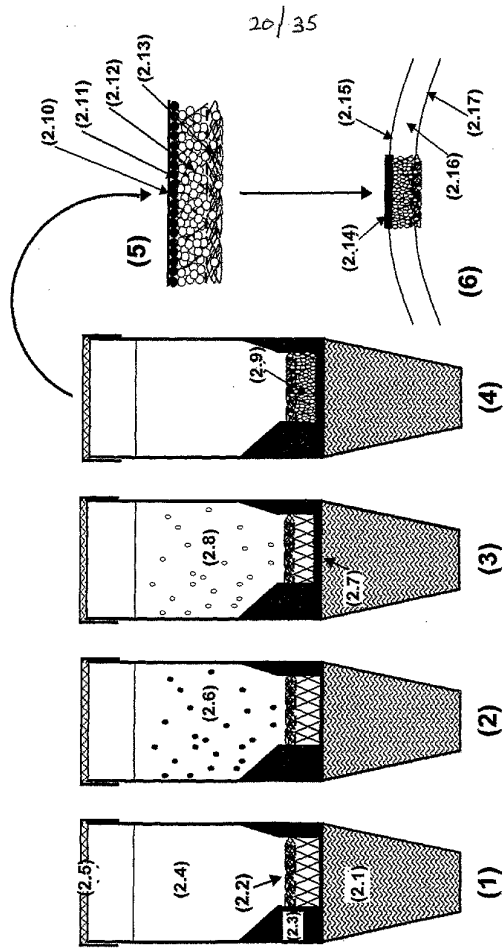


Fig. 2.13

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

21/35

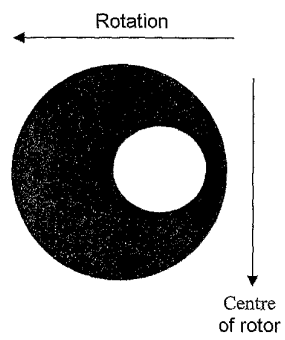


Fig. 2.14



Fig. 2.15

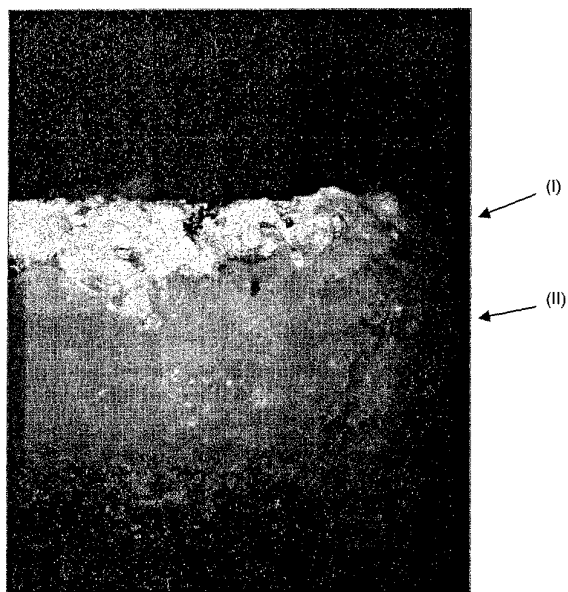


Fig. 2.16

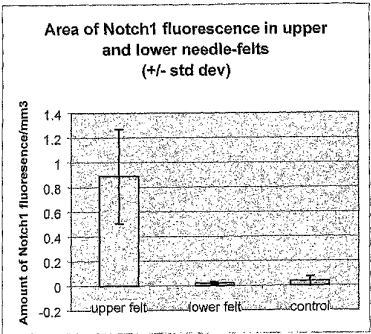


Fig. 2.17

