

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038957**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.15

(51) Int. Cl. **A61L 27/36** (2006.01)
A61F 2/04 (2013.01)

(21) Номер заявки
201591373

(22) Дата подачи заявки
2013.05.27

(54) **ИЗГОТОВЛЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫМ МАТРИКСОМ
ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ НЕРВНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ
ПОВРЕЖДЕННЫХ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ**

(31) **201310028903.6**

(56) CN-A-102343114
WO-A1-2012094611
CN-A-101434934
WO-A2-2011119804
CN-A-101616698
CN-A-1589913
WO-A2-2005046457
CN-A-103041450

(32) **2013.01.25**

(33) **CN**

(43) **2016.01.29**

(86) **PCT/CN2013/076239**

(87) **WO 2014/114043 2014.07.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НАНЬТУН ЮНИВЕРСИТИ (CN)

(72) Изобретатель:
**Гу Сяосун, Дин Фэй, Гу Юнь, Сюэ
Ченбин, Ян Юймин, Ван Юнцзюнь,
Гун Лэйлэй (CN)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Тканеинженерный нервный трансплантат для восстановления поврежденных периферических нервов составляют нервный проводник и внеклеточный матрикс (ЕСМ), который выделяется аутогенными или аллогенными поддерживающими клетками и получается посредством децеллюляризации. Способ изготовления модифицированных внеклеточным матриксом тканеинженерных нервных трансплантатов, содержащих поддерживающие клетки и нервный проводник, и изготовление модифицированного внеклеточным матриксом тканеинженерного нервного трансплантата.

B1**038957****038957****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение, относящееся к области техники медицинских биоматериалов, используемых для трансплантации в организм человека, предлагает изготовление модифицированных внеклеточным матриксом (ЕСМ) тканеинженерных нервных трансплантатов для восстановления поврежденных периферических нервов.

Уровень техники

В процессе общественного развития и постоянного ускорения повседневной жизни людей возрастающее число несчастных случаев, которые вызывают дорожно-транспортные происшествия, промышленность, спорт, местные войны, насильственные действия и стихийные бедствия (например землетрясения), приводит к повреждениям периферических нервов. Когда образующееся повреждение нерва средней и большой длины не может быть устранено посредством сшивания концов в клинических условиях, требуется введение нервного трансплантата для восстановления поврежденного нерва. Хотя нервные трансплантаты исследуются и разрабатываются уже в течение более ста лет, по-прежнему осуществляются значительные усилия в целях разработки идеальных нервных трансплантатов, чтобы заменить аутогенные нервные трансплантаты в клинической практике. Несмотря на то, что они представляют собой золотой стандарт для восстановления периферических нервов, аутогенные нервные трансплантаты невозможно широко использовать в клинических условиях вследствие их нескольких ограничений, таких как недостаточное снабжение донорскими нервами, несоответствие между поврежденным нервом и донорским нервом в отношении структуры и размера, а также осложнения на месте донорского нерва и вторичные нарушения.

Благодаря возникновению и развитию отрасли тканевой инженерии, обеспечивается уникальная возможность изготовления тканеинженерных нервных трансплантатов в качестве перспективной альтернативы аутогенным нервным трансплантатам. Существующие тканеинженерные трансплантаты включают, главным образом, два важных типа. Один тип представляет собой ацеллюлярный аллогенный нерв, т.е. ацеллюлярный нервный трансплантат (ANG), в котором удалены клетки в аллогенной ткани, но сохраняется исходная архитектура нерва. Ацеллюлярный нервный трансплантат удовлетворяет основным требованиям для нервных трансплантатов в тканевой инженерии периферических нервов и представляет собой произведенный из ткани модифицированный внеклеточным матриксом тканеинженерный нервный трансплантат. Например, в исследовательской статье описано, что ANG индуцирует дифференциацию стромальных клеток костного мозга (BMSC) взрослых крыс в клетки Шванна (Schwann) (He Hongyun, Deng Yihao, Ke Xiaojie и др., "Морфологическое исследование дифференциации стромальных клеток костного мозга крыс в клетки Шванна посредством ацеллюлярных нервных трансплантатов", Chinese Journal of Neuroanatomy (китайский журнал нейроанатомии), 2007 г., т. 23(6). В другой работе исследовано защитное действие имплантированного ANG на мотонейроны переднего рога спинного мозга (Liu Jinchao, Lin Xiaoping, Ke Xiaojie и др., "Защитное действие ацеллюлярных нервных матриксных аллотрансплантатов на мотонейроны переднего рога спинного мозга", Progress of Anatomical Sciences (Успехи анатомических наук), 2005 г., т. 3, с. 206-209), и показано, что использование ANG для восстановления поврежденных периферических нервов производит превосходное защитное действие на клеточное тело мотонейронов. Хотя существуют многочисленные исследования технологии изготовления ANG, которые быстро развиваются, многие способы изготовления включают усложненные процедуры, и в течение этих процедур наносится ущерб тонким структурам и механическим свойствам биоматериалов. Способы другого типа основаны на изготовлении нервных проводников, имеющих надлежащую форму и содержащих ЕСМ или поддерживающие клетки, которые покрывают их внутренние и внешние поверхности. Например, в исследовательской статье описано использование соединительного трансплантата, который составляет ЕСМ, источником которых являются обкладочные нейроэпителиальные клетки (ОЕК) - клетки Шванна, и сополимер D,L-молочной кислоты и гликолевой кислоты (PLGA), чтобы защищать периферические целевые органы и нейроны спинного мозга после повреждения седалищного нерва (You Hua, Jiao Shusheng, Feng Shuainan и др., "Защитное действие тканеинженерных искусственных нервов на периферические целевые органы и нейроны спинного мозга после повреждения седалищного нерва", Chinese Journal of Trauma (Китайский журнал травматологии), 2010 г., т. 26, № 3, с. 265-269). Следующий пример представляет патент Китая (заявка № CN 03134541.7) и публикация заявки № CN 1589913) под заголовком "Тканеинженерный периферический нерв, используемый для восстановления поврежденных периферических нервов, и способ его изготовления", где описан тканеинженерный нерв, используемый для восстановления поврежденных периферических нервов. Тканеинженерный нерв составляет нервный проводник, изготовленный из биоразлагающихся материалов с добавлением глиальных клеток или стволовых клеток, которые обладают способностью дифференциации в глиальные клетки, используемые как засеваемые клетки, и их модифицируют микросферы для регулируемого высвобождения нейротрофических факторов и молекул ЕСМ.

В настоящее время поддерживающие клетки, используемые в тканеинженерных нервах, включают клетки Шванна и разнообразные стволовые клетки, которые представляют собой аллогенные клетки и могут вызывать иммуногенность, что не является подходящим для применения в клинических условиях. С другой стороны, не в полной мере можно прогнозировать поведение в условиях организма и биологи-

ческое действие поддерживающих клеток после того, как они имплантируются в организм, и они могут инактивироваться в среде организма, и, таким образом, желательное биологическое действие не осуществляется. Все вышеупомянутые проблемы ограничивают разработку тканеинженерных нервных трансплантатов.

