

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **018285**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2013.06.28

(51) Int. Cl. *A61L 27/56* (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)

(21) Номер заявки
201070324

(22) Дата подачи заявки
2008.09.01

(54) **ПРОТЕЗ ДЛЯ СТИМУЛИРОВАНИЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ IN VIVO ПОЛОГО ОРГАНА
ИЛИ ЧАСТИ ПОЛОГО ОРГАНА**

(31) **0757308**

(56) WO-A-2006047758

(32) **2007.08.31**

WO-A-2004072280

(33) **FR**

EP-A-0393788

(43) **2010.10.29**

US-A1-2004198584

(86) **PCT/EP2008/061473**

US-A1-2004193242

(87) **WO 2009/027537 2009.03.05**

EP-A-0230635

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КИТОЗИМ СА (BE)

(72) Изобретатель:
**Маке Вероник, Готье Сандрин, Кулик
Верн (BE)**

(74) Представитель:
**Новоселова С.В., Рыбаков В.М.,
Липатова И.И., Дощечкина В.В.,
Хмара М.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к протезу для стимулирования восстановления in vivo полового органа или части полового органа, отличающемуся тем, что он содержит биоразлагаемую полую трубчатую основу, содержащую по меньшей мере один биосовместимый и биоразлагаемый полимерный материал, причем указанная основа содержит пористый наружный слой и, по существу, непористый внутренний слой, и живой биологический материал на наружной поверхности и/или внутри по меньшей мере части пористого слоя основы, и/или на поверхности, по существу, непористого слоя, обращенной к пористому слою, причем указанный биологический материал выбран таким образом, чтобы обеспечить восстановление in vivo указанного органа или части органа. Изобретение также относится к способу получения такого протеза и его медицинским применениям, в особенности для восстановления по меньшей мере части полового трубчатого органа, в частности пищевода.

B1**018285****018285****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к новому протезу, предназначенному для стимулирования восстановления *in vivo* полового органа или части такого органа.

Более конкретно изобретение относится к биопротезу для восстановления *in vivo* полового органа человека или животного или части такого органа.

Предшествующий уровень техники

Замещение полых органов и, в частности, замещение круговых дефектов таких органов, а более конкретно пищевода, остается одной из самых трудных задач в хирургии, особенно в хирургии органов пищеварения.

До 50-х годов аутологичные (взяты у самого пациента) сегменты кишечника и желудков широко применяли для замещения полых органов, таких как сегменты пищевода, желчного протока, мочевого пузыря, уретры или для реканализации фаллопиевых труб. Однако такая аутотрансплантация связана с высоким процентом послеоперационных осложнений.

В 1960-х годах, благодаря развитию полимеров, получили широкое распространение полимерные протезы для различных применений (пищевод, желудок, желчный проток, кровеносные сосуды). Эти протезы изготавливают из различных материалов (полиэтилен, силикон, полиуретан, терполимер акриламид, политетрафторэтилен). Полимерные протезы обычно имеют хорошую переносимость, но их интеграция не является оптимальной. Поскольку протез контактирует с живыми тканями только одной поверхностью, его колонизация не осуществляется, что приводит к формированию, отделению и вытеснению струпа. Таким образом, вне зависимости от их состава, эти протезы являются лишь временными и требуют регулярной замены. Таким образом, их клиническое применение ограничивается несколькими областями, такими как дренирование желчного протока, протоков поджелудочной железы, трахейных трубок и пищевода.

Ожидаемая продолжительность жизни пациентов, больных далеко зашедшим раком пищевода, является очень короткой, и лечение большей части этих пациентов ограничивается паллиативными методами: хирургической резекцией, радио/химиотерапией с очень незначительными результатами. Хотя применение протезов показало свою эффективность в решении проблем нарушений речи и улучшения качества жизни пациентов, больных раком пищевода, такие осложнения, как миграция, перфорация и закупорка пищей, приводят к очень высокой смертности.

Биопротезы были разработаны для покрытия внутренней поверхности искусственных трубок тканевыми культурами. Этот вариант показал свою эффективность при замещении поражений своеобразными повязками, часто называемыми "лоскутами" ("patch"), но не применявшимися для решения проблем круговых поражений пищевода.

Применение расширяющихся металлических стентов представляется эффективной альтернативой нерасширяющимся пластиковым трубкам, но по-прежнему связано с теми же осложнениями (струпы, вытеснение).

Лоскуты являются эффективным терапевтическим решением для лечения частичных поражений, не затрагивающих всю окружность органа (например, после удаления дивертикулов). Однако в настоящее время терапевтические возможности лечения круговых поражений, таких как поражения пищевода, вызванные раком (злокачественной опухолью) или ожогом с образованием значительного стеноза, очень ограничены и должны быть основаны на лучшей конструкции эзофагального протеза.

В качестве альтернативы в целях развития и восстановления новых тканей появились стратегии, основанные на применении биоразлагаемых полимеров. Многочисленные биоразлагаемые материалы в виде губок, ячеистых тканей (называемых сетками или в некоторых случаях матрицами), трубок и нановолокон применяли на опытных моделях у крыс или мышей в качестве основы для восстановления пищевода. Для этого применяли синтетические полимеры, такие как биоразлагаемые полиэферы семейства полимолочной кислоты (PLA), полигликолевой кислоты (PGA) и поликапролактона (PCL). Некоторые из этих продуктов являются коммерчески доступными (например, хирургическая сетка Vicryl). Однако одни эти синтетические полимеры неспособны вызвать биологический ответ, приводящий к восстановлению тканей, за неимением биомиметического эффекта, что часто приводит к необходимости модификаций поверхности (прививка коллагена, фибронектина).

Описана трансплантация взрослых тканей (дуоденальных слизистых и подслизистых, реваскуляризованных трансплантатов тонкой кишки, лиофилизированной твердой мозговой оболочки) и аутологичных материалов (клеток, слизистых) для лечения поражений пищевода.

Однако взрослые ткани не выдерживают ишемии, что ограничивает их шанс на выживание после трансплантации. Кроме того, пересадки взрослых тканей являются тяжелыми, приводят к потере трудоспособности и требуют повторных вмешательств. Такие пересадки пригодны для закрытия некруговых дефектов, но не позволяют закрывать круговые поражения.

Описана также полная транспозиция желудка, но она создает такие проблемы, как рефлюкс и слишком быстрая эвакуация в кишечник.

Были предложены комбинированные стратегии, основанные на применении синтетических протезов в сочетании с аутологичными клетками, а не со взрослыми тканями.

Этот принцип, называемый тканевой инженерией, в последнее десятилетие вызывает большой интерес.

Он основан на применении основы из биоразлагаемого натурального или синтетического полимера в сочетании с клетками человека, предпочтительно аутологичными, предварительно культивированными *in vitro*. Затем систему клетки-матрица имплантируют *in vivo* для восстановления, регенерации или заживления органа или пораженной ткани. Эта стратегия была разработана Marzaro et al. (Journal of Biomedical Materials Research, 2006, 77a (4), 795-801), который предложил применять бесклеточную матрицу гомологичного пищевода и аутологичные клетки гладкой мускулатуры, культивированные *in vitro*, для развития имплантируемого пищевода.

Также для инженерии пищевода получали двухслойные трубки, состоящие из засеянной коллагеновой сетки и мышечного слоя. Они обеспечивали круговую инфильтрацию и неоваскуляризацию.

Также в качестве биосовместимой основы для тканевой инженерии применяли очищенный от собственных клеток пищевод. Однако при этом возникает проблема наличия тканей, а также осуществления протеза, соответствующего величине и размеру заживляемого органа. Кроме того, искусственные основы и аутологичные ткани, применяемые для восстановления пищевода, могут вызывать такие осложнения, как стеноз, и через долгое время потерю непроницаемости, поскольку их внутренняя поверхность не может полностью покрыться эпителием.

