



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61L 27/24 (2022.02); A61L 27/52 (2022.02); A61L 27/56 (2022.02); A61F 2002/30766 (2022.02); A61P 19/00 (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2021126356, 07.09.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.09.2021

Дата регистрации:
18.04.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.09.2021

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2021 Бюл. № 30

(45) Опубликовано: 18.04.2022 Бюл. № 11

Адрес для переписки:

125284, Москва, 2-й Боткинский пр-д, 3,
Московский научно-исследовательский
онкологический институт имени П.А. Герцена
- филиал ФГБУ "НМИЦ радиологии МЗ РФ,
патентоведу, Урванцева Татьяна Дмитриевна

(72) Автор(ы):

Бекетов Евгений Евгеньевич (RU),
Исаева Елена Васильевна (RU),
Аргучинская Надежда Валерьевна (RU),
Кисель Анастас Андреевич (RU),
Филимонова Анна Николаевна (RU),
Демяшкин Григорий Александрович (RU),
Шегай Петр Викторович (RU),
Каприн Андрей Дмитриевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Национальный медицинский
исследовательский центр радиологии»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: EP3771547 A1, 03.02.2021.
WO2016036275 A1, 10.03.2016. ЦЕЛУЙКО С.С.
и др., "3D биопечать на службе дыхательной
системы (обзор литературы)" Бюллетень
физиологии и патологии дыхания, по. 61, 2016,
pp. 128-134. КАЛЮЖНАЯ Л.И. и др., "Анализ
мирового опыта использования биоматериалов
пуповины в тканевой инженерии и 3D-
биопечати" Медицина и организация (см.
прод.)

(54) Способ создания тканеинженерных конструкций методом биопечати биочернилами для регенерации хрящевой ткани в условиях организма

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и касается способа создания тканеинженерных конструкций методом биопечати биочернилами для регенерации хрящевой ткани в условиях организма, включающего приготовление биочернил, которые получают непосредственно перед процессом 3D-биопечати, и далее используют для создания тканеинженерной

конструкции, где биочернила включают в себя следующие компоненты: коллаген, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и порошок децеллюляризованного внеклеточного матрикса (дВКМ), причем дВКМ получали из реберных хрящей самок крыс, которые подвергали децеллюляризации и лиофилизации, полученный порошок просеивают через сито и

до использования хранят при +4°C, при приготовлении биочернил используют стерильный ателоколлаген свиньи I типа, который смешивают с МСК, с буферным раствором и порошком дВКМ, далее скаффолд печатают и заливают теплой питательной средой, после чего проводят процесс инкубации в CO₂-инкубаторе.

Изобретение обеспечивает создание тканеинженерных конструкций, воссоздающих клеточное строение и функцию заменяемой хрящевой ткани, а также высокую точность создания тканеинженерной конструкции посредством 3D-биопечати. 3 ил., 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

здоровоохранения, vol. 4, no. 1, 2019, pp. 40-55. КРАСНОВ М.С. "Биорегуляторы регенерации - работают в сверхмалых дозах" Наука из первых рук, no. 6 (60), 2014, pp. 16-23.

RU 2 7 7 0 5 5 8 C 2

RU 2 7 7 0 5 5 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61F 2/00 (2006.01)*A61L 27/24* (2006.01)*A61L 27/52* (2006.01)*A61L 27/56* (2006.01)*A61P 19/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61L 27/24 (2022.02); *A61L 27/52* (2022.02); *A61L 27/56* (2022.02); *A61F 2002/30766* (2022.02); *A61P 19/00* (2022.02)

(21)(22) Application: **2021126356, 07.09.2021**

(24) Effective date for property rights:
07.09.2021

Registration date:
18.04.2022

Priority:

(22) Date of filing: **07.09.2021**(43) Application published: **27.10.2021 Bull. № 30**(45) Date of publication: **18.04.2022 Bull. № 11**

Mail address:

**125284, Moskva, 2-j Botkinskij pr-d, 3, Moskovskij
nauchno-issledovatel'skij onkologicheskij institut
imeni P.A. Gertsena - filial FGBU "NMITs
radiologii MZ RF, patentovedu, Urvantseva
Tatyana Dmitrievna**

(72) Inventor(s):

**Beketov Evgenii Evgenevich (RU),
Isaeva Elena Vasilevna (RU),
Arguchinskaja Nadezhda Valerevna (RU),
Kisel Anastas Andreevich (RU),
Filimonova Anna Nikolaevna (RU),
Demiashkin Grigori Aleksandrovich (RU),
Shegai Petr Viktorovich (RU),
Kaprin Andrei Dmitrievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
uchrezhdenie «Natsionalnyi meditsinskii
issledovatel'skii tsentr radiologii» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (FGBU
«NMITs radiologii» Minzdrava Rossii) (RU)**

