

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6821583号  
(P6821583)

(45) 発行日 令和3年1月27日(2021.1.27)

(24) 登録日 令和3年1月8日(2021.1.8)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 L 27/20 (2006.01)	A 6 1 L 27/20
A 6 1 L 27/52 (2006.01)	A 6 1 L 27/52
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 L 27/38 3 0 0
A 6 1 L 27/50 (2006.01)	A 6 1 L 27/38 1 1 2
	A 6 1 L 27/50

請求項の数 24 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2017-547081 (P2017-547081)  
 (86) (22) 出願日 平成27年12月1日(2015.12.1)  
 (65) 公表番号 特表2017-535405 (P2017-535405A)  
 (43) 公表日 平成29年11月30日(2017.11.30)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2015/053271  
 (87) 国際公開番号 W02016/087762  
 (87) 国際公開日 平成28年6月9日(2016.6.9)  
 審査請求日 平成30年11月28日(2018.11.28)  
 (31) 優先権主張番号 1461746  
 (32) 優先日 平成26年12月1日(2014.12.1)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 フランス (FR)

(73) 特許権者 517191297  
 アドヴァンスト・キトサン・ソリューションズ・バイオテック  
 フランス・69100・ヴィルールバンヌ・リュ・レオン・ブリュム・200  
 (73) 特許権者 506316557  
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシエルシュ シアンティフィック  
 フランス国 75016 パリ リュ ミケランジュ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キトサン及び軟骨細胞を含む軟骨修復のための軟骨ゲル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

キトサンヒドロゲルの粒子及び硝子軟骨を形成することが可能な細胞を含む、軟骨組織修復のための移植可能な組成物を得るための in vitro 方法であって、以下の連続した工程：

(i) キトサンの物理的ヒドロゲル又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルの粒子を含む三次元構造において一次細胞を増幅する工程、次に

(ii) 工程(i)の三次元構造内の前記増幅された細胞による細胞外マトリックスの合成を誘導する工程

を含み、前記一次細胞が、一次関節軟骨細胞、及び/又は軟骨細胞に分化する一次間葉系幹細胞であり、前記一次細胞がヒト胚幹細胞ではなく、前記細胞がヒドロゲル粒子に浸透せず、前記キトサンの物理的ヒドロゲル又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルが架橋剤なしで合成される、方法。

【請求項2】

2つの工程(i)及び(ii)が、細胞トリプシン処理工程なしに同じ三次元構造内で実行される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

細胞外マトリックスの合成を誘導する工程(ii)が、培養媒体を変更することによって実

行される、請求項1又は請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記組成物が、45日未満、好ましくは35日未満、特に28日未満で生成される、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

増幅工程の持続期間が1から3週間、好ましくは2週間未満であり、及び、細胞数が少なくとも4倍、好ましくは6倍に増倍することを可能にする、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

細胞外マトリックスの合成を誘導する工程の持続期間が2~4週間、好ましくは3週間未満である、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項7】

ヒドロゲル粒子が、10 $\mu$ m~1.5mmの範囲内、好ましくは400 $\mu$ m~700 $\mu$ mの範囲内の平均サイズを有する、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

キトサンが150kDa超、好ましくは150から220kDaの間の質量平均分子量を有する、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

キトサンが真菌類から、好ましくはツクリタケから抽出される、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項10】

三次元構造が、前記キトサンヒドロゲルの粒子の表面において会合したアニオン性ポリマー、好ましくはヒアルロン酸又はヒアルロン酸の複合体も含み、前記アニオン性ポリマーが、請求項1に定義された2つの工程(i)及び(ii)の両方において存在する、又は、前記アニオン性ポリマーが、請求項1に定義された工程(i)若しくは(ii)の終わりに追加される、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

ヒアルロン酸が細菌発酵によって抽出され、1MDa超、好ましくは2MDa超の質量分子量を有する、請求項10に記載の方法。

30

【請求項12】

増幅工程が、FGF-2(線維芽細胞増殖因子)及びインスリンを含む媒体で実行される、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

細胞外マトリックスの合成を誘導する工程が、BMP-2(骨形成タンパク質-2)、インスリン及びトリヨードサイロニンT3を含む媒体で実行される、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記一次細胞が関節軟骨細胞であるか、又は鼻中隔若しくは心房中隔から得られ、ヒト、イヌ又はウマ起源である、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項15】

請求項1から14のいずれか一項に記載の方法の後の細胞生存率が90%超、好ましくは93%超である、請求項1から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

キトサンヒドロゲル中の含水量が70%超、好ましくは80%超である、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

一次細胞が、キトサン又はキトサン誘導体のゲル化及び物理的ヒドロゲル粒子の形成の後に三次元構造に追加される、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項18】

アニオン性ポリマー、好ましくはヒアルロン酸又はヒアルロン酸の複合体に会合した、キトサンの物理的ヒドロゲル又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルの粒子から形成される三次元構造、及び分化した軟骨細胞、軟骨細胞に分化する任意の細胞、軟骨細胞に分化する幹細胞、幹細胞、間葉系幹細胞又は人工多能性細胞(IPS)から得られる軟骨細胞の前駆体細胞を含む移植可能な組成物であって、前記キトサンの物理的ヒドロゲル又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルが架橋剤なしで合成され、前記移植可能な組成物が、請求項1から17のいずれか一項に記載の方法によって得られる組成物。

10

## 【請求項19】

軟骨細胞が、II型コラーゲンタンパク質及びII型コラーゲンのメッセンジャーRNAを優先的に合成し、1より高いCOLII/COLI比を表す、請求項18に記載の移植可能な組成物。

## 【請求項20】

ヒトまたは動物のための、軟骨修復で使用するため、移植組織として使用するため、又は、有効成分のためのベクターとして使用するための、関節鏡検査によって移植可能な、請求項18又は19に記載の組成物。

## 【請求項21】

キトサンヒドロゲル中の含水量が70%超、好ましくは80%超である、請求項18から20のいずれか一項に記載の移植可能な組成物。

20

## 【請求項22】

前記三次元構造内の前記軟骨細胞又は細胞によって合成される細胞外マトリックス(ECM)をさらに含む、請求項18から21のいずれか一項に記載の移植可能な組成物。

## 【請求項23】

前記キトサンが真菌類から抽出され、前記ヒドロゲル粒子が400 $\mu$ m~700 $\mu$ mの範囲内の平均サイズを有する、請求項18から22のいずれか一項に記載の移植可能な組成物。

## 【請求項24】

増幅後の、播種された細胞による細胞外マトリックスの増殖及び合成のために一次細胞を播種するための、アニオン性ポリマー、好ましくはヒアルロン酸又はヒアルロン酸の複合体に会合した、キトサンの物理的ヒドロゲル又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルの粒子によって形成される三次元構造の使用であって、前記一次細胞が、一次関節軟骨細胞、及び/又は軟骨細胞に分化する一次間葉系幹細胞であり、ならびに、前記キトサンの物理的ヒドロゲル又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルが架橋剤なしで合成され、前記使用が、請求項1から17のいずれか一項に記載の方法において使用するためのものである、使用。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

40

## 【0001】

本発明は、とりわけ軟骨の再建を可能にする組成物、及びそのような組成物を得るための方法に関する。より詳細には、本出願は、硝子軟骨を形成することが可能である細胞の増殖だけでなく、これらの細胞による軟骨細胞外マトリックスの合成にも極めて好都合である環境又は足場に関する。この環境又は足場中の細胞は、ヒト又は動物の軟骨欠損部に移植することができる移植可能な組成物を構成する。この構造は、移植の間の好都合な環境をも構成する。

## 【背景技術】

## 【0002】

軟骨又は軟骨組織は、少なくとも80%の水を含む細胞外マトリックスに分布する特異的

50

細胞、すなわち軟骨細胞によって構成される。軟骨細胞は、グリコサミノグリカンと、硝子軟骨では事実上II型であるコラーゲン線維とで構成される、軟骨細胞外マトリックスの成分を合成又は分解することが可能である。したがって、軟骨細胞は、軟骨組織の合成だけでなく維持の役割も担う。

#### 【0003】

成人の軟骨、特に関節軟骨は、主にその無血管性のため、及び成熟軟骨細胞は増殖しないので、非常に不良な自己修復能力を有する。したがって、軟骨病変は事実上不可逆的であり、その結果、特に外傷、機械的摩耗又は骨関節炎などの変性関節病の結果として、疼痛及び能力障害の主要な原因となる。軟骨欠損部、特に大きな欠損部を治療するために使用することができる完全に満足な治療的解決策は現在のところない。

10

#### 【0004】

天然軟骨の弾性及び圧縮性を模倣することを意図する材料で病変を充填するか、又は細胞、特に軟骨細胞をそれらが細胞外マトリックスを新規に合成し、したがって欠損部を修復する狙いで移植することからなる、様々な外科的処置が試験されている。より有望なアプローチは、軟骨組織、すなわち軟骨細胞から得られる新組織の移植に基づく。軟骨欠損を患っている患者を治療するために、自家軟骨細胞の移植(「ACI」、自家軟骨細胞移植)が今までに数十年の間使用されてきた。しかし、軟骨細胞移植、特に自家軟骨細胞の主要な困難は、移植される細胞の数にある。実際、一般に、治療する患者の天然の軟骨から少数の軟骨細胞だけを取り出すことができる。結果として、それらの数を大幅に増加させるために、取り出した軟骨細胞を増幅する第1の工程を実行することが必要である。しかし、移植のために十分な数の細胞までの軟骨細胞の*in vitro*増幅は、非常に困難であることが証明された。この増幅工程の間、軟骨細胞は脱分化してそれらの軟骨細胞表現型を失い、その後II型コラーゲンよりもI型コラーゲンを発現し、そのため、再移植されるとき、それらは満足な特性を有する組織の形成につながらず、むしろ瘢痕型の組織、又は軟骨修復の場合は、I型コラーゲンで事実上構成される非機能的線維軟骨の形成につながることが実際知られている。一部の著者は、単層増殖工程の間に脱分化した軟骨細胞が再分化することを可能にする培養液を提案した。しかし、それらの方法は、十分な数を得るために軟骨細胞がいくつかの継代を経なければならない増殖工程のために、約4週間の比較的長い期間を必要とする(Liu等、2007)。しかし、再分化は、特に2継代の後により複雑であることが示された(Hautier等、2008)。

20

30

#### 【0005】

「足場」として知られる3D(三次元)構造に播種することによって、他は単層増殖工程の後の軟骨細胞の再分化を試験した。それらの構造は、軟骨組織の構成を模倣する利点を提供する。プロテオグリカン及びII型コラーゲンの分泌によって証明されるように、そのような環境は軟骨細胞の再分化及び細胞外マトリックスの合成に有利である(Tallheden等、2005)。しかし、軟骨細胞の脱分化を制限するために、前の増倍工程は故意に短縮される。

#### 【0006】

3D構造への播種は、軟骨細胞の*in vivo*移植を促進し、細胞リークを制限し、大きな欠損部を治療する利点を提供することもできる。

40

#### 【0007】

3D構造への軟骨細胞の播種に関して多くの材料を試験した;アルギン酸塩、コラーゲン、ポリエチレングリコール及びポリ乳酸を列挙することができる。最も適当なものは以下の生物学的性質を示すものである:無毒の分解生成物により、細胞適合性、低い免疫原性及び生分解性。したがって、疑いなく生組織とのそれらの化学的及び生物学的類似性のために、これらの生物学的性質を有する天然のポリマーは選択の候補になる。天然ポリマーは、高度に生体適合性であり、生物体によって容易に生体再吸収性及び生体同化性である。

#### 【0008】

三次元構造のための生体材料としてのその魅力的な性質のためにしばしば指摘される天

50

然ポリマーは、キトサンである。

【0009】

実際、文献によると、このバイオポリマーは、生分解性、生体適合性、無毒、血液適合性、細胞適合性及び、更に、生体活性、止血性、治癒性、静菌性及び静真菌性であることが公知である。

【0010】

更に、キトサンは細胞接着に有利に働くことが知られている。それは、軟骨細胞の培養中に、軟骨細胞表現型を維持し、細胞外マトリックス合成過程を刺激するその能力についても知られている。更に、キトサンに関係する感染症もアレルギーも報告されていない。したがって、それは非免疫原性である。その再吸収時間に関しては、その生理化学的性質を改変することによってそれを変えることが可能である。

