

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290100** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.24

(22) Дата подачи заявки
2020.07.21

(51) Int. Cl. *A61L 27/26* (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
B33Y 70/00 (2020.01)
B33Y 80/00 (2015.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, НЕ СОДЕРЖАЩЕГО ДЕТЕРГЕНТОВ, И БИОЧЕРНИЛА ДЛЯ 3D-ПЕЧАТИ

(31) 19461559.7; 19218191.5

(32) 2019.07.22; 2019.12.19

(33) EP

(86) PCT/IB2020/056856

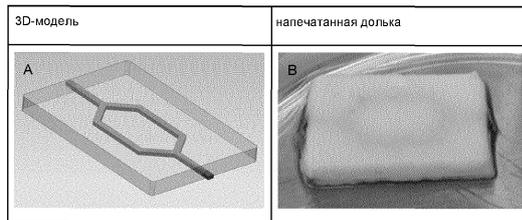
(87) WO 2021/014359 2021.01.28

(71) Заявитель:
ПОЛБИОНИКА СП.З О. О. (PL)

(72) Изобретатель:
Вшола Михал, Клак Марта, Берман Анжей, Косовска Катаржина, Бринярски Томаш, Добржанский Томаш, Тимики Гжегож, Гомолка Магдалена, Ковальска Патриция, Цивонюк Пётр, Туровский Павел, Замора Игорь, Олендер Ева, Ольковский Радослав, Каминский Артур (PL)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к способу получения децеллюляризованного ЕСМ, не содержащего детергента, к децеллюляризованному ЕСМ, не содержащему детергента, в форме порошка и в жидкой форме, к способу получения первичных биочернил, к первичным биочернилам, к способу получения биочернил для печати кровеносных сосудов, к биочернилам для печати кровеносных сосудов, к трехмерной структуре, содержащей первичные биочернила и/или биочернила для печати кровеносных сосудов, и к способу получения указанной трехмерной структуры.



A1

202290100

202290100

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА, НЕ СОДЕРЖАЩЕГО ДЕТЕРГЕНТОВ, И БИОЧЕРНИЛА ДЛЯ 3D-ПЕЧАТИ

5 Настоящее изобретение относится к способу получения децеллюляризованного
внеклеточного матрикса (ЕСМ), не содержащего детергентов, к децеллюляризованному
ЕСМ, не содержащему детергентов, в форме порошка и в жидкой форме, к способу
получения первичных биочернил, к первичным биочернилам, к способу получения
10 биочернил для печати кровеносных сосудов, к биочернилам для печати кровеносных
сосудов, к трехмерной структуре, содержащей первичные биочернила и/или биочернила
для печати кровеносных сосудов, и к способу получения указанной трехмерной
структуры.

Биопечать обеспечивает возможность автоматического нанесения живых клеток
вместе с другими компонентами для построения трехмерной (3D) тканевой конструкции.
15 Композиции биочернил создают из различных источников, включая синтетические, а
также природные полимеры, такие как коллаген, желатин, альгинат, гиалуроновая
кислота, фибрин и полиэтиленгликоль. Общеизвестно, что матриксные материалы,
используемые для биопечати, не позволяют воплотить сложность природного
внеклеточного матрикса (ЕСМ), который составляет микроокружение для клеток и может
20 модулировать клеточные процессы, в том числе миграцию, дифференцировку и другие
функции. Таким образом, присутствие ЕСМ в биочернилах считают благоприятным для
воссоздания микроокружения с межклеточными связями.

В международной патентной заявке WO2017014582 раскрыта композиция
биочернил, содержащая $(0,05-60) \times 10^6$ /мл клеток, от 0,1 до 10 масс./об.% материала
25 носителя клеток, от 0,01 до 1 масс./об.% повышающего вязкость агента, от 1 до 30
об./об.% смазывающего вещества и 0,1 до 10 масс./об.% структурного материала.
Композиция биочернил может дополнительно содержать материал полученного из ткани
компонента. Предпочтительно материал носителя клеток представляет собой желатин или
коллаген, повышающий вязкость агент представляет собой гиалуроновую кислоту или
30 декстран, смазывающее вещество представляет собой глицерин, и структурный материал
представляет собой фибриноген или метакрилированный желатин (GelMa).

В литературе присутствуют многочисленные публикации по вопросу выбора
подходящей композиции биочернил с оптимальными свойствами для применения в
тканевой инженерии. Mohamed Ali с соавторами работали над изготовлением биочернил
35 на основе децеллюляризованного ЕСМ (dЕСМ), полученного из почки [1]. Относительно

низкую концентрацию (1-3%) гидрогеля dECM получали способом растворения с применением 0,5 М уксусной кислоты и 0,1 мг/мл пепсина. Кроме того, осуществляли процесс метакрилирования dECM с добавлением фотоинициатора (Irgacure).

5 Следующие исследовательские группы предпринимали попытки получения биочернил с применением ECM, добавляя метакрилированный желатин (GelMa) и фотоинициатор, т. е. LAP (фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфинат лития) [2]. В других работах использовали гидрогель dECM, полученный при относительно высокой концентрации пепсина с добавлением поликапролактона (PCL) в качестве синтетического консерванта [3].

10 В описании патента KR20180125776 описана композиция биочернил, содержащая порошок dECM и гидрогель. Порошок dECM может быть выбран из ткани печени, ткани сердца, хрящевой ткани, костной ткани, жировой ткани, мышечной ткани, кожной ткани, ткани слизистого эпителия, амниотической ткани или роговичной ткани. Предпочтительно порошок dECM имеет размер частиц от 0,05 до 100 мкм. Гидрогель
15 может содержать один или более материалов, выбранных из группы, включающей желатин, гиалуроновую кислоту, декстран и коллаген.

Falguni с соавторами (2014 г.) разработали тканеспецифические dECM-биочернила, содержащие жировую, хрящевую и сердечную ткани, способные обеспечивать ключевые условия для трансплантации, выживания и долгосрочного функционирования клеток.
20 Способ биопечати позволил восстанавливать характеристические морфологию клеток и клеточные функции. Наблюдали сборку напечатанных клеточных конструкций более высокого порядка с организованными пространственными паттернами и тканеспецифической экспрессией генов. Ключевое преимущество методики заключалось в применении тканеспецифического ECM, обеспечивающего ключевые условия для
25 приживления, выживания и долгосрочного функционирования клеток [3].

Эксперименты, включающие децеллюляризацию органа в целях получения dECM в качестве компонента биочернил, были проведены многими исследовательскими группами [4, 5, 7]. Для децеллюляризации использовали разнообразные вещества, главным образом, детергенты Triton X-100 и/или додецилсульфат натрия (SDS). В KR1020180011607A
30 описан способ децеллюляризации печени, в котором ткань печени обрабатывают ненасыщенным раствором, содержащим поверхностно-активное вещество и гиперактивный раствор. В качестве поверхностно-активного вещества может быть использован 0,5% Triton X-100 (Triton X-100).

Mohamed Ali с коллегами сконструировали фотосшиваемую почку, содержащую
35 полученные из ECM биочернила [1]. Цельные почки свиньи подвергали

децеллюляризации способом перфузии, растворяли в растворе кислоты и химически модифицировали путем метакрилирования. Результаты показали, что биопечатные клетки почки человека проявляли высокую жизнеспособность и зрелость с течением времени. Кроме того, биопечатные почечные конструкции проявляли структурные и функциональные характеристики природной почечной ткани. Тканеспецифические полученные из ЕСМ биочернила могли ускорять созревание клеток и, в конечном счете, образование ткани.

Mirmalek-Sani с соавторами (2013 г.) представили процесс децеллюляризации поджелудочной железы свиньи для создания каркаса для стволовых клеток человека и панкреатических островков свиньи. Клеточный материал эффективно удаляли, сохраняя при этом белки ЕСМ и природную сосудистую систему. Кроме того, продемонстрировано, что децеллюляризованная поджелудочная железа может поддерживать клеточную адгезию и сохранение клеточных функций [6].

Цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы обеспечить не содержащий детергентов dЕСМ, который можно было бы использовать в биопечати. В данной литературе отсутствуют результаты, относящиеся к остаточному содержанию детергентов в ЕСМ, полученном путем децеллюляризации, или к способам оценки их содержания. В ранее опубликованных процедурах децеллюляризации разнообразных тканей стадия удаления детергентов является относительно короткой. Считают, что отсутствие детергента в dЕСМ значительно влияет на качество полученного dЕСМ. Процедура, разработанная заявителем, позволяет удалять детергент почти полностью без необходимости добавления других химических веществ. Вторая цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы получить биочернила надлежащей консистенции и вязкости без необходимости добавления повышающих вязкость агентов.

Согласно первому аспекту предложен способ получения децеллюляризованного внеклеточного матрикса (dЕСМ), не содержащего детергентов, включающий следующие этапы:

- механическая фрагментация, предпочтительно путем механической экструзии, органа животного происхождения, выбранного из поджелудочной железы, печени, почек, сердца, кожи, легких, толстого кишечника, тонкого кишечника, кровеносных артерий и вен, жировой ткани и плаценты, при этом орган отделен от тела животного;

- инкубация фрагментированного органа в забуференном растворе детергента, предпочтительно содержащем 1X забуференный фосфатом солевой раствор (PBS), причем забуференный раствор детергента содержит 0,5%-1,5%, предпочтительно 1% (об./об.), октоксинола-9, при этом в раствор детергента добавлен противомикробный агент,

предпочтительно стрептомицин, предпочтительно в концентрации 0,01% (масс./об.), и инкубацию осуществляют при температуре ниже комнатной температуры, предпочтительно при 4°C, в течение по меньшей мере 72 ч при перемешивании, причем измельченный орган переносят в свежий раствор детергента каждые 4-12 ч

5 - инкубация фрагментированного органа в первом забуференном промывочном растворе, предпочтительно содержащем 1X PBS, причем первый забуференный промывочный раствор содержит противомикробный агент, предпочтительно стрептомицин, предпочтительно в концентрации 0,01% (масс./об.), в течение по меньшей мере 72 ч при температуре ниже комнатной температуры, предпочтительно при 4°C при
10 перемешивании, при этом измельченный орган переносят в свежий промывочный раствор каждые 4-12 ч

- инкубация фрагментированного органа в растворе дезоксирибонуклеазы, содержащем ДНКазу, предпочтительно в концентрации от 0,0001 до 0,0003% (масс./об.), наиболее предпочтительно 0,0002% (масс./об.), предпочтительно в течение по меньшей
15 мере 8 ч при температуре, подходящей для функционирования ДНКазы

- инкубация фрагментированного органа во втором забуференном промывочном растворе, предпочтительно содержащем 1X PBS, причем второй забуференный промывочный раствор содержит противомикробный агент, предпочтительно стрептомицин, предпочтительно в концентрации 0,01% (масс./об.), в течение по меньшей
20 мере 72 ч при температуре ниже комнатной температуры, предпочтительно при 4°C при перемешивании, при этом измельченный орган переносят в свежий промывочный раствор каждые 4-12 ч

- замораживание фрагментированного органа и дробление замороженного фрагментированного органа на фрагменты

25 - лиофилизация замороженного фрагментированного органа, предпочтительно при -32°C, предпочтительно под давлением 0,31 мбар (31 Па);

- необязательная заключительная сушка в течение от 5 до 15 минут при 0,0010 мбар (0,1 Па) и -76°C;

- перемалывание дробленого и высушенного продукта в порошок dECM с размером
30 частиц 25-500 мкм;

- необязательная стерилизация продукта, предпочтительно путем воздействия излучения и/или этиленоксида.

Механическая фрагментация органа улучшает удаление детергента из органа и обеспечивает получение продукта с более низким содержанием жира, что улучшает
35 свойства конечного продукта, т. е. увеличивает вязкость и улучшает пригодность для

печати. Добавление ДНКазы имеет критическое значение для удаления ДНК из органа животного происхождения. Если бы получаемая в результате напечатанная трехмерная структура содержала dECM с ДНК, ее невозможно было бы использовать в дальнейшем в экспериментах по трансплантации.

5 Предпочтительно после этапа перемалывания осуществляют этап проверки количества октоксинола-9 в порошке dECM, при этом предпочтительно перед проверкой присутствия октоксинола-9 в порошке dECM его обрабатывают коллагеназой, предпочтительно в концентрации, составляющей по меньшей мере 43953 PZ/г dECM.

Предпочтительно после этапа перемалывания осуществляют следующие этапы:

- 10 - растворение порошка dECM в растворе хлористоводородной кислоты, предпочтительно 0,01 М, с добавлением 0-10 мг/мл пепсина;
- перемешивание в течение 48-72 ч, предпочтительно в течение 72 ч, при комнатной температуре;
- нейтрализация на льду, предпочтительно с применением 0,1 М натриевого
- 15 основания и раствора PBS.

Согласно второму аспекту предложен децеллюляризованный ЕСМ, не содержащий детергента, в форме порошка, который может быть получен с применением способа получения не содержащего детергента децеллюляризованного внеклеточного матрикса (dECM). Предпочтительно порошок dECM является стерильным. Если это необходимо,

20 порошок может быть стерилизован путем стерилизации излучением или стерилизации этиленоксидом.

Согласно третьему аспекту предложен децеллюляризованный ЕСМ, не содержащий детергента, в форме раствора, который может быть получен с применением способа получения не содержащего детергента децеллюляризованного внеклеточного

25 матрикса (dECM).

Согласно четвертому аспекту предложен способ получения первичных биочернил, включающий следующие этапы:

- получение пасты, содержащей 5-50% (масс./об.), предпочтительно 15-25% (масс./об.), порошка dECM согласно второму аспекту настоящего изобретения и 1-10%
- 30 (масс./об.), предпочтительно 8-10% (масс./об.), раствора dECM согласно третьему аспекту настоящего изобретения, путем смешивания;
- инкубация пасты при температуре 7-10°C в течение по меньшей мере 24 ч;
- добавление 1,46-7,32% (масс./об.) метакрилизованного желатина, 0,15-1,10% (масс./об.) метакрилизованной гиалуроновой кислоты, 5-10% (масс./об.) глицерина, и

фотоинициатора, предпочтительно 0,03-0,17% (масс./об.) фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфината лития, с последующим аккуратным перемешиванием.

Поскольку порошок dECM первоначально получают путем лиофилизации и не растворяют после этого, он сохраняет полную четвертичную структуру ECM.

5 Следовательно, применение dECM в форме пасты, одновременно содержащей порошок dECM и раствор dECM, обеспечивает получение первичных биочернил с надлежащей консистенцией, и, поскольку порошок dECM не растворяют в первичных биочернилах, он сохраняет полную четвертичную структуру ECM.

10 Согласно пятому аспекту предложены первичные биочернила, содержащие пасту dECM и 1,46-7,32% (масс./об.) метакрилизованного желатина, 0,15-1,10% (масс./об.) метакрилизованной гиалуроновой кислоты, 5-10% (масс./об.) глицерина, и фотоинициатор, предпочтительно 0,03-0,17% (масс./об.) фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфината лития, причем паста dECM содержит 5-50% (масс./об.), предпочтительно 15-25% (масс./об.), порошка dECM согласно второму аспекту
15 настоящего изобретения и 1-10% (масс./об.), предпочтительно 8-10% (масс./об.), раствора dECM согласно третьему аспекту настоящего изобретения, и при этом вязкость первичных биочернил составляет по меньшей мере 5 Па·с при измерении в системе с конусом и пластиной, при постоянной скорости сдвига 21/с и температуре 37°C.

20 Применение dECM делает возможным воспроизведение внеклеточных условий организма, таким образом придавая результату биопечати характеристики природной ткани, что стимулирует дифференцировку клеток и улучшает их показатель выживаемости. Кроме того, внеклеточный матрикс необходим для получения надлежащей вязкости биочернил и сохранения устойчивой трехмерной структуры напечатанной конструкции благодаря дополнительной возможности термического сшивания в
25 диапазоне температур от 33 до 37°C.

30 Применение фотоинициатора позволяет обеспечить сшивание, которое не токсично для клеток в отличие от химического сшивания с применением химических реагентов, токсичных для клеток, содержащихся в первичных биочернилах. Сшивание с применением фотоинициатора и видимого света сокращает до минимума повреждение клеточной ДНК по сравнению с термическим сшиванием. Как температура, так и свет производит отрицательное воздействие на клетки, приводя к повреждению ДНК. Однако при сшивании с применением видимого света эти изменения остаются на минимальном уровне.

35 Метакрилованный желатин (GelMa) используют для придания формы напечатанной конструкции. Кроме того, он удерживает волокна вместе таким образом,

чтобы предотвращать расслоение долек и улучшать жизнеспособность клеток и островков. GelMa стабилен при более высоких температурах по сравнению с желатином, что благоприятно при термическом сшивании.

5 Метакрилизованная гиалуроновая кислота (НАМА) способствует сохранению трехмерной структуры за счет сшивания. Кроме того, НАМА обеспечивает ровность, гладкость и гомогенность печатных волокон и поддерживает клеточные культуры. Эти признаки не могут быть получены посредством добавления гиалуроновой кислоты, которая не является метакрилизованной.