(54) METHOD FOR CREATING TISSUE-ENGINEERING STRUCTURES BY BIOPRINTING WITH BIOINK FOR CARTILAGE TISSUE REGENERATION UNDER BODY CONDITIONS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine and relates to a method for creating tissue engineering structures by bioprinting with bioink for regeneration of cartilage tissue in the body, including the preparation of bioink, which is obtained immediately before the 3D bioprinting process, and then used to create a tissue engineering structure, where the bioink includes the following components: constructions, where the bioink includes the following components: collagen, mesenchymal stem cells (MSCs) and decellularized extracellular matrix (dECM) powder, moreover, dECM was obtained from the costal cartilages of female rats that were subjected to decellularization and

lyophilization, the resulting powder is sieved through a sieve and before use stored at +4°C, in the preparation of bioink, sterile type I porcine atelocollagen is used, which is mixed with MSC, with a buffer solution and dECM powder, then the scaffold is printed and filled with a warm nutrient medium, after which the incubation process is carried out in a CO₂ incubator.

EFFECT: invention ensures the creation of tissue-engineering structures that recreate the cellular structure and function of the cartilage tissue to be replaced, as well as high accuracy in the creation of a tissue-engineered structure by means of 3D bioprinting.

1 cl, 3 dwg, 1 tbl, 1 ex

Изобретение относится к тканевой инженерии и 3D-биопечати, может быть использовано для создания тканеинженерных конструкций (скаффолдов).

3D-биопечать – перспективная технология изготовления тканевых конструкций сложной внешней геометрии и/или внутренней структуры, со строго определенными механическими свойствами, с персонализированным составом. Основным компонентом в 3D-биопечати являются биочернила, которые представляют собой биоматериал в форме гидрогеля, содержащим определенное количество и типы клеток. Биочернила должны обладать такими биологическими характеристиками как биосовместимость, цитосовместимость, биodeградация с контролируемой скоростью, близкой к скорости регенерации замещаемой ткани. Приготовление биочернил осуществляется с использованием различных природных и синтетических материалов и их комбинаций, таких как коллаген, желатин, агароза, фиброин шёлка, альгинат и т.д. Однако большинство этих материалов не способно воссоздать микроокружение, типичное для живых тканей, внутреннюю клеточную морфологию и функции.

Идеальным образцом такого материала может являться основа самой целевой ткани – ее внеклеточный матрикс (ВКМ). Состав ВКМ каждой ткани уникален. Он представлен сложной сетью компонентов, основными из которых являются волокнообразующие белки, такие как коллагены, эластин, фибронектин, ламинины, гликопротеины, протеогликаны и гликозаминогликаны [Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016, 97: 4-27. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001.]. ВКМ регулирует многие клеточные процессы, включая рост, миграцию, дифференцировку, гомеостаз и морфогенез [K.C. Clause, T.H. Barker. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2013, 24: 830-833; Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016; 97: 4-27. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001.]. Он является основным источником и проводником биохимических и биомеханических сигналов, для обеспечения организации и функционирования ткани в целом [Herrera J, Henke CA, Bitterman PB. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. *J Clin Invest.* 2018, 128(1): 45-53. DOI: 10.1172/JCI93557.], обеспечивая физико-механическое микроокружение клеток [Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016, 97: 4-27. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001].

В последнее время появляются данные о применении гидрогелей на основе децеллюляризованного ВМК (дВМК) в биопечати. Биочернила на основе дВМК изначально обладают тканеспецифичными свойствами.

Однако использование дВМК в форме гидрогеля ограничено слабыми механическими свойствами получаемых тканеинженерных конструкций и низкой точностью самого процесса печати.

Известен вариант создания биочернил на основе фибринового геля с добавлением микрочастиц дВМК для реконструкции роговицы глаза. [H. Yin, Q. Lu, X Wang, et al. Tissue-derived microparticles reduce inflammation and fibrosis in cornea wounds. *Acta Biomater.* 2019, 85:192-202. doi: 10.1016/j.actbio.2018.12.027; A Chandru, P Agrawal, SK Ojha, et al. Human Cadaveric Donor Cornea Derived Extra Cellular Matrix Microparticles for Minimally Invasive Healing/Regeneration of Corneal Wounds *Biomolecules* 2021, 11(4). 10.3390/biom11040532]. В данных работах гидрогель применяли без 3D-биопечати.

Недостатком представленных выше способов является неприменимость данных гидрогелей для биопечати из-за реологических свойств гидрогелей.

Наиболее близким к заявляемому изобретению (прототип) является способ применения биочернил представленный в работе М. Kimetal. [Kim MK, Jeong W, Lee SM, et al.