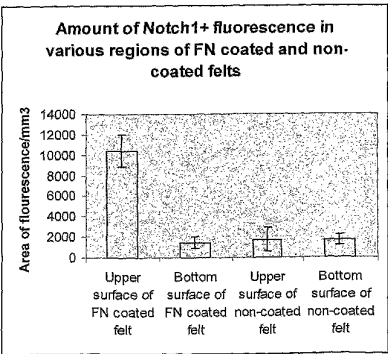


Fig. 2.18

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

24/35



Fig. 3.1a

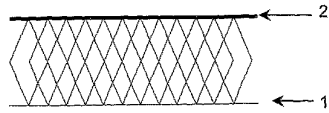


Fig. 3.1b

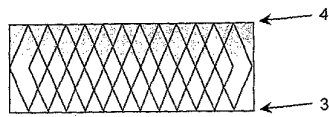


Fig. 3.1c

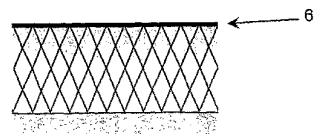
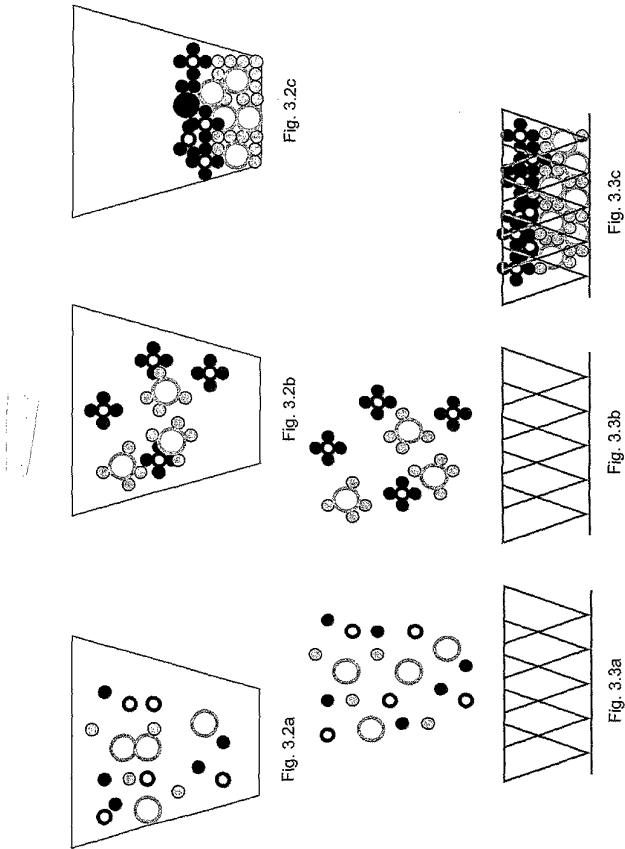