10

【0011】

キトサンは使用するのが比較的容易であり、様々な物理的形態で、特に溶液、フィルム(Lahiji等、2000)、繊維、スポンジ、ビーズ、ヒドロゲル又は微粒子で生成することができる。この理由から、それは極めて多様な構造で使用されてきた。

【0012】

3D構造に軟骨細胞を播種することに関連して、両方の軟骨細胞の優れた分布及び維持、並びにそれらの軟骨形成能力の刺激に有利である環境を提供することができる構造が特に注目されてきた。この目的で、様々なアプローチが考えられている。試験された様々な構造内で、ビーズ又は材料の断片、細胞の封入を意図したポリマー、及び軟骨細胞をその中に収納できるように調整された孔径のヒドロゲルを指摘することができる。一部の著者は、軟骨細胞を封入するポリマーによる注射可能な組成物を想定した(WO2011/104131、Lieg e等の大学)。一部の变形形態により、欠損部への注射の後にポリマーは軟骨細胞とin situで架橋される(Hoemann等、2005)。しかし、このアプローチには、重合時間のために、注射された軟骨細胞が注射部位に残らない傾向を有する欠点がある。対照的に、他の著者はin situ架橋ポリマーからのいくつかの組成物を試験し、プラグの形で移植することができる組織の生成を目指した(Hao等、2010)。しかし、それらの方法は、移植の間に困難をなお引き起こすことがある。

20

【0013】

できるだけ良好に軟骨組織の構造を模倣するために、一部の著者は、ヒドロゲル形、より詳細には架橋剤を追加せずに、したがって構造の生体適合性及び生体再吸収性を有利にして合成された物理的ヒドロゲルを試験した。

30

【0014】

したがって、キトサンの物理的ヒドロゲルと接触させることによる新組織の生成が想定された(Montembault等)。しかし、単層を使用する従来の増倍工程は播種前の軟骨細胞の脱分化を制限するために故意に迅速であり、それは細胞の増倍が比較的少ないことを意味する。

【0015】

変形形態では、細胞外マトリックスの合成のためにin vitro工程の間に三次元構造はほとんど再吸収され、前記構造は構築物にもはや加わらない(特にWO02078760、Laboratoire Genevri er等を参照)。そのような方法の実行は、移植可能である新組織を得るまで4~6週と特に長々しく、前記新組織は移植時には3D構造によってもはや支持されない。

40

【0016】

軟骨細胞の移植の分野で頻繁に試験された別のポリマーは、ヒアルロン酸である。それは、同じく生体適合性及び生分解性である天然の多糖である。更に、それは、関節軟骨に存在する滑液及びグリコサミノグリカン(GAG)の主要な成分である。滑液の粘度を増加させ、軟骨をより弾性に導くことによって、ヒアルロン酸は関節の保護を助ける。ヒアルロン酸が軟骨細胞表現型の発現に有利に働くことも実証されている。

【0017】

この理由から、軟骨細胞の培養でヒアルロン酸はキトサン組成物と時々組み合わせられ

50

ている。

【0018】

一部の著者(Correia等、2011)は、例えば、軟骨細胞の播種のためのキトサンとヒアルロン酸の混合物の三次元スポンジ様構造を提案した。しかし、それらの構造は、細胞の均一な分布を得るために使用することができない。構造の外部から内部にかけて増加する細胞勾配が観察される。

【0019】

Denuziere等(1998)による文書は、キトサン及びヒアルロン酸に特に基づく高分子電解質複合体のスポンジを記載する。キトサンのポリカチオン性鎖は、ヒアルロン酸のポリアニオン性鎖と静電的に相互作用する。しかし、出された結論は、軟骨細胞の増殖のため及び他の関連する生物学的性質のためには、ヒアルロン酸等のGAGとのキトサン複合体のスポンジに対してキトサンだけのスポンジが好ましいということである。

10

【0020】

軟骨細胞が封入されるキトサンとヒアルロン酸の光架橋ヒドロゲルも提案されている(Park等、2013)。しかし、そのタイプの封入は、比較的長い培養時間(3週間で増殖率4)にもかかわらず、増殖に対して十分に有利に働かない。

【0021】

更に、文献によると、軟骨の再建のためにキトサンが興味深い性質を有するようであるが、キトサンだけのスポンジの上での軟骨細胞の細胞外マトリックスの増殖及び合成の程度は、構造の孔径に高度に依存することに注意すべきである(Griffon等、2006)。

20

【0022】

一部の著者は、軟骨細胞の増殖にキトサンが不適當であると考えてもいる(Suh等、2000)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0023】

【特許文献1】W02011/104131

【特許文献2】W002078760

【特許文献3】FR 2 965 278

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0024】

現在のところ、これらの3D(三次元)環境のいずれも、移植目的の軟骨組織の再生に適合する状態での、軟骨細胞の増殖の問題を解決しない。したがって、迅速な方法を使用して、分化した、適する性質を有する軟骨組織を生成することが可能である軟骨細胞の十分な数を得るための大きな必要性がある。

【0025】

更に、全ての方法は増倍工程と分化工程の間の環境の改変を提案しており、それは材料及び時間のロス並びに細胞を害するトリプシン処理の発生を含む。

【課題を解決するための手段】

40

【0026】

本発明者は、それらの完全な増倍、それらの再分化及び軟骨マトリックスの生成を確実にすることができる構造内で、十分な数の軟骨細胞を得るための方法を開発した。この構造は、病変部への移植のためにも適する。

【0027】

この文脈において、本発明者は、物理的ヒドロゲルの粒子の形のキトサンが、硝子軟骨の細胞外マトリックスの合成の観点でだけでなく、それらの増倍の観点でも、軟骨細胞のための優れた環境であることを完全に予想外に見出した。実際のところ、全く予想に反して、発明者は、同じキトサン構造において、通常単層技術(プラスチックの上又はスポンジで)を使用し、次に細胞の再分化を直ちに可能にして観察されたものに類似している

50

、又はそれより優れてさえいる増殖の程度を得ることを可能にした、増殖工程を実行することができた。結果として、発明者は、一次状態で抽出した直後に軟骨細胞を増倍させ、次に同じ構造で再分化及び特異的細胞外マトリックスの合成を誘導し、それによってトリプシン処理及び構造改変のための工程を回避するために、首尾よく使用することができる方法を開発した。更に、この構造は、補助的改変を必要とすることなく、in vivo移植に適合する。

【0028】

本発明の方法によって、したがって、軟骨組織の修復のために非常に好ましい条件下で、これまで記載されたものと比較して低減された時間で、移植に直ちに適合する構造の、構造内に均一に分布し、それらの再移植を可能にする密度を有する軟骨細胞を含む組成物を得ることが可能である。

10

【0029】

この記載と関連して、以下の用語は、以下の特定の意味を有する：

「キトサン」という用語は、-(1-4)-結合D-グルコサミン単位(脱アセチル化単位)及びN-アセチル-D-グルコサミン単位(アセチル化単位)で構成される多糖を意味する。それは、キチンの化学的又は酵素的脱アセチルによって生成することができる。それは、天然の状態でも存在する。天然起源のキトサンでは、多糖は一般的に無視できる量のベータグルカンと関連している。本発明との関連で、キトサンで天然に見出されるそれらと一致する量でのベータグルカンの天然の存在は、無影響である。その存在が多糖に対して5質量%未満である限り、キトサンはベータグルカンの存在の場合でさえ「純粋である」と言われる。

20

【0030】

「キトサン誘導体」という用語は、官能基性を変えるためにキトサンの化学基を改変することを目的とする反応、例えばメチル化、ハロゲン化などを経た任意のキトサンポリマーを意味する。好ましくは、キトサン誘導体は、3種類を超える改変を有さず、好ましくは2種類の改変だけ、より好ましくは1種類の改変だけである。本発明と関連すると特に考えられるキトサン誘導体は、グリコールキトサン、N-スクシニルキトサン及びN-又はO-カルボキシメチルキトサンである。このリストは、限定的でない。

【0031】

「アセチル化度(DA)」は、単位の総数(アセチル化及び脱アセチル化された単位)に対するアセチル化単位の百分率である。それは、フーリエ変換赤外分光法(FTIR)によって、又は陽子NMRによって判定することができる。

30

【0032】

「キトサンヒドロゲル」という用語は、水は別として、ヒドロゲルの大半(質量で)、すなわち80%超、又は更に90%超、又は更に95%を占める構成成分がキトサンであることを意味する。同様に、「キトサン誘導体ヒドロゲル」は、水は別として、ヒドロゲルの大半、すなわち80%超、又は更に90%若しくは95%超を占める構成成分がキトサン誘導体であるヒドロゲルを意味する。

【0033】

「キトサンのヒドロゲル」又は「キトサン誘導体のヒドロゲル」は、好ましくは少なくとも70%の水又は更に少なくとも80%の水を含むヒドロゲルを意味する。

40

【0034】

「物理的ヒドロゲル」という用語は、架橋剤の添加を必要としない水性媒体又は水アルコール媒体でのゲル化の方法によって得られるヒドロゲルを意味する。

【0035】

「軟骨細胞表現型」という用語は、I型コラーゲンに対してII型コラーゲンを優先的に発現する軟骨細胞様細胞を意味する。

【0036】

「ヒアルロン酸」という用語は、グリコシド結合を通して連結されるD-グルクロン酸及びD,N-アセチルグルコサミンで構成される多糖を意味する。

50

## 【0037】

「ヒアルロン酸誘導体」という用語は、その官能基性を変えるためにヒアルロン酸の化学基を、例えばエステル化によって改変することを目的とする反応を経た、ヒアルロン酸の任意のポリマーを意味する。

## 【0038】

したがって、第1の態様では、本発明は、軟骨修復のための、関節鏡検査によって移植可能な、キトサン又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルの粒子又は断片、及び軟骨、好ましくは硝子軟骨を形成する細胞を含む組成物を得るためのin vitroの方法に関する。この方法を実行することによって得られる組成物は、軟骨ゲルとしての資格を得ることができる。そのような軟骨ゲルは、キトサン粒子に基づく三次元構造の、細胞勾配なしで全て均一に分布した軟骨マトリックスを合成する細胞を实际含む。

10

## 【0039】

本発明によるそのような方法は、特に、三次元構造(3D構造)において一次細胞を増幅する工程、次にこの同じ三次元構造において、すなわち細胞の環境を変えずに、再分化させ、細胞外マトリックスの合成を誘導する工程を含む。

## 【0040】

上で示されるように、キトサンは実際、無毒の分解生成物を有する、生体適合性の、生体再吸収性の材料である。それは、非免疫原性、細胞適合性及び生体活性である。それは、移植可能な装置としての製薬必要条件にも完全に適合する。本発明との関連で、キトサン又はキトサン誘導体のヒドロゲルは、架橋剤を加えることなしに得られる物理的ヒドロゲルである。

20

## 【0041】

この方法によって、再移植の後に軟骨マトリックスの合成を実行することが可能である未損傷軟骨細胞により、直ちに移植に用いることができるマトリックス構造内に軟骨細胞を含む組成物又は新組織を得ることが可能である。3D構造の変化がないため、この方法は、実行するのがより容易であり、優れた品質の新組織を得るために使用することができる。更に、この方法は、従来の技術分野で記載されるものより速い。

## 【0042】

したがって、本発明による方法は、以下の工程：

(i) 純粋なキトサン又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルの粒子を含む三次元構造の

30

いてにおいて一次細胞を増幅する工程、次に  
(ii) 工程(i)の三次元構造内の前記増幅された細胞による分化又は再分化、及び細胞外マトリックスの合成を誘導する工程

を特徴とする。

## 【0043】

これらの2つの工程は、これらの工程の各々の条件及び収率を最適化する目的で、同時にではなく連続して実行される。

## 【0044】

細胞：

第1の工程で増幅される細胞は、この3D構造に播種される。それらは、軟骨細胞、又は幹細胞、例えば間葉系幹細胞又は人工多能性細胞(IPS)から得られる軟骨細胞の前駆体細胞であってもよい。それらは、軟骨細胞に分化する任意の細胞であってもよい。好ましくは、それらは軟骨細胞であり、より好ましくは関節軟骨細胞である。