Decellularized extracellular matrix-based bio-ink with enhanced 3D printability and mechanical properties. Biofabrication 2020; 12: 025003], где дВКМ использовали в виде микрочастиц в составе желатинового гидрогеля (гиалуроновая кислота 3 мг/мл + желатин 37,5 мг/мл + фибриноген 3мг/мл). Полученные формуляции биочернил исследовали на цитосовместимость в условиях *in vitro*. Данное исследование в первую очередь направлено на создание биочернил, которые могут исправить дефекты печени, для исправления дефектов хрящевой ткани они не могут быть применимы.

Техническим результатом является создание тканеинженерных конструкций, воссоздающие клеточное строение и функцию заменяемой хрящевой ткани, а также обеспечение высокой точности создания тканеинженерной конструкции посредством 3D-биопечати

Технический результат решается тем, что так же, как и в известном способе приготавливают биочернила, которые получают непосредственно перед процессом 3D-биопечати и осуществляют биопечатать тканеинженерной конструкции, способной воссоздать клеточное строение и функцию заменяемой ткани, экструзионной насадкой.

Особенностью заявляемого способа является то, что биочернила включают в себя следующие компоненты: коллаген, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и порошок децеллюляризованного внеклеточного матрикса (дВКМ), причем дВКМ получали из реберных хрящей самок крыс линии Wistar, которые подвергали децеллюляризации и лиофилизации, полученный порошок просеивают через сито с диаметром пор 280 мкм и до использования хранят при +4°C, при приготовлении биочернил с концентрацией коллагена 4% используют стерильный ателоколлаген свиньи I типа – 80 мг/мл, который смешивают с МСК – 5×10^6 в мл, с буферным раствором – 250 мкл на мл и порошком дВКМ – 25 мг/мл, далее скаффолд печатают изаливают теплой питательной средой t37°C, после чего проводят процесс инкубации при 37°C в CO₂-инкубаторе.

Изобретение поясняется подробным описанием, примерами использования и иллюстрациями, на которых изображено:

Фиг. 1 – Тестовая печать для оценки печатопригодности биочернил (схематическое изображение напечатанного объекта).

Фиг. 2 – Скаффолд через 1 неделю после имплантации, об. $\times 10$.

Фиг. 3 – Формирование хрящевой ткани через 2 недели после имплантации, об. $\times 10$.

Способ осуществляют следующим образом.

Для создания тканеинженерных конструкций используют коллагеновый гидрогель, порошкообразный ВКМ и культуру МСК. Порошкообразный ВКМ представлен в виде сухих лиофилизированных гранул, их диаметр не превышает диаметр сопла биопринтера. При необходимости клеточных факторов роста, их добавление в биочернила осуществляют на этапе смешивания. Печать производят на лабораторную культуральную посуду (например, чашки Петри, луночные планшеты) или на стекло, находящиеся сверху печатного столика. После процесса биопечати скаффолд заливают теплой питательной средой (от 25 до 37°C), например, RPMI-1640, DMEM, F-12. Процесс инкубации проводят при 37°C в CO₂-инкубаторе. Замену среды в процессе инкубации производят один раз в сутки.

Для оценки печатопригодности биочернил на основе 4% коллагена и порошка дВКМ была проведена печать в тестовом режиме (Фиг.1), после которой появляется возможность оценки толщины линии (3 слоев филамента) в 12 местах и площади формируемых ниш в 8 местах (указывает на продолжающийся процесс полимеризации). Оба параметра оценивали в динамике: сразу после печати и через 24 часовой инкубации

в буферном растворе PBS. Данные по биочернилам и гидрогелю на основе коллагена (без дВКМ) представлены в табл.1.

Таблица 1

Результаты тестовой печати биочернилами на основе 4% коллагена с и без гранул дВКМ

	Коллаген		Коллаген + дВКМ	
	$\bar{X} \pm S_x$ [доверительный интервал]			
	После печати	После инкубации	После печати	После инкубации
Ниши, мм ²	1,516±0,125 [1,427÷1,605]	1,411±0,103 [1,338÷1,485]	1,286±0,126 [1,195÷1,376]	1,097±0,094 [1,030÷1,164]
Линии, мм	0,886±0,017 [0,874÷0,898]	0,901±0,027 [0,882÷0,920]	0,920±0,036 [0,894÷0,946]	0,957±0,027 [0,938÷0,976]

Пример создания тканеинженерной конструкции *in vivo* для создания полноценной ткани *de novo*.

ВКМ получали из реберных хрящей крыс линии Wistar, самок, возрастом от 1 до 1,5 месяцев, которые предварительно обрабатывали, децеллюляризировали и лиофилизировали. Лиофилизированный хрящ размалывали пестиком в ступке. Полученный порошок просеивали через сито из нержавеющей стали с диаметром пор 280 мкм и до использования хранили в герметичной упаковке при +4°C. Для приготовления биочернил с концентрацией коллагена 4% использовали стерильный ателоколлаген свиньи I типа – 80 мг/мл, который смешивали с МСК – 5×10^6 в мл, буферным раствором трис-HCl – 250 мкл на мл, порошком дВКМ – 25 мг/мл. После приготовления биочернил осуществляли биопечать скаффолда. Скаффолд залили теплой (37°C) питательной средой DMEM. Далее в CO₂-инкубаторе провели процесс инкубации при 37°C.