Fig. 3.1d



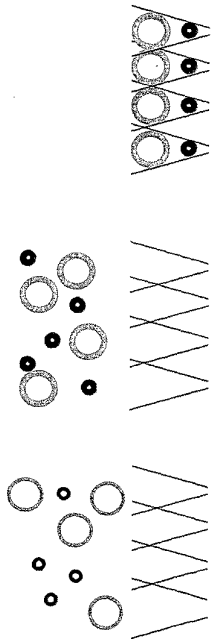


Fig. 3.4c

Fig. 3.4b

Fig. 3.4a

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

27/35

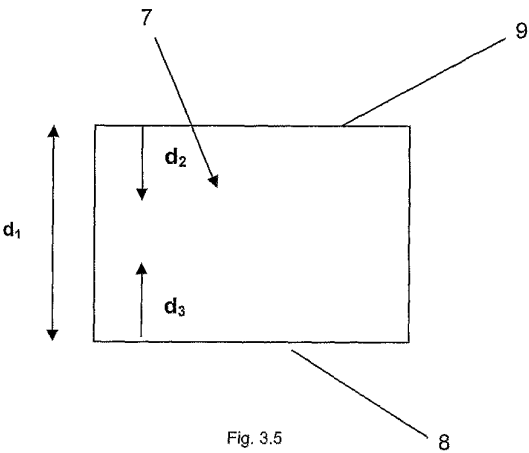


Fig. 3.5

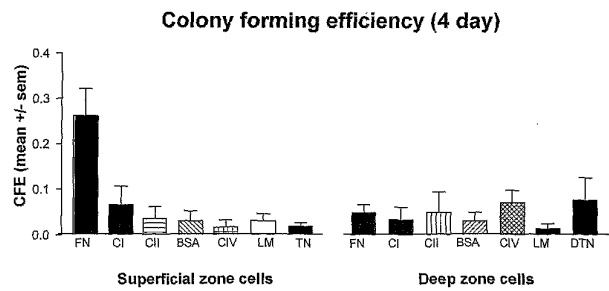


Fig. 3.6

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

28/35

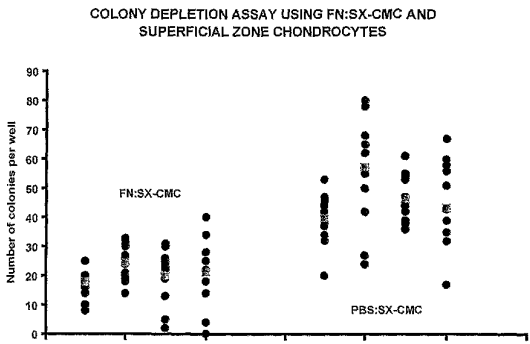


Fig. 3.7

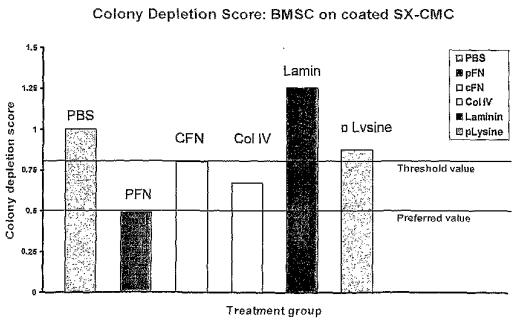


Fig. 3.8

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

29/35

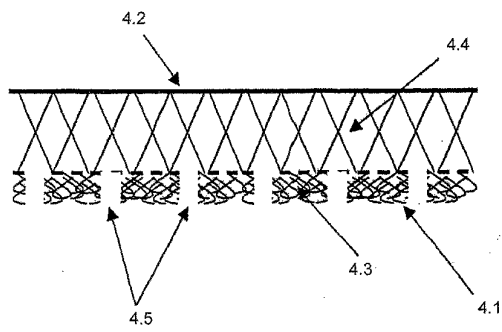