Заявка на патент CN 1410034 А описывает основу, имеющую двухслойную структуру, состоящую из кожи и подкожного слоя, содержащего сосудистые клетки, для тканевой инженерии пищевода. Основа может являться биоматериалом или синтетическим материалом, но предпочтительно соединяется с бесклеточной матрицей. Засеянные клетки могут являться фиброцитами, эндотелиальными клетками или кератиноцитами. Систему можно применять для восстановления ткани, но не для замещения всего органа, такого как пищевод.

Все прочие существующие случаи лечения ставят проблемы сбора клеток, времени осуществления и высокой стоимости.

Заявка на патент WO 2006/047758 описывает способ получения трубок из хитозана, содержащих один пористый слой и один непористый слой. Эта заявка на патент описывает применение центробежной силы для получения трубчатой структуры и обязательное расположение непористого слоя на наружной поверхности трубчатой структуры. Таким образом, в этой заявке не описывается трубчатая структура, позволяющая решить техническую задачу восстановления трубчатого органа. Кроме того, не даны примеры тканевого восстановления.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является решение комплекса описанных выше проблем, особенно с помощью создания нового протеза, предназначенного для стимулирования восстановления полого органа или части полого органа.

В этих рамках в соответствии с настоящим изобретением предлагается решение технической задачи, состоящей в поддержке движений, которые вынужден совершать восстанавливаемый орган, и особенно пищевод, частично расположенный в шее - части тела, постоянно приводимой в движение (повороты, глотание и т.д.).

Кроме того, задачей настоящего изобретения является решение проблемы, состоящее в создании протеза, имеющего соответствующие свойства для восстановления органа, такие как механическое сопротивление и/или непроницаемость протеза для жидкостей организма, и находящегося в постоянном или непостоянном контакте с внутренней поверхностью восстанавливаемого органа.

Хитозан является биополимером, полученным путем деацетилирования хитина, присутствующего в панцире ракообразных, кутикулах членистоногих, эндоскелетах головоногих, диатомеях, или имеющего грибное происхождение, как, например, хитозан, содержащийся в оболочке грибов. Он обладает интересными свойствами, включающими биосовместимость, биоразлагаемость и структуру, аналогичную структуре гликозаминогликанов с внеклеточным матриксом. Хитозан представляет значительный интерес для биомедицинских областей применения, включая заживление, системы с регулируемым высвобождением лекарственных веществ, гемостатические средства, хирургические применения (рассасывающиеся шовные нити, антиадгезивные барьеры), офтальмологию, применения в тканевой инженерии, в клеточной инкапсуляции, в генной терапии и в вакцинации.

Обзор возможных применений хитозана был опубликован Khor и соавторами (Khor and Lim, Biomater 2003; 24:2339-2349).

Хитозан является пригодным для тканевой инженерии полых органов, если он имеет вид пористой клеточной структуры. В работе "Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system", Biomater 2005; 26-4624-4632, Freier и соавторы представили способ получения трубок из хитозана с помощью щелочного гидролиза хитина. Авторы показали цитосовместимость хитозановых пленок с нейронами, полученными из ганглиев задних корешков, и выращивание нервной ткани *in vitro*.

В патентном документе WO 2007/042281 A2 описывается способ, основанный на экстракции геля N-ацилхитозана для получения волокон и трубок из хитозана и производных хитозана, имеющих достаточное механическое сопротивление, без применения токсичных растворителей или сшивающих агентов

и других токсичных соединений.

Способы получения специфических структур, содержащих хитозан, таких как полые трубки с пористой структурой, описаны Madihally и соавторами (Madihally and Matthew, Biomater 1999; 20:1133-1142). Основы из пористой трубки получали путем замораживания раствора хитозана, содержавшегося в цилиндрических пластиковых трубках. Трубки с непористой люминальной мембраной можно получить путем первоначального покрытия инертной трубки хитозановой пленкой, причем указанную пленку получают путем гелирования хитозана в основной среде, и последующей дегидратации его на воздухе. После сушки и регидратации основы с помощью обработки содой или этанолом, а также нейтрализации фосфатно-солевым буферным раствором, основу характеризуют с помощью электронной микроскопии и механических испытаний. Осуществляли несколько биологических оценок, но этот документ не имеет никакого технического значения для применения в тканевой инженерии.

Осуществимость применения материалов на основе хитозана для развития пищевода в тканевой инженерии изучали Qin и соавторы (Qin, Xiong, Duier Junyi Daxue Xuebao 2002, 23, 1134-1137), которые имплантировали коллаген-хитозановые мембраны с эпителиальными клетками пищевода крыс под мышцы. Они показали, что пересаженный комплекс остается неповрежденным через 2 недели и полностью разлагается через 4 недели после имплантации. Авторы показали клеточную совместимость полимерной основы, но не дают других описаний основы, и в особенности не описывают применение указанной основы в качестве биоразлагаемого искусственного пищевода.

В связи с проблемами, поставленными восстановлением полых органов и, в частности, пищевода, в особенности, имеющих круговые дефекты, представляется, что имеется насущная необходимость разработки новых решений, способных обеспечить восстановление этих органов, в особенности имеющих круговые дефекты.

В соответствии с настоящим изобретением предлагается новый тип протеза или биопротеза, который можно имплантировать на поверхности или внутри полого органа, или в каком-либо другом отношении к полному органу, в частности к пищеводу, чтобы обеспечить его восстановление.

Этот биопротез содержит биоразлагаемую пористую основу, соединенную с живым материалом, предпочтительно низкодифференцированным или недифференцированным, и предпочтительно с зародышевым материалом, или соединенную с клетками ткани органа, подлежащего восстановлению.

Биоразлагаемая пористая основа предпочтительно состоит из хитозана, но может также состоять из любого биоразлагаемого и биосовместимого полимерного материала, который может обеспечить необходимую пористость. В соответствии с настоящим изобретением допустимой является также комбинация различных основ (как, например, хитозан/коллаген, хитозан/гликозаминогликаны, такие как комбинации хитозан/гиалуроновая кислота или любая другая комбинация, известная специалистам в данной области).

Биоразлагаемая трубчатая основа оригинально разработана и содержит

биоразлагаемую пористую наружную поверхность, обеспечивающую клеточную пролиферацию и васкуляризацию клеток;

биоразлагаемую непористую внутреннюю поверхность, контактирующую с пищевым комком, если речь идет о протезе пищевода, или, в более общем случае, с жидкостью организма, циркулирующей в полном органе;

диаметр и пропорции, идентичные диаметру и пропорциям органа, подлежащего восстановлению, или аналогичные;

достаточные механические свойства.

Преимуществом этого протеза является возможность его простого получения из биоразлагаемого и биосовместимого биополимера с соблюдением анатомических свойств различных органов. Неожиданно было обнаружено, что этот протез обеспечивает хорошее контролируемое восстановление полого органа или части полого органа, подлежащих восстановлению или замещению. Под контролируемым восстановлением подразумевается восстановление органа или части органа путем клеточной пролиферации внутри протеза. Особенно неожиданным является то, что клетки, имплантированные с помощью добавления биологического материала, способны пролиферировать и остаются функциональными, позволяя обеспечить восстановление внеклеточного матрикса, несмотря на присутствие биоразлагаемой трубчатой основы, и, таким образом, восстановить замещенную часть полого органа. Кроме того, получают необходимые механические и физиологические свойства.

Трубчатую основу предпочтительно применяют в сочетании с дифференцированным, низкодифференцированным или недифференцированным живым материалом. В соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения применяют специфический зародышевый материал органа, подлежащего восстановлению, обеспечивая, таким образом, восстановление органа с соблюдением структуры, морфологии и функции рассматриваемого органа. В соответствии с другим вариантом применяют живой материал, образованный по меньшей мере частью клеток ткани органа, подлежащего восстановлению. Эти клетки обычно являются клетками, имеющими высокую способность к пролиферации внутри пористого слоя в соответствии с настоящим изобретением.