40

## 【0045】

本発明との関連で、分化した軟骨細胞及び/又は軟骨細胞に分化する幹細胞の共培養を使用することも可能である。

## 【0046】

軟骨細胞又は幹細胞は、当業者に公知の任意の方法を使用して得ることができ、それらは細胞を含有するかもしれない生体試料から細胞を回収するために使用することができる。そのような方法は、特に文書FR 2 965 278(University of Caen Basse-Normandie等)に

50

記載されている。

【0047】

それらは、好ましくはヒト又は動物の細胞、特にウマ又はイヌの細胞である。それらは関節細胞又は耳細胞であってもよく、鼻中隔から得ることさえできる。

【0048】

ヒト患者のために特に好ましい細胞は、ヒト細胞、例えばヒト軟骨細胞であり、より詳細にはヒト関節軟骨細胞である。これは、動物、特にウマ又はイヌの場合もそうである。

【0049】

構造に播種される一次細胞は、治療される生物体に対して同種異系、異種間、異種又は自家の細胞であってもよい。好ましい実行例によると、それらは自家細胞であり、すなわち、それらは治療される患者、ヒト又は動物に由来する。より好ましくは、それらは、したがって、本発明による方法の終了後にドナーに再移植されるかもしれない自家ヒト軟骨細胞である。これは、動物の軟骨細胞の場合、例えば軟骨細胞移植が同様に有益かもしれない競走馬又はイヌの場合もそうである。移植中の拒絶反応を回避するために当業者に周知のある特定の措置が実行されることがあるので、それは異種間又は同種異系の細胞にも関するかもしれない。

【0050】

—実施形態により、それらはヒト胚幹細胞でない。

【0051】

三次元構造及びキトサン：

細胞は、純粋なキトサン又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルの断片又は粒子を含む三次元の構造若しくは足場、又は生体材料に播種される。前記粒子は、構造を機械的に維持するのに十分な細胞外マトリックスを細胞が生成するまで、三次元組織の形成に好ましい、適合する足場又は構造を次に形成する。

【0052】

細胞は、キトサンヒドロゲルのゲル化及び粒子形成の段階の後に追加される。したがって、細胞はヒドロゲルの断片又は粒子の外側に位置する。それらは断片又は粒子の表面に残存し、ヒドロゲル内に閉じ込められても封入されてもいなく、また、それらはヒドロゲルの孔に浸透もしない。したがって、本発明の方法の様々な工程の間、栄養素及び老廃物がそうすることができるように、それらは粒子の周囲を自由に移動することができる。キトサン粒子と細胞の間で培養の始めに生成した混合物は、この方法の終わりの三次元構造内の細胞の優れた分布が有利なことを意味する。

【0053】

三次元構造又は装置の設計のために使用されるキトサンは、例えば、キチンの脱アセチルによって得られ、それは節足動物(エビ、昆虫、カニ、等)、頭足類(イカ)の内部骨格又は真菌類の細胞壁に由来することができる。その起源によっては、キトサンは 立体配座(真菌類の細胞壁、エビ、カニ)、又は 立体配座(イカ)、又は 立体配座(昆虫)であってもよく、それはその生物学的性質に大いに影響する。

【0054】

本発明との関連で、使用されるキトサンはこれらの様々な供与源を起源とすることができるが、生体適合性、低いエンドトキシン含有量、バッチの再現性及び医薬標準とのコンプライアンス上の理由で非動物起源のキトサンが好ましくは使用される。好ましくは、本発明と関連して使用されるキトサンは、真菌類、より詳細には一般的なキノコ、ツクリタケ(*Agaricus bisporus*)の細胞壁から抽出されるキトサンである。実際、移植可能な装置と関連して、規制上の要件のために、動物起源のいかなる材料も有しないことが特に有利である。一般的なキノコから抽出される、本発明で使用されるキトサンは、エンドトキシン含有量、微生物残留及び重金属に関して医薬要件を満たす。

【0055】

工程の連続：

本発明による方法は、三次元構造において一次細胞を増幅する第1の工程と、全く同じ

10

20

30

40

50

三次元構造内の分化及び細胞外マトリックス(ECM)の合成を誘導する第2の工程の2つの工程の連続を特に特徴とする。

【0056】

この方法の主要な利点は、増幅工程とECMの合成による再分化工程の間でも、また、実際、再分化工程と移植のための工程の間でも、細胞の足場を変更する必要がないという事実が存在する。これは、いかなるときでも細胞トリプシン処理工程を実行する必要がないことを意味する。実際、抽出の後、事前の増殖工程なしで、したがって、特にトリプシン処理によって、又は細胞壁を損傷し易い任意の他の手段によってそれらを切り離す必要なしで、一次細胞は本発明の構造に播種される。それらは次に構造内で増殖し、次に、同じくそれらを切り離し、それらをトリプシン処理し、細胞壁を損傷するかもしれない性質の任意の他の治療を受けさせる必要性なしで、再分化し、軟骨マトリックスを生成するように誘導される。

10

【0057】

したがって、本発明の方法は、抽出の後、損傷を受けず、ストレス状態にさらされていない細胞を得るために使用することができ、それは、次に、細胞死亡率を低減することによる、取り出す細胞の数の最適化を保証するだけでなく、方法の終わりにそれを保証することもでき、細胞は細胞死プログラムになく、再移植の後に宿主生物体に有害かもしれないシグナルを発現しない。1週間の培養の終わりに、及び、一般に培養期間全体で、細胞生存率は90%超、又は更に93%超、又は97%超でさえある。

【0058】

好ましくは、本発明の方法の2つの主要な工程、すなわち一方では増幅、次に他方では再分化及びECM合成は、異なる工程である。発明者は、軟骨細胞などの細胞のためには、増殖する能力及びECMを生成する能力が好ましくは連続した工程であることを実際観察した、そのため、2つの工程が異なる場合、増殖の収率及び軟骨マトリックス合成の収率は大きいにより優れていた。更に、これらの工程のどちらか一方を排他的に有利にするかもしれない媒体があり、そのため、それらを順々に実行することが好ましい。好ましくは、したがって、記載されるような2つの工程は連続しているだけでなく、異なってもあり、第1の工程が終了したときに第2の工程が開始するだけである。

20

【0059】

増幅工程は、軟骨細胞の数が第1の工程の間増加し、第2の工程の間は増幅がほとんどなく、比較的安定したままである場合は、軟骨マトリックスを合成する工程と異なると考えられる。

30

【0060】

増幅工程は、媒体の粘度の関数としての軟骨マトリックスを合成する工程と異なると考えられる。低い粘度が増幅工程の間に観察され、増加する粘度が第2の工程の間に観察され、細胞外マトリックスの生成を確認する。

【0061】

好ましくは、第1の工程の間、細胞外マトリックスの合成は低い。

【0062】

免疫組織化学的方法、例えば下の実施例に記載されるものなどを使用することにより、そのようなマトリックスが合成されるかどうか観察することも可能である。

40

【0063】

II型コラーゲン(COLII)は、硝子軟骨の特徴的なマーカーである。それは、遺伝子Col2a1によってコードされる3つの1(II)鎖によるホモトリマーである。このタイプのコラーゲンの分析は、従来、分化した軟骨細胞を同定するために実行される。

【0064】

I型コラーゲン(COLI)、遺伝子Col1a1及びCol1a2から生成される $1_2$   $2_1$ ヘテロトリマーは、軟骨細胞の脱分化のためのマーカーであると従来考えられている。

【0065】

本発明による方法は、構造内の培養に置かれた細胞の、軟骨細胞に再分化する能力を維

50

持することを特徴とする。「この能力を維持する」という用語は、第2の工程の終わりに、大部分の細胞が軟骨細胞表現型を好ましくは少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%有することを意味する。

【0066】

発明者は、キトサン又はその誘導体のヒドロゲル粒子に基づく、記載される構造に播種される大多数の細胞が、細胞外マトリックスを合成する方法の第2の工程の間、安定した軟骨細胞表現型を有することを実際観察した。方法の終わりに、組成物中の細胞はI型コラーゲンの発現をほとんど有さず、及び/又はタンパク質レベルでそれを生成しないが、1を超えるCOL11/COL1分化指数を発現する。好ましくは、この組成物中に存在する細胞は、1を超える(好ましくは1.5を超えるCOL11/COL1タンパク質比でII型コラーゲンのタンパク質を合成し、及び/又は、II型コラーゲンメッセンジャーRNAの割合は、I型メッセンジャーRNAの割合より有意に高い。

10

【0067】

上記の本発明による方法は、好ましくは、40日未満で、好ましくは36日未満で、又は更に約30日未満、例えば28日未満で、又は実際21日未満で、移植のために直ちに使用可能な軟骨組成物又はゲルを得るために使用することができる。したがって、軟骨細胞の、又は軟骨細胞に分化する一次幹細胞の生検から、関節病変を修復することができるために十分な数の軟骨細胞を有する、移植のために直ちに使用可能な組成物を、1カ月半で、又は1カ月未満で、又は3週未満で得ることが可能である。

【0068】

このために、増幅工程は1~3週で、好ましくは概ね2週、12~16日で、又は更に2週未満で実行される。

20

【0069】

この工程の間、構造に最初に播種される細胞数に対する生細胞数の増倍は、少なくとも4、又は更に少なくとも6、又は更に少なくとも7、又は7を超える。

【0070】

明らかに、好ましくは集密に到達しないことを条件に、細胞の所定数を得るのに十分な時間、増倍工程を延長すると決定してもよい。その結果として、3D構造への播種の間の細胞密度は明らかに適合されなければならない。

【0071】

好ましい実行例により、増倍工程は1から3週間持続し、少なくとも4、又は更に少なくとも6、又は更に少なくとも7の比率で3D構造内の細胞を増倍させることができなければならない。

30

【0072】

結果として、発明者によって観察された増幅速度により、それが1~3週間で達成されるので、増幅工程の終わりに $4 \times 10^6$ 細胞~ $10.5 \times 10^6$ 細胞を得るために、概ね $10^6$ ~ $1.5 \times 10^6$ 細胞を含む300mg~500mgの軟骨の生検を使用することができる。そのような細胞数は、軟骨細胞構築物の移植に相当であると考えられる。

【0073】

細胞外マトリックスの合成が付随する再分化に連結される第2の工程は、様々な持続期間を有することができる。

40

【0074】

しかし、軟骨ゲルの再移植の目的で、そのような工程が2から4週間、好ましくは概ね3週間、又は実際それ未満持続することが好ましい。この第2の工程の持続期間は、選択される再移植様式に対応して任意選択で調整されてもよい。

【0075】

したがって、本発明の方法の実行の終わりに、新たに合成された軟骨マトリックス中に分布する軟骨細胞を含む組成物又は軟骨ゲルであって、例えば、関節軟骨の外傷性の限定的な欠損、又は早期表在性骨関節炎タイプの欠損、又は骨軟骨タイプのより深い欠損の結果である、軟骨関節欠損部を特に充填するために、ヒト又は動物に前記組成物又は軟骨ゲ

50

ルを直接的に移植することができるように、キトサン又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルの粒子で構成される3D構造内で軟骨組織の合成を継続することが可能である、前記組成物又は軟骨ゲルが得られる。

【0076】

したがって、この方法が完了すると、ヒト又は動物へのin vivoの注射又は移植のために直ちに使用できるキット又は軟骨ゲルが得られる。この方法の間、キトサンヒドロゲル又はキトサン誘導体ヒドロゲルの粒子を含む3D構造が部分的に生物分解されることがあっても、好ましくはそれは非常にわずかであり、好ましくは、播種前のキトサンヒドロゲルの粒子に基づき最初の3D構造の50%未満である。

【0077】

本発明の方法の工程、特にECM合成工程の持続期間によって、本発明の組成物又は軟骨ゲルは、同じくヒト又は動物に注射可能であると想定できるかもしれない。これに関して、組成物が注射可能なままであることを確実にするために、ECMを合成する第2の工程の持続期間は、数日間短縮される。