Fig. 4.1

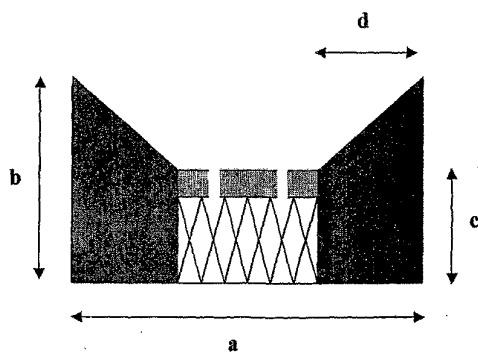


Fig. 4.2

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

30/35

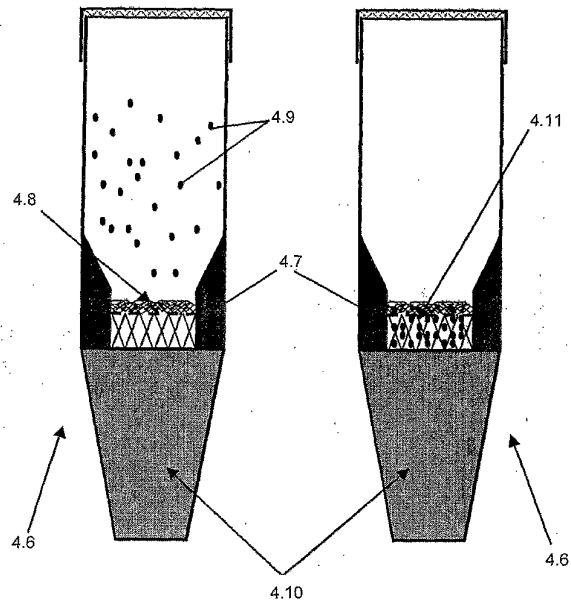


Fig 4.3

Fig. 4.4

WO 02/10348

PCT/GB01/03463

31/35

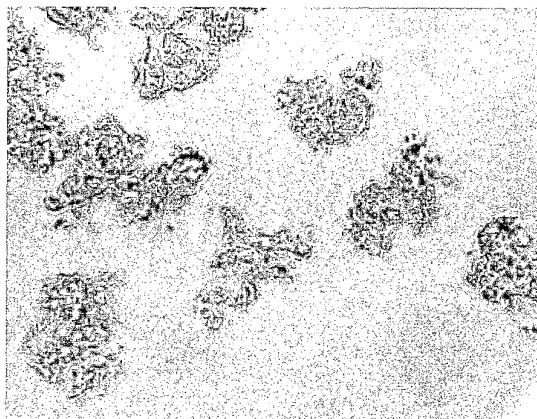


Fig. 4.5

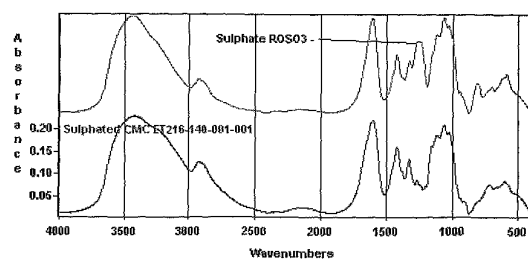


Fig. 4.6

WO 02/10348

32/35

PCT/GB01/03463

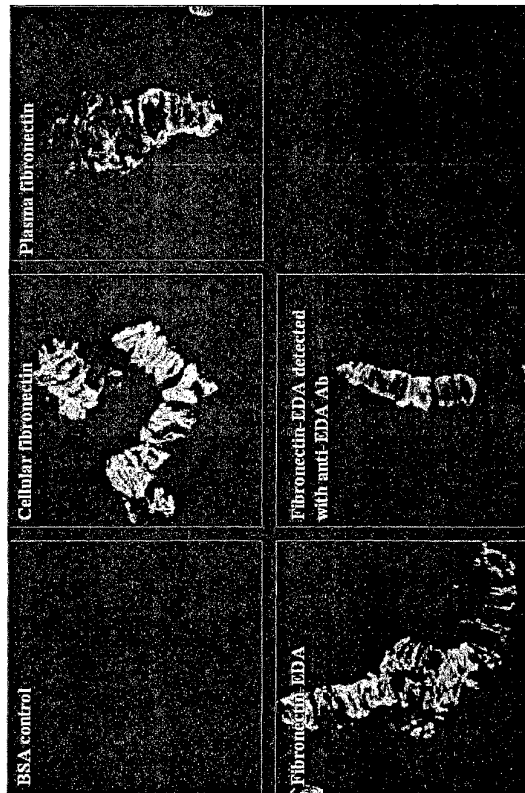


Fig. 4.7

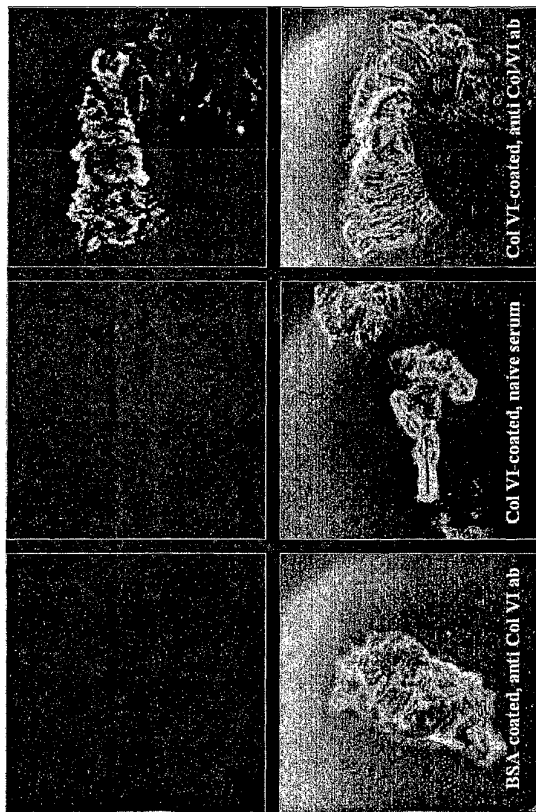


Fig. 4.8

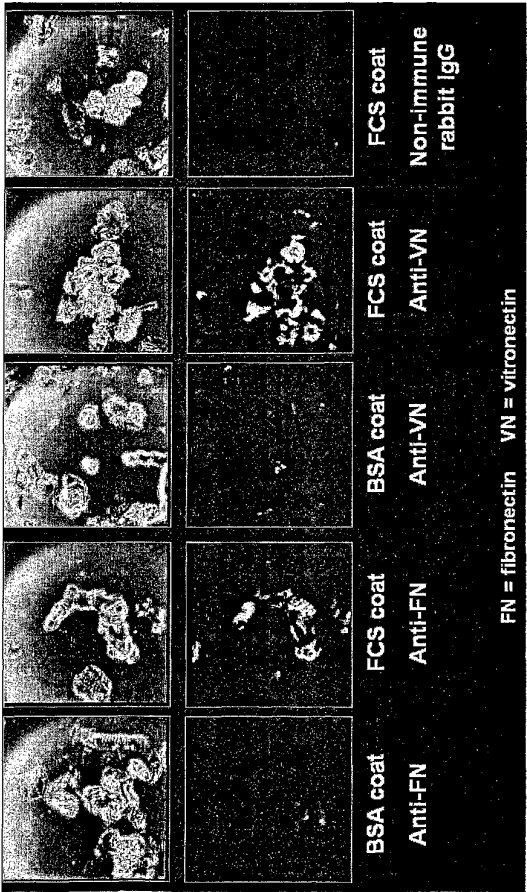