Сущность изобретения

Задачу настоящего изобретения представляет собой изготовление модифицированных произведенным из клеток ЕСМ тканеинженерных нервных трансплантатов для восстановления поврежденных периферических нервов. Нервные трансплантаты являются благоприятными для клеточной адгезии и способны ускорять регенерацию аксонов, преодолевая, таким образом, недостатки существующих технологий. Настоящее изобретение выполнено на основе методов тканевой инженерии и использует ротационный клеточный реактор для культивирования поддерживающих клеток в нервном проводнике и полостных волокнах, после чего осуществляется децеллюляризация, чтобы стимулировать секретирование ЕСМ из поддерживающих клеток, и, таким образом, получают модифицированные произведенным из поддерживающих клеток ЕСМ тканеинженерные нервные трансплантаты для восстановления поврежденных периферических нервов. Настоящее изобретение может преодолевать ограничения аутогенных нервных трансплантатов, предотвращает иммуногенность аллогенных нервных трансплантатов, обеспечивает ЕСМ, благоприятный для адгезии нервных клеток, и создает среду, подходящую для регенерации аксонов. Таким образом, настоящее изобретение способствует ускорению регенерации нервов и восстановлению их функций, и на его основе может быть разработана практически осуществимая клиническая терапия. Техническая схема настоящего изобретения заключается в следующем.

Тканеинженерный нервный трансплантат для восстановления поврежденных периферических нервов составляют нервный проводник и ЕСМ, который секретруется аутогенными или аллогенными поддерживающими клетками и получается посредством децеллюляризации. Поддерживающие клетки могут представлять собой индивидуально или в сочетании клетки Шванна, полученные из кожи фибробласты, стволовые клетки кожи, мезенхимные стволовые клетки костного мозга или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Нервный проводник составляют биоразлагающиеся материалы, которые предпочтительно представляют собой индивидуально или в сочетании фиброин шелка, хитозан, коллаген, полимолочную кислоту и полигликолевую кислоту.

Нервный проводник может представлять собой просто тканеинженерный нервный трансплантат, который обычным образом производится и применяется в данной отрасли. Предпочтительным является имеющий пористую поверхность и хитозановую основу нервный проводник, который имеет пористость от 50 до 90%, размер пор от 30 до 300 мкм, высокую прочность при растяжении, внутренний диаметр от 0,5 до 8 мм и толщину стенок от 0,1 до 3 мм, причем он может быть изготовлен согласно способу, описанному в патенте (патентная заявка Китая № CN 201110324474.8, озаглавленная "Тканеинженерный нервный трансплантат и его функции"). Кроме того, предпочтительным является еще один наноразмерный нервный проводник на основе фиброина шелка, который может быть изготовлен, в частности, согласно способу, описанному в патенте (патентная заявка Китая № CN 200910034583.9 и публикация № CN 101664346 под заголовком "Искусственный нервный трансплантат, изготовленный посредством электропрядения, способ его изготовления и соответствующие устройства"). Третий выбранный нервный проводник имеет композитную структуру, которую составляет поверхностно-пористый нервный проводник на основе хитозана или нервный проводник на основе фиброина (любой нервный проводник может быть изготовлен согласно вышеупомянутым патентам) с введением 120 волокон из фиброина шелка в качестве полых наполнителей.

Настоящее изобретение также предлагает способ изготовления тканеинженерного нервного трансплантата, модифицированного натуральным клеточным матриксом, для восстановления поврежденных периферических нервов, для изготовления которого используется тканеинженерный нервный трансплантат, содержащий поддерживающие клетки, который затем подвергается децеллюляризации, и получается децеллюляризованный тканеинженерный нервный трансплантат. Содержащий поддерживающие клетки тканеинженерный нервный трансплантат можно изготавливать, используя клеточную культуру, чтобы прикреплять поддерживающие клетки на внутренней и внешней поверхностях нервного проводника, причем предпочтительным является способ трехмерного микрогравитационного клеточного культивирования. В настоящем изобретении используется система микрогравитационного трехмерного культивирования типа RCMWTM от компании Synthecon.

Чтобы изготавливать содержащие поддерживающие клетки тканеинженерные нервные трансплантаты и децеллюляризованные трансплантаты, предпочтительно осуществляется следующая техническая схема.

(1) Изготовление содержащего поддерживающие клетки нервного трансплантата. 100 мл полной среды медленно помещают в резервуар для культивирования, а затем добавляют $2,5 \times 10^7$ клеток и стерильный нервный проводник, после чего осуществляют обработку, используя перистальтический насос, чтобы обеспечить конечную плотность клеток, составляющую $1 \cdot 10^5$ /мл. После того как воздух выпускают из резервуара для культивирования, ротационное микрогравитационное циркуляционное перфузион-

ное культивирование инициируют, используя ротационный биореактор, помещенный в содержащий CO₂ инкубатор при 37°C, чтобы обеспечить полный контакт и адгезию клеток на нервном проводнике, устанавливая скорость вращения 10 об/мин в течение первых 24 ч, а затем нервный проводник суспендируют в культуральном растворе, регулируя скорость вращения после 24 ч. После культивирования в течение двух суток среду заменяют средой для дифференцирования, чтобы способствовать секретированию ЕСМ, и продолжают культивирование в течение двух следующих недель, прежде чем получается нервный проводник, покрытый поддерживающими клетками.

Оптимизированный состав среды для дифференцирования представляет собой H-DMEM+15% FBS+50 нг/мл HRG+2 мкМ форсколина+50 мкг/мл витамина C.

(2) Изготовление децеллюляризованного тканеинженерного нервного трансплантата. Содержащий поддерживающие клетки тканеинженерный нервный трансплантат подвергают децеллюляризации. Его промывают, используя содержащий фосфатный буфер физиологический раствор (PBS), помещают в стерильную деионизированную воду при 37°C для гипотонической обработки в течение 10 мин, а затем осуществляют клеточный лизис, используя неионный детергент в течение 10-15 мин при 37°C, и далее добавляют в неионный детергент, в который добавлена ДНКаза I (4 мг/мл), чтобы в течение 30 мин при 37°C осуществлять разложение и удаление ДНК. Ацеллюлярный продукт перед использованием хранят при -80°C. Оптимизированная композиция неионного детергента представляет собой содержащий фосфатный буфер физиологический раствор, состоящий из 0,5% TritonX-100 и 20 mM водного раствора амиака.

Поддерживающие клетки, используемые в описанных выше процедурах, представляют собой индивидуально или в сочетании клетки Шванна, полученные из кожи фибробласты, стволовые клетки кожи, мезенхимные стволовые клетки костного мозга и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, в то время как нервный проводник составляют биоразлагающиеся материалы, которые представляют собой индивидуально или в сочетании фиброин шелка, хитозан, коллаген, полимолочную кислоту и полигликолевую кислоту. Предпочтительным является имеющий пористую поверхность и хитозановую основу нервный проводник, который имеет пористость от 50 до 90%, размер пор от 30 до 300 мкм, высокую прочность при растяжении, внутренний диаметр от 0,5 до 8 мм и толщину стенок от 0,1 до 3 мм, причем он может быть изготовлен согласно способу, описанному в патенте (патентная заявка Китая № CN 201110324474.8, озаглавленная "Тканеинженерный нервный трансплантат и его функции"). Кроме того, предпочтительным является еще один наноразмерный нервный проводник на основе фиброина шелка, который может быть изготовлен, в частности, согласно способу, описанному в патенте (патентная заявка Китая № CN 200910034583.9 и публикация № CN 101664346 под заголовком "Искусственный нервный трансплантат, изготовленный посредством электропрядения, способ его изготовления и соответствующие устройства"). Третий выбранный нервный проводник имеет композитную структуру, которую составляет поверхностно-пористый нервный проводник на основе хитозана или нервный проводник на основе фиброина (любой нервный проводник может быть изготовлен согласно вышеупомянутым патентам) с введением 120 волокон из фиброина шелка в качестве полых наполнителей.