Таким образом, настоящее изобретение относится к комплексному биопротезу, состоящему из а)

биоразлагаемой и биосовместимой пористой трубчатой основы и б) низкодифференцированного или недифференцированного живого материала и предпочтительно специфического зародышевого материала, обеспечивающего после имплантации формирование эктопической матрицы из зародышевого материала.

Одной из задач настоящего изобретения является создание комплексного биопротеза для восстановления полых органов, позволяющего снизить ограничения предшествующего уровня техники, связанные с применением аутологических клеток или взрослых тканей. Этот биопротез позволяет восстановить весь орган без риска передачи вируса или отторжения пересаженных тканей. (В случае применения аллогенного или ксеногенного зародышевого материала (донор и реципиент не являются генетически идентичными или относятся к разным видам) необходимо предусмотреть обычные меры по проведению иммунодепрессии или обеспечению переносимости).

В соответствии с первым аспектом настоящее изобретение относится к протезу, предназначенному для стимуляции восстановления *in vivo* полого органа или части полого органа, отличающемуся тем, что он содержит

биоразлагаемую полую трубчатую основу, содержащую, по меньшей мере, биоразлагаемый и биосовместимый полимерный материал, причем указанная основа содержит пористый наружный слой и, по существу, непористый внутренний слой, и

живой биологический материал на наружной поверхности и/или внутри по меньшей мере части пористого слоя указанной основы, и/или на поверхности, по существу, непористого слоя, обращенной к пористому слою, причем указанный биологический материал выбирают таким образом, чтобы обеспечить восстановление *in vivo* органа или части органа.

В соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения, по существу, непористый и пористый слои могут состоять из разных материалов или могут состоять из одинаковых материалов, имеющих разную пористость.

В соответствии со вторым аспектом настоящее изобретение также относится к способу получения такого протеза. Этот способ включает в себя получение пористой трубчатой основы, содержащей, по существу, непористый слой на внутренней поверхности, и введение биологического материала на наружную поверхность и/или внутрь трубчатой основы. В частности, способ включает в себя получение биоразлагаемой трубчатой основы, содержащей пористый наружный слой, обеспечивающий клеточную пролиферацию, и, по существу, непористый внутренний слой (по существу, не допускающий клеточной пролиферации), и введение биологического материала, предназначенного для формирования протеза, на наружную поверхность и/или внутрь по меньшей мере части пористого слоя указанной основы, и/или на поверхность, по существу, непористого слоя, обращенную к пористому слою.

Краткое описание графических материалов

Другие отличительные особенности и преимущества настоящего изобретения станут понятны из подробного описания и примеров, которые будут приведены ниже со ссылками на прилагаемые чертежи (фиг. 1-8).

На фиг. 1 схематически представлен разрез трубки в соответствии с настоящим изобретением. На фиг. 1 ссылочной позицией 1 обозначен слой на наружной поверхности трубки, содержащий биоразлагаемый полимер, позицией 2 обозначен промежуток для развития клеток и живого органа, и позицией 3 обозначен, по существу, непористый внутренний слой. Позиция А определяет живой материал в соответствии с первым вариантом осуществления настоящего изобретения, при котором живой материал помещают или закрепляют на наружной поверхности трубки. Позиция В определяет живой материал в соответствии со вторым вариантом осуществления настоящего изобретения, при котором живой материал помещают между пористым наружным и непористым слоями.

На фиг. 2, включающей в себя фиг. 2А, 2В, 2С и 2D, представлены полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии изображения пористой трубки, полученной в соответствии с примером 1.

Фиг. 3А, 3В и 3С относятся к этапам интеграции и последующего рассасывания хитозанового материала в организме через 7 (а, b) и 14 (c) дней после имплантации.

На фиг. 4А и 4В представлено эктопическое развитие кишечника зародыша через 2 и 3 месяца в присутствии хитозановой трубки и ее исчезновение (рассасывание).

На фиг. 5А, 5В, 5С и 5D схематически представлен способ введения трубчатой основы в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, при котором непористый внутренний слой и пористый наружный слой являются физически независимыми.

На фиг. 6А, 6В, 6С, 7А, 7В и 7С схематически представлен способ введения трубчатой основы в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, при котором непористый внутренний слой и пористый наружный слой являются физически независимыми.

На фиг. 8А, 8В и 8С схематически представлены варианты осуществления настоящего изобретения, при которых трубчатая основа содержит средство, повышающее ее гибкость.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Настоящее изобретение относится к комбинированному биопротезу для восстановления полых органов и, в частности, для восстановления частей пищевода, имеющих патологию. Настоящее изобретение

можно применять для заживления, замещения или восстановления других органов, таких как кишечник, желчный проток, желудок, проток поджелудочной железы, мочевые протоки (уретра и мочеточник) и мочевой пузырь, кровеносные сосуды, фаллопиевы трубы и матка. Причиной патологии может являться, например, рак. Таким образом, настоящее изобретение относится к применению протеза в соответствии с настоящим изобретением, включая все варианты его осуществления, для замещения полого органа, по меньшей мере часть которого поражена злокачественной опухолью, и, в частности, когда полый орган является пищеводом. Изобретение также относится к способам хирургического лечения злокачественной опухоли, по меньшей мере части полого органа, особенно при необходимости рассечения или удаления полного сечения полого органа. Это лечение можно также применять при других патологиях, например при ожогах с образованием значительного стеноза. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу хирургического лечения патологии, требующей рассечения или удаления по меньшей мере части сечения полого трубчатого органа, отличающемуся тем, что включает в себя рассечение или удаление полного или частичного сечения полого органа и помещение вблизи области рассечения или удаления протеза из трубчатой основы или полимерного материала в соответствии с настоящим изобретением, включая все варианты его осуществления, для восстановления *in vivo* рассеченной или удаленной части.

В соответствии с настоящим изобретением трубчатую основу предпочтительно получают из биоразлагаемого и биосовместимого полимера. Трубка является пористой, но ее внутренняя стенка соединяется с инертной, по существу, непористой поверхностью. Предпочтительно пористый и, по существу, непористый слои состоят из одного и того же биоразлагаемого полимера.

В соответствии с настоящим изобретением тканевая основа имеет достаточные механические свойства, совместимые с механическими условиями, встречающимися *in vivo*.

В соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения трубчатая основа в соответствии с настоящим изобретением содержит средство, повышающее гибкость основы, в особенности для улучшения сопротивления движению восстановленного органа. Это средство имеет, например, структуру "гармошки" или спирали, но эти формы не являются ограничивающими.

В соответствии с настоящим изобретением трубчатая основа является совместимой с биологическим материалом, предпочтительно с зародышевым материалом.

В соответствии с настоящим изобретением трубчатая основа является биоразлагаемой *in vivo* и контролируемо разлагается со временем, предоставляя временную основу, обеспечивающую рост и пролиферацию новой ткани.

В соответствии с настоящим изобретением трубчатая основа имеет специфические структуру и размеры в соответствии с анатомией и функцией органов, подлежащих восстановлению. По существу, непористый слой должен обеспечивать непроницаемость пористого слоя и/или живого материала по отношению к биологической среде, которая может содержаться в органе, подлежащем восстановлению, или проходить через него (биологическая жидкость, пищевой комок и т.д.). Под непроницаемостью подразумевается непроницаемость для субстанций, которые могут помешать функционированию "хозяина", например привести к тому, что воспаление не сможет рассосаться со временем естественным образом. Толщина, по существу, непористого слоя может составлять от 60 мкм до 3 мм, или максимально 2,5 или 2 мм. Она также может составлять по меньшей мере 100 мкм. По существу, непористый слой служит также основой для живого материала в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения или для пористого слоя, необязательно содержащего живой материал, в соответствии с другим вариантом. Непористый слой может также служить проводником для восстановления трубчатого полого органа, такого как пищевод.