Fig. 4.9

WO 02/10348

35/35

PCT/GB01/03463

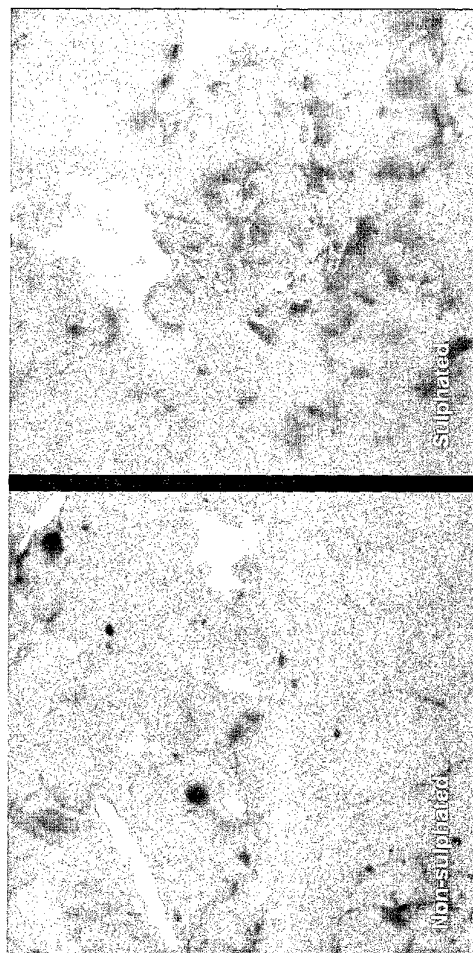


Fig. 4.10

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 February 2002 (07.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/010348 A3(51) International Patent Classification: C12N 5/06, (74) Agent: DRAGGETT, Peter, T.; Group Patents & Trade
A61L 27/38, 24/10 Marks Department, Smith & Nephew Group Research Cen-
tre, York Science Park, Heslington, York YO10 5DF (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB01/03463