Настоящее изобретение имеет следующие преимущества.

(1) Как правило, ЕСМ составляют коллаген (Col), ламинин (LN), фибронектин (FN), гиалуроновая кислота и протеогликан (такой как хондроитинсульфатный или гепарансульфатный протеогликан). ЕСМ обеспечивает механическую опору и физическую прочность для целостности тканей, органов и всего организма.

Исследования показывают, что LN, FN и Col могут обеспечивать подходящую "адгезионную способность" для роста нервов, заставляя аксоны расти вдоль мостика из матрикса и ориентировать направленный рост нервных волокон. Один или более компонентов ЕСМ, такие как LN и FN, приняты в наибольшей степени в современной отрасли тканевой инженерии.

Однако имеющиеся в продаже синтезированные ЕСМ являются дорогостоящими, и их компоненты являются относительно индивидуальными. Натуральный произведенный из клеток ЕСМ, полученный согласно настоящему изобретению после децеллюляризации культивируемых клеток, может сохранять разнообразные важные компоненты и структуру ЕСМ и является более благоприятным для адгезии нервных клеток, производя определенное направляющее воздействие на регенерацию ориентированных аксонов и, таким образом, способствуя регенерации нервов. Кроме того, он имеет меньшую цену, чем синтезированный ЕСМ, и его легче принимают пациенты.

(2) Поддерживающие клетки, используемые в тканеинженерных нервных трансплантатах, включают клетки Шванна и разнообразные стволовые клетки. Большинство из этих клеток представляют собой аллогенные клетки, которые могут вызывать иммуногенность в течение имплантации. ЕСМ, который содержит тканеинженерные нервные трансплантаты, разработанные согласно настоящему изобретению, получается после децеллюляризации культивируемых клеток, и, таким образом, возникает меньшая или нулевая иммуногенность. Тканеинженерные нервные трансплантаты являются подходящими для больших групп пользователей.

(3) Тканеинженерные нервные трансплантаты, разработанные согласно настоящему изобретению, изготавливают, осуществляя способ трехмерного микрогравитационного клеточного культивирования,

который позволяет поддерживающим клеткам равномерно прикрепляться к внутренним и внешним поверхностям полых волокон, и ЕСМ, полученный после децеллюляризации, также оказывается равномерно распределенными на внутренних и внешних поверхностях полых волокон, способствуя, таким образом, регенерации нервов.

(4) В тканеинженерных нервных трансплантатах, разработанных согласно настоящему изобретению, не содержатся экзогенные токсичные вещества, внедрение которых может становиться вероятным в течение процесса изготовления; кроме того, они обеспечивают превосходную биосовместимость и биоразлагаемость, а также хорошие механические свойства. Стенки нервных проводников представляют собой трехмерную микропористую структуру, что упрощает транспортировку питательных веществ, которые требуются для роста нервов. Волокна фиброина шелка, которые содержатся в полном канале и изготовлены посредством электропрядения, имеют большую удельную площадь поверхности, чтобы обеспечивать требуемое пространство для роста нервных клеток.

Далее настоящее изобретение представлено подробно посредством использования чертежей и рабочих примеров.

Описание чертежей

Фиг. 1 (А) - полученная оптическим микроскопом фотография клеток Шванна, (В) - иммуногистохимическая микрофотография клеток Шванна, которые являются иммунопозитивными по отношению к белку S100 (серые веретенообразные пятна) с ядрами, маркированными Hoechst33342 (серые точки).

Фиг. 2 (А) - полученная оптическим микроскопом фотография фибробластов (при 100-кратном увеличении), (В) - иммуногистохимическая микрофотография фибробластов (при 100-кратном увеличении), которые являются иммунопозитивными к своему маркеру (серый) с ядрами, маркированными Hoechst33342 (белый).

Фиг. 3 (А) - полученная оптическим микроскопом фотография стволовых клеток кожи (при 100-кратном увеличении), (В) - иммуногистохимическая микрофотография сфер стволовых клеток кожи (при 100-кратном увеличении), которые являются иммунопозитивными по отношению к версикану (а) и нестину (b) с ядрами, маркированными Hoechst33342 (с), и (d) представляет собой сочетание (а), (b) и (с), (С) - иммуногистохимическая микрофотография сфер стволовых клеток кожи (при 100-кратном увеличении), которые являются иммунопозитивными по отношению к виментину (а) и нестину (b) с ядрами, маркированными Hoechst33342 (с), и (d) представляет собой сочетание (а), (b) и (с).

Фиг. 4 - индуцированная дифференциация стволовых клеток кожи в клетки Шванна. Полученная оптическим микроскопом фотография (при 100-кратном увеличении) (А) и местное увеличенное изображение (В), представляющее колонии клеток Шванна, которые образуются посредством индуцированной дифференциации стволовых клеток кожи.

Фиг. 5 - иммуногистохимическая микрофотография клеток Шванна, образующихся посредством индуцированной дифференциации стволовых клеток кожи (при 100-кратном увеличении). Дифференцированные клетки Шванна являются иммунопозитивными по отношению к белку S100 (А) с ядрами, маркированными Hoechst33342 (В), (С) сочетание (А) и (В).

Фиг. 6 - проточная цитометрия мезенхимных стволовых клеток костного мозга и иммуногистохимическое исследование с молекулами CD.

Фиг. 7 - иммуногистохимическая микрофотография ЕСМ. (А) - полученная оптическим микроскопом фотография ЕСМ на поверхности материала после децеллюляризации. (В) - ЕСМ является иммунопозитивным по отношению к анти-FN. (С) - ЕСМ является иммунопозитивным по отношению к анти-LN. (D) - сочетание (В) и (С).

Фиг. 8 - воздействие ЕСМ на рост нейронов. (А) - иммуногистохимическая микрофотография с ядерным фактором (NF) нейронов, культивируемых на ЕСМ, где группа ЕСМ означает нейроны, культивируемые на товарном ЕСМ, а группа N-ЕСМ означает нейроны, культивируемые на ЕСМ, полученном после децеллюляризации поддерживающих клеток. (В) - клеточная жизнеспособность нейронов. (С) - полученные методом вестерн-блоттинга изображения, представляющие экспрессию молекулы адгезии нервных клеток (NCAM) и связанного с ростом аксонов белка (GAP43).

Фиг. 9 - полученная сканирующим электронным микроскопом фотография (SEM) модифицированного ЕСМ тканеинженерного нервного трансплантата. (А) - фотография SEM внутренней поверхности содержащего поддерживающие клетки нервного проводника. Поддерживающие клетки равномерно распределяются на внутренней поверхности. (В) - фотография SEM внутренней поверхности нервного проводника, обработанного посредством децеллюляризации. ЕСМ образуется и становится видимым. (С) - фотография SEM волокон фиброина внутри полого содержащего поддерживающие клетки нервного проводника. (D) - фотография SEM волокон фиброина внутри полого нервного проводника, обработанного посредством децеллюляризации.