10 Применение глицерина улучшает функциональность клеток и островков. Оно также улучшает смазывающую способность биочернил, обеспечивает образование непрерывных волокон, улучшает смешивание компонентов биочернил в шприце или смесителе и уменьшает давление, которое необходимо прилагать в ходе печати.

15 Предпочтительно первичные биочернила содержат по меньшей мере одну добавку, выбранную из следующих: гиалуроновая кислота в концентрации от 0,001 до 0,100 мг/мл биочернил, предпочтительно 0,007 мг/мл; ламинин в концентрации от 0,005 до 0,100 мг/мл биочернил, предпочтительно 0,084 мг/мл; коллаген I в концентрации от 0,001 до 0,100 мг/мл биочернил, предпочтительно 0,041 мг/мл; коллаген IV в концентрации от 0,005 до 0,175 мг/мл биочернил, предпочтительно 0,122 мг/мл; фибронектин в концентрации от 3 до 300 мкг/мл, предпочтительно 100 мкг/мл; фибриноген человека в концентрации от 10 до 100 мг/мл биочернил; апротинин в концентрации от 1 до 2 EPU/мл биочернил; полисорбат в концентрации от 0,05 до 2 мг/мл биочернил; тромбин человека в концентрации от 5 до 55 мг/мл биочернил; хлорид кальция в концентрации от 20 до 60 мМ/мл биочернил; проангиогенные витамины: витамин A в концентрации от 1 нМ до 500 мкМ, предпочтительно 100 мкМ; витамин B1 в концентрации от 50 до 100 мкМ, предпочтительно 100 мкМ; витамин B3 в концентрации от 1 до 10 мкМ, предпочтительно 10 мкМ; витамин B12 в концентрации от 10 до 100 мг/мл биочернил; витамин D3 в концентрации от 0,1 до 10 нМ, предпочтительно 10 нМ; поддерживающие ангиогенез факторы роста: VEGF в концентрации от 10 до 30 нг/мл биочернил, предпочтительно 30 нг/мл; FGF в концентрации от 10 до 20 нг/мл биочернил, предпочтительно 20 нг/мл, TGF-β в концентрации от 1 до 10 нг/мл биочернил, предпочтительно 20 нг/мл; интерлейкин (IL)-8 в концентрации от 0 до 100 нг/мл биочернил, предпочтительно 10 нг/мл; IL-17A в концентрации от 20 до 50 нг/мл биочернил, предпочтительно 20 нг/мл.

35 Коммерческие добавки, такие как гиалуроновая кислота, коллаген I и IV и ламинин, дополнительно улучшают функциональность напечатанной трехмерной структуры.

Витамин А – АТРА (полностью транс-ретиноевая кислота), как один из метаболитов витамина А оказывает проангиогенное действие: улучшает экспрессию факторов, лежащих в основе ангиогенеза (таких как, например, циклоксидаза-2 (COX-2), индуцируемый гипоксией фактор (HIF)-1, С-Х-С, хемокиновый рецептор (CXCR)-4, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиотензин (Ang)-2, -4. Кроме того, продемонстрировано, что АТРА уменьшает активность pro-MMP2 (проматриксная металлопротеиназа-2 – коллагеназа типа IV).

Витамин В1 – бенфотиамин (производное тиамина) ингибирует апоптоз на пути протеинзависимой В-киназы (PKB/Akt) и отвечает за индуцирование пролиферации эндотелиальных клеток-предшественников.

Витамин В3 – ниацин, через свой рецептор, т. е. рецептор 2 гидроксикарбоновой кислоты (GPR109A), усиливает и стимулирует функции эндотелиальных клеток, которые поддерживают ангиогенез. Кроме того, витамин В3 является предшественником NAD(+), который путем взаимодействия с медиатором сиртуином (SIRT) индуцирует и поддерживает образование сосудов.

Витамин В12 (кобаламин) индуцирует продуцирование простагландинов E1, простациклинов и оксида азота (NO). Все из указанных веществ оказывают благоприятное воздействие на начало ангиогенеза.

Витамин D3 предназначен для стимуляции ангиогенеза *in vitro*. Он индуцирует повышенную экспрессию VEGF и активность pro-MMP2. Он также влияет на функцию ECFC (эндотелиальные колониеобразующие клетки).

VEGF индуцирует пролиферацию, миграцию, споруляцию и образование связей между эндотелиальными клетками, а также, индуцируя образование разнообразных протеаз, влияет на разложение внеклеточного матрикса (ECM) и активирует поверхностные интегрины эндотелиальных клеток.

Фактор роста фибробластов (FGF) усиливает миграцию эндотелиальных клеток и стимулирует капиллярный морфогенез. Он также повышает продуцирование эндогенного VEGF.

Трансформирующий фактор роста (TGF-β) стимулирует образование ECM (протеогликаны, фибронектин, коллаген), регулирует пролиферацию эндотелиальных клеток, их миграцию и образование кровеносных сосудов. TGF-β опосредует взаимодействия эндотелиальных клеток и перицитов.

Интерлейкин (IL)-8 оказывает мощное проангиогенное воздействие на эндотелиальные клетки путем взаимодействия с рецепторами CXCR1 и CXCR2. Он стимулирует образование микрососудистой сети.

IL-17A – индуцирует ангиогенез, миграцию клеток и реорганизацию цитоскелета.

Предпочтительно первичные биочернила содержат одну или более добавок животного или человеческого происхождения, выбранных из эндотелиальных клеток при плотности $(0,1-10) \times 10^5$ /мл биочернил, первичных микрососудистых эндотелиальных клеток в концентрации $(0,1-10) \times 10^5$ /мл биочернил, α -клеток животного или человеческого происхождения в концентрации $(3-9) \times 10^6$ /мл биочернил, β -клеток животного или человеческого происхождения в концентрации $(1,1-3,4) \times 10^7$ /мл биочернил, панкреатических островков животного или человеческого происхождения, предпочтительно в количестве 20000 iEq/мл биочернил.

Панкреатические островки отвечают за продуцирование инсулина. Эндотелиальные клетки добавляют для ускоренного образования сосудистой сети в напечатанной трехмерной структуре. Первичные микрососудистые эндотелиальные клетки используют для поддержки образования и роста микрососудов в биопечатной трехмерной структуре.

Согласно шестому аспекту предложен способ получения биочернил для печати кровеносных сосудов, включающий следующие этапы:

а) необязательное получение раствора микробиологического желатина с добавлением СМС, включающее получение раствора 1-2% (масс./об.) микробиологического желатина в буферном растворе, предпочтительно PBS, путем суспендирования микробиологического желатина в буферном растворе при перемешивании при температуре от 50 до 65°C, предпочтительно при 60°C, добавление водного раствора 2-5% (об./об.) карбоксиметилцеллюлозы (СМС) с получением конечной концентрации 0,2-1% (об./об.) СМС в биочернилах и охлаждение раствора до температуры, равной 40°C или ниже;

б) получение раствора 5-10% (масс./об.) dECM путем добавления порошка dECM согласно второму аспекту настоящего изобретения, предпочтительно стерилизованного излучением, в (i) раствор микробиологического желатина с добавлением СМС, полученный на этапе (а), или (ii) буферный раствор или (iii) раствор клеточной среды, при аккуратном перемешивании;

с) ультразвуковая обработка полученного раствора при температуре, не превышающей 37°C, в течение 0,5-2,0 ч;

д) необязательное добавление по меньшей мере одной добавки животного или человеческого происхождения, выбранной из следующих: фибронектин в концентрации от 3 до 300 мкг/мл, предпочтительно 100 мкг/мл; VEGF в концентрации от 10 до 30 нг/мл, предпочтительно 30 нг/мл; FGF в концентрации от 10 до 20 нг/мл, предпочтительно 20

нг/мл; PGE2 в концентрации от 100 до 300 нМ, предпочтительно 100 нМ; эндотелиальные клетки при плотности $(0,1-10) \times 10^7$ клеток/мл биочернил; фибробласты при плотности $(0,1-10) \times 10^6$ клеток/мл биочернил.

5 Согласно седьмому аспекту предложен способ получения биочернил для печати кровеносных сосудов, включающие следующие этапы:

а) необязательное получение раствора микробиологического желатина с добавлением СМС, включая получение раствора 1-5% (масс./об.) микробиологического желатина в буферном растворе, предпочтительно PBS, путем суспендирования микробиологического желатина в буферном растворе при перемешивании при 10 температуре от 50 до 65°C, предпочтительно при 60°C, добавление водного раствора 2-5% (об./об.) СМС для получения конечной концентрации 0,2-2% (об./об.) СМС в биочернилах и охлаждение раствора до температуры, равной 40°C или ниже;

б) получение раствора 2-10% (масс./об.) dECM путем добавления порошка dECM согласно второму аспекту настоящего изобретения, предпочтительно стерилизованного 15 излучением, в (i) раствор микробиологического желатина с добавлением СМС, полученный на этапе (а), или (ii) буферный раствор, или (iii) раствор клеточной среды при аккуратном перемешивании.

с) кипячение смеси при 100°C в течение 15-30 минут;

д) необязательное добавление по меньшей мере одной добавки животного или 20 человеческого происхождения, выбранной из следующих: фибронектин в концентрации от 3 до 300 мкг/мл, предпочтительно 100 мкг/мл; VEGF в концентрации от 10 до 30 нг/мл, предпочтительно 30 нг/мл; FGF в концентрации от 10 до 20 нг/мл, предпочтительно 20 нг/мл; PGE2 в концентрации от 100 до 300 нМ, предпочтительно 100 нМ; эндотелиальные клетки в концентрации $(0,1-10) \times 10^7$ клеток/мл биочернил; фибробласты в концентрации 25 $(0,1-10) \times 10^6$ клеток/мл биочернил.

Согласно восьмому аспекту предложены биочернила для печати кровеносных сосудов, содержащие подвергнутый ультразвуковой обработке или кипячению раствор dECM согласно упомянутому выше третьему аспекту настоящего изобретения в 30 концентрации от 2 до 10% (масс./об.), предпочтительно с добавлением микробиологического желатина в концентрации от 1 до 5% (масс./об.) и/или СМС в концентрации от 0,2 до 2% (об./об.).

Подвергнутый ультразвуковой обработке или кипячению dECM изменяет свои физические и химические свойства при изменении температуры. Этот компонент предназначен для обеспечения надлежащей вязкости биочернил в ходе печати при

относительно низкой температуре (15-20°C) и для сохранения напечатанного протока до инфильтрации клеток, а также медленного разжижения при температуре культуры 37°C.

Микробиологический желатин обеспечивает желательную консистенцию и улучшает показатель выживаемости клеток. СМС увеличивает вязкость и стабилизирует консистенцию биочернил. Фибронектин стимулирует ангиогенез и в зависимости от дозы стимулирует удлинение образующихся сосудов без воздействия на скорость пролиферации.

Предпочтительно биочернила для печати кровеносных сосудов содержат по меньшей мере одну добавку животного или человеческого происхождения, выбранную из следующих: фибронектин в концентрации от 3 до 300 мкг/мл, предпочтительно 100 мкг/мл; VEGF в концентрации от 10 до 30 нг/мл, предпочтительно 30 нг/мл; FGF в концентрации от 10 до 20 нг/мл, предпочтительно 20 нг/мл; PGE2 в концентрации от 100 до 300 нМ, предпочтительно 100 нМ; эндотелиальные клетки при плотности $(0,1-10) \times 10^7$ клеток/мл биочернил; фибробласты при плотности $(0,1-10) \times 10^6$ клеток/мл биочернил.

Эндотелиальные клетки производят кровеносные сосуды. Фибробласты продуцируют индуцирующие ангиогенез факторы. VEGF индуцирует пролиферацию, миграцию, множественное деление и образование связей между эндотелиальными клетками. Кроме того, индуцируя образование разнообразных протеаз, VEGF влияет на разложение ЕСМ и активирует поверхностные интегрины эндотелиальных клеток. FGF увеличивает миграцию эндотелиальных клеток и стимулирует капиллярный морфогенез. Он также повышает продуцирование эндогенного VEGF. PGE2 – простагландин E2, предназначен для индуцирования миграции, пролиферации и образования новых сосудов путем активации (фосфорилирования) FGF рецептора (R)-1.

Согласно девятому аспекту предложена трехмерная структура, содержащая по меньшей мере три прилегающих слоя биочернил, в которой слой биочернил для печати кровеносных сосудов согласно восьмому аспекту настоящего изобретения расположен между двумя слоями первичных биочернил согласно пятому аспекту настоящего изобретения.

Согласно десятому аспекту предложен способ получения трехмерной структуры, в котором первичные биочернила согласно пятому аспекту настоящего изобретения и биочернила для печати кровеносных сосудов согласно восьмому аспекту настоящего изобретения наносят послойно в процессе 3D-биопечати при скорости печати от 5 до 50 мм/с, давлении от 4 до 300 кПа и температуре от 4 до 37°C, и при этом в течение или после нанесения на первичные биочернила воздействует ультрафиолетовый свет и/или видимый свет, предпочтительно имеющий длину волны от 365 до 405 нм,

предпочтительнее 405 нм, в течение по меньшей мере 5 секунд. Сшивание при 405 нм предпочтительно, поскольку не является токсичным для клеток, содержащихся в трехмерной структуре.

Настоящее изобретение позволило получить модель дольки, имеющей размеры 27×17×2,5 мм. Дольку, состоящую из пяти слоев, печатали в течение 3-10 минут. Кроме того, получали 3D-модель прототипа функционального органа с размерами 30×40×20 мм. Модель состояла из 30 слоев и была напечатана в течение 20-60 минут. Важно также отметить, что это стало первым сообщением о применении dECM, подвергнутого кипячению или ультразвуковой обработке. Настоящее изобретение позволяет получение конструкции за непродолжительное время, поскольку скорость печати надлежащим образом скоррелирована с вязкостью биочернил (вплоть до 30 мм/с). Может быть получена устойчивая трехмерная пористая структура (30 слоев), которую можно сохранять при температуре 37°C в течение 20 суток. Согласно предпочтительному варианту осуществления первичные биочернила основаны на применении менее токсичного фотоинициатора, т.е. LAP, а не Irgacure, в относительно низкой концентрации. Кроме того, для получения раствора dECM пепсин используют в меньшем количестве, чем описано в литературе.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Влияние концентрации пепсина на свойства гидрогеля dECM.

Фиг. 2. Взаимосвязь между концентрацией растворов dECM и вязкостью: А) раствор 5% (масс./об.) dECM с добавлением 15% (масс./об.) порошка dECM, В) раствор 5% (масс./об.) dECM с добавлением 25% (масс./об.) порошка dECM, С) раствор 8% (масс./об.) dECM с добавлением 15% (масс./об.) порошка dECM, D) раствор 8% (масс./об.) dECM с добавлением 25% (масс./об.) порошок dECM, E) раствор 10% (масс./об.) dECM с добавлением 15% (масс./об.) порошка dECM, F) раствор 10% (масс./об.) dECM с добавлением 25% (масс./об.) порошка dECM.

Фиг. 3. Анализ кинетики 5% (масс./об.) растворов dECM (А, В), 8% (масс./об.) растворов dECM (С, D) и 10% (масс./об.) растворов dECM (Е, F) при заранее заданной температуре.

Фиг. 4. Анализ поглощающей способности напечатанных долек: GelMa, НАМА, Смесь.

Фиг. 5. Вязкость dECM(η) после (А) кипения и (В) ультразвуковой обработки.

Фиг. 6. 3D-модель А) васкуляризованной дольки и В) фото напечатанной конструкции.

Фиг. 7. Визуализация сосудистой системы 3D-модели (А, В) и прототип (С, D) поджелудочной железы.

Фиг. 8. Действие глицерина на функциональность панкреатических островков: А) в начале эксперимента и В) после инкубации в течение 24 ч.

5 Фиг. 9. Влияние коммерческих добавок на функциональность и жизнеспособность панкреатических островков (А) в начале эксперимента, В) после инкубации в течение 24 ч и С) после инкубации в течение 48 ч.

10 Фиг. 10. Влияние добавления метакрилизованного желатина на жизнеспособность панкреатических островков А) в начале эксперимента, В) после инкубации в течение 24 ч, С) после инкубации в течение 48 ч и D) после инкубации в течение 72 ч.

Фиг. 11. Влияние добавления метакрилизованной гиалуроновой кислоты на жизнеспособность панкреатических островков А) в начале эксперимента, В) после инкубации в течение 24 ч и С) после инкубации в течение 48 ч.

15 Фиг. 12. Влияние добавления смеси GelMa и НАМА в варьирующих пропорциях на жизнеспособность панкреатических островков А) в начале эксперимента, В) после инкубации в течение 24 ч, С) после инкубации в течение 48 ч и D) после инкубации в течение 72 ч.

20 Фиг. 13. Влияние добавления полученного резанием или измельчением порошка ЕСМ на жизнеспособность панкреатических островков А) в начале эксперимента, В) после инкубации в течение 24 ч, С) после инкубации в течение 48 ч и D) после инкубации в течение 48 ч.