(22) International Filing Date: 30 July 2001 (30.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0018583.5 29 July 2000 (29.07.2000) GB
0025959.0 24 October 2000 (24.10.2000) GB
0116885.5 11 July 2001 (11.07.2001) GB
0116886.3 11 July 2001 (11.07.2001) GB
0116888.9 11 July 2001 (11.07.2001) GB

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, 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, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, 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, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): SMITH & NEPHEW PLC [GB/GB]; 15 Adam Street, London WC2N 6LA (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): THOMSON, Brian, Mark [GB/GB]; 33 Burnby Lane, Pocklington, York YO42 2QE (GB). SMITH, Mark, Frederick [GB/GB]; Chapman House, Main Street, Ilaby, York YO61 1HS (GB). ARCHER, Charles, William [GB/GB]; Fairfield House, Brongie Terrace, Aberlure, Mid Glamorgan CF44 7PL (GB). DOWNTHWATE, Gary, Paul [GB/GB]; Craig-Yr-Hellian Farm, The Common, Glyn Taf, Mid Glamorgan CF37 4LX (GB).

Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
6 September 2002

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 02/010348 A3

(54) Title: TISSUE IMPLANT FOR CARTILAGE REPAIR

(57) Abstract: The invention relates to a medicament and method of treating cartilage defect. The invention also relates to an implant for treating cartilage defect.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/03463
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/06 A61L27/38 A61L24/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61L A61F C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 326 357 A (KANDEL RITA A) 5 July 1994 (1994-07-05) column 1, line 30 - line 48 column 7, line 43 - column 8, line 8 claims 1,10-12,15,17,18	1-36,43, 54,58, 120-123, 126
X	WO 97 30662 A (ADVANCED TISSUE SCIENCES INC) 28 August 1997 (1997-08-28) page 6, line 12 - page 7, line 17 page 33, line 21 - page 36, line 21 -/-	36-42, 47-57, 59,60, 120-125, 127,128
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 April 2002		Date of mailing of the international search report 07.05.02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5616 Patentsaan 2 NL - 6200 PH Delft Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Heck, G

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/03463
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 736 372 A (VACANTI CHARLES A ET AL) 7 April 1998 (1998-04-07) claims 1,2,5,7-11	44,45, 61-101, 108-119
X	US 5 962 325 A (NAUGHTON GAIL K ET AL) 5 October 1999 (1999-10-05) column 20, line 39 -column 21, line 29	102-107
A	ROBINSON D ET AL: "IMPLANTS COMPOSED OF CARBON FIBER MESH AND BONE-MARROW-DERIVED, CHONDROCYTE-ENRICHED CULTURES FOR JOINT SURFACE RECONSTRUCTION" BULLETIN - HOSPITAL FOR JOINT DISEASES, HOSPITAL FOR JOINT DISEASES, NEW YORK, NY, US, vol. 53, no. 1, 1993, pages 75-82, XP000882116 ISSN: 0018-5647 page 75, paragraph 1 -page 77, paragraph 1	1-35, 120-123
A	WO 00 29552 A (OSIRIS THERAPEUTICS INC; BARRY FRANK (US); MURPHY MARY (US); BOYNT) 25 May 2000 (2000-05-25) claims 1-11	1-35, 120-123
A	US 5 786 217 A (TUBO ROSS A ET AL) 28 July 1998 (1998-07-28) claims 1-4,7-9,14,15	1-35, 120-123
A	US 5 904 717 A (BREKKE JOHN H ET AL) 18 May 1999 (1999-05-18) column 2, line 15 - line 49	44,45, 61-85, 108-119
A	US 6 051 750 A (BELL EUGENE) 18 April 2000 (2000-04-18) column 8, line 36 -column 9, line 6	102-107

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1999)

International Application No. PCT/GB 01/03463

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-35 (entirely), 120-123 (partially)

Superficial zone chondroprogenitor cells for repairing cartilage defects.

2. Claims: 36-60, 124-128 (entirely), 120-123 (partially)

Immature chondroprogenitor cells for repairing cartilage defects.