Фиг. 10 - иммуногистохимическая микрофотография ЕСМ на поверхности волокон фиброина шелка внутри полого нервного проводника, обработанного посредством децеллюляризации. (А) - иммунопозитивный по отношению к анти-FN. (В) - иммунопозитивный по отношению к анти-FN. (С) - волокна фиброина шелка. (D) - сочетание (А), (В) и (С).

Фиг. 11 - повторный рост аксонов, маркированных ядерным фактором (NF) (масштабная полоска,

200 мкм) для контрольной группы через одну неделю (А) и через две недели (С) после трансплантации, и для группы ЕСМ через одну неделю (В) и через две недели (D) после трансплантации.

Фиг. 12 - гистограмма для статистических сравнений регенерированных нервных волокон среди указанных групп.

Фиг. 13 - микрофотография SEM поперечного сечения регенерированного нерва в средней части (масштабная полоска, 5 мкм) для контрольной группы (А) и группы ЕСМ (В).

Подробное описание

Если не определены другие условия, все термины, используемые согласно настоящему изобретению, имеют такие же значения, которые обычно используются исследователями в области тканевой инженерии.

Далее настоящее изобретение будет подробно описано со ссылкой на рабочие примеры. Описания этих рабочих примеров используются исключительно в целях иллюстрации настоящего изобретения, но не предназначаются для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом.

В следующих примерах разнообразные процессы и методы, которые не описаны подробно, представляют собой традиционные методы, известные в области тканевой инженерии.

Рабочий пример 1. Культивирование и очистка клеток Шванна.

Новорожденных крыс линии Sprague Dawley (SD) в суточном возрасте убивали и дезинфицировали спиртом. Седалищный нерв с двух сторон извлекали и помещали на охлаждаемый в ванне со льдом рабочий стол, чтобы удалить эпиневию и спайки. После разложения коллагеназой/панкреатином осуществляли центрифугирование и отделяли надосадочную жидкость. Затем клетки повторно суспендировали в полной среде и высевали в покрытую поли-D-лизин (PDL) чашку для культивирования и осуществляли культивирование в течение 24 ч. После этого среду заменяли полной средой, содержащей цитарабин (10 мкМ), и осуществляли культивирование в течение 48 ч, а затем среду заменяли полной средой, содержащей HRG (50 нг/мл) и форсколин (2 мкМ), продолжали культивирование в этой среде, которую обновляли через каждые трое суток до слияния клеток, после чего осуществляли разложение панкреатином и центрифугирование, получая клеточный осадок, который повторно суспендировали, используя 1 мл полной среды, содержащей Thyl.1 (1:1000), и осуществляли инкубацию на льду в течение 2 ч. Осуществляли центрифугирование, надосадочную жидкость отделяли. Клетки повторно суспендировали, используя смесь DMEM и добавки (3:1), инкубировали в течение 1 ч при 37°C, промывали дважды, используя полную среду после центрифугирования, и повторно инокулировали в чашку для культивирования. Среду обновляли каждые двое суток, и после этого клетки можно было использовать после роста для покрытия контейнера (культивирование и идентификация клеток представлены на фиг. 1).

Рабочий пример 2. Культивирование полученных из кожи фибробластов.

Новорожденных крыс линии SD в суточном возрасте убивали и дезинфицировали спиртом. Кожу со спины снимали и помещали в предварительно охлажденный раствор для препарирования, чтобы отделить подкожную ткань (жир, слой подкожной соединительной ткани и кровеносные сосуды). После трехкратного промывания PBS кожу разрезали на части, имеющие размеры менее 1×1 мм, используя хирургический скальпель, и полностью разлагали, используя коллагеназу типа I (1 мг/мл). Надосадочную жидкость отделяли. Клетки повторно суспендировали в полной среде и высевали в чашку для культивирования. После слияния 90% клеток клетки субкультивировали. В течение процесса первичного культивирования может происходить эпителиальное загрязнение, и большинство паренхимных клеток (эпителиальные и эндотелиальные клетки) постепенно погибают после нескольких процедур субкультивирования. Таким образом, клетки, используемые согласно настоящему изобретению, представляли собой клетки, которые подвергались субкультивированию в течение более чем трех поколений (культивирование и идентификация клеток представлены на фиг. 2).

Рабочий пример 3. Культивирование стволовых клеток кожи и направленная дифференциация в клетки Шванна.

Данную процедуру осуществляли согласно предшествующему описанию (Jeffrey Biernaskie, Ian McKenzie, Jean G. Toma & Freda D. Miller, "Полученные из кожи предшественники (SKP) и дифференциация и обогащение потомства их клеток Шванна", Nature Protocols, 2006 г., т. 1, с. 2803-2812). Вкратце, новорожденных крыс линии SD в суточном возрасте убивали и дезинфицировали спиртом. Кожу со спины снимали и помещали в предварительно охлажденный раствор для препарирования, чтобы отделить подкожную ткань (жир, слой подкожной соединительной ткани и кровеносные сосуды). После трехкратного промывания PBS кожу разрезали на части, имеющие размеры менее 1×1 мм, используя хирургический скальпель, и полностью разлагали, используя раствор 0,1% панкреатина или коллагеназу типа XI (1 мг/мл), в течение 45-60 мин при 37°C, а затем разложение прекращали, добавляя полную среду. Осуществляли центрифугирование и отделяли надосадочную жидкость. Суспензионное культивирование осуществляли в среде DMEM/F12 (3:1), содержащей 0,1% вторичного антитела, 40 мкг/мл фунгизона, 40 нг/мл FGF2 (фактор роста фибробластов), 20 нг/мл EGF (эпидермальный фактор роста) и 2% добавки B27. Полученные в результате клеточные сферы субкультивировали, получая достаточное количество стволовых клеток кожи (культивирование и идентификация клеток представлены на фиг. 3).

Полученные стволовые клетки кожи дифференцировали в клетки Шванна, осуществляя следующие стадии. Стволовые клетки кожи культивировали в среде для дифференцирования I (среда DMEM/F12 (3:1), содержащая 0,1% вторичного антитела, 40 мкг/мл фунгизона, 40 нг/мл FGF2, 20 нг/мл EGF, 2% добавки B27 и 10% FBS) в течение трех суток, а затем культивировали в среде для дифференцирования II (среда DMEM/F12 (3:1), содержащая 0,1% вторичного антитела, 5 мкМ форсколина, 50 нг/мл херегулина-1 β , 50 мкг/мл 2% добавки N2 и 1% FBS) в течение от двух до трех недель, и таким образом получали колонию клеток Шванна (фиг. 4А). Клетки Шванна (SKP-SC), дифференцированные из стволовых клеток кожи, пролиферировали после увеличения колонии (фиг. 4В). Результаты иммуногистохимического исследования показали, что клетки были иммунопозитивными по отношению к белку S100 (фиг. 5).

Рабочий пример 4. Культивирование мезенхимных стволовых клеток костного мозга.