В соответствии с настоящим изобретением трубчатую основу можно получить такими способами, как лиофилизация, формовка, экструзия, испарение растворителя, экстракция порообразующего агента, погружение-осаждение, или с помощью комбинации этих способов.

В соответствии с настоящим изобретением составной биопротез можно применять для заживления, замещения или восстановления полых органов человека, включая желудочно-кишечный тракт, пищеварительные, желчные, панкреатические, мочевые и половые каналы, а также кровеносные сосуды и нервные ткани.

Комплексный биопротез в соответствии с настоящим изобретением состоит из основы, имеющей оптимальные характеристики для эктопического роста биологического материала и предпочтительно зародышевого материала. Основа представляет собой биоразлагаемую трубчатую структуру, обеспечивающую восстановление полых органов, таких как пищеварительные, желчные, панкреатические, мочевые и половые каналы (пищевод, кишечник, желудок, желчный проток, уретра, мочеточник, мочевой пузырь, фаллопиевы трубы и матка). Принцип состоит не в замещении поврежденной части биоразлагаемой трубчатой основой, а в стимуляции восстановления тканей путем применения биоразлагаемой трубчатой основы, соединенной с трансплантатом из живого биологического материала, предпочтительно низкодифференцированного или недифференцированного, и предпочтительно имеющего зародышевое происхождение, или соединенной по меньшей мере с частью клеток ткани органа, подлежащего восстановлению.

Основа выполнена в виде трубки с пористым наружным слоем, который может стимулировать кле-

точно-тканевую миграцию, васкуляризацию и восстановление полых органов. Внутренний просвет трубки является непроницаемым и может контактировать с пищевым комком или любой другой жидкостью, циркулирующей в полостной части органа. Размеры и величина этого просвета соответствуют размерам и величине органа, подлежащего восстановлению.

Как уже было сказано, трубчатая основа, служащая основой для живого биологического материала, может состоять из разных полимеров постольку, поскольку они пригодны для получения трубки, имеющих размеры, аналогичные размерам пересаживаемого органа или части органа, и достаточные механические свойства (эластичность, сопротивление, гибкость без уменьшения формы и просвета), а также пористость, позволяющую обеспечить хорошую адгезию биологического материала и предпочтительно зародышевого материала в процессе его роста *in vivo*, и нормальную циркуляцию жидкости, обычно циркулирующей в полости органа.

Более конкретно, пористость должна иметь достаточную величину, чтобы обеспечить клеточную инфильтрацию и колонизацию кровеносными сосудами, а также рост биологического материала и предпочтительно зародышевого материала.

Предпочтительно поры объединены в единую систему, чтобы обеспечить клеточное взаимодействие, диффузию кислорода и метаболитов.

Предпочтительно пористость должна проходить по всей толщине трубки до ее внутренней поверхности.

Внутренний диаметр должен соответствовать величине восстанавливаемого прохода. Выбор наружного диаметра является менее важным. Однако следует учитывать необходимость сохранения гибкости трубки.

Внутренняя поверхность (или внутренний слой) трубки должна быть непроницаемой и непористой, так чтобы обеспечить непроницаемость трубки для химуса, если речь идет о пищеварительных каналах (например, пищеводе или желудке), для газа, если речь идет о дыхательном канале (например, трахее), или для любой другой жидкости, если речь идет о других органах, чтобы избежать проникновения бактерий и вирусов. Вместе с тем, эта внутренняя поверхность состоит, по существу, из непористого слоя, в значительной мере препятствующего клеточной пролиферации, чтобы избежать неконтролируемой клеточной пролиферации, которая со временем закрыла бы просвет трубчатой основы.

В общем, механическое сопротивление трубки предпочтительно является достаточным для исключения сдавливания трубки и для сохранения просвета (внутреннего диаметра), обеспечивающего прохождение воздуха, или пищевого комка, или любой другой жидкости в зависимости от органа, подлежащего восстановлению.

Предпочтительно полимерный материал полностью разлагается за период времени, необходимый для восстановления органа. Кроме того, он должен являться биосовместимым так, чтобы не вызывать цитотоксичности, воспалительной реакции или реакции отторжения, и, кроме того, должен являться совместимым с биологическим материалом и предпочтительно зародышевым материалом.

В то же время полимерный материал должен быть легко стерилизуемым.

Как уже было сказано, основа предпочтительно состоит из хитозана, являющегося легкодоступным материалом, которому можно простым способом придать все описанные выше преимущества. Однако можно выбрать значительное количество других полимеров, известных своими свойствами биоразлагаемости и биосовместимости.

Более конкретно, полимерный материал выбирают из группы, состоящей из хитозана, хитина, хитин-глюканового сополимера и их производных или сополимеров, причем эти полимеры необязательно соединяют по меньшей мере с одним другим биосовместимым и биоразлагаемым полимером.

Другие различные биосовместимые и биоразлагаемые полимеры можно применять в соединении с хитозаном, хитином или их производными или сополимерами, определенными выше, в особенности для изменения одного или нескольких из их свойств, таких как способность к клеточной пролиферации, механическое сопротивление, коэффициент набухания в контакте с биологической средой хозяина, прилегающей к протезу, деформируемость, скорость разложения, сжимаемость, эластичность, податливость, гибкость и т.д.

В частности, можно обратиться к биополимерам, в частности к биополимерам, выбранным из группы, состоящей из гликозаминогликанов (GAG), в частности гиалуроната, сульфата хондроитина или гепарина, коллагенов, альгинатов, декстранов и их смесей.

Также можно выбрать биоразлагаемые и биосовместимые синтетические полимеры, в частности выбранные из группы, состоящей из синтезированных биоразлагаемых полиэфиров, таких как гомополимеры и сополимеры на основе молочной кислоты, гликолевой кислоты, эпсилон-капролактона и п-диоксанона, или любого другого натурального полиэфира, например, из семейства полигидроксиалканоев, таких как, например, гомо- и сополимеры на основе гидроксибутирата, гидроксивалерата, полиортоэфиров, полиуретанов.

Предпочтительно применяют хитозан или содержащий его полимерный материал.

Хитозан получают путем деацетилирования хитина, различные возможные источники которого хорошо известны. Речь идет о панцирях ракообразных (преимущественно крабов, креветок и омаров), эн-

доскелетах головоногих, кутикулах членистоногих, диатомеях и клеточных оболочках грибов. Предпочтительно выбирают полимеры грибного происхождения, ввиду их гипоаллергенного характера, постоянного и легко прослеживаемого качества, почти неисчерпаемого и полностью обновляемого источника, позволяющего, помимо прочего, использовать отходы агропищевой и биотехнологической промышленности. Предпочтительно можно получить хитозан способом, описанным в заявке на патент WO 03/068824 KITOZYME.

Степень деацетилирования и молекулярную массу хитозана выбирают таким образом, чтобы обеспечить оптимальную скорость разложения. Например, было установлено, что скорость разложения хитозана сильно зависит от его молекулярной массы и степени деацетилирования, т.е. чем меньше молекулярная масса и степень деацетилирования, тем быстрее осуществляется разложение. Также большое значение имеет контроль пористости - основы, имеющие поры большей величины и более высокую пористость, разлагаются быстрее.

Хитозан, выбранный для получения трубок, служащих основой, можно соединять с различными биоразлагаемыми полимерами, например с другим гликополимером, таким как хитин или хитин-глюкан. Способы получения этих полимеров или сополимеров описаны в заявках на патенты KITOZYME (WO 03/068824, FR 0507066 и FR 0651415).