3. Claims: 61-85, 108-119

Implant comprising a chondroprogenitor cell binding material.

4. Claims: 86-101

Synthetic implant for cartilage repair comprising a biocompatible scaffold and a conformable zone.

5. Claims: 102-107

Method and bioreactor for manufacturing a cell-seeded implant.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/G8 01/03463**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. ☒ Claims Nos.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/GB 01/03463

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 7, 8, 13, 14, 54, 55, 58 and 59 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 composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by surgery

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/GB 01/03463	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 5326357 A	05-07-1994	AT 193550 T	15-06-2000		
		AU 677953 B2	15-05-1997		
		AU 3881693 A	21-10-1993		
		CA 2131904 A1	30-09-1993		
		WO 9319168 A1	30-09-1993		
		DE 69328776 D1	06-07-2000		
		DE 69328776 T2	09-11-2000		
		DK 631619 T3	09-10-2000		
		EP 0631619 A1	04-01-1995		
		ES 2146611 T3	16-08-2000		
		GR 3034190 T3	30-11-2000		
		JP 7505620 T	22-06-1995		
		PT 631619 T	29-09-2000		
WO 9730662 A	28-08-1997	US 5842477 A	01-12-1998		
		AU 715282 B2	20-01-2000		
		AU 1973197 A	10-09-1997		
		CA 2247158 A1	28-08-1997		
		EP 0955959 A1	17-11-1999		
		JP 2000505338 T	09-05-2000		
		WO 9730662 A1	28-08-1997		
US 5736372 A	07-04-1998	US 5041138 A	20-08-1991		
		AT 142511 T	15-09-1996		
		AU 635025 B2	11-03-1993		
		AU 5556890 A	16-11-1990		
		CA 2051663 A1	18-10-1990		
		DE 69028524 D1	17-10-1996		
		DE 69028524 T2	13-02-1997		
		DK 469070 T3	30-09-1996		
		EP 0469070 A1	05-02-1992		
		ES 2095252 T3	16-02-1997		
		JP 6006155 B	26-01-1994		
		JP 4505717 T	08-10-1992		
		WO 9012603 A1	01-11-1990		
		US 5567612 A	22-10-1996		
		US 5804178 A	08-09-1998		
		US 5759830 A	02-06-1998		
		US 6309635 B1	30-10-2001		
		AT 139432 T	15-07-1996		
		DE 3751843 D1	25-07-1996		
		DE 3751843 T2	12-12-1996		
		EP 0299010 A1	18-01-1989		
		JP 7102130 B	08-11-1995		
		JP 1501362 T	18-05-1989		
		WO 8803785 A1	02-06-1988		
		US 5770193 A	23-06-1998		
		US 5770417 A	23-06-1998		
US 5962325 A	05-10-1999	US 5902741 A	11-05-1999		
		US 5443950 A	22-08-1995		
		US 5266480 A	30-11-1993		
		US 5032508 A	16-07-1991		
		US 4963489 A	16-10-1990		
		US 4721096 A	26-01-1988		
		AU 689605 B2	02-04-1998		
		AU 2769695 A	04-01-1996		
		CA 2192064 A1	14-12-1995		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/GB 01/03463