Фиг. 14. Влияние добавления GelMa и НАМА в первичные биочернила на жизнеспособность панкреатических островков после печати А) в начале эксперимента, В) после инкубации в течение 24 ч.

25 Фиг. 15. Визуализация с помощью электронного микроскопа, представляющая структуру белка на отдельных стадиях получения dЕСМ для его применения в качестве исходного материала для биопечати.

30 А)-С) Изображения, полученные с помощью СЭМ (сканирующий электронный микроскоп): А) природная ткань до децеллюляризации; В) ткань после децеллюляризации; С) конструкция, напечатанная с применением первичных биочернил.

Д)-F) Изображения, полученные с помощью ПЭМ (просвечивающий электронный микроскоп): D) ткань после децеллюляризации; E), F) конструкции, напечатанные с применением первичных биочернил с сохраненной четвертичной структурой коллагена (видимые коллагеновые волокна).

Варианты осуществления настоящего изобретения

Вариант осуществления 1: получение dECM, не содержащего детергента

А. Процедура децеллюляризации поджелудочной железы

Получали раствор 1% (об./об.) Triton X-100 с 0,1% (об./об.) аммиачной воды в концентрированном растворе 1XPBS с 0,01% (масс./об.) стрептомицина для удаления клеточных структур из органа поджелудочной железы, сохраняя внеклеточный матрикс (каркас). После сбора тканевый материал замораживали при -80°C . Затем, после размораживания, наружный слой жировой ткани и окружающие мембраны удаляли из органа. Подготовленные поджелудочные железы обрабатывали двумя способами:

10 разрезали на кусочки малого размера (приблизительно 1-1,5 см) и механически измельчали (с применением метода экструзионного помола).

Фрагментированную ткань помещали в сосуд и суспендировали в предварительно полученном растворе Triton X-100. Образцы помещали в инкубатор с температурой 4°C при постоянном перемешивании со скоростью 150 об/мин. Каждые 4-12 ч заменяли детергент до тех пор, пока клеточная фракция не была полностью удалена (3-5 суток). Затем детергент вымывали из полученного каркаса. Для этой цели использовали раствор 1X PBS с 0,01% (масс./об.) стрептомицина. Процесс промывания проводили в течение 72 ч при 4°C с непрерывным перемешиванием при 150 об/мин.

15

Следующая стадия – децеллюляризация – состояла в добавлении раствора дезоксирибонуклеазы (0,0002% (масс./об.) ДНКазы в 1X PBS с добавлением 0,12 мМ ионов кальция и магния). Каркас инкубировали в вышеупомянутом растворе в течение 8 ч при 37°C с перемешиванием при 150 об/мин. Заключительный этап включал повторное промывание раствором 1X PBS с 0,01% (масс./об.) стрептомицина в стандартных условиях (4°C ; 150 об/мин; 72 ч). Кроме того, тестировали также вымывание детергента с применением аммиачной воды в концентрации 0,1% (об./об.) в концентрированном растворе 1X PBS. Кроме того, исследовали действие увеличения температуры до $20-24^{\circ}\text{C}$ на этап промывания.

20

25

После окончания процесса децеллюляризации полученный каркас замораживали в жидком азоте и дробили на кусочки с размерами около 0,5 см. Материал лиофилизировали в течение 26 ч при температуре -32°C и давлении 0,31 мбар (31 Па). Процесс заключительной сушки занимал 10 минут при давлении 0,0010 мбар (0,1 Па) и температуре -76°C . Дробленый и высушенный каркас перемалывали в порошок с применением криогенной мельницы. Процедура перемалывания включала три цикла продолжительностью 1 минуту при скорости 15 ударов в секунду.

30

Чтобы охарактеризовать полученный продукт, т. е. порошок dECM, сокращенно называемый «dECM(p)», исследовали распределение частиц порошка по размерам в градиенте потока, используя лазерный дифракционный спектрометр Spraytec от компании Malvern (Великобритания), оборудованный вспомогательной ингаляционной камерой для исследования ингаляционных аэрозолей. Во всех исследованных случаях сравнивали значения параметров, описывающих анализируемый порошок после образования аэрозоля, показывая отсутствие необходимости подведения дополнительной энергии в форме усиленного воздушного потока для разделения порошка на индивидуальные частицы. В таблице 1 представлены значения параметров, описывающих диаметры частиц порошка, где:

$Dv(50)$ – медиана объемного распределения частиц по размерам: диаметр частиц, который разделяет пополам совокупное распределение объема; другими словами, все частицы как меньшего, так и большего размера, чем медиана, имеют одинаковый объем (частицы с меньшим диаметром составляют 50% объема образца).

$Dv(10)$ – частицы мельче этого диаметра составляют 10% объема образца.

$Dv(90)$ – частицы мельче этого диаметра составляют 90% объема образца.

$D[3][2]$ – диаметр Саутера представляет собой диаметр частицы, отношение объема к площади поверхности которой совпадает с отношением полного объема всех анализируемых частиц к полной площади поверхности всех таких частиц.

$D[4][3]$ – диаметр, определяемый как отношение суммы четвертых степеней диаметров частиц к сумме третьих степеней диаметров частиц.

Таблица 1. Значения параметров, описывающих диаметры частиц порошка

Поток [л/мин]	Параметр	Диаметр [мкм]	SD [мкм]
100	$Dv(10)$	28,23	1,48
	$Dv(50)$	148,43	10,14
	$Dv(90)$	410,1	29,41
	$D[3][2]$	54,19	4,54
	$D[4][3]$	189,6	12,4
200	$Dv(10)$	27,7	5,7
	$Dv(50)$	139,7	27,2
	$Dv(90)$	474,4	123,8
	$D[3][2]$	43,4	5,2
	$D[4][3]$	202,1	40,1
270	$Dv(10)$	25,3	2,2

	Dv(50)	146,7	25,6
	Dv(90)	498,3	62,7
	D[3][2]	46,3	4,6
	D[4][3]	209,5	27,5

Результаты измерений после образования аэрозоля из порошка dECM показывают, что порошок был полидисперсным. Медиана объемного распределения диаметров частиц $Dv(50)$ при номинальном воздушном потоке для ингалятора типа Cyclohaler составлял $148,43 \pm 10,14$ мкм. В то же время самые мелкие частицы, полный объем которых не превышал 10% полного объема образца, имели диаметр $Dv(10)$ менее $28,23 \pm 1,48$ мкм, причем диаметр, определяющий частицы, полный объем которых составлял менее чем 90% полного объема образца, составлял $410,10 \pm 29,41$ мкм. Увеличение скорости воздушного потока, поступающего в ингалятор, до 200 и 270 $\text{дм}^3/\text{мин}$ значительно не влияло на значение медианы объемного распределения размера частиц (значение $Dv(10)$). Можно было наблюдать лишь незначительное увеличение размера $Dv(90)$ наиболее крупных частиц от приблизительно $410,1 \pm 29,41$ мкм до $498,3 \pm 62,7$ мкм. Это приводило к увеличению диапазона распределения от $2,57 \pm 0,04$ (для потока 100 $\text{дм}^3/\text{мин}$) до $3,3 \pm 0,4$ (для потока 270 $\text{дм}^3/\text{мин}$).

В. Эффективность способа децеллюляризации

15 - Белковые характеристики продукта:

После децеллюляризации поджелудочной железы свиньи определяли белковый состав ECM с применением метода масс-спектрометрии. Полученные результаты четко продемонстрировали максимально высокое процентное содержание коллагенов в исследованных образцах, причем для коллагена типа 1 (COL1) цепи альфа (A)-1, так называемого COL1A1, обнаружены наиболее высокие значения по сравнению с другими обнаруженными типами коллагена.

Таблица 2. Процентное содержание COL1A1 в протестированных образцах. M18, M22, M23, M24s, M24, M25 означают номера образцов.

	Контрольный образец	M18	M22	M23	M24s	M24	M25
% (масс./масс.) COL1A1 в образце	0,001	99,5	91,4	99,5	94,3	92,6	99,3

Кроме того, были обнаружены значительные количества коллагена типа IV и типа VI. Это показывает, что используемый протокол децеллюляризации позволяет сохранить типы коллагена, которые имеют наиболее высокий уровень интеграции с

панкреатическими островками и β -клетками. Коллаген типа I и типа IV наиболее эффективен для поддержания функциональности и жизнеспособности панкреатических островков и обычно находит применение в качестве добавки во вариантах биомедицинского применения, которые основаны на функционировании клеток панкреатических островков. Следует отметить, что коллагены типов VI и IV присутствуют на внесекреторной поверхности и базальной мембране панкреатических островков и регулируют активность фибронектина. Процентное содержание любого из других анализируемых типов коллагена (COL1A2, COL3A1, COL4A2, COL6A1, COL6A2, COL6A3 COL14A1) не превышало 3,5% для всех исследованных образцов.

10 - Конечная концентрация ДНК

Для определения остаточной концентрации ДНК осуществляли три анализа:

(a) PicoGreen для определения остаточной концентрации ДНК.

(b) Электрофорез в агарозном геле для определения размеров частиц оставшегося генетического материала.

15 (c) Микроскопическая визуализация– окрашивание гематоксилином и эозином (ГЭ).

Процесс децеллюляризации успешно завершился, когда остаточная концентрация ДНК не превышала 50 нг двухцепочечной ДНК (дцДНК) на 1 мг сухой массы ЕСМ, и длина молекул оставшейся ДНК не превышала 200 пар оснований (п.о.). Кроме того, микроскопическое изображение полученного каркаса исследовали на присутствие ядер клеток (окрашивание гематоксилином и эозином).

20 Остаточная концентрация ДНК в сухом веществе составляла в среднем 0,077 нг/мг. Во всех исследованных образцах остаточная концентрация ДНК составляла менее 0,15 нг/мг. Анализ проводили, используя наборы DNeasy Blood & Tissue Kit для выделения остаточной ДНК, а также реагент и наборы Quant-iT PicoGreen для анализа дцДНК для определения концентрации выделенного генетического материала.

При применении электрофореза в агарозном геле сигнал не выявлялся. Уровни во всех образцах были ниже уровня детекции, что явным образом демонстрирует, что в ЕСМ отсутствовала остаточная ДНК в форме частиц крупнее 200 п.о.

30 Микроскопическое исследование не показало наличия генетического материала, и после процесса децеллюляризации не просматривались ядра клеток.

- Остаточный Triton X-100 и эффективный способ его детекции и удаления

Для сравнения проводили децеллюляризацию с применением 0,5% (масс./об.) ДСН. Однако результат оказался неудовлетворительным вследствие большого количества остаточного детергента в конечном продукте. Порошок ЕСМ демонстрировал высокий уровень пенообразования при попытках его растворения. При применения Triton X-100 этого не наблюдалось.

Чтобы проверить остаточную концентрацию Triton X-100 после процесса децеллюляризации, определяли его остаток в конечном продукте.

Получение образцов для анализа

Учитывая белый цвет растворенного dЕСМ, образцы обрабатывали коллагеназой в трех концентрациях: 4,3953 единиц активности PZ/г dЕСМ(p), 43953 PZ/г dЕСМ(p) и 87,906 PZ/г dЕСМ(p). Коллагеназу получали в специальном растворе, содержащем 150 мл раствора Рингера при рН от 7,2 до 7,4, 2,72 мл НЕРЕС (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) (1 М), 1,125 мл бикарбоната Na (7,5%) и 1,05 мл CaCl₂ (1 М).

Образцы перемешивали в течение 24 ч при 37°C при постоянном встряхивании со скоростью 1000 об/мин. В полученных растворах анализировали остаточную концентрацию неионогенного детергента Triton X-100. Образец А получали в результате обработки dЕСМ коллагеназой в однократной концентрации. Образец В обрабатывали коллагеназой в 10-кратной концентрации. Образец С обрабатывали коллагеназой в 20-кратной концентрации (А = 6,977 мкг Triton X-100/г dЕСМ(p), В = 40,475 мкг Triton X-100/г dЕСМ(p), С = 39,325 мкг Triton X-100/г dЕСМ(p)).

Важно отметить, что наиболее высокая остаточная концентрация Triton X-100 была обнаружена в растворе dЕСМ, который обрабатывали коллагеназой в концентрации 43 953 PZ/г dЕСМ. Увеличение концентрации коллагеназы не приводило к увеличению получаемого количества Triton X-100, и это свидетельствовало, что концентрация 43953 PZ/г dЕСМ была достаточной для экстракции всего остаточного Triton X-100 из образца.

Предшествующие описанные в публикациях попытки оценки этого детергента не приводили к каким-либо ощутимым результатам по следующим причинам:

- Оценка порошка Triton X-100 была невозможна, поскольку эта форма ЕСМ абсорбировала краситель и, таким образом, искажала результат. Эта корреляция была продемонстрирована путем анализа порошка ЕСМ после децеллюляризации с применением ДСН в качестве детергента, который показал присутствие Triton X-100, что было невозможно вследствие используемого детергента.

- Белый цвет dECM, растворенного в пепсине и нейтрализованного, не позволял провести измерение концентрации.

Таким образом, до настоящего времени обработка dECM коллагеназой оставалась единственным способом оценки остаточных детергентом в биологическом материале после децеллюляризации. Это важно, когда такой материал (dECM) предназначен для применения в процессе биопечати с жизнеспособными клетками. Это имеет решающее значение, если такой материал предназначен для имплантации в организм человека.

С. Результаты

На первом этапе анализировали различия в жировом составе децеллюляризованного матрикса в зависимости от подготовки поджелудочной железы для децеллюляризации. На следующем этапе анализировали содержание остаточной ДНК в зависимости от способа подготовки поджелудочной железы, содержание коллагена и содержание остаточного детергента Triton X-100.

Применение способа помола путем механической экструзии позволило значительно уменьшить содержание жира в получаемом внеклеточном матриксе. При применении способа помола путем механической экструзии содержание жира составляло $6,24 \pm 0,07\%$ (масс./масс.) по сравнению с содержанием жира $21,47 \pm 0,07\%$ (масс./масс.) при применении способа резания. Это различие было статистически значимым ($p < 0,001$). Низкое содержание жира в получаемом dECM значительно увеличивало жизнеспособность клеток и панкреатических островков.

Содержание остаточного ДНК, исследованное с помощью Picogreen, было значительно ниже в случае применения помола путем механической экструзии, а именно, составляло $0,07 \pm 0,07$ нг/мг по сравнению с до $0,13 \pm 0,06$ нг/мг ткани ($p = 0,027$). В обоих случаях это значение было существенно ниже допустимого значения 50 нг/мг.

Применение способа помола путем механической экструзии позволило значительно сократить содержание Triton X-100 в получаемом внеклеточном матриксе. В способе помола путем механической экструзии содержание детергента составляло $3,79 \pm 2,33$ мкг/г по сравнению с $6,53 \pm 2,34$ мкг/г в способе резания. Это различие было статистически значимым ($p = 0,008$).

Содержание коллагенов в протестированном материале, полученном с применением способа получения, не различалось в зависимости от применения способа резания и помола путем механической экструзии.

Применение аммиачной воды для подщелачивания среды в целях улучшения вымывания Triton не приводило к улучшенному вымыванию Triton. Однако оно

приводило к изменению состава получаемых коллагенов. Аналогичным образом, промывание при 24°C не улучшало вымывание Triton, усиливая при этом повреждение коллагеновых структур, в результате чего были получены более высокие значения содержания ДНК, которые могли свидетельствовать о риске инфицирования материала.

5 Таким образом, оптимальный способ представлял собой промывание децеллюляризованного материала в PBS при температуре 4°C в течение 72 ч.

Вариант осуществления 2: Получение биочернил

А. Растворение dECM(p)

10 Для получения раствора dECM (dECM(r)) была разработана процедура растворения порошка dECM (dECM(p)) с применением пепсина и хлористоводородной кислоты (HCl).

Процедура получения раствора dECM была разделена на две части:

(a) Растворение dECM

15 Пепсин (в концентрации 0-10 мг/мл, предпочтительно 1 мг/мл) растворяли в 50 мл 0,01 М HCl, после чего добавляли dECM(p) (0,5-5 г). Этот способ приводил к получению концентрации dECM(r) в диапазоне 1-10% (масс./об.). Полученный раствор помещали на магнитную мешалку с применением следующих условий перемешивания: комнатная температура около 25°C, продолжительность растворения 72 ч, при этом раствор встряхивали через каждый час с течение первых 8 ч перемешивания.

(b) Нейтрализация dECM(r)

20 Нейтрализацию 50 мл dECM(r) осуществляли на льду (желательная температура раствора dECM составляла от 4 до 4,5°C) до достижения pH 7,2-7,4 с применением следующих веществ:

- 5 мл 0,1 М NaOH (объем 0,1 М NaOH составлял 1/10 объема dECM(r) для нейтрализации);

25 - 5,56 мл 10X PBS (объем 10X PBS составлял 1/9 объема dECM(r) для нейтрализации);

- подходящий объем 1X PBS (1-10 мл) использовали для разбавления раствора dECM.