Как уже было сказано, пористость трубчатой основы имеет большое значение для обеспечения приращения и роста биологического материала и предпочтительно зародышевого материала после введения протеза *in vivo*.

Эта пористость должна быть достаточной, чтобы пропускать, как минимум, кровяные клетки и не обязательно некоторые клетки трансплантата. Таким образом, диаметр пор в пористой части составляет более 10 мкм и предпочтительно от 10 до 200 мкм.

Внутренний диаметр и толщину трубки, образующей основу, приспособляют к тем полым органам, которые требуется восстановить.

Размеры, в частности толщина, полимера зависят от желаемых физических свойств, причем эти свойства должны обеспечивать эластичность и сопротивление в соответствии с природой органа, подлежащего восстановлению. Эта толщина также зависит от диаметра трубки и природы органа, подлежащего восстановлению. Следует понимать, что в любом случае, внутренний диаметр трубки определяется диаметром органа, подлежащего восстановлению.

Живой материал можно помещать на поверхность или внутрь наружного и пористого слоя трубки, и необязательно закреплять на месте с помощью ткани, обернутой вокруг указанной трубки. Другой возможностью является помещение живого материала между непроницаемой внутренней поверхностью трубки (по существу, непористым слоем) и ее пористой поверхностью. В последнем случае пористый и, по существу, непористый слои могут не являться взаимосвязанными и выполняться независимо. Таким образом, они могут являться физически независимыми. Непористый слой может представлять собой пленку или вторую непористую трубку. Под "по существу, непористым слоем" подразумевается, что клетки или биологический материал, соединенные с биоразлагаемым полимером, совсем не колонизируют или слабо колонизируют и предпочтительно не колонизируют непористый слой.

Добавление биологического материала на поверхность или внутрь биоразлагаемой трубчатой основы осуществляют предпочтительно *in vivo* или непосредственно перед резекцией.

В соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения биоразлагаемую полую трубчатую основу имплантируют для замещения по меньшей мере части полого органа, затем живой биологический материал вводят на поверхность или внутрь пористого слоя или на поверхность, по существу, непористого слоя, обращенную к пористому слою. Таким образом, пролиферация живого биологического материала осуществляется *in vivo*. Это обеспечивает обладающее большими преимуществами восстановление полого органа или части полых органов, подлежащих восстановлению или замещению.

В соответствии с вторым вариантом осуществления настоящего изобретения биологический материал добавляют к основе непосредственно перед резекцией, чтобы исключить этап культивирования биологического материала.

В соответствии с третьим вариантом осуществления биоразлагаемую трубчатую основу имплантируют без биологического материала. Затем основа колонизируется клетками хозяина.

В соответствии с четвертым вариантом осуществления настоящего изобретения трубчатую основу изготавливают в виде двух отдельных и физически независимых частей (т.е. выполненных с возможностью независимого манипулирования), причем первая часть содержит пористый слой, а вторая часть содержит, по существу, непористый слой. В таком случае непористый слой помещают внутрь восстанавливаемого полого трубчатого органа, а затем пористый слой помещают снаружи этого органа.

Указанные варианты осуществления настоящего изобретения позволяют в особенности исключить засеивание и культивирование клеток в условиях *in vitro*, но также обеспечивают экономию времени и производственных затрат. Кроме того, не требуется создание банка клеток. В соответствии с этими предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения протез предназначен для введения *in vivo* живого биологического материала. Колонизация клеток, осуществляемая *in vivo*, является очень хорошей, и обеспечивается восстановление замещенной части или целого органа.

Биологический материал, взятый у человека, может представлять собой клетки (за исключением эмбриональных стволовых клеток) и предпочтительно терминальные стволовые клетки, включая клетки, взятые у зародыша в возрасте более 8 недель, в частности у зародыша в возрасте от 8 до 10 недель, или из пупочного канатика после рождения. Предпочтительно применяемый живой материал является низкодифференцированным или недифференцированным и предпочтительно имеет зародышевое происхождение. Он также может быть образован пролиферативными клетками восстанавливаемой ткани.

Применение зародышевых стволовых клеток (взятых у зародыша от 8 до 10 недель) является более предпочтительным, чем применение взрослых стволовых клеток, поскольку они имеются в изобилии. Взрослые стволовые клетки предпочтительно берут из органа, подлежащего восстановлению (желудка, кишечника, матки, мочевого пузыря, кровеносных сосудов).

Клетки могут являться клетками по меньшей мере одного животного, в особенности млекопитающего или по меньшей мере одного человеческого существа.

Зародышевый материал может являться органом, или сегментом органа, или клеточной эмульсией. Этот зародышевый материал предпочтительно находится во влажном и вязком состоянии так, чтобы им можно было покрыть такую поверхность, как поверхность трубки, к которой он должен пристать или к которой его необходимо прикрепить для формирования своеобразной сетчатой повязки. Другая альтернатива состоит в применении стволовых клеток, дифференциация которых является контролируемой.

Толщина нанесенного слоя предпочтительно составляет от 0,1 до 1 мм, но также может быть и больше. Специалисту в данной области должно быть ясно, что толщина этого слоя, по существу, зависит от природы органа и от природы реципиента (человека или животного).

Соотношения полимера и биологического материала и предпочтительно зародышевого материала могут также варьироваться в широком диапазоне в зависимости от природы органа, подлежащего восстановлению.

Преимуществами применения зародышевых материалов являются следующие.

Высокая степень выживаемости трансплантата даже при отсутствии васкуляризации (благодаря диффузии питательных веществ до колонизации сосудами хозяина).

Зародышевые органы являются в достаточной степени недифференцированными, чтобы обеспечить высокую способность роста и восстановления зрелых органов, будучи при этом достаточно дифференцированными, чтобы исключить любую ошибку в их развитии и росте (никакого отклонения в развитии не наблюдалось в материале зародышевого происхождения). Дифференциация зародышевых материалов является более простой и обеспечивает, например, лучший контроль дифференциации, чем при применении стволовых клеток.

Зародышевый материал не содержит возбудителей инфекции и, таким образом, снижает риск передачи вирусов.

Как уже было сказано, изобретение также относится к способу получения протеза в соответствии с настоящим изобретением.

Указанный способ включает в себя получение пористой трубчатой основы, содержащей, по существу, непористый слой на внутренней поверхности, и введение на поверхность и/или внутрь указанной трубчатой основы зародышевого материала.

Как уже было сказано, пористые трубчатые основы уже известны, в особенности основы на базе хитозана. Такие основы можно использовать для получения протезов в соответствии с настоящим изобретением.

В общем, технология получения трубок на полимерной основе, имеющих пористую структуру и непористый (непроницаемый) внутренний слой, хорошо известна.

Лиофилизация является хорошо известным способом получения пористых материалов. Ее принцип основан на замораживании раствора, вызывающем кристаллизацию растворителя.

Затем растворитель удаляют путем вакуумной возгонки для создания пор на месте кристаллов растворителя. Эта технология сочетает в себе следующие преимущества:

простоту осуществления;

возможность контроля пористости и диаметра пор путем изменения параметров осуществления и состава (скорость охлаждения, концентрация полимерного раствора и т.д.);

допустимость разных типов геометрии: пористые мембраны, трехмерные основы, шары, трубки;

простоту перехода на промышленное производство.

Как описано в публикации "Porous chitosan scaffolds for tissue engineering" (S.V. Madihally, H.W.T. Matthew, Biomaterials 20 (1999), 1133-1142), пористые трубки из хитозана получали путем лиофилизации, замораживая раствор хитозана в кольцевом пространстве, заключенном между двумя концентрическими трубками (силиконовыми или политетрафторэтиленовыми), раствор хитозана впрыскивали в это пространство и комплект замораживали прямым контактом, например, с сухим льдом при температуре -78°C (как описано в статье). Затем наружную трубку убирали и комплект лиофилизировали. Трубка, полученная указанным способом, является полностью пористой по всей толщине, включая наружную и внутреннюю (или люминальную) поверхности.