【0078】

対照的に、特に、非常に特異的な形の移植組織を得ることが望ましいとき、ECM合成工程は、その後に所望の形に組成物の形を調整することができる所望のコンシステンシーを得るように調整される。所望の形を有し、軟骨マトリックスを合成する工程の終わりに軟骨ゲルがその容器によって誘導される形状を有するような方法で、その容器の中で本方法の様々な工程が実行される容器の中で、構造を直接的に生成できるかもしれないことも想定可能である。

【0079】

上記の組成物は、本方法の第2の工程の間に細胞によって合成される硝子軟骨を含み、このため、それは軟骨ゲルと呼ばれる。

【0080】

本発明の主要な利点は、本方法の終わりに得られる組成物を直接的に移植することができるという事実に存在する。3D構造から細胞を移動させる必要が特になく、したがって、それらにいかなる処置を受けさせる必要がない。構造が消滅することを確実にすることも、その分解を待つことも必要でない。対照的に、本発明の方法により、ECM合成工程の終わりにキトサンベースの構造はなお存在し、移植する予定の組成物又は新組織の一部を形成する。実際、移植後に、ECMがその合成を続行し、したがって病変、例えば関節病変に完全に充填されることをそれが可能にするように、そのような構造は、適する環境に細胞を維持する足場の働きをする。したがって、キトサン構造はin vitroでECMの合成に有利に働くだけでなく、再移植の後に移植された細胞を支える働きもする。したがって、それは再移植された新組織の構造に加わる。

【0081】

この構造は、播種された細胞の最適化された空間分布も確実にし、したがって、本発明の方法の間及び再移植の後も、合成されたECMが調和して分布されることを可能にする。

【0082】

本発明の構造に移植される細胞の数は、それが充填される病変のサイズに対応して、及び播種のためにそれが収集する予定である細胞の数にも対応して異なることができる。しかし、好ましくは、少なくとも概ね $10^5$ 個の一次細胞、特に少なくとも概ね $6 \times 10^5$ 個の一次細胞、又は少なくとも $10^6$ 個の一次細胞、好ましくはヒト、イヌ又はウマの一次軟骨細胞が播種される。本発明の方法の終わりに、最終組成物は、好ましくは少なくとも $3 \times 10^5$ 個の軟骨細胞、又は少なくとも $6 \times 10^6$ 個の軟骨細胞、又はおそらくそれを超えて含む。軟骨病変に直接的に移植することができる組成物を得るために、増幅工程の終了後に $4 \sim 10.5 \times 10^6$ 個の細胞を得るために、 $10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 個の細胞が好ましくは播種される。

【0083】

本発明の1つの実行例により、組成物中の軟骨細胞は、培養の開始時に、3D構造1g当たり概ね少なくとも細胞数 $10^6$ 、好ましくは概ね少なくとも細胞数 $6 \times 10^6$ の濃度を有する。

10

20

30

40

50

## 【0084】

培養媒体:

特に好ましい実施形態により、2つの異なる培養媒体が使用される。1つは第1の増幅工程のためであり、もう1つは再分化及びECMの合成を誘導する第2の工程のためである。したがって、工程の一方から他方への通過は、媒体を改変することによって実行され、2つの媒体は異なる。

## 【0085】

特に、第1の工程の間、細胞の増殖に有利に働く媒体は、ECM合成を誘導することなく使用される。細胞の増殖には、脱分化の現象が一般的に付随する。しかし、増殖工程の終わりに軟骨細胞に再分化するそれらの能力を保存する媒体が使用される。

10

## 【0086】

発明者は、三次元構造内で、ECMの合成を全く誘導せずに、強い増幅工程を実行することが好ましいことを実際明白に示した。

## 【0087】

実際、本発明の前に、三次元構造及びキトサンは、細胞外マトリックス合成工程の間に脱分化を制限することによって軟骨細胞表現型に有利に働く、それらの能力について知られていた。完全に予想外に、キトサンヒドロゲル又は誘導体に基づく三次元構造中で細胞外マトリックスの大規模な合成を誘導することなく、軟骨細胞を増幅することが可能であることを発明者は示した。

## 【0088】

実験のセクションで例示されるように、増殖工程のために特に適する媒体は、増幅を誘導する媒体、特に、「F1」と命名された媒体に対応する、線維芽細胞増殖因子(FGF-2)、更にインスリンを含む媒体である(Claus等、2012)。FGF-2は2から10ng/mLの濃度で好ましくは存在し、インスリンは2から10 $\mu$ g/mLの濃度で存在する。しかし、当業者に周知である他の培養媒体、特に、単層であるが、この種の細胞のために最も使用される培養媒体のいずれかを使用することもできる。三次元構造及びキトサンのために、本発明の構造中に播種される細胞は、それらの円形形態及び後に軟骨細胞に再分化するそれらの能力を大部分保存する。

20

## 【0089】

第2の工程の培養媒体については、用いられる媒体は、脱分化した軟骨細胞の分化又は再分化を有利にし、ECMの特異的合成を可能にするために従来使用されているものである。そのような媒体は、当業者に周知である。特に好ましい媒体は、BMP-2(骨形成タンパク質2)を含む。好ましくは、媒体は、「BIT」と呼ばれる媒体に対応する、特にBMP-2及びインスリン、及び好ましくは更にトリヨードサイロニンT3(Liu等、2007、Claus等、2012)で構成される、実験セクションで使用されるものである。BMP-2は、好ましくは100~500ng/mLの範囲内の濃度であり、インスリンは2から10 $\mu$ g/mLの濃度であり、トリヨードサイロニン、T3は50から250mMの濃度である。

30

## 【0090】

BMP-2は好ましくは使用した細胞と同じ種からのもの、すなわちヒト細胞の場合はヒトBMP-2である。これは、動物細胞の場合も同じである。

40

## 【0091】

第1の工程の培養媒体の場合がそうであったように、ECM合成工程の終わりの組成物の後の再移植を妨害しない培養媒体が、第2の工程のために好ましい。これは、化合物が移植可能な装置のための規制と相容れない拒絶反応を起こす危険を冒すことを特に阻止する。

## 【0092】

更に、上で指摘した2つの工程の終わりの注射又は再移植の前に培養媒体を排除する工程を想定することができる。

## 【0093】

正常酸素又は低酸素条件の下で、第1及び第2の工程を独立して実行することができる。

## 【0094】

50

キトサンヒドロゲルの生成:

純粋なキトサン又はキトサン誘導体のヒドロゲルは、真菌類から好ましくは抽出され、長い巨大分子鎖の存在によって物理的ゲル化プロセスを有利にするために150kDa(すなわち150000g/mol)を好ましくは超える質量平均分子量(Mw)を有するキトサンから生成される。それは、好ましくは150~220kDaの範囲内である。

【0095】

キトサンが実質的に異なるモル質量を有する場合、特にそれが別の供与源から抽出される場合は、周知の技術を使用して、実験セクションに記載されるキトサンの物理的ヒドロゲルを生成するための方法を当業者が容易に応用できるかもしれない。

【0096】

更に、様々なアセチル化度を有するヒドロゲルのためにキトサンを使用することも可能である。しかし、好ましくは、キトサンのアセチル化度は、5%~60%の範囲内、好ましくは25%超、例えば25%から60%の間、又は28%から40%の間である。このアセチル化度は、細胞に好ましい環境を事実上誘導し、形成されるヒドロゲルと細胞の優れた接着に、及び優れた軟骨形成結果につながる。

【0097】

ヒドロゲルの形成の目的で、高分子鎖が絡まり、したがって物理的ゲル化に有利に働くことを可能にするために濃度が十分に高い、キトサンの溶液が好ましくは使用される。本発明と関連して、ヒドロゲルは、いかなる化学的架橋剤も使用することなく、完全に物理的なプロセスによって実際得られる。溶液中のキトサンの濃度は、0.5~4%(w/w)の範囲内、好ましくは1.5%超、又は2%超であってさえよい。好ましくは、キトサン又はキトサン誘導体は、中和の前にヒドロゲル中に質量で3.4%~4.2%の範囲内の濃度を有する。

【0098】

いくつかのキトサングル化方法を、本発明と関連して使用することができる。気体(アンモニア)による物理的ゲル化又は水アルコール若しくは水性媒体中での物理的ゲル化などの、以下の特に適する方法を、特に使用することができる。

【0099】

好ましくは、実験セクションの実施例1に例示されるように、本発明と関連して使用されるヒドロゲルは、アルコール媒体で実行される蒸発方法によって得られる。そのような方法は、水アルコールゲル化としても知られる。

【0100】

得られるヒドロゲルは、好ましくは3から5mmの間の厚さを有する。

【0101】

得られるヒドロゲルの孔径は、細胞のサイズより小さく、更に栄養素の自由な拡散及び老廃物の排除を可能にするために十分でなければならない。このタイプの孔径を得るために、上に記載され、実験セクションで実行される実施形態を使用することができる。本発明と関連して、キトサン又はキトサン誘導体のヒドロゲルは、その孔径がヒドロゲルの内部への細胞の浸透を可能にすることができないようなものであることに注意すべきである。したがって、本発明による三次元構造に播種される細胞は、ヒドロゲルの中に浸透することなく増殖する。細胞がヒドロゲルの孔の中で増倍しないので、及びそれらはヒドロゲル粒子の周囲を自由に移動することができるので、このことは、Correia等、2011で報告される実質的な細胞勾配なしで、構造内の細胞の均一な分布を得ることができることを意味する。

【0102】

細胞、特に軟骨細胞が浸透することを阻止するのに十分に孔径が小さいことを確実にし、それにもかかわらず栄養素の自由な拡散を可能にするために、当業者は、ヒドロゲルの孔径を決定し、その生成のためのパラメータを調整することができる。

【0103】

本発明の三次元構造の基礎を構成するヒドロゲル粒子を得るために、このように得られるヒドロゲルは、当業者に周知の任意の適する手段を使用して操作される。これは、ヒド

10

20

30

40

50

ロゲルが粒子に断片化されることを確実にする。

【0104】

このように得られるヒドロゲル粒子は形状が不規則であるが、好ましくは比較的均一なサイズ分布を有し、すなわち、粒子の50%は平均サイズの-20%から+20%の間のサイズを有する。好ましい実行例により、粒子は、10  $\mu\text{m}$  ~ 1500  $\mu\text{m}$  の範囲内、好ましくは200  $\mu\text{m}$  から1200  $\mu\text{m}$  (1.2mm) の間、より好ましくは400  $\mu\text{m}$  から700  $\mu\text{m}$  の間の平均サイズを有する。「粒径」という用語は、粒子が長方形に一様になるならば辺の長さを意味し、粒子が楕円に一様になるならば最大直径の長さを意味する。粒子は、好ましくは楕円として形成される。

【0105】

発明者は、100ミクロン超、特に60  $\mu\text{m}$  超、又は、実際400  $\mu\text{m}$  超及び1.2mm未満の平均サイズの粒子で、最良の結果を実証した。

10

【0106】

キトサンヒドロゲル粒子の粒径のある特定の変動性が、軟骨細胞の培養に好ましいようである。

【0107】

好ましい実施形態により、ヒドロゲルは、水アルコール経路を使用したゲル化によって最初に得られ、次に、任意の適当な手段を使用して断片化される。

【0108】

三次元構造の設計:

したがって、本発明による三次元構造は、上で詳述されるように、その中で細胞が播種されるか又は天然に移動する三次元構造を構成する、キトサン又はその誘導体の1つの物理的ヒドロゲルの粒子を含む。好ましい実施形態により、細胞はヒドロゲルの粒子と混合される。好ましくは、純粋なキトサン又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルは、キトサン又は誘導体及び好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%の量の水によって構成されるだけである。特に、このヒドロゲル組成物は、キトサンと天然に会合する - グルカンとは別として、化学的架橋剤もいかなる他のポリマー、特に多糖又は誘導体も含有しない。大きな百分率の水は、それが実際キトサンのヒドロゲルであって、スポンジ様構造又はキトサン溶液の凍結乾燥によって得られる他の構造でもないことを確実にする。軟骨組織は概ね80%の水を含むので、ヒドロゲル中の水の大きな百分率は、軟骨細胞の天然の環境をできるだけ良好に模倣することができることに注意すべきである。