30 Чтобы идентифицировать процедуру, подходящую для получения dECM(r), осуществляли анализ растворов с относительно высокой концентрацией dECM(p), измельченного после стерилизации излучением: 10% (масс./об.) с варьирующим содержанием пепсина.

Получали растворы dECM с варьирующим содержанием пепсина. Раствор, содержащий 1 мг/мл пепсина, имел относительно высокую гомогенность: малый диапазон значений вязкости. При изменении температуры наблюдали незначительное изменение мутности. Все проанализированные способы растворения с варьирующим содержанием пепсина использовали для получения dECM(r), однако было продемонстрировано, что используемое количество 1 мг/мл было оптимальным.

В. Получение биочернил

(а) Условия получения первичных биочернил:

- Нейтрализованный раствор dECM с dECM(p), полученным измельчением, резанием, с применением и без применения стерилизации излучением или стерилизации этиленоксидом
- Порошок dECM(p), полученный измельчением, резанием, с применением и без применения стерилизации излучением или стерилизации этиленоксидом
- Стерильный GelMa 10-20% (масс./об.) с 0,2-0,5% (масс./об.) LAP
- Стерильный НАМА 1-3% (масс./об.) с 0,2-0,5% (масс./об.) LAP
- Стерильный глицерин
- Культуральная среда 1:5-7 об./об., панкреатические островки 20000 iEq/мл и линии клеток: эндотелиальные клетки 1×10^5 /мл, первичные микрососудистые эндотелиальные клетки 1×10^5 /мл, витамины: А - 100 мкМ, В1 - 100 мкМ, В3 - 10 мкМ, D3 - 10 нМ, факторы роста: VEGF - 30 нг/мл, FGF - 20нг/мл, фактор некроза опухоли (TNF)- α - 10 нг/мл, IL-8 - 10нг/мл, IL-17A - 20нг/мл.

Сначала получали пасту, содержащую подходящее количество нейтрализованного dECM(r) и dECM(p), путем тщательного перемешивания стерильным металлическим шпателем. Поскольку dECM(p) получали путем лиофилизации и не растворяли после этого, он сохранял четвертичную структуру ЕСМ. Полученную пасту выдерживали при температуре 7-10°C в течение по меньшей мере 24 ч. Непосредственно перед применением пасты для получения биочернил ее помещали в стерильный шприц и перемешивали, пропуская из одного шприца в другой. В то же самое время получали растворы GelMa (10-20% (масс./об.)) и НАМА (1-3% (масс./об.)) с LAP согласно общеизвестной процедуре. Шприц, содержащий пасту, прикрепляли через коннектор к другому шприцу без поршня, который переворачивали и устойчиво устанавливали в вертикальном положении. Последовательно добавляли глицерин, культуральную среду, факторы роста, витамины, GelMa и НАМА в растворах. Затем аккуратно вводили поршень и перемешивали пасту с другими реагентами. После перемешивания полученные

биочернила выдерживали в инкубаторе в течение 5 минут, добавляли островки и клетки, затем повторно перемешивали и вводили в картридж. На следующей стадии наполненный картридж центрифугировали в течение 2 минут при скорости 1500 об/мин и повторно выдерживали в инкубаторе в течение приблизительно 5 минут.

5 Композиции полученных первичных биочернил содержали: 40-50% (об./об.) dECM(r), 2,763-27,692% (масс./об.) dECM(p), 1,464-7,320% (масс./об.) GelMa, 0,146-1,098% (масс./об.) НАМА, 5,0-10,0% (масс./об.) глицерина, 0,03- 0,17% (масс./об.) LAP, VEGF - 30 нг/мл, FGF - 20нг/мл, TGF- β - 10нг/мл, IL-8 - 10нг/мл, IL-17A - 20нг/мл, витамин А - 100 мкМ, витамин В1 - 100 мкМ, витамин В3 - 10 мкМ, витамин D3 - 10 нМ, панкреатические островки - 20000 iEq/мл, эндотелиальные клетки - 1×10^5 /мл, первичные микрососудистые эндотелиальные клетки - 1×10^5 /мл.

(b) Биочернила для печати кровеносных сосудов

Процесс получения биочернил для печати кровеносных сосудов с применением ультразвуковой обработки разделяли на два этапа:

15 - Предварительное растворение – подходящее количество микробиологического желатина суспендировали в PBS (1-2% (масс./об.)) и перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение приблизительно 10 минут при 60°C. Затем, при непрерывном перемешивании, температуру снижали, и dECM(p), полученный измельчением, резанием, с применением и без применения стерилизации излучением или стерилизации этиленоксидом добавляли порциями (5-10% (масс./об.)), и раствор дополнительно перемешивали каждые 2 минуты. В зависимости от варианта в смесь добавляли предварительно полученный раствор карбоксиметилцеллюлозы (СМС) на основе PBS (2-5% (об./об.)).

25 - Ультразвуковая обработка: сосуд с полученным раствором ЕСМ помещали в лабораторный стакан со льдом, после чего внутрь стакана помещали головку ультразвукового аппарата и температурный датчик, и процесс ультразвуковой обработки проводили согласно разработанной процедуре с применением 3-секундных импульсов с амплитудой 45%, останавливая обработку при увеличении температуры выше 30°C по предупредительному сигналу. Ультразвуковую обработку проводили в течение от 0,5 до 30 2,0 ч.

- В качестве альтернативы, этап предварительного растворения не проводили, и раствор 5-10% (масс./об.) dECM получали, добавляя порошок dECM в буферный раствор или раствор клеточной среды при аккуратном перемешивании. После этого осуществляли этап ультразвуковой обработки, как описано выше.

Процесс изготовления биочернил для печати кровеносных сосудов путем кипячения разделяли на два этапа:

5 - Предварительное растворение: подходящее количество микробиологического желатина суспендировали в PBS (1-5% (масс./об.)) и перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение приблизительно 10 минут при 60°C. Затем, при непрерывном перемешивании, температуру снижали, и dECM(p), полученный измельчением, резанием, с применением и без применения стерилизации излучением или стерилизации этиленоксидом добавляли порциями (2-10% (масс./об.)), и раствор дополнительно перемешивали через каждые 2 минуты. В зависимости от варианта в смесь добавляли
10 предварительно полученный раствор СМС на основе PBS (2-5% (об./об.)).

- Кипячение: сосуд с полученным раствором ЕСМ или порошком ЕСМ (5-10% (масс./об.)) в растворе PBS помещали на магнитную мешалку, оборудованную нагревательной плитой, нагретой до 100°C, на которой смесь кипятили в течение от 15 до 30 минут.

15 - В качестве альтернативы, этап предварительного растворения пропускали, и раствор 5-10% (масс./об.) dECM получали, добавляя порошок dECM в буферный раствор или раствор клеточной среды при аккуратном перемешивании. После этого осуществляли этап ультразвуковой обработки, как описано выше.

В полученные таким способом основы биочернила для печати кровеносных
20 сосудов добавляли фибронектин, факторы роста и эндотелиальные клетки.

Композиция полученных подвергнутых ультразвуковой обработке биочернил для печати кровеносных сосудов содержала: 5-10% (масс./об.), предпочтительно 7,5% (масс./об.) dECM(p), 0,2-1% (об./об.) СМС, 1-2% (масс./об.), предпочтительно 1% (масс./об.) микробиологического желатина, фибронектин - 100 мкг/мл, VEGF - 30 нг/мл,
25 FGF – 20 нг/мл, PGE2 - 100 нМ, $1,5 \times 10^7$ /мл эндотелиальных клеток и 3×10^6 /мл фибробластов.

Композиция полученных подвергнутых кипячению биочернил для печати кровеносных сосудов содержала: 2-10% (масс./об.), предпочтительно 5% (масс./об.) dECM(p), 0,2-2% (об./об.) СМС, 1-5% (масс./об.), предпочтительно 1% (масс./об.) микробиологического желатина, фибронектин - 100 мкг/мл, VEGF - 30 нг/мл, FGF -20
30 нг/мл, PGE2 - 100 нМ, $1,5 \times 10^7$ /мл эндотелиальных клеток и 3×10^6 /мл фибробластов.

В качестве альтернативы, биочернила для печати кровеносных сосудов состояли из 5-10% (масс./об.), предпочтительно 5% (масс./об.) dECM(p) в буферном растворе или клеточной среде.

Вариант осуществления 3: Характеристики первичных биочернил

А. Реологические свойства

5 Проведенные тесты служили в качестве основы для определения значений характеристических параметров, составляющих факторы, которые ограничивают возможность применения конкретной системы для печати модели дольки поджелудочной железы: значение вязкости, составляющее более чем 5 Па·с. Влияние концентрации пепсина на свойства гидрогеля dECM представлено ниже.

Таблица 3. Действие температуры (25-37°C) на мутность dECM (τ)

Концентрация пепсина [мг/мл]			
	0	1	10
T [°C]	Поглощающая способность [-]		
25	2,241	2,3565	2,437
26	2,2415	2,356	2,4365
27	2,2415	2,356	2,4365
28	2,242	2,356	2,4355
29	2,2425	2,356	2,435
30	2,2425	2,3555	2,435
31	2,242	2,3555	2,434
32	2,242	2,3555	2,4325
33	2,2425	2,355	2,4315
34	2,2425	2,3545	2,4295
35	2,2425	2,3535	2,428
36	2,242	2,353	2,424
37	2,242	2,352	2,4215

10 Таблица 4. Влияние продолжительности воздействия температуры 37°C на мутность dECM (τ)

Концентрация пепсина [мг/мл]			
	0	1	10
t [минут]	Поглощающая способность [-]		
0	2,2875	3,1455	2,8155
10	2,282	3,131	2,8075
20	2,2755	3,118	2,786
30	2,2695	3,1005	2,769
40	2,267	3,0885	2,7585

50	2,265	3,081	2,752
60	2,2635	3,0725	2,7455
70	2,2625	3,0685	2,7415
80	2,262	3,065	2,7365
90	2,261	3,0605	2,732
100	2,261	3,0585	2,7295
110	2,2595	3,0545	2,727
120	2,259	3,052	2,7225

Таблица 5. Влияние концентрации пепсина на вязкость dECM (r), измеряемую в течение 50 минут при постоянной скорости сдвига (21/с)

Концентрация пепсина [мг/мл]	η [мПа·с]
0	2109,7 < η < 5611,9
1	3026,9 < η < 4040,7
10	3287,6 < η < 4691,3

Чтобы идентифицировать композицию биочернил с оптимальными свойствами, вязкость растворов и паст dECM исследовали, используя реометр MCR 72 (Anton Paar) согласно специально разработанной процедуре, отражающей условия, существующие в ходе биопечати: система с конусом и пластиной, постоянная скорость сдвига 21/с и температура исследования 37°C. Результаты реологического тестирования системы, учитывавшего различия образцов по типу используемого порошка (MS - полученный измельчением и стерилизованный, CS - полученный резанием и стерилизованный, MNS - полученный измельчением и нестерилизованный, CNS - полученный резанием и нестерилизованный), и концентрации используемых компонентов, представлены на фиг. 2.

Увеличение концентрации растворов dECM приводит к увеличению вязкости [фиг. 2]. Полученные значения вязкости предположительно чрезмерно низкие, чтобы позволить применение dECM(r) в качестве вещества, придающего надлежащую консистенцию биочернилам. Растворы, полученные с применением dECM(p), подвергнутого стерилизации, в каждом рассматриваемом случае имели меньшие значения вязкости, чем растворы нестерильных порошков. Незначительное различие в консистенции растворов наблюдали в случае применения полученного измельчением и резанием порошка при меньших концентрациях dECM(r). При использовании 10% (масс./об.) измельченный порошок dECM(r) создавал несколько более высокую вязкость, чем dECM(r) из полученного резанием dECM(p).

Обзор результатов показывает, что применение пасты dECM было необходимым для получения основы биочернил, имеющей подходящую консистенцию. Все системы из обзора имеют вязкость в пределах диапазона, приемлемого для применения в ходе печати. Кроме того, целесообразным кажется применение для биопечати смеси компонентов с клетками и островками с применением стерильного порошка, после стерилизации.

Добавление глицерина в первичные биочернила (пасту) вызывало незначительное уменьшение вязкости первичных биочернил, в отличие от данных литературы, свидетельствующих об увеличении вязкости биочернил после добавления глицерина. Каждый из агентов при добавлении в пасту вызывал изменение вязкости. Добавление веществ, поддерживающих сохранение конструкции или жизнеспособности клеток и островков, индуцирует изменения текучести паст, настолько незначительные, что их можно считать пренебрежимыми. Паста из dECM составила основу для получения первичных биочернил и для определения возможности применения конкретных биочернил в печати.

В. Способы отверждения биочернил

- Сшивание продуктов печати с применением сшивающих агентов

В приведенной ниже таблице представлены различия в составе сшивающих агентов, используемых в первичных биочернилах [таблица 6].

Таблица 6. Разнообразные сшивающие агенты, используемые в первичных биочернилах

Сшивающий агент	GelMa	НАМА	GelMa/НАМА		LAP
			GelMa	НАМА	
Концентрация [% (масс./об.)]	1,464 - 7,320	0,146 - 1,098	0,0732 - 5,490	0,0732 - 0,8235	0,03- 0,17

Тестирование сшиваемости в системах, представленное выше, проводили, используя свет с длиной волны в диапазоне от 365 до 405 нм с положительным результатом [таблица 7].

Таблица 7. Процент повреждения ДНК под действием света с длиной волны от 365 до 405 нм

Продолжительность воздействия (сек)	% повреждения ДНК под действием света с длиной волны 365 нм			% повреждения ДНК под действием света с длиной волны 405 нм		
	панкреатические островки	альфа-клетки панкреатических островков	бета-клетки панкреатических островков	панкреатические островки	альфа-клетки панкреатических островков	бета-клетки панкреатических островков
0 сек		1,0%	1,0%		4,0%	4,0%
10 сек	12,0%	2,0%	1,5%	2,0%	2,5%	1,5%

30 сек	14,0%			5,5%		
60 сек	45,0%	5,0%	1,5%	2,0%	3,5%	2,0%
90 сек	18,0%			9,5%		
120 сек	19,0%	6,0%	2,0%	3,5%	16,0%	5,5%
180 сек	20,0%			5,0%		
300 сек	50,0%	7,5%	2,0%	6,0%	9,5%	3,0%

Анализ результатов сшивания после процесса или в течение процесса биопечати показал, что применение света с длиной волны 365 нм и 405 нм обеспечивало заданный эффект, т. е. переход гидрогеля из жидкого в твердое состояние. Однако, поскольку биочернила содержат клетки и микроорганизмы, может быть использован только видимый свет. Таким образом, наиболее предпочтительный способ сшивания представляет собой применение света с длиной волны 405 нм.

Добавление дополнительных химических веществ в пасту dECM приводило к сглаженной топографии поверхности волокон. Кроме того, при добавлении GelMa и НАМА было обнаружено увеличение аэрации биочернил, причем этот эффект оказывается наиболее выраженным в случае НАМА.

- Термическое гелеобразование

Интенсивность процесса гелеобразования тестировали, используя определение мутности раствора с применением специализированного оборудования в широком диапазоне температур и продолжительности воздействия для его осуществления. На фиг. 3 представлены примеры результатов тестирования сшивания раствора dECM. Для 5% (масс./об.) наблюдали незначительное увеличение поглощающей способности во всех протестированных системах, обусловленное увеличением температуры в диапазоне 25-37°C. Применение измельченного и стерильного порошка уменьшало мутность раствора dECM. В случае более высоких концентраций dECM(r) (8 и 10% (масс./об.)) для растворов полученного резанием порошка получали такую же корреляцию со стерилизацией, в то время как для полученного измельчением порошка она была противоположной. Для обеих концентраций (8 и 10% (масс./об.)) мутность раствора dECM(r) незначительно увеличивалась при увеличении температуры. Раствор 10% dECM(r) проявлял относительно высокую мутность и был стабилен в протестированном температурном диапазоне

На основании кинетики гелеобразования при постоянной температуре 37°C не наблюдали значимых изменений мутности при увеличении продолжительности воздействия температуры 37°C. dECM(r) из измельченного стерильного порошка имеет минимальное значение поглощающей способности, в то время как раствор полученного

резанием нестерильного порошка имеет наиболее высокую мутность для всех концентраций dECM(r).

С. Проницаемость компонента биочернил на примере диффузии глюкозы

5 При увеличении так называемой движущей силы, т. е. концентрации глюкозы, уменьшается время задержки и достижения состояния равновесия с соответствующим увеличением диффузионной способности. Данные, представленные в таблице 8, показывают, что диффузионная способность мембран, полученных с применением первичных биочернил, была сопоставима со способностью мембран, полученных с применением 4% (масс./об.) альгината (Alg4).