Взрослых крыс линии SD убивали путем сворачивания шеи и выдерживали в течение 5 мин в растворе 75% спирта. Бедренные и фетальные кости извлекали в асептических условиях, и полости костного мозга открывали и промывали, используя основной культуральный раствор IMDM, чтобы получить костный мозг. Полученный костный мозг повторно продували инжектором и превращали в содержащую одиночные клетки суспензию, которую фильтровали через сито с ячейками размером 200 меш (76 мкм) и помещали в горизонтальную центрифугу для центрифугирования при скорости 1000 об/мин в течение 5 мин. После отделения надосадочной жидкости клетки высевали при плотности $4 \times 10^5/\text{см}^2$ в полную культуральную среду IMDM, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки, для культивирования. Через 24 ч осуществляли замену всего количества раствора, удаляя клетки, которые не прикрепились к стенкам. После этого замену половины количества раствора осуществляли через каждые трое суток. Состояние развития и роста клеток наблюдали ежедневно, используя инвертированный микроскоп. Когда клетки распространялись по всему дну чашки для культивирования и сливались на 90%, клетки субкультивировали (культивирование и идентификация клеток представлены на фиг. 6).

Рабочий пример 5. Децеллюляризация поддерживающих клеток.

Поддерживающие клетки (например клетки Шванна) культивировали в чашке для культивирования. Когда клетки распространялись по всему дну чашки для культивирования и сливались на 90%, клетки культивировали в течение двух недель в среде для дифференцирования (H-DMEM+15% FBS+50 нг/мл HRG+2 мкМ форсколина+50 мкг/мл витамина C), чтобы стимулировать секретирование ECM. После промывания PBS клетки подвергали децеллюляризации и гипотонической обработке в течение 10 мин в деионизированной стерильной воде при 37°C. Добавляли клеточные экстракты (PBS, содержащий 0,5% TritonX-100 и водный раствор 20 мМ аммиака), чтобы расщепить клетки, и выдерживали в течение 10-15 мин при 37°C, а затем добавляли дезоксирибонуклеазу I (4 мг/мл) и выдерживали в течение 30 мин при 37°C, чтобы удалить ДНК. Полученный ECM представлен на фиг. 7А. Некоторые компоненты ECM (LN и FN) идентифицированы методами иммунохимии. ECM фиксировали в течение 30 мин при комнатной температуре, используя раствор 4% параформальдегида, а затем осуществляли реакцию, используя первичные антитела, т.е. мышинный антиламинин (LN) и кроличий антифибронектин (FN), соответственно, в течение ночи при 4°C, после чего осуществляли инкубацию, используя вторичные антитела, т.е. конъюгированный с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) козий антикроличий иммуноглобулин G (IgG) (1:200) и конъюгированный с изотиоцианатом тетраметилродамина В (TRITC) козий антимышинный IgG (1:200), соответственно, в течение 2 ч при комнатной температуре, и обнаружение, используя конфокальный флуоресцентный микроскоп DMR от компании Leica (фиг. 7B-D).

Рабочий пример 6. Натуральный ECM, благоприятный для роста аксонов.

Нейроны заднекорешкового ганглия высевали в чашку для культивирования, покрытую ECM, полученным из ацеллюлярных поддерживающих клеток, как описано в рабочем примере 5, имеющимся в продаже ECM от компании SIGMA (товарный номер E0282), для культивирования в течение 48 ч; клеточную жизнеспособность нейронов определяли методом МТТ, в то время как рост аксонов наблюдали методом иммуноцитохимии, а экспрессию GAP43 и CAM) обнаруживали методом вестерн-блоттинга. Результаты представлены на фиг. 8. Здесь отсутствует статистическое различие клеточной жизнеспособности нейронов для двух типов ECM. Однако результаты иммуноцитохимического исследования показывают, что длина аксонов нейронов является заметно больше в случае культивирования с полученным из ацеллюлярных поддерживающих клеток ECM, чем в случае культивирования с товарным ECM, и определенная методом вестерн-блоттинга экспрессия GAP43 или NCAM для нейронов, культивированных с полученным из поддерживающих клеток ECM, является выше, чем для нейронов, культивированных с товарным ECM, соответственно (фиг. 8).

Рабочий пример 7. Изготовление содержащих поддерживающие клетки тканеинженерных нервных трансплантатов.

Хитозановые нервные проводники и волокна из фиброина шелка обрабатывали в асептических условиях, 120 моноволокон фиброина шелка вставляли в канал хитозанового нервного проводника в качестве наполнителей полости, чтобы получить композитный нервный проводник. Используя перистальтический насос, 100 мл полной среды (DMEM+10% FBS+50 нг/мл HRG+2 мкМ форсколина) медленно вводили в резервуар для культивирования, а затем добавляли $2,5 \times 10^7$ клеток и стерильный нервный провод-

ник, после чего с помощью перистальтического насоса обеспечивали конечную плотность клеток на уровне 1×10^5 /мл. После того как воздух выпускали из резервуара для культивирования, начинали ротационное микрогравитационное циркуляционное перфузионное культивирование в ротационном биореакторе, помещенном в содержащий CO_2 инкубатор при 37°C , чтобы обеспечить полный контакт и адгезию клеток на нервном проводнике, устанавливая скорость вращения 10 об/мин в течение первых 24 ч, а затем осуществляли суспендирование нервного проводника в культуральном растворе, изменяя скорость вращения через 24 ч. После культивирования в течение двух суток среду заменяли средой для дифференцирования (H-DMEM+15% FBS+50 нг/мл HRG+2 мкМ форсколина+50 мкг/мл витамина C) через каждые трое суток, чтобы способствовать секретированию ЕСМ, и культивирование осуществляли в течение двух недель и более перед тем, как извлекали покрытый поддерживающими клетками нервный проводник, который представлял собой полученный в результате тканеинженерный нервный трансплантат.

Фотография SEM показывает, что поддерживающие клетки равномерно распределяются на обеих поверхностях нервного проводника и волокнах фиброина шелка (фиг. 9А и 9С). Чтобы осуществить наблюдения SEM, полученный в результате тканеинженерный нервный трансплантат фиксировали раствором 4% глутаровой кислоты при 4°C , промывали трижды PBS, фиксировали раствором 1% осмиевой кислоты при комнатной температуре в течение 2 ч, промывали дважды PBS, дегидратировали, используя этанол в возрастающих концентрациях (30, 50, 70, 80, 95 и 100%), каждый раз в течение 10 мин, соответственно, а затем инкубировали, заменяя среду смесью этанола и трет-бутилового спирта (1:1) и чистым трет-бутиловым спиртом, выдерживая каждый раз в течение 10 мин. После лиофилизации и распыления платины образец наблюдали, используя сканирующий электронный микроскоп TCS SP2 от компании Leica.

Рабочий пример 8. Изготовление тканеинженерных нервных трансплантатов, модифицированных полученным из поддерживающих клеток ЕСМ.

Содержащие поддерживающие клетки тканеинженерные нервные трансплантаты, изготовленные в рабочем примере 7, подвергали децеллюляризации. Их промывали PBS, помещали в стерильную деионизированную воду при 37°C для гипотонической обработки, а затем осуществляли клеточный лизис, используя неионный детергент (состоящий из раствора 0,5% TritonX-100 и водного раствора 20 мМ аммиака) в течение 10-15 мин при 37°C , а затем выдерживали в неионном детергенте, содержащем дезоксирибонуклеазу I (4 мг/мл), в течение 30 мин при 37°C , чтобы удалить ДНК.

Фотография SEM показывает, что компоненты полученного из поддерживающих клеток ЕСМ равномерно распределяются на обеих поверхностях нервного проводника и волокнах фиброина шелка (см. фиг. 9В и 9D). Изготовленный тканеинженерный нервный трансплантат, модифицированный ЕСМ, перед использованием хранили при -80°C . Сохранившиеся после децеллюляризации компоненты ЕСМ, соответственно, наблюдали, используя SEM, и обнаруживали иммунохимическими методами, причем результаты наблюдения с помощью SEM являются такими же, как в примере 7, и результаты иммунохимического исследования являются такими же, как в примере 5. Результаты представлены на фиг. 10.