20

30

【0109】

特に好ましい実施形態により、三次元構造の機械的及び生物学的性質を補強するために、キトサン又はキトサン誘導体のヒドロゲル粒子にアニオン性分子が追加される。この分子はヒドロゲルの組成物の一部を形成しないが、キトサン又はキトサン誘導体のヒドロゲルをゲル化した後、好ましくはヒドロゲル粒子を生成した後に追加される構成成分である。したがって、アニオン性分子は本発明によるヒドロゲル粒子の表面だけで相互作用し、それによってこのアニオン性分子の直鎖による「毛状の」キトサン粒子の形成を有利にする。

【0110】

キトサン粒子の表面に会合したアニオン性分子は、好ましくはポリマー、例えばヒアルロン酸又はコンドロイチン硫酸の形である。キトサン鎖はプロトン化された形のアミン基、 $\text{NH}_3^+$  のために正電荷を有し、このアニオン性分子の鎖は静電結合を通して相互作用し、それによって生理的媒体 (5 ~ 8 の範囲内、特に6 ~ 7 の範囲内のpH) で安定した複合体を形成する。したがって、粒子の周辺でキトサンのカチオン性鎖と相互作用することによってヒドロゲルの断片又は粒子を静電的に架橋結合し、それによって、細胞が播種される三次元構造又は足場の機械的性質を補強するために、アニオン性分子を使用することができる。

40

【0111】

アニオン性分子は、一次細胞を播種する前に三次元構造に追加すること、したがって、増殖し、ECMを合成する工程の間、したがって、組成物の後の移植の間にも存在すること

50

ができることに注意すべきである。本発明と関連して、アニオン性分子非含有三次元構造に一次細胞を播種すること、及び第1の増倍工程の間若しくは第2の再分化工程が開始される第1の工程の終わりに、又は移植前に再分化させECMを合成する第2の工程の終わりに再び後者を追加することを想定することもできる。

【0112】

アニオン性分子は、好ましくは、滑液の成分の1つであり、その軟骨保護的性質が知られ、軟骨形成に好ましいヒアルロン酸である。したがって、三次元構造の粘弾性特性を改変するのに必要なヒアルロン酸の量が、追加される。静電的相互作用は、キトサンのプロトン化された形のアミン基、 $\text{NH}_3^+$ とヒアルロン酸のカルボキシル基の間で起こる。

【0113】

ヒアルロン酸の誘導体又はヒアルロン酸の複合体を使用することもできる。キトサンヒドロゲルに対するアニオン性分子の相対割合は、好ましくは1%~10%の範囲内、好ましくは1%~3%の範囲内である。

【0114】

ヒアルロン酸は、例えば雄鶏とさかからの抽出による動物起源からであってもよく、又は細菌発酵によって得られた非動物起源からであってもよい。本発明と関連して、最も好ましくは、ヒアルロン酸は細菌起源からであるように選択される。実際、細菌発酵によって得られるヒアルロン酸は、それによってアレルギー及び拒絶反応を回避する生体適合性のそのより優れた性質、バッチの再現性及び医薬規格とのコンプライアンスが知られている。本発明と関連して使用されるヒアルロン酸は、医薬規格に従う。

【0115】

その質量分子量は、好ましくは50kDa~4MDaであり、好ましくは500kDa超、好ましくは500kDaから2MDaの間、例えば1MDaから2MDaの間であるように選択される。

【0116】

より詳細には、好ましくは本発明と関連して、キトサン又はキトサン誘導体のヒドロゲル粒子である三次元構造の成分は、アニオン性化合物の鎖の付加の有無にかかわらず、*in vivo*で再吸収可能でなければならない。そのような性質を得るために、三次元構造の成分のいずれもその再吸収可能な性質を妨害しないことが重要である。

【0117】

好ましくは、キトサン又はキトサン誘導体のヒドロゲル粒子の連合は、アニオン性化合物の鎖の有無にかかわらず、移植されてから数週後に、例えば少なくとも2週後に、好ましくは少なくとも4週後に再吸収される。再吸収時間が6カ月を超えないこと、好ましくは4カ月を超えないことが一般的に好ましい。想定されるタイプの適用によって、再吸収時間は、当業者が調整することができる。

【0118】

様々な標的化適用によって、本発明による組成物を形態、直径、濃度及び含有量に関して適合させることができることに注意することが重要である。特に、アニオン性化合物の鎖の有無にかかわらず、キトサン又はキトサン誘導体のヒドロゲル粒子で形成される三次元構造は、その形状が、本発明による方法の終了後にそれが再移植される観察された病変の形状に対応する方法で生成することができる。

【0119】

しかし、再移植の前に脱水工程は必要ではなく、望まれてもいない。

【0120】

上記のように、本方法は、特にヒト又はイヌ若しくはウマなどの動物のために、*in vivo*で移植又は注射で直ちに使用可能な軟骨ゲル又は組成物を得るために使用することができる。

【0121】

しかし、移植の前に、媒体を変更すること、又は追加の化合物、特に三次元構造で可溶性である化合物を追加することができる。一例として、それらの化合物の全部若しくは一部又はそれらの化合物の組合せを含めた、抗炎症剤、麻酔薬、鎮痛薬、コルチコステロイ

10

20

30

40

50

ド、ビタミン、ミネラル、免疫応答を低減することを目指している化合物及び/又は移植に有利に働く化合物などの医薬化合物を追加することを想定することができる。このリストは、非限定的である。

【0122】

第2の態様により、本発明は、キトサン又はキトサンの誘導体の物理的ヒドロゲルの粒子及びこれらの粒子に会合したアニオン性分子によって形成される三次元構造に関する。そのようなマトリックスは、軟骨細胞を播種し、それらを増殖させ、次に、特に本発明に従って使用するための細胞外マトリックス、より詳細には硝子軟骨に特徴的なマトリックスを合成させ、その後軟骨ゲルの形で特に関節欠損部に移植又は注射するために、有利に使用することができる。本発明と関連して実証されるように、そのような構造は軟骨細胞などの細胞の増殖を確実にするだけでなく、硝子軟骨マトリックスの合成に特に好ましい環境を提供するために、実際、使用することができる。本発明は、この三次元構造を含む移植可能又は注射可能な組成物、及び軟骨組織を合成することが可能である分化した軟骨細胞にも関する。組成物又は軟骨ゲルは、組成物に含有される軟骨細胞によって合成される軟骨マトリックスも含むことに注意すべきである。

10

【0123】

本発明の方法に関して指摘される様々な要素は、本発明の第1の態様、特に三次元構造、キトサン又はその誘導体、ヒドロゲル、粒子及びアニオン性分子について記載される通りである。この第1の態様との関連で好ましい実行例は、この第2の態様との関連でも好ましい。特に、キトサンは、好ましくは真菌類から得られる、より詳細には一般的なキノコ、ツクリタケの細胞壁から抽出されるキトサンである。粒子は、上で与えられる特異的サイズ、すなわち10 µmから1200 µmの間、好ましくは平均して400から700 µmの間を有する。したがって、構造は、好ましくは、400 µm~700 µmの範囲内の平均サイズを有する、キトサンの物理的ヒドロゲルの粒子によって形成される3D構造であり、前記キトサンは一般的なキノコから抽出される。

20

【0124】

アニオン性分子に関しては、本発明の方法について説明されるように、これは好ましくはポリマー分子、より好ましくはヒアルロン酸又はヒアルロン酸の誘導体又はヒアルロン酸の複合体、より具体的には細菌発酵に由来するヒアルロン酸である。

【0125】

本発明の組成物に存在する分化した軟骨細胞は、例えば関節軟骨細胞である。より好ましくは、それらはヒト又は動物、特にイヌ又はウマの軟骨細胞である。軟骨細胞は、軟骨細胞表現型、特に1を超えるCOLII/COLI分化指数を有する分化した軟骨細胞である。好ましくは、この組成物中に存在する軟骨細胞は、1を超える、好ましくは1.5を超えるCOLII/COLIタンパク質比でII型コラーゲンのタンパク質を主に合成し、及び/又はII型コラーゲンのメッセンジャーRNA含有量はI型コラーゲンのメッセンジャーRNA含有量より有意に高く、細胞のCOLII/COLI転写比は1より高く、例えば100超又は1000超である。

30

【0126】

本発明の一実行例により、組成物中の軟骨細胞の相対割合は、培養が開始されるとき、3Dヒドロゲル構造1g当たり細胞数 $10^6 \sim 10^7$ の範囲内の濃度に対応する。

40

【0127】

本発明の組成物は、他の化合物又は分子、特に細胞外マトリックス(ECM)を含むこともできる。

【0128】

好ましくは、記載される組成物又は軟骨ゲルは、本発明の方法を実行することによって、特に細胞を三次元構造内で培養し、次にそれらを増殖させ、続いて、ECM合成を伴うこれらの再分化によって得ることが可能である。

【0129】

追加の化合物、特に、例えば抗炎症剤、麻酔薬、鎮痛薬、コルチコステロイド、ビタミン、ミネラル、免疫応答を低減すること及び/又は移植を有利にすることを旨とする化合物

50

、これらの化合物の全部若しくは一部又はこれらの化合物の組合せから選択される可溶性化合物を追加することを想定することもできる。このリストは非限定的である。

【0130】

本発明の方法と関連して記載されるように、記載されるような三次元構造は有利には再吸収可能であり、特にin vivoで生体再吸収性である。キトサン又はキトサンの誘導体のヒドロゲルの性質は、組成物が移植された後の、三次元構造の統合された再吸収のために望まれるタイムスケールに対応して選択される。好ましくは、再吸収時間は、そのような再吸収が組成物中に存在する軟骨細胞による軟骨マトリックスの合成と同時に起こるように適合される。好ましくは、再吸収時間は、軟骨細胞によって形成される軟骨マトリックスがキトサン又はキトサン誘導体のヒドロゲルの三次元構造をそれ自体で完全に置換する

10

【0131】

本発明の別の態様により、本発明の方法の終わりに得られる、又は本発明の第2の態様に従って記載される組成物は、治療的及び/又は外科的使用のため、特に、軟骨組織の修復若しくは再建において、又は骨関節炎の治療において、より一般的には軟骨組織の分解若しくは消失、特に軟骨欠損、例えば関節軟骨の外傷性及び限定的欠損に続くもの、若しくは骨軟骨型のより深い欠損で特徴付けられる任意の疾患の治療において、移植組織又は構築物として使用するためのものである。in vivo使用のためのそのような組成物は、特に手術について、リウマチ学について、又は有効成分のためのベクターとして想定される。組成物又は軟骨ゲルは、関節鏡検査によって移植することができる。

20

【0132】

特定の想定される使用は、軟骨細胞移植におけるものである。好ましくは、移植される組成物中に存在する軟骨細胞は、自家又は同種異系細胞、好ましくはヒト、イヌ又はウマの軟骨細胞である。

【0133】

更なる態様により、本発明は、特に本発明の第1の態様による方法を実行するための、特に細胞外マトリックスの増殖及び合成のための、純粋なキトサン又はキトサンの誘導体の物理的ヒドロゲルの粒子又は断片によって形成される三次元構造及び細胞をin vitroで播種するためのその使用に更に関する。三次元構造は、上に記載されるものである。これは、キトサン又はキトサンの誘導体のヒドロゲルの場合にも当てはまる。このヒドロゲルは、上で説明したような一般的なキノコから好ましくは抽出され、好ましくは150~220kDaの範囲内である質量平均分子量を有する。ヒドロゲル粒子は、200 $\mu$ m~1.2mmの範囲内、より好ましくは400~700 $\mu$ mの範囲内の平均サイズを好ましくは有する。三次元構造のヒドロゲル粒子にアニオン性分子が好ましくは追加される。それは好ましくはアニオン性ポリマー、より詳細には特に細菌発酵によって得られる、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸の誘導体、又はヒアルロン酸の複合体である。