10 Таблица 8. Диффузионная способность мембран из первичных биочернил с различными добавками. Для сравнения добавляли 4% альгинат

	Глюкоза [mM]					
	2,78			12,00		
параметр	t задержки [мин]	t плато [мин]	D [см ² /с]	t задержки [мин]	t плато [мин]	D [см ² /с]
Alg4	110,0	175,0	0,26	10,0	35,0	1,62
НАМА	77,5	122,5	0,36	10,0	55,0	1,85
GelMa	170,0	195,0	0,16	20,0	28,0	2,78
НАМА/GelMa	85,0	145,0	0,34	7,5	45,0	0,87

Д. Поглощающая способность

15 Чтобы оценить применимость полученных биочернил, осуществляли анализ поглощающей способности напечатанных долек с применением специально полученного буфера, имитирующего внутреннее состояние организма. В течение первых 15 минут наблюдали незначительное увеличение массы напечатанной конструкции, за которым следовали ее уменьшение и стабилизация на определенном уровне. На следующей стадии наблюдали изменения массы напечатанной дольки с течением времени для исследования явления разрушения в среде буфера SBF [фиг. 4].

20 Вариант осуществления 4: Характеристики биочернил для печати кровеносных сосудов

А. Реологические свойства

25 После кипячения dECM(r) проявляет значительно более высокое значение вязкости, чем после ультразвуковой обработки. Однако вследствие надлежащей стабильности биочернил для печати кровеносных сосудов после ультразвуковой обработки этот способ был определен как более предпочтительный для печати сосудистого протока.

В. Гелеобразование

Увеличение температуры в диапазоне от 25 до 37°C и продолжительности воздействия температуры 37°C вызывает незначительное уменьшение концентрации dЕСМ после кипячения и ультразвуковой обработки.

5 Таблица 9. Действие температуры на концентрацию dЕСМ, используемого для получения биочернил для печати кровеносных сосудов

Т [°С]	Поглощающая способность подвергнутого кипячению dЕСМ			Поглощающая способность подвергнутого ультразвуковой обработке dЕСМ		
	5% (масс./об.)	7,5% (масс./об.)	10% (масс./об.)	5% (масс./об.)	7,5% (масс./об.)	10% (масс./об.)
25,4	2,248	2,401	2,236	2,514	3,028	3,030
26	2,247	2,401	2,234	2,513	3,027	3,028
27	2,247	2,401	2,230	2,513	3,028	3,031
28	2,247	2,400	2,225	2,514	3,027	3,029
29	2,246	2,400	2,221	2,513	3,031	3,029
30	2,246	2,399	2,222	2,514	3,030	3,030
31	2,245	2,399	2,220	2,514	3,029	3,030
32	2,244	2,399	2,212	2,514	3,029	3,030
33	2,244	2,398	2,210	2,514	3,029	3,028
34	2,243	2,398	2,209	2,514	3,033	3,029
35	2,242	2,397	2,208	2,514	3,031	3,027
36	2,242	2,396	2,209	2,513	3,030	3,028
37	2,241	2,393	2,209	2,513	3,032	3,028

Таблица 10. Влияние продолжительности воздействия температуры 37°C на концентрацию dЕСМ, используемого для получения биочернил для печати кровеносных сосудов

t [мин]	Поглощающая способность подвергнутого кипячению dЕСМ			Поглощающая способность подвергнутого ультразвуковой обработке dЕСМ		
	5% (масс./об.)	7,5% (масс./об.)	10% (масс./об.)	5% (масс./об.)	7,5% (масс./об.)	10% (масс./об.)
0	2,267	2,446	2,251	2,750	2,684	2,762
10	2,276	2,439	2,239	2,748	2,691	2,768
20	2,272	2,428	2,251	2,740	2,691	2,764
30	2,269	2,416	2,243	2,730	2,690	2,759
40	2,270	2,412	2,240	2,721	2,690	2,757
50	2,275	2,412	2,238	2,714	2,686	2,754
60	2,279	2,412	2,230	2,707	2,685	2,751
70	2,274	2,413	2,228	2,703	2,684	2,749
80	2,277	2,415	2,227	2,698	2,683	2,746

90	2,273	2,416	2,220	2,694	2,681	2,745
100	2,271	2,416	2,216	2,690	2,680	2,742
110	2,271	2,417	2,219	2,686	2,678	2,741
120	2,270	2,417	2,213	2,684	2,676	2,740

Вариант осуществления 5: Действие давления, используемого в ходе биопечати, на жизнеспособность клеток и микроорганизмов

Исследования жизнеспособности осуществляли, используя фибробласты (линии клеток 3Т3-L1 и HFF-1) и панкреатические островки. Для этой цели панкреатические клетки/островки подвергали давлению в диапазоне от 15 кПа до 100 кПа с применением иглы диаметром 0,2 и 0,6 мм. Результаты проведенных тестов показали, что усилия сдвига, индуцированные в ходе 3D-биопечати с применением способа экструзии, вызывают значительные изменения жизнеспособности клеток и микроорганизмов.

10 Таблица 11. Процентное содержание живых и мертвых клеток 3Т3-L1 после применения заранее заданных значений давления

Игла 0,6 мм							
	Контрольный образец	15 кПа	25 кПа	30 кПа	50 кПа	75 кПа	100 кПа
	99%	100%	99%	98%	98%	97%	98%
p	--	0,0817	1	0,1771	0,4368	0,067	0,1102
Игла 0,2 мм							
	97%	97%	95%	94%	87%	89%	97%
P	--	0,0352	0,0247	0,0001	0	< 0,00001	< 0,00001

Таблица 12. Процентное содержание живых и мертвых клеток HFF-1 после применения заранее заданных значений давления

Игла 0,6 мм							
	Контрольный образец	15 кПа	25 кПа	30 кПа	50 кПа	75 кПа	100 кПа
	87%	91%	89%	83%	91%	84%	86%
p	--	0,1947	0,6025	0,2606	0,1987	0,3478	0,6158
Игла 0,2 мм							
	87%	74%	74%	79%	82%	78%	80%
p	--	0,0001	0	0,0061	0,0463	0,0018	0,0114

Таблица 13. Жизнеспособность панкреатических островков, подвергнутых определенному давлению с применением иглы 0,6 мм. Для панкреатических островков предпочтительно не применять иглу меньшего диаметра, поскольку диаметр панкреатических островков варьирует от 50 до 500 мкм.

Панкреатические островки свиньи - игла 0,6 мм							
	Контрольный образец	15 кПа	25 кПа	30 кПа	50 кПа	75 кПа	100 кПа
	100%	78%	92%	71%	64%	86%	75%
p	--	0,22		0,83	0,042	0,019	0,037
Панкреатические островки крысы - игла 0,2 мм							
	86%	95%	-	56%	66%	35%	22%
p	--	1	-	0,001	0,019	0,002	0,0001

5 Для получения жизнеспособной и функциональной биологической трехмерной структуры давление и диаметр иглы должны соответствовать конкретному типу клеток. Однако предпочтительно применяли давление, составляющее не более чем 30 кПа.

Вариант осуществления 5: Пригодность для печати

10 Продукты печати с применением первичных биочернил получали, используя следующие параметры: давление: 4-100 кПа, скорость печати: 5-40 мм/с, температура: печатная головка 10-37°C; талер 4-37°C, диаметр иглы: 100 нм - 1 мм. Продукты печати с применением биочернил для печати кровеносных сосудов получали, используя следующие параметры: давление: 5-100 кПа, скорость печати: 5-40 мм/с, температура: печатная головка 10-37°C; талер 4-37°C, диаметр иглы: 100 нм - 1 мм.

15 - Долька

Печать панкреатической дольки, снабженной сосудом, занимала приблизительно 3 минуты. На фиг. 6 представлена 3D-модель васкуляризированной дольки и изображение напечатанной конструкции. Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) использовали для определения морфологии латеральной поверхности и поперечного среза напечатанной дольки. Наблюдалось рыхлое расположение волокон из биочернил, обуславливающее существенную пористость дольки. Кроме того, на основании анализа поперечного среза была определена стратификация трехмерной пористой структуры с незарощенными протоками, имитирующими сосуды.

20

- Васкуляризированная трехмерная структура

Печать из биочернил прототипа поджелудочной железы, снабженного сетью незарощенных протоков, занимала приблизительно 30 минут. Как и в случае дольки, наблюдали рыхлое расположение волокон из биочернил в высокопористой структуре напечатанной конструкции, снабженной сетью незарощенных протоков.

5 Напечатанную сосудистую систему оценивали, используя визуализацию методом ядерного магнитного резонанса. Полученные 3D-реконструкции демонстрируют незарощенные протоки без тенденции к сжатию или расслоению.

Вариант осуществления 5: Цитотоксичность напечатанной дольки

10 Осуществляли МТТ-анализ на линии фибробластов (3Т3), чтобы оценить цитотоксичность первичных биочернил. Результат представлен в процентах от значения для контроля при максимальной концентрации экстракта [таблица 14]. Продолжительность воздействия для экстракта составляла 24 ч, клетки высевали с плотностью 1×10^5 /мл. Оба анализа показали отсутствие цитотоксичности в отношении протестированной линии клеток.

15 Таблица 14. Результаты МТТ-анализа цитотоксичности первичных биочернил. Тесты проведены на линии фибробластов 3Т3.

МТТ	Материал	Форма 3D-биопечати (максимальная концентрация экстракта (100%))
Время экстракции (сутки)	3Т3	% от контроля
1	% от контроля	106,59
	SD (%)	7,72
7	% от контроля	121,74
	SD (%)	9,29
14	% от контроля	117,17
	SD (%)	10,18
Положительный контроль	% от контроля	7,37
	SD (%)	9,49

Вариант осуществления 6: Действие индивидуальных компонентов биочернил на функциональность и жизнеспособность панкреатических островков/клеток

20 Чтобы оценить влияние индивидуальных компонентов первичных биочернил на жизнеспособность и функциональность панкреатических островков, осуществляли тест с глюкозной стимуляцией.

- Глицерин

Благодаря свойствам глицерина, его добавление в количествах 5% (масс./об.) и 10% (масс./об.) в биочернила улучшало пригодность первичных биочернил для печати. Чтобы оценить воздействие глицерина на функциональность панкреатических островков, его добавляли в культуральную среду в концентрации 5% или 10%, и островки инкубировали в этой среде в течение 24 ч [фиг. 8]. В обоих случаях функциональность панкреатических островков значительно возрастает по сравнению с панкреатическими островками в культуральной среде без добавок.

- Коммерческие белковые добавки

Исследовали действие добавления белков внеклеточного матрикса на функциональность и жизнеспособность панкреатических островков. Для этой цели получали раствор, содержащий 0,007 мг/мл гиалуроновой кислоты, 0,041 мг/мл коллагена I, 0,122 мг/мл коллагена IV и 0,084 мг/мл ламинина, который добавляли в культуральную среду. Эксперимент осуществляли, используя гиалуроновую кислоту двух типов, высокомолекулярную или низкомолекулярную, которую добавляли в культуральную среду, и островки инкубировали в ней в течение 48 ч [фиг. 9]. В обоих вариантах, с применением высокомолекулярной (H) и низкомолекулярной (L) гиалуроновой кислоты, панкреатические островки сохраняли функциональность на уровне, сопоставимом с функциональностью островков, не подвергнутых обработке с применением каких-либо добавок.

- GelMA

Тестировали возможное воздействие на жизнеспособность островков метакрилированного желатина, который в качестве компонента биочернил предназначен для обеспечения надлежащего сшивания продукта печати. Для этой цели 7,8% об./об. GelMa добавляли в культуральную среду, и островки инкубировали в ней в течение 72 ч [фиг. 10]. Островки, выращенные в среде с добавлением GelMa, секретировали инсулин в аналогичных или больших количествах в зависимости от времени измерения, что указывает на благоприятное воздействие этого соединения в заданной концентрации на жизнеспособность островков.

- НАМА

Тестировали возможное воздействие на жизнеспособность островков метакрилированной гиалуроновой кислоты, которая в качестве компонента биочернил предназначена для обеспечения надлежащего сшивания продукта печати. Для этой цели 0,78% об./об. НАМА добавляли в культуральную среду, и островки инкубировали в ней в течение 48 ч [фиг. 11]. Островки, выращенные в среде с добавлением НАМА,

секретировали инсулин в меньших количествах, чем контрольные островки, что может свидетельствовать о неблагоприятном воздействии этого соединения в протестированной концентрации на жизнеспособность островков.

- GelMA и НАМА

5 Тестировали возможное воздействие на жизнеспособность островков смеси метакрилированного желатина и метакрилированной гиалуроновой кислоты, которые в качестве компонентов биочернил предназначены для обеспечения надлежащего сшивания продукта печати. Для этой цели 4,68% об./об. GelMa и 0,312% об./об. НАМА (G3:2H) или 3,12% об./об. GelMa и 0,468% об./об. НАМА (G2:3H) добавляли в культуральную среду, и 10 островки инкубировали в ней в течение 72 ч [фиг. 12]. Островки, выращенные в среде с добавлением смеси с соотношением G3:2H, секретировали инсулин в больших или меньших количествах по сравнению с контрольными островками, в зависимости от момента времени измерения. Обнаружено, что этот вариант смеси производил благоприятное действие на жизнеспособность островков. Островки, выращенные в среде с 15 добавлением смеси с соотношением G2:3H, секретировали инсулин в значительно меньших количествах, чем контрольные островки, что свидетельствовало о неблагоприятном воздействии смеси GelMa и НАМА в заданных концентрациях на жизнеспособность островков.

- Порошок ЕСМ

20 Тестировали возможное воздействие на жизнеспособность островков ЕСМ, полученного путем децеллюляризации. Для этой цели 3,33% об./об. полученного резанием или измельчением ЕСМ в ходе децеллюляризации добавляли в культуральную среду, и островки инкубировали в ней в течение 72 ч [фиг. 13]. Островки, выращенные в среде с добавлением измельченного ЕСМ, производили благоприятное воздействие на секрецию 25 инсулина островками в течение 24 ч. Среда с добавлением полученного резанием ЕСМ значимо уменьшала секрецию инсулина, что может свидетельствовать о неблагоприятном воздействии на жизнеспособность островков.

Вариант осуществления 7: жизнеспособность панкреатических островков после биопечати

30 Для оценки жизнеспособности панкреатических островков после 3D-биопечати выбирали биочернила с добавками трех типов: метакрилированный желатин, метакрилированная гиалуроновая кислота, смесь метакрилированного желатина и метакрилированной гиалуроновой кислоты.

Для этой цели в первичные биочернила добавляли 7,8% об./об. GelMa или 0,78% об./об. НАМА или смесь (MIX) 4,68% об./об. GelMa и 0,312% об./об. НАМА. После печати дольки с островками инкубировали в культуральной среде в течение 24 ч [фиг. 14].

Островки в дольке, напечатанной первичными биочернилами, в которые добавляли GelMa, проявляли наиболее высокий уровень секреции инсулина после процесса печати, что свидетельствовало о благоприятном воздействии этого компонента на жизнеспособность и функциональность панкреатических островков. Добавление как НАМА, так и смеси GelMa и НАМА в биочернила индуцировало незначительное снижение уровней секреции инсулина островками по сравнению с выращенными в среде контрольными островками (которые не представляли собой продукт 3D-биопечати). Хотя результаты для биочернил только с добавлением GelMa показали наиболее высокую активность островков при заданной концентрации глюкозы, напечатанные структуры проявляли наименьшую стабильность и быстрее всего разрушались в культуральной среде. Таким образом, наилучшее решение заключалось в применении смеси метакрилированного желатина и метакрилированной гиалуроновой кислоты в процессе биопечати. Эта комбинация позволяла сохранять жизнеспособные и функциональные панкреатические островки, поддерживая при этом надлежащие параметры биопечати и устойчивость напечатанной модели.

Вариант осуществления 8: Подтверждение сохраненной четвертичной структуры dECM в первичных биочернилах

Чтобы визуализировать и подтвердить сохранение четвертичной структуры ECM в напечатанной конструкции, содержащей первичные биочернила, с применением электронного микроскопа осуществляли визуализацию белковых структур на отдельных стадиях получения dECM (для его применения в биопечати) (фиг. 15). Напечатанные конструкции (E и F), содержащие первичные биочернила, демонстрировали четвертичную структуру коллагена с видимыми коллагеновыми волокнами.

Список литературы

[1] Mohamed Ali, Anil Kumar PR, James J. Yoo, Faten Zahran, Anthony Atala, and Sang Jin Lee (2019). A Photo-Crosslinkable Kidney ECM-Derived Bioink Accelerates Renal Tissue Formation, *Adv. Healthcare Mater.*, 1800992, doi: 10.1002/adhm.201800992.

[2] Pengfei Chen, Lin Zheng, Yiyun Wang, Min Tao, Ziang Xie, Chen Xia, Chenhui Gu, Jiaxin Chen, Pengcheng Qiu, Sheng Mei, Lei Ning, Yiling Shi, Chen Fang, Shunwu Fan and Xianfeng Lin (2019). Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular

matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration, *Theranostics*. 9(9): 2439-2459.

[3] Falguni Pati, Jinah Jang, Dong-Heon Ha, Sung Won Kim, Jong-Won Rhie, Jin-Hyung Shim, Deok-Ho Kim & Dong-Woo Cho (2014). Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink, *Nature communications*, 5:3935, doi: 10.1038/ncomms4935 10.1038/ncomms4935.