Для получения трубок, отличающихся непористой люминальной стенкой, можно применять раз-

личные решения; те же авторы описывают способ, основанный на предварительном покрытии внутренней силиконовой трубки хитозановой пленкой. Такую хитозановую пленку можно получить путем окунания трубки в раствор хитозана и ее желирования посредством быстрого погружения в 30% раствор нашатырного спирта и затем высушивания. Можно также получить пленку непосредственно простым испарением растворителя, как это осуществляется в примере 1, что является более предпочтительным.

После регидратации в водной среде описанные выше трубки быстро набухают и в конце концов вновь растворяются, благодаря присутствию растворимого ацетата хитозана внутри лиофилизированной структуры. Кроме того, растворения основ можно избежать путем нейтрализации образцов с помощью их погружения либо в раствор NaOH, либо в последовательность спиртов нисходящей концентрации (S.V. Madihally, H.W.T. Matthew, *Biomaterials* 20 (1999), 1133-1142).

Предпочтительно для получения пористых трубок способом лиофилизации применяют концентрации хитозана от 1 до 10% в уксусной кислоте.

Кроме технологий лиофилизации или термического разделения фаз известны другие технологии, направленные на формирование пор для получения пористых основ.

Среди них можно назвать экстракцию порообразующих солей, вспенивание в сверхкритической жидкости (сверхкритическом CO₂), а также новейшие способы, такие как моделирование эмульсии, технология известная под английским наименованием "solid free-forming" (свободное формирование трехмерной модели), состоящая в построении контуров трехмерных объектов, но большая часть этих способов не обеспечивает хорошего контроля пористости и создает слабосвязанные пористые структуры.

Для создания непористого просвета трубки непористую трубку можно вставить внутрь пористой трубки, или также непористую полую трубку можно окружить пористой мембраной, образующей пористую наружную часть трубчатой основы. В этих случаях пористые и непористые слои могут также быть физически независимыми. В этом варианте можно предусмотреть валики, расположенные на каждом из концов непористой трубки, таким образом, чтобы улучшить непроницаемость соединения непористая трубка/пищевод. Указанные валики можно получить с помощью нитей, предварительно размещенных на непористой трубке, путем припуска материала трубки или материала, отличающегося от материала непористой трубки. Этот валик может также упрощать соединение трубки с пищеводом.

Пористую хитозановую трубку, имеющую достаточное механическое сопротивление, получают путем лиофилизации растворов хитозана. Для растворения хитозана применяют органические и неорганические кислоты, такие как муравьиная, молочная, янтарная, соляная, глюконовая кислоты и предпочтительно уксусную кислоту. Их можно применять для получения хитозановых трубок.

Наиболее предпочтительно растворы хитозана получают путем растворения хитозана до концентраций, составляющих от 1 до 10% в водном растворе уксусной кислоты.

Наиболее предпочтительно хитозан, применяемый в качестве исходного материала для получения биопротезов, имеет грибное происхождение, и его получают путем деацетилирования хитина, извлеченного из грибов, например, способами, описанными в заявках на патенты Kitozyme, перечисленных выше.

Предпочтительно степень ацетилирования и молекулярную массу хитозана выбирают таким образом, чтобы получить оптимальную скорость разложения в соответствии со скоростью восстановления органа, подлежащего восстановлению.

Нейтрализацию хитозановой основы предпочтительно осуществляют с помощью обработки содой для получения основы, совместимой с физиологическими условиями. Предпочтительно осуществлять обработку 1% раствором NaOH.

Хитозановую основу можно стерилизовать с помощью облучения γ -лучами, обработки оксидом этилена или в автоклаве.

Настоящее изобретение также относится к определенной выше биоразлагаемой трубчатой основе, предназначенной для восстановления по меньшей мере части полого органа.

Изобретение также относится к биоразлагаемым и биосовместимым пористым материалам для восстановительной хирургии полого органа трубчатой формы, причем указанные полимерные материалы предназначены для формирования пористого слоя биоразлагаемой полый трубчатой основы, содержащей пористый наружный слой и, по существу, непористый внутренний слой или состоящей из указанных слоев.

Предпочтительно биоразлагаемую полую трубчатую основу размещают, в конце концов, таким образом, что пористый наружный слой располагается на наружной поверхности полого органа, а, по существу, непористый внутренний слой располагается на внутренней поверхности полого органа.

В соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения полимерный материал трубчатой формы содержит дистальный конец и проксимальный конец, причем указанный проксимальный конец предназначен для размещения на конце полностью или частично рассеченного полого органа, а указанный дистальный конец предназначен для размещения на другом конце полностью или частично рассеченного полого органа.

Такое расположение позволяет заместить или восстановить полное или частичное сечение полого органа.

Ясно, что "конец полого органа" понимается в широком смысле и относится в случае частичного

сечения полого органа к части ткани органа, обращенной к другой части ткани, причем указанные две части можно геометрически соединить прямой линией, пересекающей рассеченную часть ткани, при этом указанная прямая линия не пересекает просвет полого органа.

Настоящее изобретение также относится к способу клеточной пролиферации, в особенности для восстановления по меньшей мере части полого органа, включающему в себя этапы получения биоразлагаемой трубчатой основы, содержащей пористый наружный слой и, по существу, непористый внутренний слой, и посев клеток или тканевого имплантата на наружную поверхность и/или внутрь по меньшей мере части пористого слоя указанной основы и/или на поверхность, по существу, непористого слоя, обращенную к пористому слою, в условиях, обеспечивающих их пролиферацию внутри пористого слоя.

Другие задачи, отличительные особенности и преимущества настоящего изобретения специалисту в данной области техники поможет понять поясняющее описание со ссылками на примеры, которые будут даны только в качестве иллюстрации и никак не ограничивают объем правовой охраны настоящего изобретения.

Эти примеры являются неотъемлемой частью настоящего изобретения, и всякий отличительный признак, представляющийся новым по сравнению с каким бы то ни было предшествующим уровнем техники по отношению к описанию, рассматриваемому в целом, включая примеры, является неотъемлемой частью изобретения в отношении его назначения и применимости.

Таким образом, каждый пример входит в общий объем правовой охраны.

Описание примеров осуществления изобретения

Пример 1. Получение пористых хитозановых трубок.

Хитозан растительного происхождения, произведенный компанией KitoZyme, отличающийся вискозиметрической молекулярной массой, составляющей 42 К, и степенью ацетилирования 11%, растворяли в уксусной кислоте (1%) из расчета 5% (мас./об.).

Пористую основу трубчатой формы получали путем лиофилизации раствора хитозана, предварительно впрыснутого шприцем в кольцевое пространство, сформированное двумя концентрическими трубками разных диаметров. Комплект замораживали прямым контактом с жидким азотом в течение 15 мин. Затем наружную трубку убирали и продолжали лиофилизацию комплекта в течение 24 ч. После высушивания внутреннюю трубку, в свою очередь, убирали, и полученную трубку анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии. На фиг. 2А, 2В, 2С и 2D представлены полученные изображения и показана структура трубки. На фиг. 2А представлено поперечное сечение, на котором хорошо видно, что пористость комплекта получена по всей толщине трубки. На фиг. 2В особенно хорошо видна полученная пористая структура. Внутренняя поверхность трубки представлена на фиг. 2С, на которой можно видеть, что поры не открываются в просвет трубки. На фиг. 2D, представляющей вид наружного слоя трубки, можно видеть, что поры, наоборот, очень заметно открываются к наружной поверхности трубки.

Пример 2. Гистология после подкожной имплантации мембран и пористых трубок крысам и мышам.