30

【0134】

三次元構造の要素に関して上で詳述される好ましい実行例の全ては、本発明のこの態様にも、より詳細には以下の特性にも適用可能である:ヒドロゲル粒子は、200 $\mu$ m~1.2mmの範囲内、好ましくは400~700 $\mu$ mの範囲内のサイズを好ましくは有し、及び/又は、キトサンは、好ましくは50kDa超、好ましくは150~220kDaの範囲内の質量平均分子量を有し、及び/又は、キトサンは、5%~60%の範囲内、好ましくは28%~40%の範囲内のアセチル化度を有し、及び/又は、ヒアルロン酸は、50kDa~4MDaの範囲内、好ましくは1~2MDaの範囲内の質量平均分子量を有する。

40

【0135】

キトサンヒドロゲルに対するヒアルロン酸の割合は、好ましくは1%~10%の範囲内、好ましくは1%~3%の範囲内である。上記のように、この三次元構造は、有利には、一次細胞、特に一次軟骨細胞、又は軟骨細胞に分化する一次幹細胞、特に間葉系幹細胞を播種又は培養するために使用される。しかし、他の種類の細胞、特に骨細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト又はこれらの細胞の中の特定のものの組合せを、この三次元構造で培養すること

50

ができる。このリストは、非限定的である。本発明者は、この三次元構造が、それらが増殖若しくは増倍相、又は細胞外マトリックスの合成相にあるかどうかにかかわらず、細胞に特に好ましい三次元構成を提供することを、実際実証した。更に、上記のように、この三次元構造は生分解性及び生体再吸収性であり、したがって、細胞によって播種されると *in vivo* でヒト又は動物に移植することができる。

【0136】

本発明と関連して、本発明による三次元構造、すなわち、アニオン性分子、好ましくはポリマー、特にヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はヒアルロン酸複合体によって静電的に架橋結合される、キトサン又はキトサン誘導体の物理的ヒドロゲルの断片又は粒子を含む三次元構造の *in vivo* 移植であって、前記構造は、3D構造が細胞によって *in vivo* で正確に定着するように細胞を含まない移植を、想定することもできる。

10

【0137】

本発明の様々な態様と関連して記載される三次元構造は、播種前に好ましくは滅菌される。

【図面の簡単な説明】

【0138】

【図1】純粋なキトサンの物理的ヒドロゲルの走査電子顕微鏡法顕微鏡写真を示す図である。

【図2】純粋な脱水キトサンの物理的ヒドロゲルの走査電子顕微鏡法顕微鏡写真を示す図である。

20

【図3】エオシン処理後の純粋なキトサンの物理的ヒドロゲルの光学顕微鏡検査画像を示す図である。

【図4】7日培養分画(FI媒体で増幅の間)でLive and Deadキットで測定された、軟骨細胞の初期密度に対応した、M1タイプの3D構造に播種された細胞の生存率を示す図である。×20の倍率の蛍光顕微鏡画像からの死細胞(黒色)及び生細胞(灰色)の計数を、ImageJソフトウェアで実行した。死細胞/合計細胞比を計算することによって、各条件について死細胞の百分率を計算した。

【図5】ヒアルロン酸を補充した又は補充しない、異なる粒径を有する真菌類から抽出されたキトサンの物理的ヒドロゲルの粒子に基づく3D構造での、又は、イカから抽出されたキトサンの物理的ヒドロゲルの粒子に基づく3D構造での軟骨細胞の、又は、更に「FI」培養条件の下で単層で培養された軟骨細胞の集団の時間に対応した漸進的变化を示す図である。細胞数は、縦軸に沿っている。日数で示す培養時間は、横軸に沿っている。

30

【図6】「FI」培養条件下で単層として培養した軟骨細胞の異なる初期密度についての時間に対応した軟骨細胞の集団の漸進的变化を示す図であり、得られた細胞集団が初期密度にかかわらず7日間を越えて同一であることを確認する。

【図7】純粋なヒドロゲル粒子の三次元構造内で培養された軟骨細胞の時間に対応した光学式顕微鏡画像を示す図である(M1)。図7Aは、播種の14日後のFI媒体での増幅工程から得られた細胞を表す図である。図7Bは、播種の24日後、すなわち再分化及びECM合成の誘導の10日後の、BIT媒体でのECM合成工程の間の細胞を表す図である。倍率は、×20である。

40

【図8】35日間の培養後の、単層技術と比較していくつかの初期細胞密度の3D構造(M1)で培養された軟骨細胞の定量的RT-PCRによって測定した、GAPDH遺伝子と比較したI型コラーゲン及びII型コラーゲンのメッセンジャーRNAの量を示す図である。

【図9】35日間の培養後の、単層技術と比較していくつかの初期細胞密度の3D構造(M1)に播種した軟骨細胞についての、定量的RT-PCRによって得られたCOL1I/COL1I遺伝子のメッセンジャーRNAの比を示す図である。

【図10】35日後の、単層で培養された軟骨細胞と比較して三次元構造M1で培養された軟骨細胞についての、I型及びII型コラーゲンのタンパク質カウントのウェスタンブロット分析を示す図である。アクチンの発現レベルは、対照の役割をする。

【図11】HES及びSO染色、並びにI型コラーゲン及びII型コラーゲンの免疫標識による、

50

同じ初期細胞密度( $6 \times 10^5$ 細胞)についての、35日後の単層で培養したもの( $\times 20$ )(MC)と比較して3D構造M1及びM2で培養した軟骨細胞の免疫組織化学による分析を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0139】

(実施例1)

物理的キトサンに基づくヒドロゲルの合成。

使用したキトサンは非動物起源であり、一般的なキノコ、ツクリタケの細胞壁から抽出された。その質量平均分子量(Mw)は、170g/molであり、そのアセチル化度(DA)は、32%であった。それは、粉末の形で使用された。

【0140】

酢酸の酸性溶液(水に1%)に、純粋なキトサンをキトサンのアミン基と化学量論的量で溶解した。キトサンが完全に溶解するまで、すなわち少なくとも3時間、好ましくは少なくとも6時間、溶液を室温で撹拌した。

【0141】

次に、1,2-プロパンジオールを酢酸のそれと同一の量で加え、少なくとも30分間、好ましくは1時間、室温で撹拌を継続した。その後、溶液が大量の気泡を示す場合は、混合物を室温で、又は必要であれば真空下で脱気してもよい。

【0142】

次に、マルチウェルプレート又は3cmシャーレのような容器に溶液を注ぎ、その後、好ましくは一晩、それを静置した。次に、ゲルの形成を可能にするのに必要な時間、好ましくは少なくとも20時間、好ましくは50 分の真空オープン中に溶液を置いた。

【0143】

ゲル化工程は室温で実行することもできたが、その後、より長い時間(キトサンの固有の特性によって5~8日間)を必要としたであろう。

【0144】

優れたゲル硬化のために蒸発及び疎水性様相互作用を有利にするように、ゲル化の前の溶液の濃度は、2~7mmの範囲内、好ましくは3~6mmの範囲内にあってもよかった。

【0145】

次に、得られた物理的ヒドロゲルを、0.1N水酸化ナトリウム溶液の塩基性媒体中で好ましくは1時間中和した。次に、水による、好ましくは滅菌水による数回の洗浄を実行した。過剰なアルコールを除去し、ヒドロゲルを中性pHにするために、各洗浄は、好ましくは概ね1時間持続した。一般に、少なくとも6回の洗浄を実行した。

【0146】

それによって得られたゲルは、概ね80質量%の含水量を有した。ヒドロゲル中のキトサンの質量による最終濃度は、中和の前に1%~4.5%の範囲内、好ましくは中和の前に3.4%から4.2%の間であった。

【0147】

キトサンに基づくヒドロゲルの合成の間、より詳細には真菌類からそれが抽出されるとき、温度及び湿度条件を好ましくは25 未満の室温条件下に制御することが重要である。

【0148】

これらの様々な工程の終わりに得られたヒドロゲルは、3~6mmの厚さ、好ましくは4から5mmの間の厚さを有し、乳白色であり、その表面は平滑及び規則的であった。しかし、その外観は、基礎のキトサンの固有の性質、特にアセチル化度、モル質量及び濃度に対して異なることがあった。それは、出発キトサンの固有の特性、特に、及び再びアセチル化度、モル質量及び濃度に依存した機械的性質を有する粘弾性ブロックの形であった。

【0149】

得られたヒドロゲルは操作するのが容易で、困難なしで、及びそれが生成された平面を引き裂くことなく切り離された。

【0150】

10

20

30

40

50

脱水ヒドロゲルの従来の走査電子顕微鏡観察は、図2に見られるように、生きた組織のそれに類似した、多孔質の原繊維3D構造を示した。水和ヒドロゲルの走査電子低温顕微鏡観察は、図1に見られるように、1から3 $\mu\text{m}$ の間の孔径を示し、それは、細胞がヒドロゲルの中に浸透することを可能にしなかったが、栄養素及び細胞老廃物の自由な拡散を可能にした。

#### 【0151】

(実施例2)

3D構造(構造M1及び構造M2)を生成するためのキトサンヒドロゲルの粒子/断片の合成。

構造M1:

実施例1の終わりに得られたキトサンヒドロゲルを1mm辺の小さい四角に切断し、その後10mLの水、好ましくは滅菌水に入れた。次に、Ultra Turraxを用いてヒドロゲルを6000~17000rpmで10秒間磨砕し、これを2~4回実行した。均一なサイズ及び予想される直径を有する粒子を得るために、400~700 $\mu\text{m}$ (50%)又は実際250~900 $\mu\text{m}$ (>80%)の、平均ほぼ650ミクロンの粒径を得るために、好ましくは6000rpmで10秒間の磨砕を3回繰り返した。

#### 【0152】

キトサンヒドロゲルの粒子によって構成されるペレットを回収するために、得られた溶液を好ましくは1375gで7分間、遠心分離した。図3は、得られたキトサン粒子の例を示す。軟骨形成細胞と接触するだろうキトサンの粒子の量を測定するために、ミニスプーンを使用した。予備的試験は、測定の実証性を示した。

#### 【0153】

構造M2:

軟骨細胞が播種された3D構造の粘弾性を補強するために、発明者は、アニオン性構成成分を追加し、キトサンのカチオン性官能基と相互作用することによって第2の構造(M2)も生成した。選択されたポリマーは、アレルギー又はいかなる拒絶反応も回避するために、好ましくは細菌起源のヒアルロン酸であったが、その理由は、そのような構成成分はそのより優れた生体適合性が知られているからである。構造M2を生成する際に使用されたヒアルロン酸の質量分子量は、概ね2MDaであった。ヒアルロン酸は、キトサンヒドロゲル粒子を調製した後に追加された。

#### 【0154】

(実施例3)

3D構造での細胞の培養

この実施例と関連して使用された細胞は、ヒト試料から得られたヒト軟骨細胞であり、文書FR 2 965 278(University of Caen Basse-Normandie、等)に記載されるプロトコールに従って処置した。

#### 【0155】

実施例2の終わりに得られた、ヒアルロン酸有り(3D構造M2)又はヒアルロン酸無し(3D構造M1)のヒドロゲル粒子を、例えば121 で15分間滅菌してから、細胞と接触させた。数ミニスプーン、好ましくは粒子数80~84に対応する2ミニスプーンのヒドロゲル粒子を取り出し、それらを挿入片(孔径8 $\mu\text{m}$ )で覆われた24ウェル培養プレートのウェルに導入した。ヒドロゲルの80~84粒子につき、1ウェル当たり $10^5$ から $10^7$ 個の細胞、好ましくはほぼ $6 \times 10^5$ 個の細胞をそれに加え、それらをキトサンヒドロゲル粒子と注意深く混合した。3D構造に対する細胞のこの割合は、播種の時点で、3D構造の1グラム当たり概ね $6.7 \times 10^6$ 個の細胞に対応した。

#### 【0156】

正常酸素条件下の5%の $\text{CO}_2$ 百分率による、37 のオープン中の制御された雰囲気下で、培養を実行した。

#### 【0157】

細胞は、キトサンヒドロゲル粒子に自然発生的に接着した。ウェルの底に落下した細胞の量は、無視できると考えられた。

#### 【0158】

10

20

30

40

50

対照として、上記のように得られた $6 \times 10^5$ 個の細胞を、3D構造について上に記載したそれらと同一だった培養条件(正常酸素状態の5%のCO<sub>2</sub>百分率による、37 °Cのオープン中の制御された雰囲気)の下で、24ウェルプレートのプラスチックの上の単層で培養した。細胞は、同じく自然発生的にそこに接着した。