[4] Lee, H., Han, W., Kim, H., Ha, D.-H., Jang, J., Kim, B. S., & Cho, D.-W. (2017). Development of Liver Decellularized Extracellular Matrix Bioink for Three-Dimensional Cell Printing-Based Liver Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 18(4), 1229-1237, doi: 10.1021/acs.biomac.6b01908.

[5] Sackett, S. D., Tremmel, D. M., Ma, F., Feeney, A. K., Maguire, R. M., Brown, M. E., ... Odorico, J. S. (2018). Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Scientific Reports*, 8(1), doi: 10.1038/s41598-018-28857-1.

[6] Mirmalek-Sani, S. H., Orlando, G., McQuilling, J. P., Pareta, R., Mack, D. L., Salvatori, M., ... & Soker, S. (2013). Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*, 34(22), 5488-5495.

[7] Brown, B. N., Freund, J. M., Han, L., Rubin, J. P., Reing, J. E., Jeffries, E. M., ... Badylak, S. F. (2011). Comparison of Three Methods for the Derivation of a Biologic Scaffold Composed of Adipose Tissue Extracellular Matrix. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17(4), 411-421, doi: 10.1089/ten.tec.2010.0342.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения децеллюляризованного внеклеточного матрикса (dECM), не содержащего детергентов, включающий следующие этапы:

5 - механическая фрагментация, предпочтительно путем механической экструзии, органа животного происхождения, выбранного из поджелудочной железы, печени, почек, сердца, кожи, легких, толстого кишечника, тонкого кишечника, кровеносных артерий и вен, жировой ткани и плаценты, причем орган отделен от тела животного;

10 - инкубация фрагментированного органа в забуференном растворе детергента, предпочтительно содержащем 1X PBS, причем забуференный раствор детергента содержит 0,5%-1,5%, предпочтительно 1% (об./об.), октоксинола-9, причем в раствор детергента добавляют противомикробное вещество, предпочтительно стрептомицин, предпочтительно в концентрации 0,01% (масс./об.), и инкубацию осуществляют при температуре ниже комнатной температуры, предпочтительно при 4°C, в течение по меньшей мере 72 ч при перемешивании, при этом фрагментированный орган переносят в свежий раствор детергента каждые 4-12 ч;

15 - инкубация фрагментированного органа в первом забуференном промывочном растворе, предпочтительно содержащем 1X PBS, причем первый забуференный промывочный раствор содержит противомикробный агент, предпочтительно стрептомицин, предпочтительно в концентрации 0,01% (масс./об.), в течение по меньшей мере 72 ч при температуре ниже комнатной температуры, предпочтительно при 4°C, при перемешивании, при этом фрагментированный орган переносят в свежий промывочный раствор каждые 4-12 ч;

20 - инкубация фрагментированного органа в растворе дезоксирибонуклеазы, содержащем ДНКазу, предпочтительно в концентрации от 0,0001 до 0,0003% (масс./об.), наиболее предпочтительно 0,0002% (масс./об.), предпочтительно в течение по меньшей мере 8 ч при температуре, подходящей для функционирования ДНКазы;

25 - инкубация фрагментированного органа во втором забуференном промывочном растворе, предпочтительно содержащем 1X PBS, причем второй забуференный промывочный раствор содержит противомикробный агент, предпочтительно стрептомицин, предпочтительно в концентрации 0,01% (масс./об.), в течение по меньшей мере 72 ч при температуре ниже комнатной температуры, предпочтительно при 4°C, при перемешивании, при этом фрагментированный орган переносят в свежий промывочный раствор каждые 4-12 ч;

30 - замораживание фрагментированного органа и дробление замороженного фрагментированного органа на фрагменты;

35

- лиофилизация замороженного фрагментированного органа, предпочтительно при -32°C , предпочтительно под давлением 0,31 мбар (31 Па);

- необязательная заключительная сушка в течение от 5 до 15 минут при 0,0010 мбар (0,1 Па) и -76°C ;

5 - перемалывание дробленого и высушенного продукта в порошок dECM с размером частиц 25-500 мкм;

- необязательная стерилизация продукта, предпочтительно излучением и/или этиленоксидом.

10 2. Способ по п. 1, в котором после этапа перемалывания осуществляют этап проверки количества октоксина-9 в порошке dECM, причем предпочтительно перед проверкой присутствия октоксина-9 в порошке dECM его обрабатывают коллагеназой, предпочтительно в концентрации 43953 PZ/г dECM.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором после этапа перемалывания осуществляют следующие этапы:

15 - растворение порошка dECM в растворе хлористоводородной кислоты, предпочтительно 0,01 М, с добавлением 0-10 мг/мл пепсина;

- перемешивание в течение 48-72 ч, предпочтительно в течение 72 ч, при комнатной температуре;

20 - нейтрализация на льду, предпочтительно с применением 0,1 М натриевого основания и раствора PBS.

4. Децеллюляризованный ЕСМ, не содержащий детергента, в форме порошка, получаемый способом по п. 1 или 2.

5. Децеллюляризованный ЕСМ, не содержащий детергента, в форме раствора, получаемый способом по п. 3.

25 6. Способ получения первичных биочернил, включающий следующие этапы:

- получение пасты, содержащей 5-50% (масс./об.), предпочтительно 15-25% (масс./об.), порошка dECM по п. 4 и 1-10% (масс./об.), предпочтительно 8-10% (масс./об.), раствора dECM по п. 5 путем перемешивания;

- инкубация пасты при температуре $7-10^{\circ}\text{C}$ в течение по меньшей мере 24 ч;

30 - добавление 1,46-7,32% (масс./об.) метакрилированного желатина, 0,15-1,10% (масс./об.) метакрилированной гиалуроновой кислоты, 5-10% (масс./об.) глицерина, и фотоинициатора, предпочтительно 0,03-0,17% (масс./об.) фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфината лития, с последующим аккуратным перемешиванием.

7. Первичные биочернила, содержащие пасту dECM, 1,46-7,32% (масс./об.) метакрилированного желатина, 0,15-1,10% (масс./об.) метакрилизованной гиалуроновой кислоты, 5-10% (масс./об.) глицерина, и фотоинициатор, предпочтительно 0,03-0,17% (масс./об.) фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфината лития, причем паста dECM содержит 5-50% (масс./об.), предпочтительно 15-25% (масс./об.), порошка dECM по п. 4 и 1-10% (масс./об.), предпочтительно 8-10% (масс./об.), раствора dECM по п. 5, и при этом вязкость первичных биочернил составляет по меньшей мере 5 Па·с при измерении в системе с конусом и пластиной, при постоянной скорости сдвига 21/с и температуре 37°C.

8. Первичные биочернила по п. 7, содержащие по меньшей мере одну добавку, выбранную из следующих: гиалуроновая кислота в концентрации от 0,001 до 0,100 мг/мл первичных биочернил, предпочтительно 0,007 мг/мл; ламинин в концентрации от 0,005 до 0,100 мг/мл первичных биочернил, предпочтительно 0,084 мг/мл; коллаген I в концентрации от 0,001 до 0,100 мг/мл первичных биочернил, предпочтительно 0,041 мг/мл; коллаген IV в концентрации от 0,005 до 0,175 мг/мл первичных биочернил, предпочтительно 0,122 мг/мл; фибронектин в концентрации от 3 до 300 мкг/мл, предпочтительно 100 мкг/мл; фибриноген человека в концентрации от 10 до 100 мг/мл первичных биочернил; апротинин в концентрации от 1 до 2 ЕРU/мл первичных биочернил; полисорбат в концентрации от 0,05 до 2 мг/мл первичных биочернил; тромбин человека в концентрации от 5 до 55 мг/мл первичных биочернил, хлорид кальция в концентрации от 20 до 60 мМ/мл первичных биочернил; проангиогенные витамины: витамин А в концентрации от 1 нМ до 500 мкМ, предпочтительно 100 мкМ; витамин В1 в концентрации от 50 до 100 мкМ, предпочтительно 100 мкМ; витамин В3 в концентрации от 1 до 10 мкМ, предпочтительно 10 мкМ; витамин В12 в концентрации от 10 до 100 мг/мл первичных биочернил; витамин D3 в концентрации от 0,1 до 10 нМ, предпочтительно 10 нМ; поддерживающие ангиогенез факторы роста: VEGF в концентрации от 10 до 30 нг/мл первичных биочернил, предпочтительно 30 нг/мл; FGF в концентрации от 10 до 20 нг/мл первичных биочернил, предпочтительно 20 нг/мл; TGF-β в концентрации от 1 до 10 нг/мл первичных биочернил, предпочтительно 20 нг/мл; интерлейкин (IL)-8 в концентрации от 0 до 100 нг/мл первичных биочернил, предпочтительно 10 нг/мл; IL-17A в концентрации от 20 до 50 нг/мл первичных биочернил, предпочтительно 20 нг/мл.

9. Первичные биочернила по п. 7 или 8, содержащие одну или более добавок животного или человеческого происхождения, выбранных из эндотелиальных клеток при плотности $(0,1-10) \times 10^5$ /мл первичных биочернил, первичных микрососудистых эндотелиальных клеток в концентрации $(0,1-10) \times 10^5$ /мл первичных биочернил, α-клеток

животного или человеческого происхождения в концентрации $(3-9) \times 10^6$ /мл биочернил, β -клеток животного или человеческого происхождения в концентрации $(1,1-3,4) \times 10^7$ /мл биочернил, панкреатических островков животного или человеческого происхождения, предпочтительно в количестве 20000 iEq/мл первичных биочернил.

5 10. Способ получения биочернил для печати кровеносных сосудов, включающий следующие этапы:

а) необязательное получение раствора микробиологического желатина с добавлением карбоксиметилцеллюлозы (СМС), включающее получение раствора 1-2% (масс./об.) микробиологического желатина в буферном растворе, предпочтительно PBS, 10 путем суспендирования микробиологического желатина в буферном растворе при перемешивании при температуре от 50 до 65°C, предпочтительно при 60°C, добавление водного раствора 2-5% (об./об.) СМС с получением конечной концентрации 0,2-1% (об./об.) СМС в биочернилах для печати кровеносных сосудов и охлаждение раствора до температуры, равной 40°C или ниже;

15 б) получение раствора 5-10% (масс./об.) dECM путем добавления порошка dECM, получаемого по п. 1 или 2, предпочтительно стерилизованного излучением, в (i) раствор микробиологического желатина с добавлением СМС, полученного на этапе (а), или (ii) буферный раствор или (iii) раствор клеточной среды при аккуратном перемешивании;

20 в) ультразвуковая обработка полученного раствора при температуре, не превышающей 37°C, в течение 0,5-2,0 ч;

д) необязательное добавление по меньшей мере одной добавки животного или человеческого происхождения, выбранной из следующих: фибронектин в концентрации от 3 до 300 мкг/мл, предпочтительно 100 мкг/мл; VEGF в концентрации от 10 до 30 нг/мл, предпочтительно 30 нг/мл; FGF в концентрации от 10 до 20 нг/мл, предпочтительно 20 25 нг/мл; PGE2 в концентрации от 100 до 300 нМ, предпочтительно 100 нМ, эндотелиальные клетки при плотности $(0,1-10) \times 10^7$ клеток/мл биочернил, фибробласты при плотности $(0,1-10) \times 10^6$ клеток/мл биочернил.

11. Способ получения биочернил для печати кровеносных сосудов, включающий следующие этапы:

30 а) необязательное получение раствора микробиологического желатина с добавлением СМС, включающее получение раствора 1-2% (масс./об.) микробиологического желатина в буферном растворе, предпочтительно PBS, путем суспендирования микробиологического желатина в буферном растворе при перемешивании при температуре от 50 до 65°C, предпочтительно при 60°C, добавление 35 водного раствора 2-5% (об./об.) СМС с получением конечной концентрации 0,2-1%

(об./об.) СМС в биочернилах для печати кровеносных сосудов и охлаждение раствора до температуры, равной 40°C или ниже;

5 б) получение раствора 5-10% (масс./об.) dЕСМ путем добавления порошка dЕСМ, получаемого по п. 1 или 2, предпочтительно стерилизованного излучением, в (i) раствор микробиологического желатина с добавлением СМС, полученный на этапе (а), или (ii) буферный раствор или (iii) раствор клеточной среды, при аккуратном перемешивании;

с) кипячение смеси при 100°C в течение 15-30 минут;

10 д) необязательное добавление по меньшей мере одной добавки животного или человеческого происхождения, выбранной из следующих: фибронектин в концентрации от 3 до 300 мкг/мл, предпочтительно 100 мкг/мл; VEGF в концентрации от 10 до 30 нг/мл, предпочтительно 30 нг/мл; FGF в концентрации от 10 до 20 нг/мл, предпочтительно 20 нг/мл; PGE2 в концентрации от 100 до 300 нМ, предпочтительно 100 нМ; эндотелиальные клетки при плотности $(0,1-10) \times 10^7$ клеток/мл биочернил, фибробласты при плотности $(0,1-10) \times 10^6$ клеток/мл биочернил.

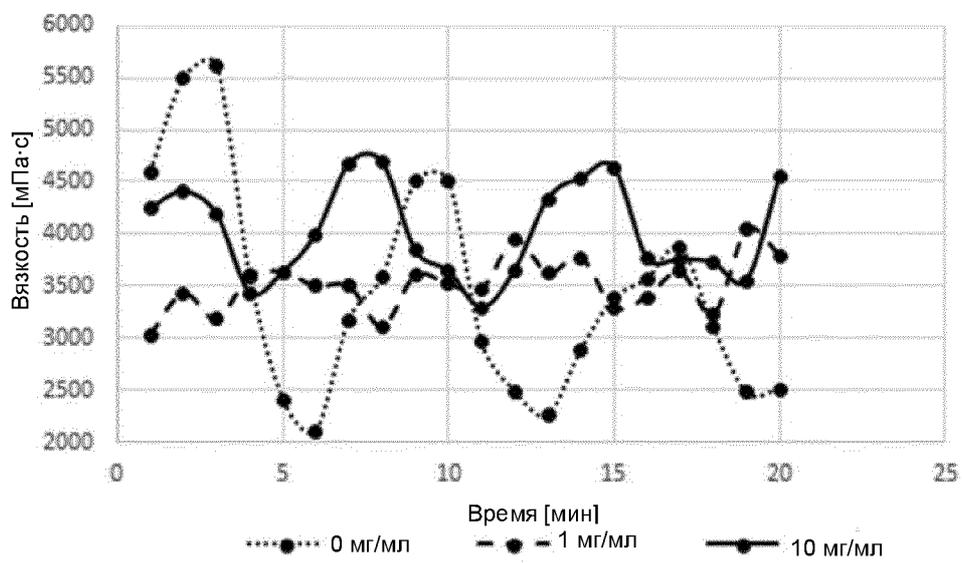
15 12. Биочернила для печати кровеносных сосудов, содержащие подвергнутый ультразвуковой обработке или кипячению раствор dЕСМ по п. 5 в концентрации 2-10% (масс./об.), предпочтительно с добавлением микробиологического желатина в концентрации от 1 до 5% (масс./об.) и/или СМС в концентрации от 0,2 до 2% (об./об.).

20 13. Биочернила для печати кровеносных сосудов по п. 12, содержащие по меньшей мере одну добавку животного или человеческого происхождения, выбранную из следующих: фибронектин в концентрации от 3 до 300 мкг/мл, предпочтительно 100 мкг/мл; VEGF в концентрации от 10 до 30 нг/мл, предпочтительно 30 нг/мл; FGF в концентрации от 10 до 20 нг/мл, предпочтительно 20 нг/мл; PGE2 в концентрации от 100 и 300 нМ, предпочтительно 100 нМ; эндотелиальные клетки в концентрации $(0,1-10) \times 10^7$ клеток/мл биочернил для печати кровеносных сосудов, фибробласты в концентрации $(0,1-10) \times 10^6$ клеток/мл биочернил для печати кровеносных сосудов.