Пористые хитозановые основы в форме трубок, полученные путем лиофилизации растворов хитозана в уксусной кислоте, сначала нейтрализовали с помощью обработки раствором NaOH (для удаления остатков кислоты), затем стерилизовали путем выдерживания в течение 20 мин в 96°-ном спирте и последующего промывания в солевом буферном растворе в течение 5 мин или в автоклаве. 10 мышей BALB/c и 5 крыс Fisher получили хитозановые имплантаты (мембраны или трубки) подкожно, по одному в каждое из ушей.

В качестве контрольных применяли парафиновые и полиэтиленовые трубки.

Через разные промежутки времени (7, 14 и 62 дня) проводили внешние биометрические анализы и гистологические анализы.

Результаты показывают, что у всех животных хитозановые имплантаты проявили хорошую переносимость (фиг. 3А) и инфильтрировали окружающие клетки и ткани уже через 7 дней (фиг. 3В). Наблюдалась умеренная воспалительная реакция, и ни один из имплантатов не вызвал реакцию отторжения. Хитозановые имплантаты начали разлагаться через период времени от 1 до 4 недель (фиг. 3С) и полностью растворились через 62 дня.

В заключение следует сказать, что протезы из хитозана являются биосовместимыми, обеспечивают инфильтрацию прилежащих клеток и тканей и вызывают при разложении только очень ограниченную воспалительную реакцию.

Пример 3. Подкожная имплантация мышам мембран и пористых трубок, соединенных с зародышевым материалом.

Кишечник зародыша брали у зародыша мыши после внутриутробного развития от 15 до 20 дней и имплантировали в подкожные карманы, сформированные в ушной раковине мыши-хозяина (10 мышей); указанный зародышевый материал соединяли с хитозановым имплантатом в виде трубок непосредственно перед имплантацией путем покрытия наружной поверхности хитозановой трубчатой основы зародышевым материалом. Донор и реципиент являлись генетически идентичными (изогенная трансплантация) во избежание реакций иммунобиологического отторжения.

В этом примере хитозановые трубки стерилизовали путем обработки спиртом от 30 до 40 мин, а затем промывали в стерильном солевом растворе в течение 5, затем 25 мин для удаления всякого спиртового остатка.

Через 2 (фиг. 4А) и 3 (фиг. 4В) месяца имплантаты из кишечника были хорошо развиты, причем хитозановая основа полностью разложилась в конце этого периода. Через 2 месяца (фиг. 4А) поперечный срез зародышевого имплантата показывает развитие нормального кишечника, подобного взрослому кишечнику и имеющего все его характеристики (структуру ворсинок) в присутствии хитозановой трубки, которая, со своей стороны, полностью рассосалась. Таким образом, этот эксперимент показал, что хитозановые имплантаты являются совместимыми с развитием изогенных зародышевых трансплантатов пищеварительных органов, в данном случае кишечника. Просвет кишечника виден на фиг. 4В.

Гистологические срезы, осуществленные в легких, печени и почках хозяина через 3 месяца, показывают отсутствие воспалительной реакции и патогенного эффекта в этих органах.

Пример 4. Моделирование биопротеза пищевода.

Комбинированные протезы, состоящие из пористой хитозановой трубки и зародышевого кишечного материала (зародышевый материал помещали либо снаружи трубки, либо между пористым слоем и непористой внутренней поверхностью трубки) продольно имплантировали между шейными мышцами крысы, не нарушая целостности пищевода. Этот эксперимент показал, что хитозановая трубка может быть колонизирована зародышевым кишечным материалом и выдерживать движения шеи.

Пример 5. Замещение сегмента пищевода путем применения пористой хитозановой трубки, покрытой изогенным кишечником или пищеводом зародыша.

Сегменты кишечника зародыша брали у крысы после внутриутробного развития от 14 до 18 дней и располагали вокруг пористых хитозановых трубок. После резекции сегмента пищевода длиной от 0,5 до 1 см в шейной области крысы хитозановую трубку с зародышевым материалом прикрепляли к двум концам разреза пищевода крысы, таким образом, что соединения между протезом и органом являлись герметичными, или непроницаемыми. Тот же эксперимент повторили с зародышевым пищеводным материалом.

Пример 6. Переносимость после имплантации в шейную область крысы полый трубчатой основы из хитозана.

Полая трубчатая основа в соответствии с примером 6 состоит из первой непористой трубки, полученной способом, описанным в патентном документе WO 2007/042281 из образца хитозана по примеру 1, и отличается тем, что ее внутренний диаметр составляет 1,5 мм, а наружный диаметр составляет 2,5 мм. Непористую трубку окружает пористая мембрана, полученная обычным способом лиофилизации из хитозана по примеру 1, составляющая, таким образом, пористый наружный слой трубчатой основы. Непористую трубку и мембрану стерилизовали (в автоклаве или путем выдерживания в дезинфицирующем спиртовом растворе от 15 до 20 мин), а затем промывали в физиологическом растворе (NaCl 0,9%) по меньшей мере 20 мин.

Анестезированную крысу помещали спиной на соответствующую опору, при этом растянув таким образом, чтобы получить доступ к передней поверхности шеи. Осуществляли медианный разрез кожи от щитовидного хряща до яремной вырезки грудины, надрезали подкожные мышцы, претрахеальные мышцы разрезали вдоль, и в щель продольно помещали хитозановую трубку, окруженную пористой хитозановой мембраной. Мышечный и подкожный слои закрывали путем наложения швов.

После умерщвления через 90 дней (3 месяца) животное не имело никаких макроскопических изменений внешнего вида и внутренних органов. Анатомо-патологическое исследование показало почти полное исчезновение мембраны, сохранность трубки, полностью окруженной волокнистыми тканями, отсутствие макроскопических, а также микроскопических изменений внутренних органов и тканей, окружающих трубку и мембрану.

Пример 7. Имплантация полый трубчатой основы в частично рассеченный пищевод.

Фиг. 5 и 6 являются схематическими иллюстрациями этого примера. Они ни в коем случае не представляют подлинную деталь, и на них не соблюдаются пропорции.

Производили продольный разрез кожи шеи анестезированной крысы, а затем обнажали трахею и пищевод (501), часть (502) которого (приблизительно 2/3 окружности) рассекали (фиг. 5А). Затем непористую трубку (510) по примеру 6 вводили внутрь пищевода (501) через рассеченную часть (502) органа (фиг. 5В) и закрепляли с помощью нитей (503), предварительно помещенных вокруг пищевода (501) и стягивали комплект трубка + пищевод у концов трубки (511, 512) (фиг. 5С). Затем пористую мембрану (520) по примеру 6 оборачивали вокруг пищевода с трубкой и прикрепляли к соседним мышечным тканям (530, 531) с помощью наложенного шва (535) (фиг. 5D). Таким образом, живой материал (540) на месте помещали между пористой наружной поверхностью (520) и непористой внутренней поверхностью (510) трубчатой основы (550).

Послеоперационное течение проходило без местных осложнений (расхождения швов, абсцесса, внешней инфекции). В течение 10 дней животное испытывало некоторые затруднения с принятием воды и пищи и теряло вес, затем ситуация быстро улучшилась. Крысу умертвили через 35 дней. Анатомо-патологическое исследование показало, что через 35 дней крыса восстановила свой первоначальный вес.

Внутренние органы выглядели нормально.

Пищевод восстановлен, непроницаем, без сужения. Не наблюдалось ни местного абсцесса, ни просачивания (пищевого комка, жидкости организма и т.д.). Таким образом, протез позволяет восстановить непроницаемое соединение с пищеводом.

Анализ гистологических срезов показал, что протез полностью исчез с места установки (он не был обнаружен ни в одной из частей пищеварительного тракта, следовательно, он рассосался или переварился) и что пищевод и прилежащие ткани выглядят нормально. Несколько остатков мембраны было обнаружено в зоне, слегка инфильтрованной живым материалом, рядом с шейным отделом пищевода.