【0159】

(実施例4)

細胞増殖工程

この工程では、選択された培養媒体は、細胞の増倍に好ましかった。

【0160】

選択された媒体は、5ng/mLの濃度のFGF-2+5 μg/mLの濃度のインスリンを含む「FI」溶液を補充したDMEM-HAM F12+1% AB(ストレプトマイシン/ペニシリン)+10FCSの50/50溶液であった。(Claus等;2012)。

10

【0161】

短い期間の後、細胞増殖を有利にすることが知られているこの培養媒体から、前の工程に記載した混合物を回収した。

【0162】

この増幅相の間に、単層培養の場合と同様に、3D構造での培養のために1週間につき3回培養媒体を更新した。十分な細胞数を得るために、増殖期間は1から2週間持続した。

【0163】

細胞が純粋なヒドロゲルの粒子によって構成された構造(3D構造M1)に播種されたときは増殖相が概ね2週間持続し、ヒアルロン酸などのアニオン性分子の直鎖が補充されたヒドロゲル粒子の存在下(3D構造M2)では1週間まで短縮することができたことを、発明者は観察した。

20

【0164】

更に、ヒドロゲルの質量当たりの細胞数又はヒドロゲルの体積当たりの細胞数又はヒドロゲル粒子の数当たりの細胞数に関する条件が厳守されるならば、挿入片当たり $6 \times 10^5$ 個の細胞の初期量は当然ながら増加することができた。例として、方法の終わりに挿入片当たり $4 \times 10^6$ 個を超える細胞、又は挿入片当たり $10.5 \times 10^6$ 個以上の細胞さえも得るために、必要な量の3D構造が追加されるならば、挿入片当たり $1 \sim 1.5 \times 10^6$ 個の細胞を播種することが完全に可能である。

30

【0165】

光学式顕微鏡による分析:

位相差顕微鏡法による分析を実行した。それは、細胞がキトサンヒドロゲルの粒子に良好に接着し、この環境がそれらの培養に好ましいことを確認した。培養条件(三次元構造M1又はM2、及びFI培養媒体)は、軟骨細胞の増殖及び分裂に有利に働いた。

【0166】

観察された細胞は、孤立して、又はクラスタ/房状に増殖することができた。ヒドロゲル粒子の3D構造で実行された培養は、主に丸い細胞を示した。周辺で、すなわち構造と外部媒体の間のインターフェイスで時折観察されたこと以外は、線維芽細胞に特有の細長い形は3D構造M1及びM2では観察されなかった。

40

【0167】

対照として、発明者は単層培養を同時に実行した。24時間の培養後、構造M1及びM2に播種した細胞と同じFI媒体で、軟骨細胞は線維芽細胞に特有の細長い形態をとった。

【0168】

細胞の生存率:

三次元構造内に播種された軟骨細胞の生存率は、7日後(FI媒体での増幅の間)の培養分画についてLive and Deadキットで測定した。ImageJソフトウェアを使用して、死細胞(赤色)及び生細胞(緑色)を倍率 $\times 20$ の蛍光顕微鏡画像から計数した。死細胞/合計細胞比を計算することによって、各条件について死細胞の百分率を推定した。生存率は、93%超又は実際97%超で、それは3D構造との優れた適合性を実証した。

50

【0169】

図4は、得られた結果を例示する。

【0170】

増殖試験：

トリプシンで細胞を切り離し、死細胞をトリパンブルーで染色した後に、Cellometer T4を使用して全細胞を計数することによって、増殖試験を実行した。

【0171】

D0に一次軟骨細胞を播種した後に、培養の1日(D1)、14日(D14)及び21日(D21)後に測定を実行した。

【0172】

図5は、細胞集団での漸進的变化を例示する。

【0173】

7日後に、細胞数の増加が明らかに観察された。細胞は、3D構造並びに単層(MC)において非常に良好に生存し、増殖した。

【0174】

三次元構造のM1又はM2で、細胞は増倍工程の間円形のままだったが、単層ではそれらは線維芽細胞のような細長い形状をとった。

【0175】

更に、図6は、単層では、播種された細胞の初期密度にかかわらず、細胞集団が7日後から同一だったことを示す。

【0176】

結論として、この増殖工程の終わりに、純粋なキトサンヒドロゲルの粒子で構成される三次元構造(構造M1)での細胞の増幅は、軟骨細胞などの細胞の増倍のための参照プロトコールであるが、構造M1を用いて回避することができるトリプシン処理工程を含む単層(MC)の場合とほとんど同じくらい生産的であるのが観察された。

【0177】

キトサンヒドロゲル粒子の三次元構造(構造M2)にヒアルロン酸を追加することは、M1構造又は単層培養よりかなり強い、特に2の比の、細胞増殖の非常に強力な加速を誘導した。

。

【0178】

(実施例5)

細胞外マトリックスの分化及び生成

本発明と関連して、増倍及び分化のための工程は好ましくは異なった：第1に細胞を増倍させ、第2にそれらを分化させ、細胞外マトリックスを生成する。先行する増倍工程のために使用される培養媒体は、15日後に改変した。細胞を分化させ細胞外マトリックスを生成する工程を有利にする狙いで、培養媒体「FI」を媒体「BIT」と置き換えた。

【0179】

したがって、培養媒体は好ましくは以下で構成された：50/50 DMEM-HAM F12+1% AB(ストレプトマイシン/ペニシリン)+10FCS、これに以下で構成されるBIT溶液を追加した：BMP-2、200ng/mL+インスリン、5µg/mL+トリヨードサイロニン、T3、100mM(Claus等、2012)。

【0180】

この新鮮な培養媒体は、2、3日おきに更新した。再分化及び軟骨形成の期間は、好ましくは3週間持続した。対照として、単層で培養した細胞に関して同じ媒体変更が用いられた。

【0181】

光学式顕微鏡による分析：

FI媒体中の単層の原繊維外観を有する細胞は、BIT媒体での1週間の培養後に円形になることが知られている。単層で培養した細胞(対照に対応する)は、BIT媒体に変更した後に外観を変え、培養媒体の変化が細胞の挙動の変化を実際に誘導したことを示した。

【0182】

10

20

30

40

50

ヒドロゲル(構造M1及びM2)では、増幅相の終わりに細胞は主に円形で、細胞外マトリックスの生成の全体の相の間、円形であり続けた。この点は、特に図7に例示される。

【0183】

培養の終わりのD35に、ヒドロゲル(構造M1及びM2)で細胞は全て円形であったが、単層ではそれほどでなかった。

【0184】

三次元構造では、細胞はヒドロゲルの粒子を凝集させ、多かれ少なかれ圧縮された形を有するある種の「ビーズ」を形成することができた。しかし、この観察は、ヒドロゲルを含有したが、対照の役割をした単層ではない、大半の条件下で行った。この観察は、細胞の周囲に蓄積した細胞外マトリックスの強力な生成の証明となる。細胞は、三次元環境において単層におけるより多くの細胞外マトリックスを生成した。

10

【0185】

特定の条件下では、しかし、大量の細胞外マトリックスの合成にもかかわらず、前記ビーズによって構成された組成物は注射可能なままだったことに注意すべきである。いかなる場合にも、組成物は移植可能だった。

【0186】

PCR試験:

以下のタンパク質の転写の程度を数量化するために、PCRを使用した:COLI、COLII及びGAPDH。転写の程度は、COLI及びCOLIIの転写のレベルを比較するための参照の役割をする。実際、軟骨細胞の表現型及び細胞外マトリックスの生成にはCOLII転写物の強力な合成が付随し、COLI転写物が、特に線維芽細胞表現型への脱分化の過程に一般的に付随することがよく知られている。結果を、図8に示す。

20

【0187】

ECM合成工程の終わりにもたらされたCOLII/GAPDH結果は、ヒドロゲルでの培養で単層培養でより多くのCOLII転写物があることを示す。COLI/GAPDH結果は、対照的に、単層培養において三次元構造内の培養におけるより多くのCOLI転写物があることを示す。

【0188】

COLII/COLI比の計算の結果を、図9に例示する。それは、この比が実際はより優れていること、及び、実際、単層と比較してキトサンヒドロゲルの粒子によって構成された3D構造中での脱分化の後に、再分化が大いにより優れていることを示す。

30

【0189】

したがって、試験した三次元環境は、少なくとも6の比率の、前の強い増倍の後に、脱分化した軟骨細胞の再分化に実質的に有利に働く。この3D構造は、軟骨細胞表現型の発現に有利に働く。

【0190】

したがって、培養条件(キトサンヒドロゲル及びBIT培養媒体に基づく三次元構造)は、単層培養と比較して、軟骨細胞の再分化及び軟骨マトリックスの生成に有利に働く。

【0191】

ウェスタンブロット試験:

培養条件(3D又は単層)に対応するColI及びColIII遺伝子の転写の程度を検証した後に、対応するタンパク質の合成の程度をウェスタンブロット技術を使用して検証した。様々なウェスタンブロットの結果を、図10に例示する。

40

【0192】

抗COLIIウェスタンブロットの結果は、全ての条件でCOLIIの存在を明らかにした。抗COLI WBの結果は、単層でより強いスポットを明らかにした。この観察は、Q-PCRで明らかにされた事実の確証となる。COLII/ColI比は、単層より3Dヒドロゲル構造でより高い。

【0193】

ウェスタンブロット分析は、3D構造中の関節軟骨の特徴的なタンパク質の発現を示した。

【0194】

50

## 免疫組織化学結果:

ECM、プロテオグリカン及びコラーゲンI型及びII型の合成のレベルにおいて、三次元構造を使用した新規方法及び単層を使用する伝統的な培養の実行例を比較するために、免疫組織化学を使用して、得られた組成物を次に観察した。結果を、図11の写真に例示する。

## 【0195】

GAGの存在を実証するサフラニンO染色(SO)のために、三次元構造(図11のM1及びM2)において単層(図11のMC)におけるより多くのプロテオグリカンの存在が明らかに観察される。更に、核及びECMの存在を実証するHES染色及びCOLIIの存在を実証するコラーゲンII免疫標識によりそれぞれ証明された、三次元環境での細胞の免疫組織化学画像で、多くの細胞外マトリックス及びII型コラーゲンの生成が観察された。コラーゲンI免疫標識によるマトリックス中の細胞の強調は、軟骨細胞が三次元構造で培養されるときのコラーゲンIの準不在も確認する。

10

## 【0196】

(実施例6)

## 軟骨細胞移植

細胞及び3D構造(すなわちキトサンヒドロゲルの粒子によって構成される構造M1又はヒアルロン酸のようなアニオン性分子が補充されたキトサンヒドロゲルの粒子によって構成される構造M2)のアセンブリーは、培養の終わりに、すなわち3から6週の間、関節鏡検査によって注射又は移植することができる軟骨新組織を構成する。

## 【0197】

3D構造を構成するヒドロゲルの質量又はヒドロゲル粒子の数に対する細胞数の同じ条件を保ちながらもヒドロゲルの量を増加させることによって、挿入片中の細胞数を増加させることが明らかに可能である。

20

## 【0198】

例として、0.3g~0.5gのヒト軟骨の試料の場合、 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ 個の細胞(軟骨細胞)を抽出することができる。前の実施例で、発明者は、ヒドロゲルの80~84粒子に対応する0.09gのヒドロゲル構造において、挿入片当たり $6 \times 10^5$ 個の初期細胞から出発して、挿入片当たり $3.6 \times 10^6$ 個の細胞をそれらから得ることが可能であることを実証したので、以下の濃度データが得られた:

- ・生体材料1g当たり細胞数 $6.7 \times 10^6$ の初期濃度、
- ・生体材料(3D構造)1g当たり細胞数 $40 \times 10^6$ を超える最終濃度。

30

## 【0199】

細胞数 $1 \sim 1.5 \times 10^6$ の試料の場合、 $3 \times 10^6$ 個を超える細胞を得ることができ、又は推奨量が $3.2 \sim 6.5 \times 10^6$ 個の細胞数である構築物にとって十分である2~5週後の方法の終わりには、 $10.5 \times 10^6$ 個を超える細胞さえ得ることができる。