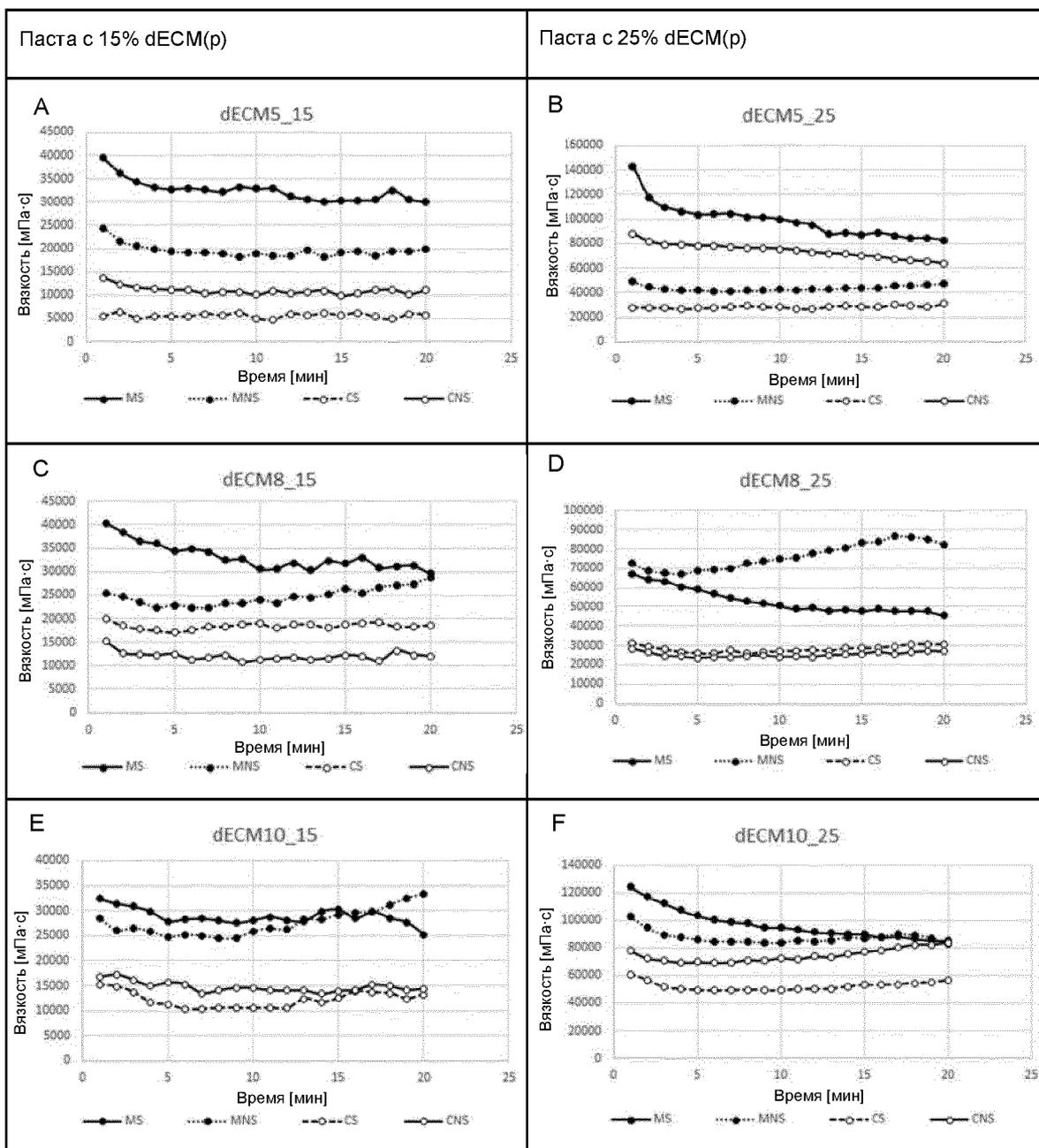
25 14. Трехмерная структура, содержащая по меньшей мере три прилегающих слоя биочернил, в которой слой биочернил для печати кровеносных сосудов по п. 12 или 13 расположен между двумя слоями первичных биочернил по одному из пп. 7-9.

30 15. Способ получения трехмерной структуры, в котором первичные биочернила по п. 7 до 9 и биочернила для печати кровеносных сосудов по п. 12 или 13 послойно наносят в процессе 3D-биопечати при скорости печати от 5 до 50 мм/с, давлении от 4 до 300 кПа и температуре от 4 до 37°C, и при этом в течение или после нанесения на первичные биочернила воздействует ультрафиолетовый свет и/или видимый свет, предпочтительно

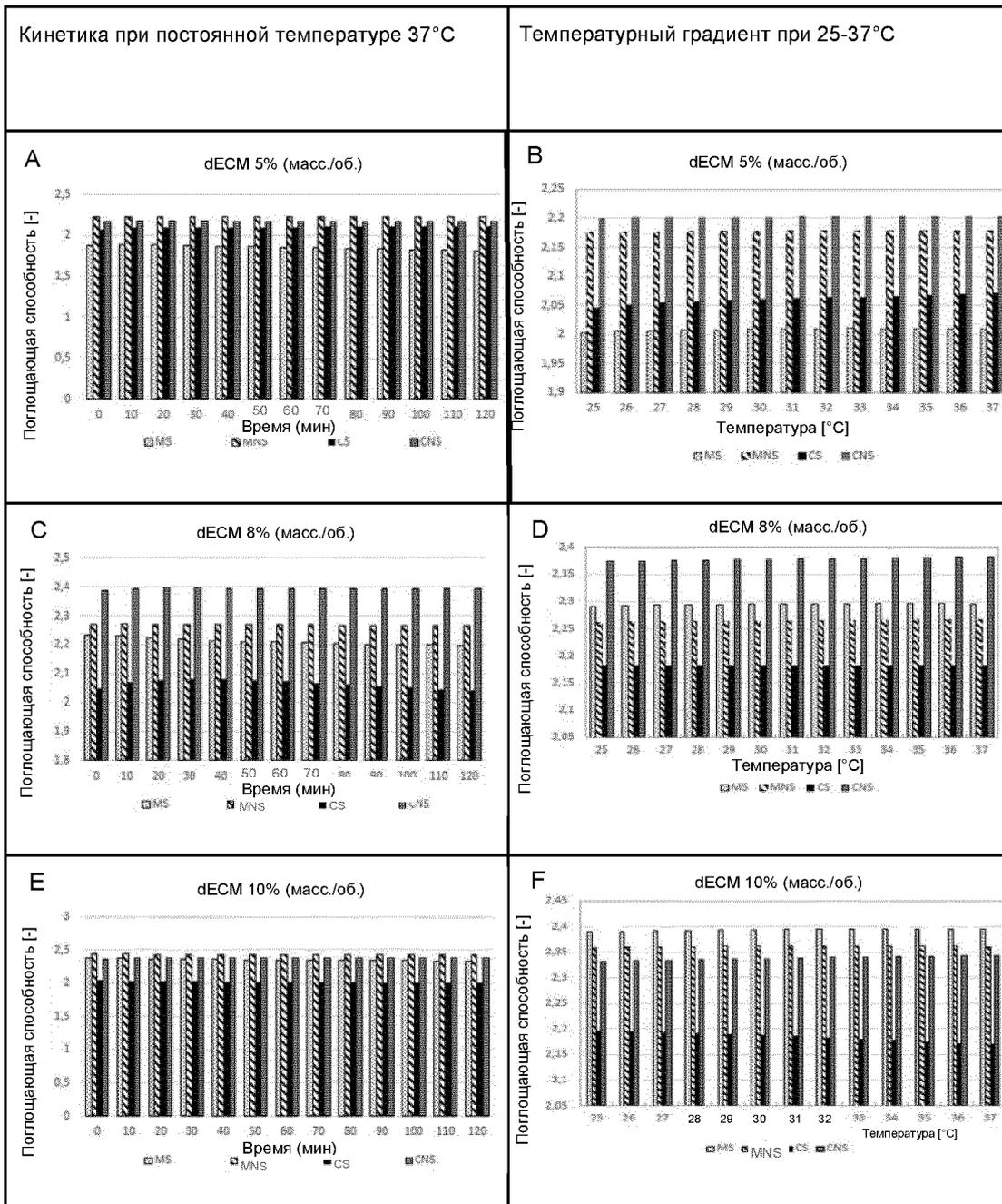
имеющий длину волны от 365 до 405 нм, предпочтительнее 405 нм, в течение по меньшей мере 5 секунд.