Рабочий пример 9. Восстановление поврежденных седалищных нервов крыс тканеинженерными нервными трансплантатами, модифицированными полученным из клеток ЕСМ.

Поврежденные седалищные нервы крыс восстанавливали, используя тканеинженерные нервные трансплантаты, модифицированные полученным из клеток ЕСМ, и регенерацию нервов и восстановление их функций наблюдали, используя ряд методов, таких как иммуногистохимия, просвечивающая электронная микроскопия (ТЕМ), электрофизиология, морфологическая оценка целевых мышц.

В качестве модели использовали крыс, у которых длина повреждения седалищного нерва составляла 10 мм. Животных случайным образом разделяли на две группы: крысы одной группы (так называемая группа ЕСМ) получали тканеинженерные нервные трансплантаты, модифицированные полученным из клеток ЕСМ, для восстановления поврежденных седалищных нервов, а крысы другой группы (так называемая контрольная группа) получали простые тканеинженерные нервные трансплантаты (не модифицированные ЕСМ) для восстановления поврежденных седалищных нервов. Через одну или две недели после хирургического вмешательства животных подвергали транскардиальной перфузии, а затем регенерированные нервные сегменты извлекали и разрезали, получая срезы. Иммуногистохимические исследования с использованием NF показали, что рост нервов в группе ЕСМ происходит быстрее, чем в контрольной группе. Позитивные по отношению к NF нервные волокна в группе ЕСМ являются относительно более плотными и распределяются более равномерно (фиг. 11А-Д); статистические сравнения представлены на фиг. 12. Седалищные нервы всех животных открывали под надлежащей анестезией через три месяца после хирургического вмешательства, чтобы осуществлять электрофизиологические исследования. Средняя амплитуда электрического вызванного ответа мышцы (СМАР) составляла $4,63 \pm 0,13$ мВ и $6,89 \pm 2,85$ мВ для контрольной группы и группы ЕСМ, соответственно, и между двумя группами наблюдалось значимое различие ($P < 0,05$). Исследование методом ТЕМ показывает, что через три месяца после хирургического вмешательства некоторые из регенерированных миелинизированных нервных волокон распределялись по всей средней части с меньшим числом немиелинизированных нервных волокон в двух группах (фиг. 13А и В). Толщина миелиновой оболочки нерва составляла $0,63 \pm 0,27$ мкм и $0,82 \pm 0,39$

мкм в контрольной группе и группе ЕСМ, соответственно, и между двумя группами наблюдалось значимое различие ($P < 0,05$).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Тканеинженерный нервный трансплантат для восстановления дефектов периферических нервов, который состоит из нервного проводника и внеклеточного матрикса (ЕСМ), где указанный ЕСМ секретируется аутогенными или аллогенными поддерживающими клетками, которые представляют собой по отдельности или в сочетании клетки Шванна, полученные из кожи фибробласты, стволовые клетки кожи, мезенхимные стволовые клетки костного мозга или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, и его получают посредством децеллюляризации;

где указанный нервный проводник сделан из биоразлагающихся материалов, которые представляют собой по отдельности или в сочетании фиброин шелка, хитозан, коллаген, полимолочную кислоту или полигликолевую кислоту; и

где указанный децеллюляризованный ЕСМ получают посредством подвергания тканеинженерного нервного трансплантата, содержащего поддерживающие клетки, клеточному лизису в неионном детергенте, состоящем из 0,5% TritonX-100 и водного раствора 20 мМ аммиака, и затем неионному детергенту с добавленной ДНКазой I; и

где указанный тканеинженерный нервный трансплантат изготавливают посредством децеллюляризации содержащего поддерживающие клетки нервного трансплантата с получением секретированного поддерживающими клетками ЕСМ и затем модифицированного внеклеточным матриксом нервного трансплантата, где указанный содержащий поддерживающие клетки нервный трансплантат образуется посредством трехмерного микрогравитационного ротационного культивирования и его изготавливают следующим образом:

полную среду помещают в резервуар для культивирования;

добавляют $2,5 \times 10^7$ поддерживающих клеток и стерильный нервный проводник, после чего осуществляют обработку с использованием перистальтического насоса, чтобы обеспечить конечную плотность клеток, составляющую 1×10^5 /мл;

после того как воздух выпускают из резервуара для культивирования, инициируют ротационное микрогравитационное циркуляционное перфузионное культивирование с использованием ротационного биореактора, помещенного в содержащий CO_2 инкубатор при 37°C , чтобы обеспечить полный контакт и адгезию клеток на нервном проводнике, с установлением скорости вращения 10 об/мин в течение первых 24 ч;

далее нервный проводник суспендируют в культуральном растворе регулированием скорости вращения после 24 ч;

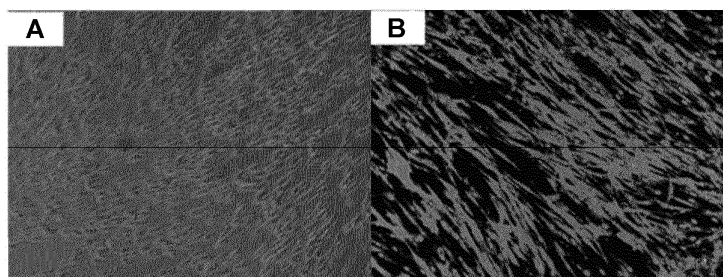
после культивирования в течение двух суток среду заменяют средой для дифференцирования, чтобы способствовать секреции ЕСМ, и продолжают культивирование в течение двух следующих недель, прежде чем изъять нервный проводник, покрытый поддерживающими клетками;

а изготовление децеллюляризованного тканеинженерного нервного трансплантата осуществляется следующим образом:

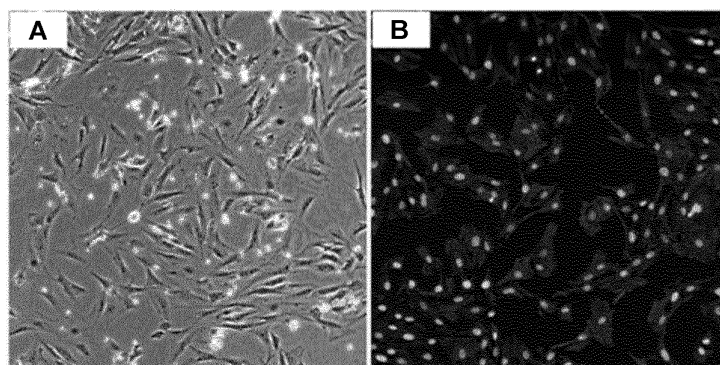
содержащий поддерживающие клетки тканеинженерный нервный трансплантат подвергают децеллюляризации;

его промывают содержащим фосфатный буфер физиологическим раствором (PBS), помещают в стерильную деионизированную воду при 37°C с целью гипотонической обработки в течение 10 мин с последующим лизисом клеток в указанном неионном детергенте в течение 10-15 мин при 37°C ; и

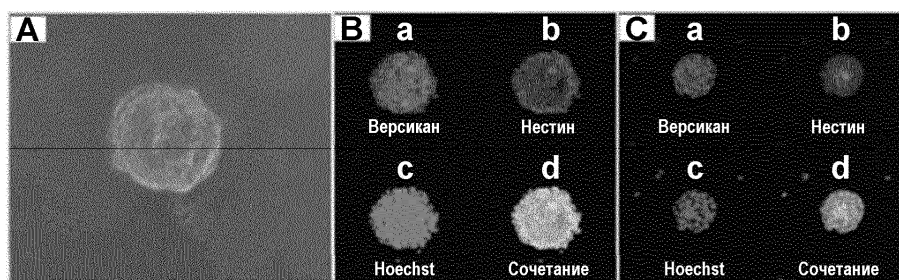
далее добавляют в неионный детергент, в который добавлена ДНКазы I (4 мг/мл), для осуществления расщепления в течение 30 мин при 37°C с целью удаления ДНК.