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5962325 A		EP 0812351 A1	17-12-1997
		JP 2002502226 T	22-01-2002
		NZ 288467 A	28-10-1998
		WO 9533821 A1	14-12-1995
		US 6140039 A	31-10-2000
		US 6022743 A	08-02-2000
		US 5863531 A	26-01-1999
		US 5460939 A	24-10-1995
		US 5510254 A	23-04-1996
		US 5580781 A	03-12-1996
		US 5516680 A	14-05-1996
		US 5512475 A	30-04-1996
		US 5541107 A	30-07-1996
		US 5516681 A	14-05-1996
		US 5578485 A	26-11-1996
		US 5785964 A	28-07-1998
		US 5518915 A	21-05-1996
		US 5624840 A	29-04-1997
		US 5849588 A	15-12-1998
		US 5858721 A	12-01-1999
		AU 644578 B2	16-12-1993
		AU 4211489 A	02-04-1990
		BR 8907642 A	20-08-1991
		CA 1335657 A1	23-05-1995
		DK 40591 A	07-05-1991
		EP 0358506 A2	14-03-1990
		HU 56393 A2	28-08-1991
		IL 91536 A	31-10-1996
		JP 2000189158 A	11-07-2000
		JP 4501657 T	26-03-1992
		JP 2001258555 A	25-09-2001
		KR 156571 B1	15-10-1998
		KR 156684 B1	15-10-1998
		KR 156685 B1	15-10-1998
		NO 910787 A	22-04-1991
		NZ 230572 A	23-12-1993
		PT 91676 A	30-03-1990
		WO 9002796 A1	22-03-1990
		US 5160490 A	03-11-1992
WO 0029552 A	25-05-2000	AU 1626500 A	05-06-2000
		WO 0029552 A1	25-05-2000
US 5786217 A	28-07-1998	AU 2435495 A	29-11-1995
		AU 2468995 A	29-11-1995
		WO 9530383 A1	16-11-1995
		WO 9530742 A1	16-11-1995
		US 5723331 A	03-03-1998
US 5904717 A	18-05-1999	US 5366508 A	22-11-1994
		US 5133755 A	28-07-1992
		US 6005161 A	21-12-1999
		AU 5445794 A	24-05-1994
		BR 9307280 A	01-06-1999
		GB 2215209 A ,8	20-09-1989
		JP 1232967 A	18-09-1989
		JP 2820415 B2	05-11-1998
		WO 9409722 A1	11-05-1994

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International Application No. PCT/GB 01/03463	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 5904717	A	US 5683459 A	04-11-1997		
		US 5755792 A	26-05-1998		
US 6051750	A	US 5800537 A	01-09-1998		
	18-04-2000	US 5893888 A	13-04-1999		
		CA 2141851 A1	17-02-1994		
		EP 0656939 A1	14-06-1995		
		JP 7509638 T	26-10-1995		
		WO 9403584 A1	17-02-1994		

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 41/00	A 6 1 P 41/00	
C 1 2 M 3/00	C 1 2 M 3/00	Z

- (31)優先権主張番号 0116886.3
 (32)優先日 平成13年7月11日(2001.7.11)
 (33)優先権主張国 イギリス(GB)
 (31)優先権主張番号 0116888.9
 (32)優先日 平成13年7月11日(2001.7.11)
 (33)優先権主張国 イギリス(GB)

(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,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

- (72)発明者 スミス、マーク、フレデリック
 イギリス、ヨーク ワイオー6 1 1エイチエス、ハビー、メイン ストリート、チャプマン ハウス (番地なし)
 (72)発明者 アーチャー、チャールズ、ウィリアム
 イギリス、ミッド グラモーガン シーエフ4 4 7ピーエル、アバデア、ブロンデグ テラス、フェアフィールド ハウス (番地なし)
 (72)発明者 ダウンスウェイト、ゲーリー、ポール
 イギリス、ミッド グラモーガン シーエフ3 7 4エルエックス、グリーン タフ、ザ コモン、クレイグワイアールーヘルファン ファーム (番地なし)

Fターム(参考) 4B029 AA02 BB11 CC01 GA02
 4B065 AA93 AC20 BB32 BD50 CA44
 4C081 AB04 AB05 AC03 BA12 BA13 BA16 BB04 BB05 BC02 CA021
 CA131 CA161 CA171 CA201 CA231 CD081 CD091 CD111 CD121 CD171
 CD34 CF011 CF021 CF031 CF061 CF111 CF121 CF151 DA01 DA04
 DA05 DA06 DA11 DB07 DC03 DC04 DC06 DC13 DC14 EA02
 EA06 EA11
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB46 BB64 CA04 MA02 MA05 MA27 MA41
 NA05 NA10 ZA96 ZB21 ZC41 ZC51
 4C097 AA01 BB01 DD01 DD06 DD15 EE02 EE07 EE08 EE11 FF05
 SC10