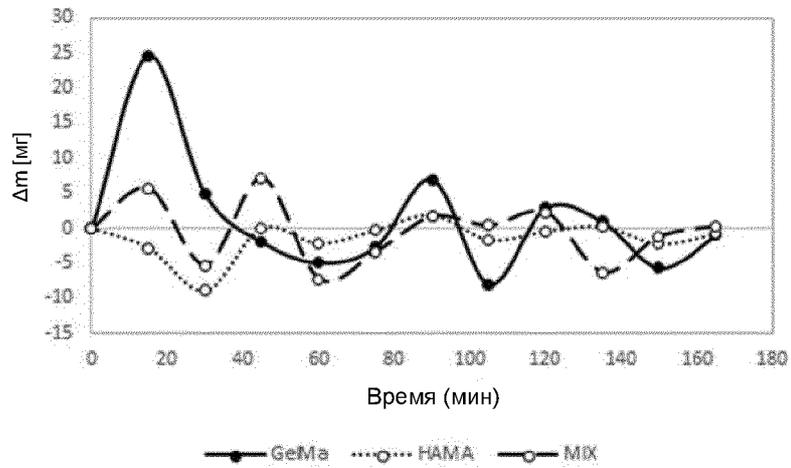
Фиг. 1



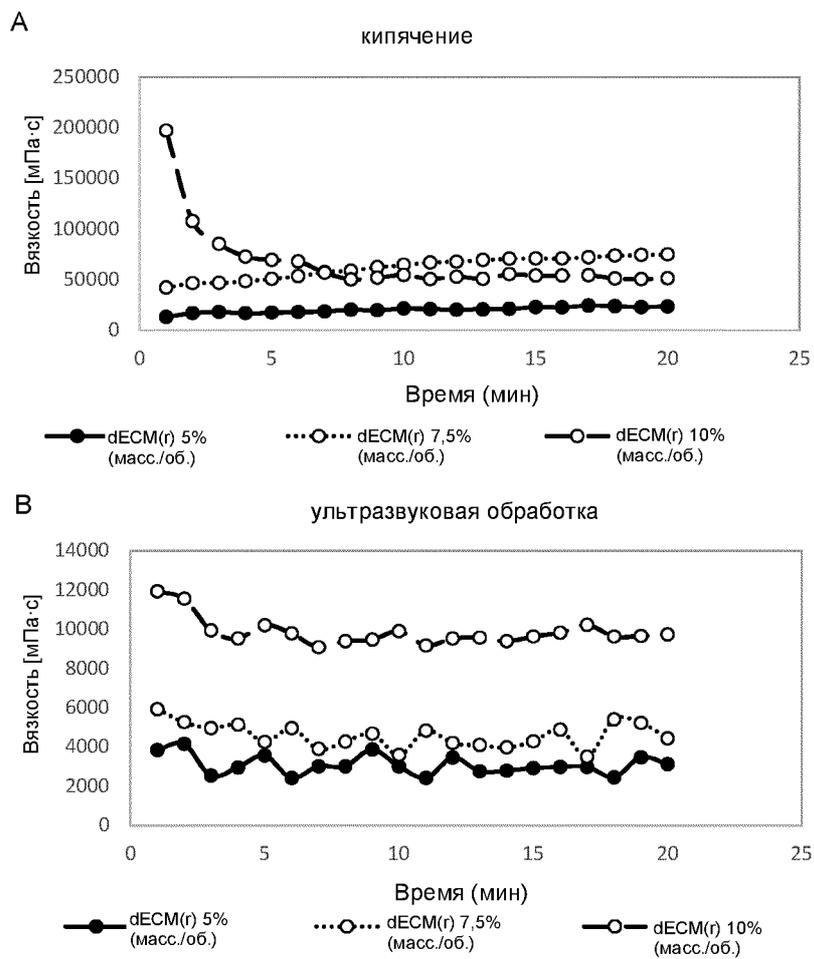
Фиг. 2



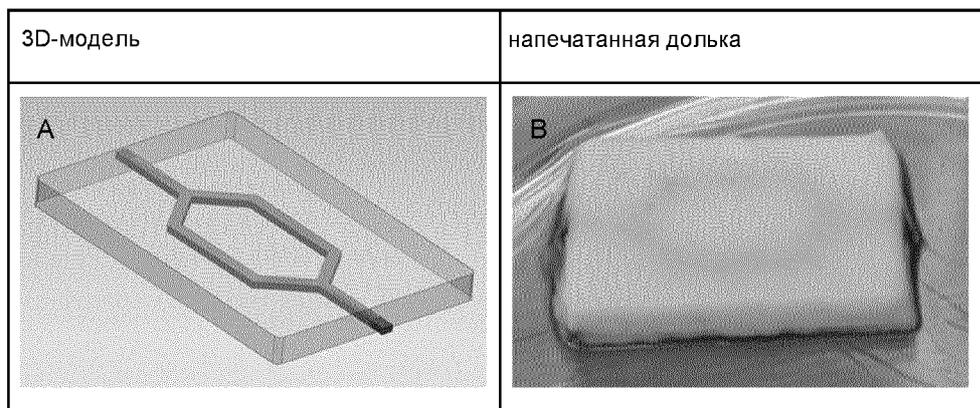
Фиг. 3



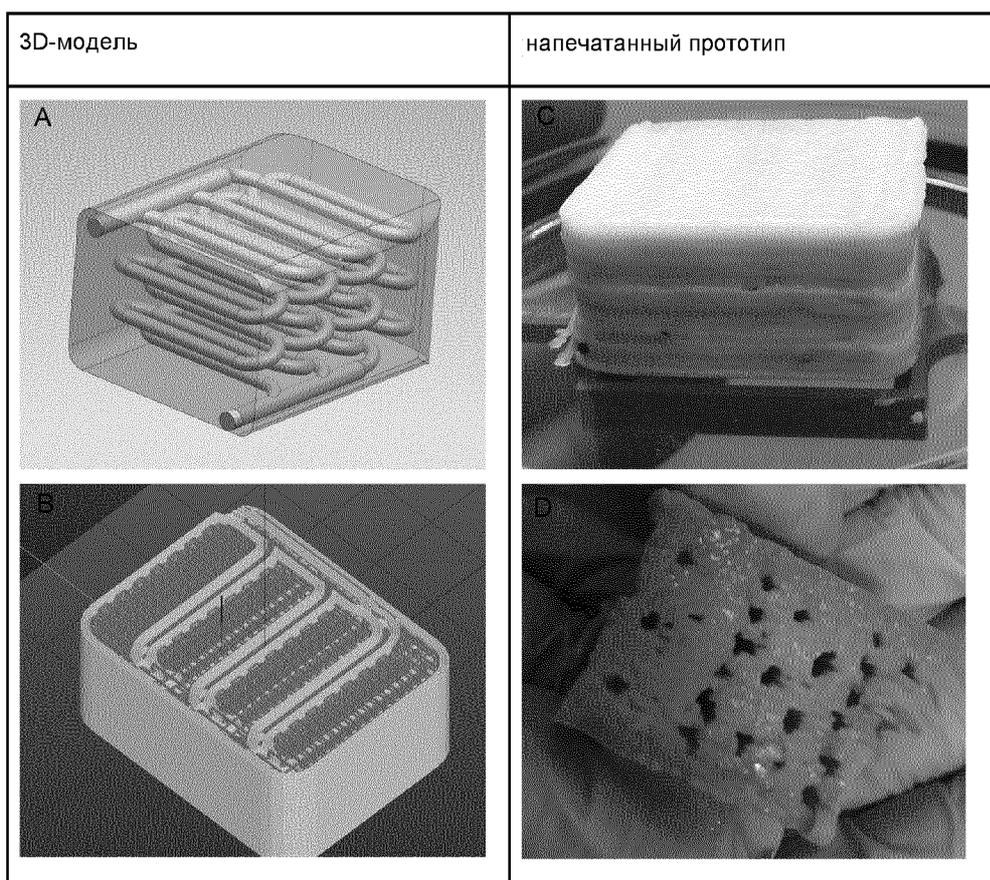
Фиг. 4



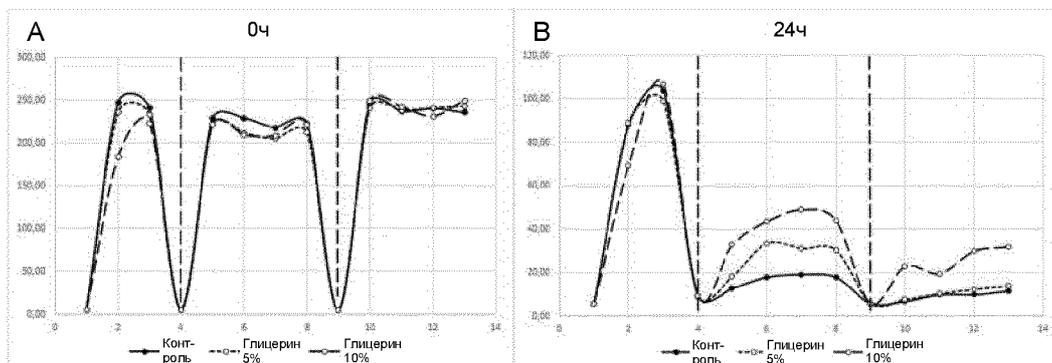
Фиг. 5



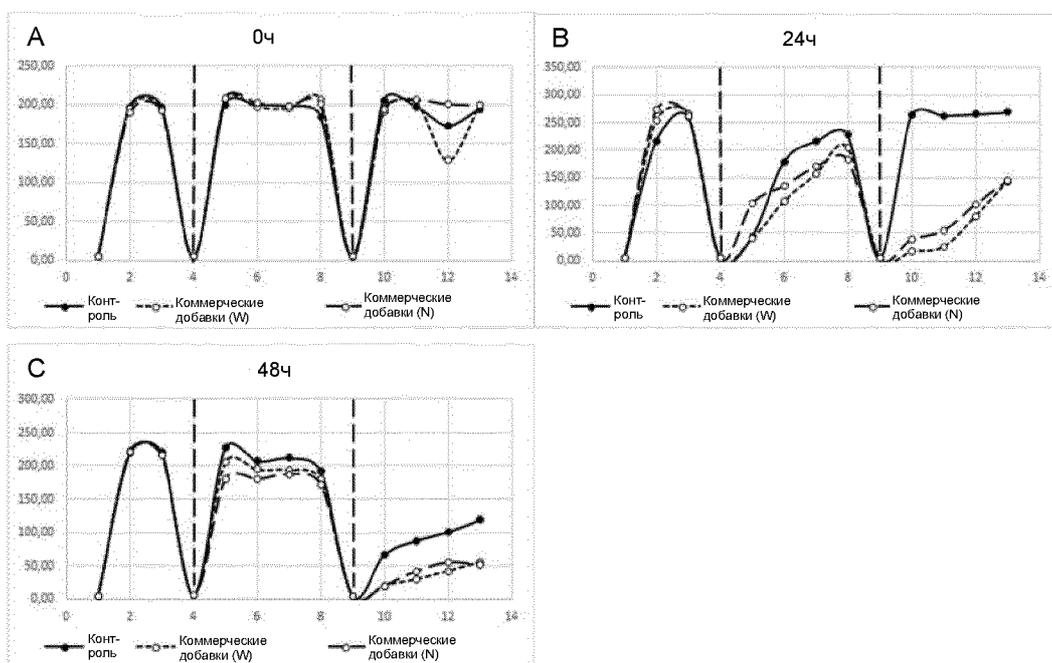
Фиг. 6



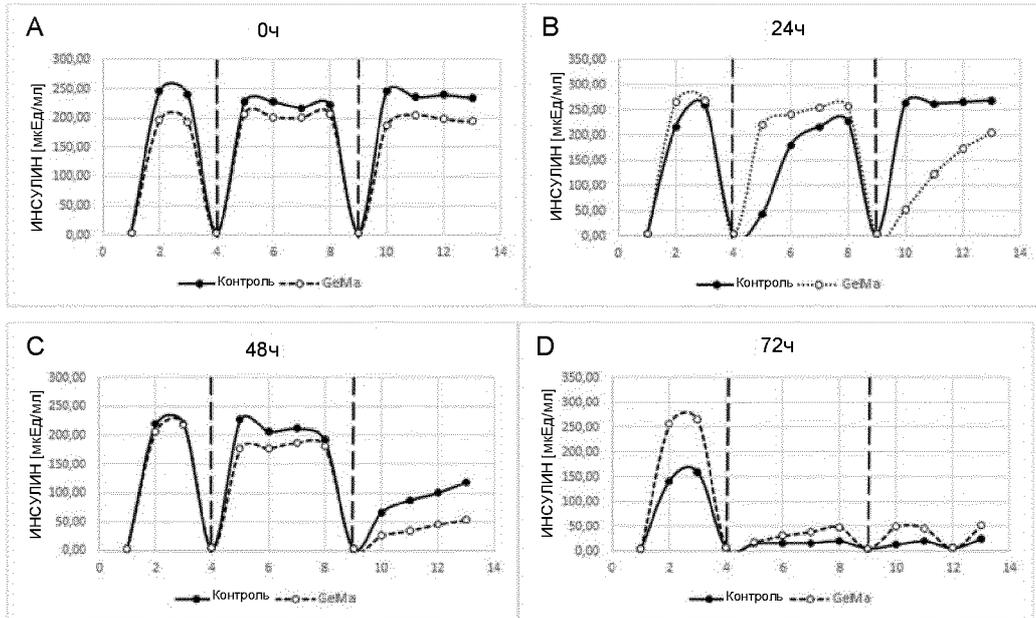
Фиг. 7



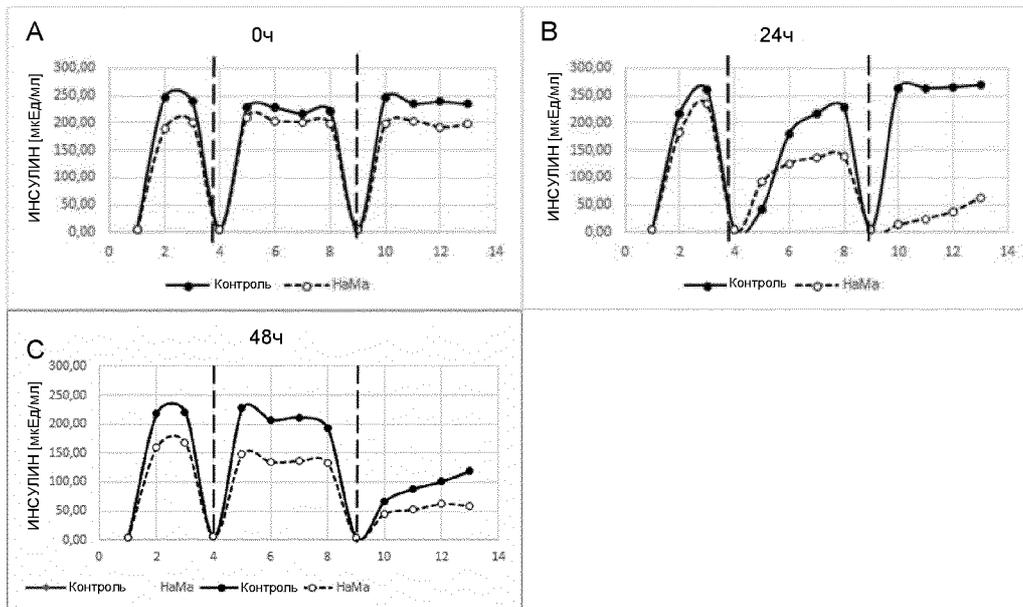
Фиг. 8



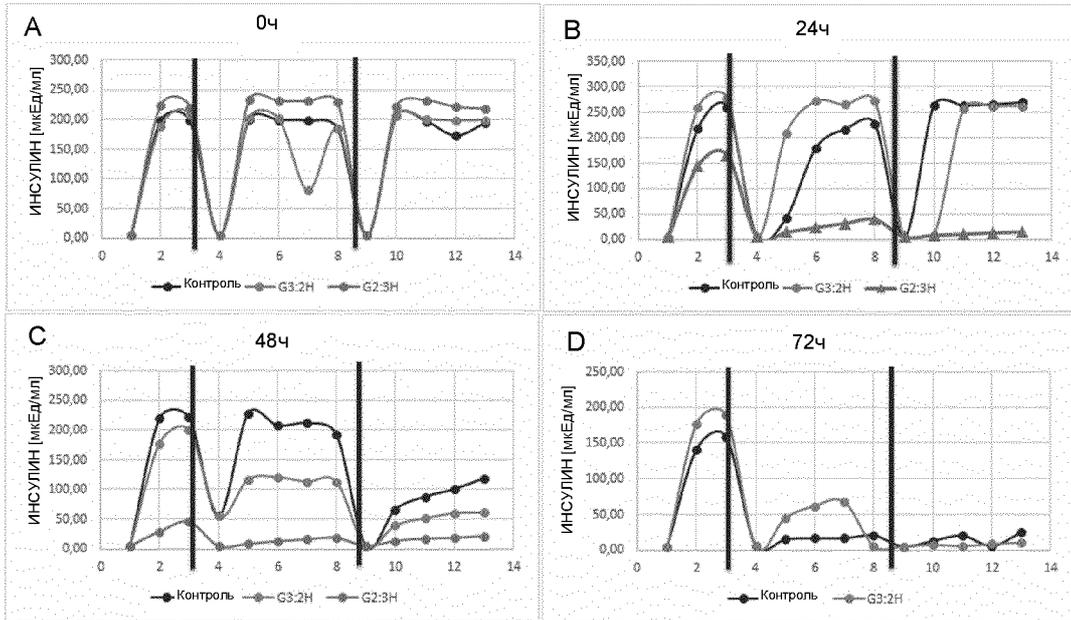
Фиг. 9



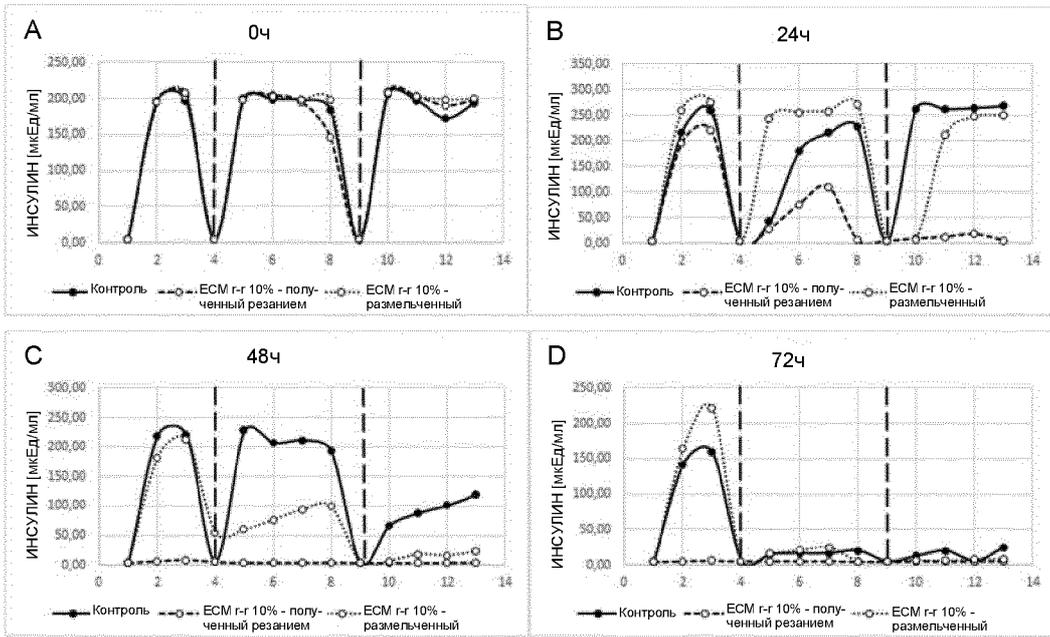
Фиг. 10



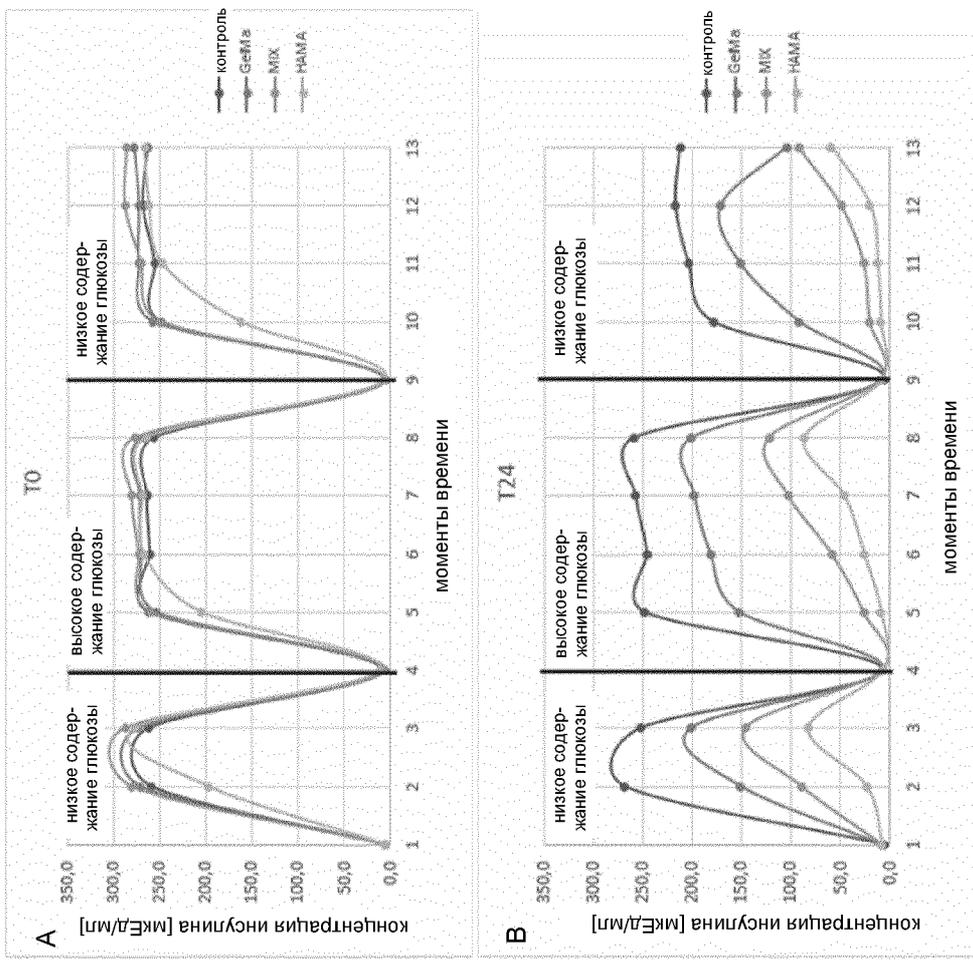
Фиг. 11



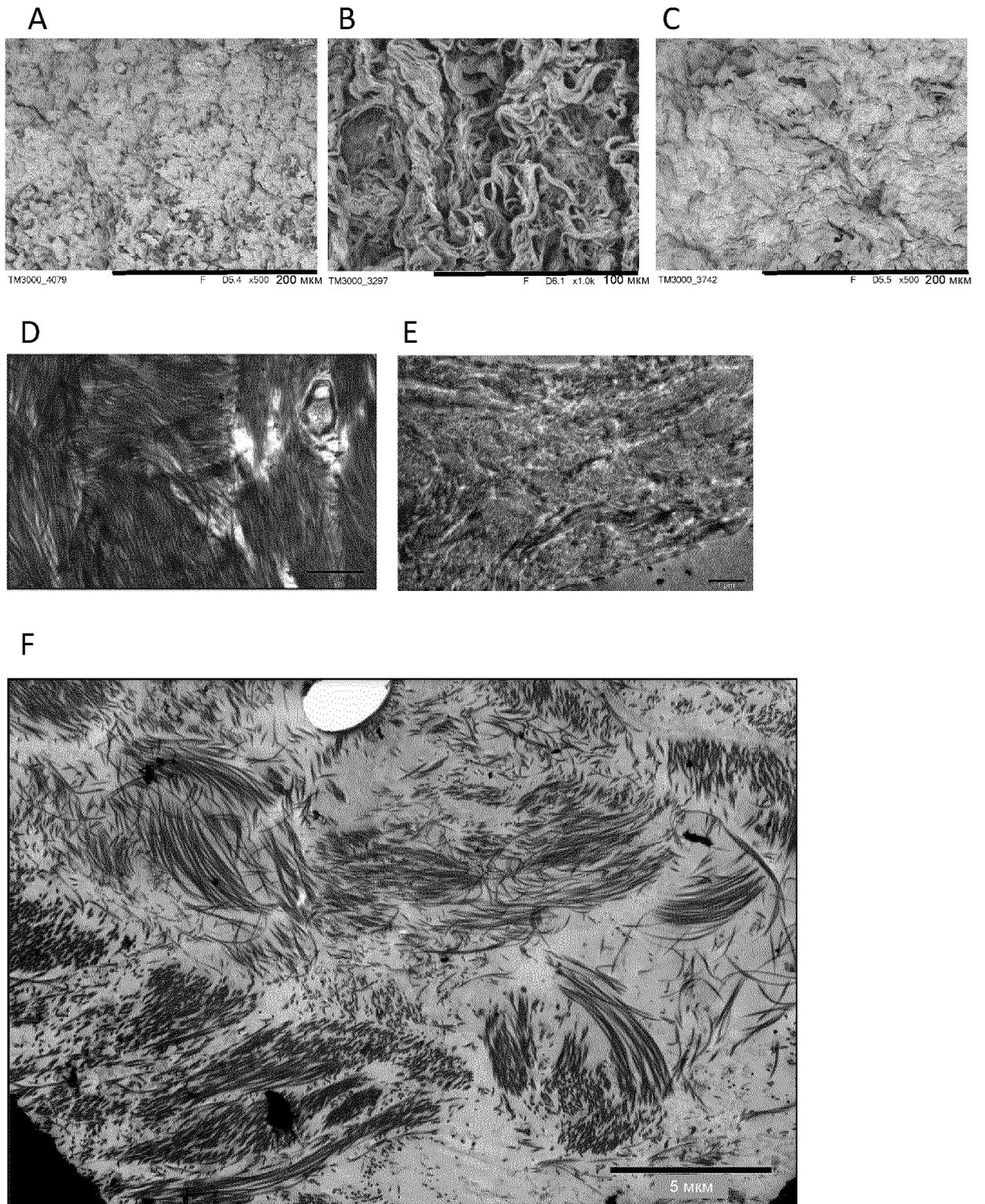
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15