## 【0200】

前の実施例の結論として、以下の点が観察される:

増幅/増倍相の間:

- ・純粋なキトサンヒドロゲルの粒子を含む三次元構造で単層培養と比較して同等の収率又は実際より大きな収率、
- ・ヒアルロン酸を補充したヒドロゲル粒子を含む三次元構造で単層より大いに高い収率

40

## 【0201】

分化及びECM生成のための相の間:

- ・PCR、WB及び免疫組織化学分析によって証明される、3D構造内及び単層での細胞の再分化;
- ・単層培養と比較して三次元構造で有意により高いCOLII/COLIメッセンジャーRNAの比、
- ・単層より三次元構造で有意に高い、COLII/COLIタンパク質比、
- ・3D構造中で安定した軟骨細胞表現型、

50

・3D構造での軟骨マトリックスの豊富な生成。

【0202】

構造化分子の有る無しのカイトサンヒドロゲルの粒子を含む同じ三次元媒体での工程の連続、増幅、その後の分化/軟骨形成は、優れた機械的及び生物学的性質を有する注射可能な又は移植可能な軟骨新組織の生成に非常に好ましい。

【0203】

ヒアルロン酸の追加は、細胞の増幅過程を加速することによって系を改善し、このことは、移植される細胞数を増加させることができるか、又はプロトコール全体で1週間を節約することができることを意味する。

【0204】

細胞との接触面を最適化するために、構造の構成を使用することができる。

【0205】

(実施例7)

様々な3D構造間の比較。

発明者は、ヒドロゲル粒子を構成するカイトサンの種類、ヒドロゲル粒子のサイズ並びにヒアルロン酸の存在及び濃度を変えることによって、前の実施例、特に実施例2に記載される3D構造を再生した。増殖比を比較し、得られた結果を表1に例示する。値1は、真菌類のカイトサンから得られた数百ミクロンの粒子に対応する構造M1に帰された。

【0206】

構造M2(真菌類から抽出され、2Mヒアルロン酸を補充した)で得られた増殖比は、構造M1(真菌類から抽出され、ヒアルロン酸を補充しない)の2倍高く、それは、それ自体で、イカから抽出されるカイトサンより1.5倍高い増殖速度を得ることを、又は、実際ほぼ数十 $\mu\text{m}$ のサイズの粒子で可能にする。

【0207】

【表1】

	断片、 数百 $\mu\text{m}$	断片、 数十 $\mu\text{m}$
2M HAを補充した真菌類から抽出されたカイトサン	2**	
1M HAを補充した真菌類から抽出されたカイトサン	1.2	
真菌類から抽出されたカイトサン	1*	0.67
イカから抽出されたカイトサン	0.67	

\* 構造M1; \*\* 構造M2

表1:増殖比

【0208】

(参考文献)

10

20

30

- Claus S**, Mayer N, Aubert-Foucher E, Chajra H, Perrier-Groult E, Lafont J, Piperno M, Damour O, Mallein-Gerin F. Cartilage-characteristic matrix reconstruction by sequential addition of soluble factors during expansion of human articular chondrocytes and their cultivation in collagen sponges. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(2):104-12.
- Correia CR**, et al. Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011 Jul;17(7):717-30.
- Denuziere A**, Ferrier D, Damour O, Domard A. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials*. 1998;19(14):1275-85. 10
- Griffon DJ**, Sedighi MR, Schaeffer DV, Eurell JA, Johnson AL. Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater*. 2006 May;2(3):313-20.
- Hao T**, Wen N, Cao JK, Wang HB, Lü SH, Liu T, Lin QX, Duan CM, Wang CY. The support of matrix accumulation and the promotion of sheep articular cartilage defects repair in vivo by chitosan hydrogels. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Feb;18(2):257-65.
- Hautier A**, et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates chondrogenic expression in human nasal chondrocytes expanded in vitro. *Growth Factors*. 2008;26(4):201-11. 20
- Hoemann CD**, Sun J, Legare A, McKee MD, Buschmann MD. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(4):318-29.
- Lahiji A**, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG. Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res*. 2000;51(4):586-95.
- Liu G**, et al. Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes. *J Biol Chem*. 2007 Jul 13;282(28):20407-15. 30
- Montebault A**, Tahiri K, Korwin-Zmijowska C, Chevalier X, Corvol MT, Domard A. A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. *Biochimie*. 2006 May;88(5):551-64.
- Park H**, Choi B, Hu J, Lee M. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater*. 2013 Jan;9(1):4779-86.
- Suh JK**, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. 2000;21(24):2589-98. 40
- Tallheden T**, et al. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(3):R560-8.

【 図 1 】

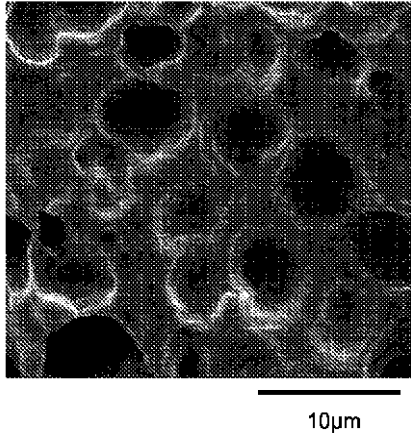


FIG. 1

【 図 2 】

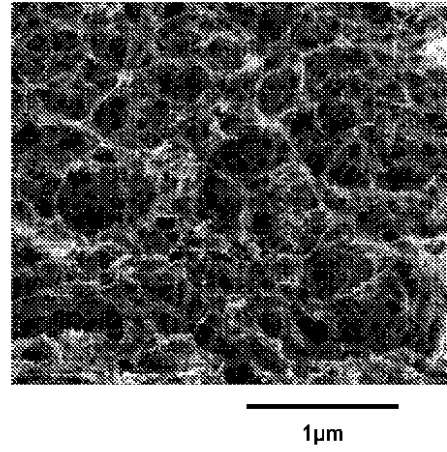


FIG. 2

【 図 3 】

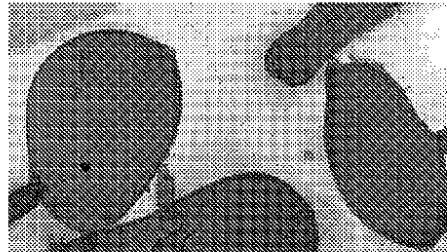


FIG. 3

【 図 4 】

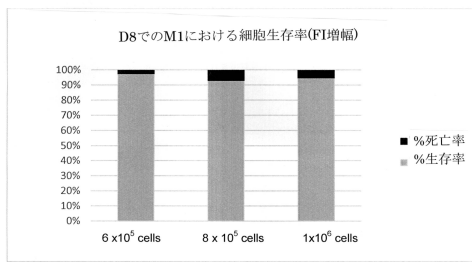


FIG. 4

【 図 6 】

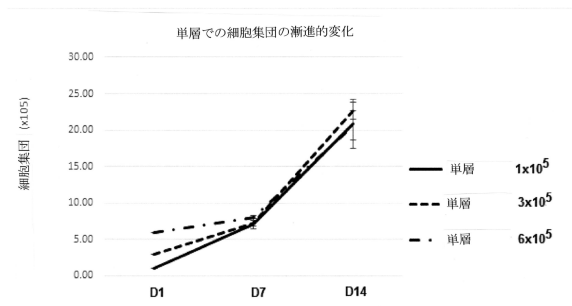


FIG. 6

【 図 5 】

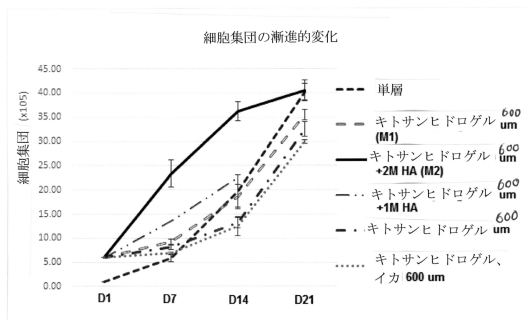
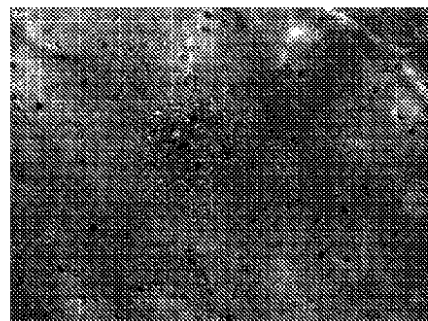


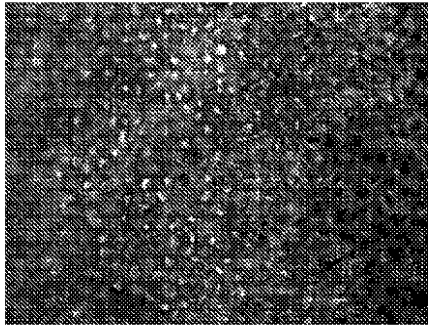
FIG. 5

【 図 7 A 】



7A

【図7B】



7B

【図9】

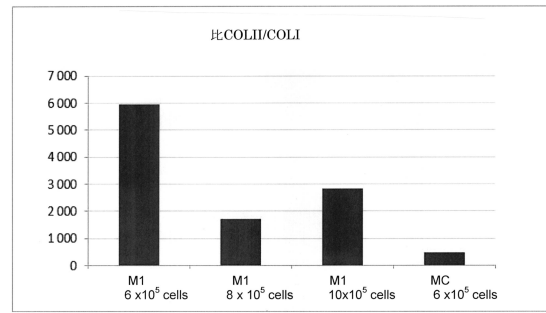


FIG. 9

【図8】

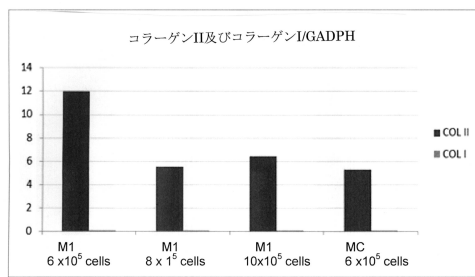


FIG. 8

【図10】

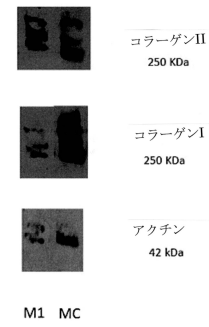


FIG. 10

【図11】

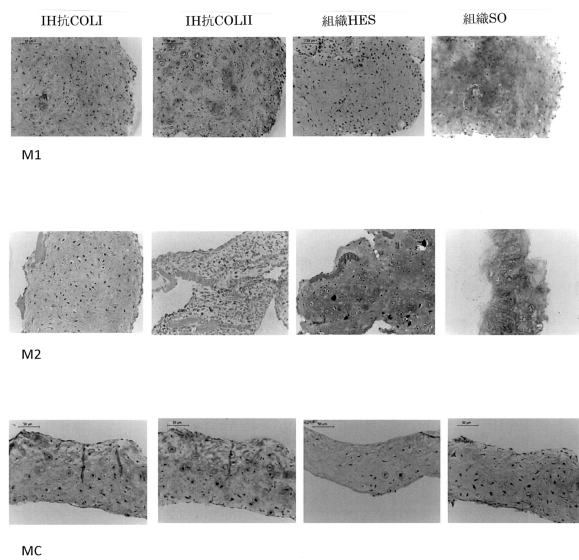


FIG. 11

## フロントページの続き

(73)特許権者 503161615

ユニベルシテ クロード ベルナール リヨン 1  
フランス・69622・ヴィリュールバンヌ・セデックス・プールヴァール・デュ・11・ノヴェ  
ンブレ・1918・43

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 パスカル・アゾ

フランス・69100・ヴィルルバンヌ・リュ・マンサール・13

(72)発明者 フレデリック・マラン・ジェラン

フランス・69004・リヨン・プールヴァール・ドゥ・ラ・クロワ・ルッス・3

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 特開2002-291461(JP,A)

特表2011-510662(JP,A)

特表2008-523870(JP,A)

特表2013-520188(JP,A)

特表2003-518926(JP,A)

特開2002-209573(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 27/20

A61L 27/38

A61L 27/50

A61L 27/52