Скаффолды были имплантированы беспородным белым крысам-самцам. Через 1 и 2 недели животных подвергли эвтаназии и отбирали материал для гистологического исследования. Через одну неделю после имплантации вокруг скаффолдов была сформирована соединительнотканная капсула, которая прорастала в коллаген, разделяя его на отдельные фрагменты, клетки располагались неравномерно, в отдельных участках скаффолдов сформировалась хрящевая ткань (Фиг. 2). Между пучками коллагена волокон также визуализировались клетки соединительной ткани. Через две недели после имплантации у животных скаффолды замещались вновь образованной хрящевой тканью (Фиг.3).

Предложенный способ позволяет создавать тканеинженерные конструкции, воссоздающие клеточное строение и функцию заменяемой хрящевой ткани.

(57) Формула изобретения

Способ создания тканеинженерных конструкций методом биопечати биочернилами для регенерации хрящевой ткани в условиях организма, включающий приготовление биочернил, которые получают непосредственно перед процессом 3D-биопечати, и далее используют для создания тканеинженерной конструкции, отличающийся тем, что биочернила включают в себя следующие компоненты: коллаген, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и порошок децеллюляризованного внеклеточного матрикса (дВКМ), причем дВКМ получали из реберных хрящей самок крыс линии Wistar, которые подвергали децеллюляризации и лиофилизации, полученный порошок просеивают через сито с диаметром пор 280 мкм и до использования хранят при +4°C, при приготовлении биочернил с концентрацией коллагена 4% используют стерильный ателоколлаген свиньи

I типа – 80 мг/мл, который смешивают с МСК – 5×10^6 в мл, с буферным раствором – 250 мкл на мл и порошком дВКМ – 25 мг/мл, далее скаффолд печатают и заливают теплой питательной средой $t\ 37^{\circ}\text{C}$, после чего проводят процесс инкубации при 37°C в CO_2 -инкубаторе.

5

10

15

20

25

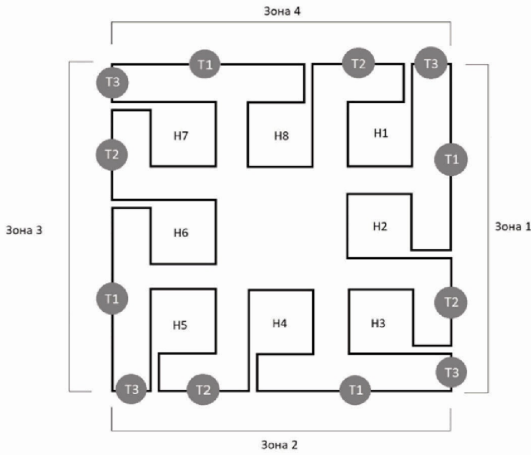
30

35

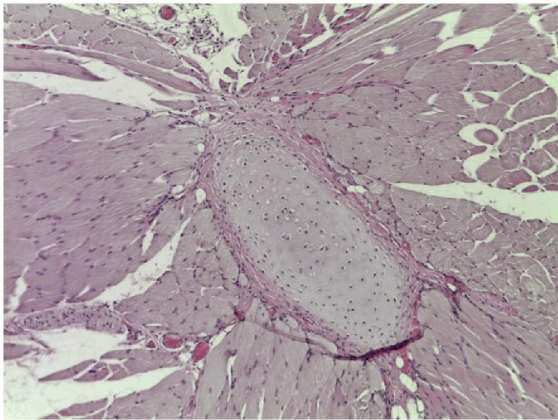
40

45

1

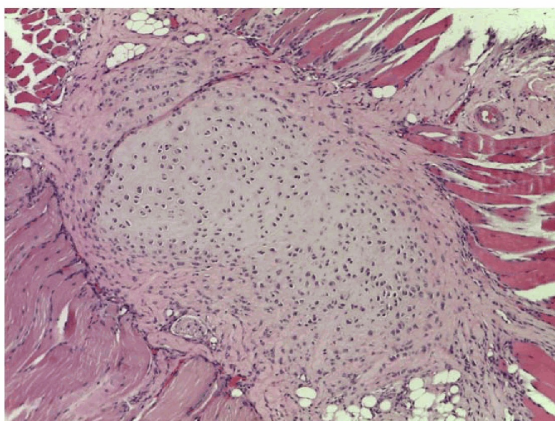


Фиг. 1



Фиг. 2

2



Фиг. 3