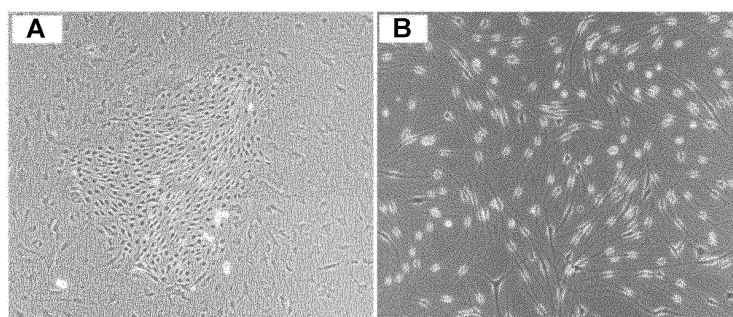
Фиг. 1



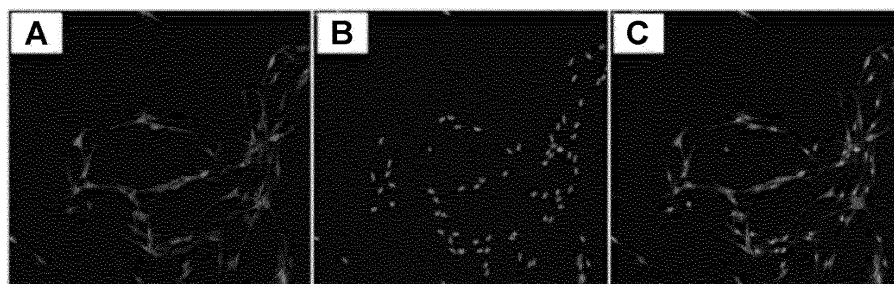
Фиг. 2



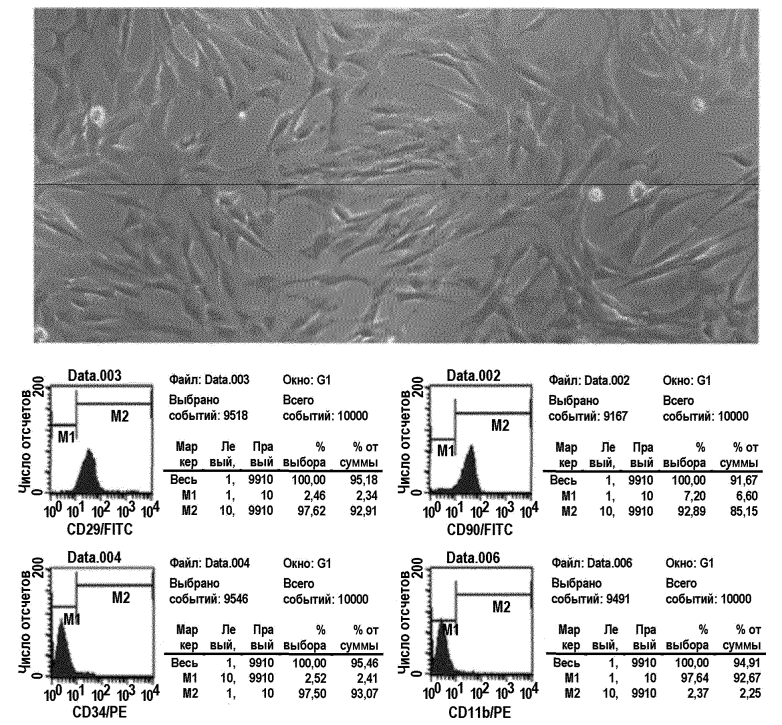
Фиг. 3



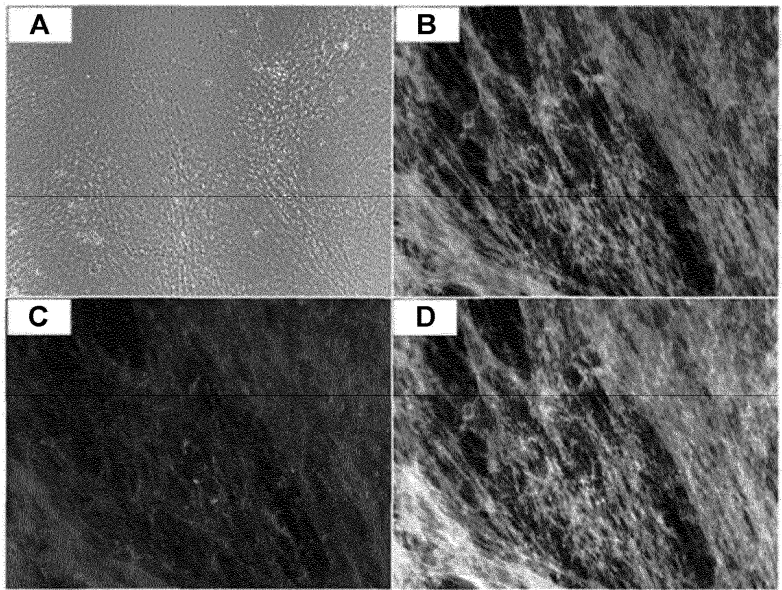
Фиг. 4



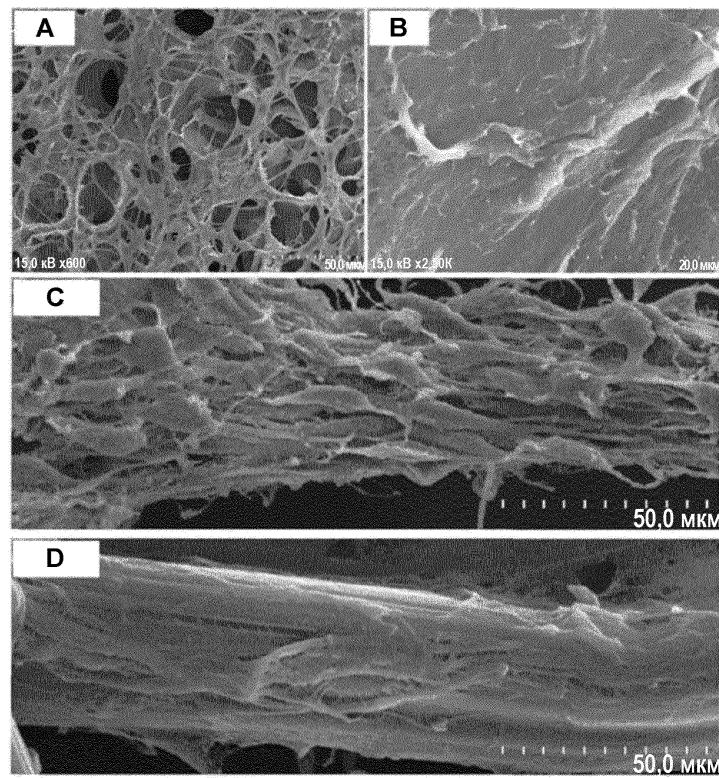
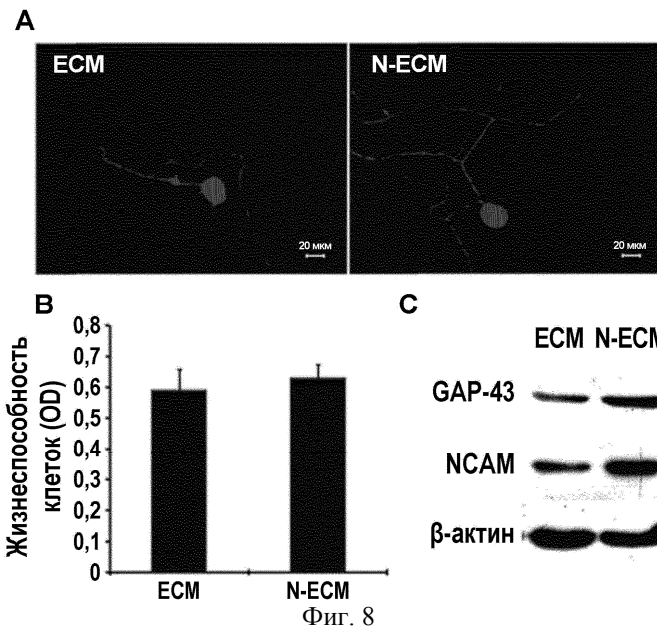
Фиг. 5



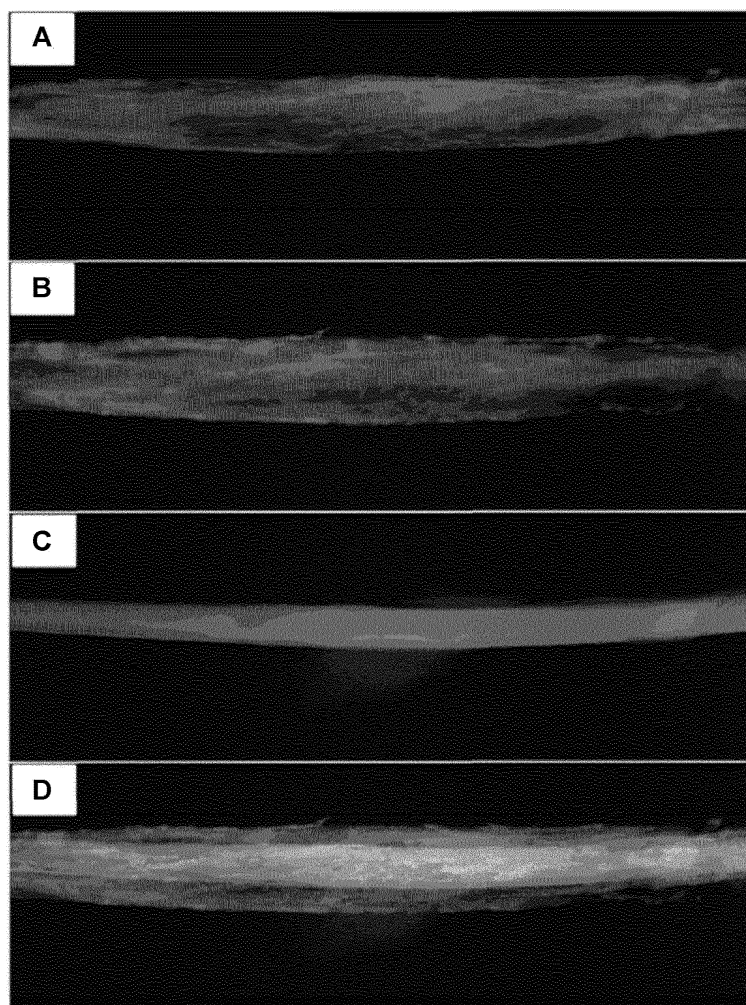
Фиг. 6



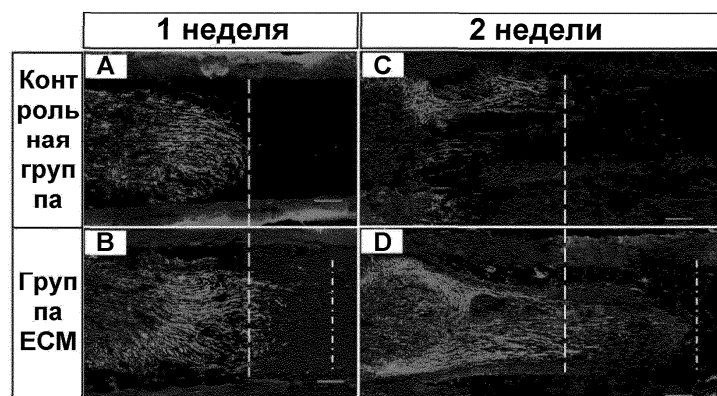
Фиг. 7



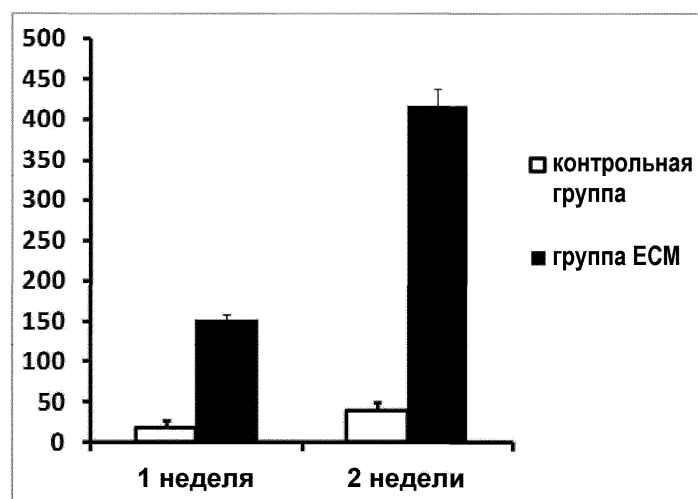
Фиг. 9



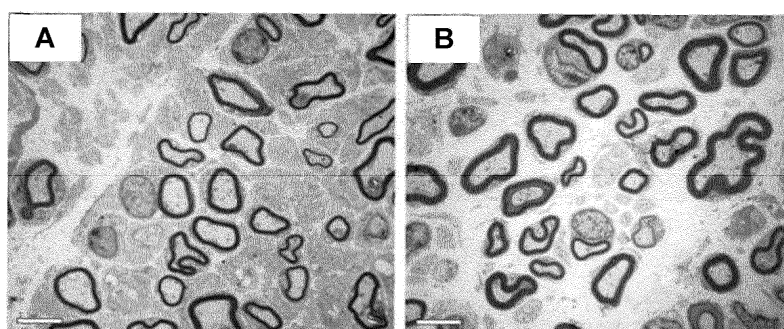
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