Пример одной из возможных процедур имплантации материалов.

1. Получение непористой хитозановой трубки (610) и пористой мембраны (620) после их стерилизации или в автоклаве, или путем выдерживания в дезинфицирующем спиртовом растворе от 15 до 20 мин;

промывание трубки (610) в стерильном физиологическом растворе в течение по меньшей мере 20 мин;

промывание пористой мембраны (620) в том же физиологическом растворе (NaCl 0,9%) в течение того же времени;

помещение 2 шовных нитей для позиционирования и прикрепления (613, 614) с формированием своеобразных валиков вокруг двух концов (611, 612) трубки (610) (фиг. 6А). Эти валики формируют припуск на концах трубки (610) и могут также упростить соединение трубки с пищеводом.

2. Обнажение трахеи и пищевода (601), рассечение пищевода.

3. Частичное рассечение пищевода (601) (рассечение приблизительно 2/3 окружности) с удалением или без удаления, со вскрытием полости (602).

4. Введение конца трубки (610) и закрепление в пищеводе (601) с помощью нитей (615, 616) с окружением каждого из свободных краев рассеченного пищевода (601), таким образом, чтобы валик, сформированный нитью (613, 614), находился внутри органа, введение и закрепление другого конца аналогичным образом (фиг. 6В и 6С).

5. Обертывание пористой мембраны (620) (стерилизованной и промытой тем же способом, что и трубка) снаружи пищевода (601) и трубки (610) (в месте их соединения). Шов накладывают между концами мембраны (620) и прилегающими тканями (630, 631), чтобы закрепить мембрану (620) (фиг. 6D). Нити (615) и (616) можно также применять для закрепления пористой мембраны (620).

6. Послойное закрытие операционной раны.

Пример 8. Имплантация полой трубчатой основы в полностью рассеченный пищевод.

Осуществляли продольный разрез кожи шеи, а затем обнажали трахею и пищевод анестезированной крысы. Шейный отдел пищевода полностью рассекали на середине высоты. Затем непористую трубку по примеру 6 вводили внутрь пищевода и закрепляли с помощью нитей, предварительно размещенных вокруг каждого из свободных концов рассеченного пищевода, чтобы стянуть комплект трубка + пищевод у концов трубки и расположить трубку таким образом, чтобы восстановить трубку, формируемую пищеводом. Затем пористую мембрану по примеру 6 оборачивали вокруг пищевода и трубки и прикрепляли к прилежащим мышечным тканям с помощью наложенного шва. Таким образом, живой материал помещали между пористой наружной поверхностью и непористой внутренней поверхностью трубчатой основы.

Послеоперационное течение проходило без местных осложнений (расхождения швов, абсцесса, внешней инфекции). Животное испытывало некоторые затруднения с принятием воды и пищи.

Наблюдения проводили через 1, 3 и 6 дней после вмешательства. Соединение трубка-пищевод оставалось непроницаемым. Никакой инфекции или местного абсцесса обнаружено не было. Гистологические срезы показывают небольшую местную воспалительную реакцию и подтверждают присутствие трубки и фрагментов мембраны.

Пример возможной процедуры имплантации материалов.

Первые этапы процедуры, осуществленные в соответствии с примером 8, идентичны этапам 1 и 2 по примеру 7. Этапы 3 и 4 отличаются тем, что пищевод подвергали не частичному, а полному рассечению. Их можно описать следующим образом.

3. Полное рассечение на середине высоты шейного отдела пищевода (701) с удалением или без удаления, с созданием, таким образом, полного сечения (702).

4. Введение конца (711) непористой трубки (710) и закрепление в дистальной части (703) пищевода (701) с помощью нитей (715, 716), окружающих каждый из свободных краев (703, 704) рассеченного пищевода (701), таким образом, чтобы валик, сформированный нитью (713, 714) на трубке, находился внутри органа (701), введение и закрепление другого конца (712) в проксимальном сегменте (704) аналогичным образом (фиг. 7А).

5. Обертывание пористой мембраны (720) снаружи пищевода (701) и трубки (710) (фиг. 7В).

6. Наложение одного или нескольких швов или клеевых соединений (735) между концами мембраны и прилегающими тканями (730) для закрепления мембраны (720) (фиг. 7С).

7. Сшивание операционной раны в 2 слоях - мышечном и кожном.

Пример 9. Вариант осуществления полой трубчатой основы в соответствии с настоящим изобретением.

Трубчатая основа в соответствии с настоящим изобретением, полученная в соответствии с приведенными примерами, может содержать часть, имеющую последовательные изменения сечения, формирующие структуру "гармошки", позволяющую повысить гибкость трубки и, таким образом, сопротивление движению хозяина, а также улучшить функцию глотания. Например, можно осуществить протокол по примеру 1, с применением двух концентрических кольцевых пространств, каждое из которых содержит часть, имеющую последовательные изменения сечения, вместо кольцевого пространства, сформированного двумя концентрическими трубками с разными диаметрами. Также можно осуществить протокол получения непористой трубки по примеру 6 для получения непористой трубки, имеющей, по существу, структуру "гармошки", позволяющую повысить гибкость трубки.

На фиг. 8А и 8В схематически представлены два варианта осуществления этой части трубки.

Кроме того, концентрические кольцевые пространства могут иметь другие формы, например, с изменениями толщины в виде спирали. На фиг. 8С схематически представлен вариант спирали.

Пример 10. Пересадка кишечника зародыша или одного пищевода.

Этап 1 (4 крысы): животных подготавливали, как описано в примере 6, но трубку заменяли сегментом кишечника, взятым у 17-дневного генетически идентичного зародыша крысы.

Этап 2 (через 1-2 месяца): шею повторно вскрывали, кисту, сформированную кишечником или пищеводом зародыша в процессе роста, вскрывали и промывали, обрезали таким образом, чтобы сформировать продольную трубку с размерами, равными размерам пищевода, без изменения его сосудистых связей с организмом, пищевод реципиента обнажали, производили резекцию сегмента после помещения нитей для позиционирования на края разреза с каждой стороны, затем "зародышевую" трубку пришивали к каждому из концов пищевода перекидным швом 6.0. По возможности на швы помещали биологический клей для усиления непроницаемости. Операционную рану закрывали в 2 слоях.

Этот пример показывает осуществимость пересадки живого материала зародышевого происхождения для восстановления трубчатого органа.

Пример 11. Пластика сегментов пищевода с помощью комбинации трубка + трансплантат.

Способ. Воспроизводили пример 10, но непористую хитозановую трубку (полученную в соответствии с патентным документом WO 2007/042281) закрепляли внутри "зародышевой" трубки, чтобы повысить ее жесткость и сопротивление и предоставить время для заживления швов и восстановления организмом кругового дефекта пищевода. Затем трубку можно удалить.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Протез для стимуляции восстановления *in vivo* полого органа или части полого органа, отличающийся тем, что он содержит

биоразлагаемую полую трубчатую основу, выполненную по меньшей мере из одного биосовместимого и биоразлагаемого полимерного материала, причем основа состоит из пористого наружного слоя и непористого внутреннего слоя, и

живой биологический материал на наружной поверхности, и/или внутри по меньшей мере части пористого слоя основы, и/или на поверхности непористого слоя, обращенной к пористому слою, причем биологический материал обеспечивает восстановление *in vivo* указанного органа или части органа и не происходит от эмбриона или эмбрионов человека,

причем полимерный материал представляет собой биосовместимый и биоразлагаемый полимер, выбранный из группы, состоящей из хитозана, хитина или их сополимера, гликозаминогликанов (GAG), коллагенов, алгинатов, декстранов и их смесей.

2. Протез по п.1, отличающийся тем, что полимер выбран из группы, состоящей из хитозана, хитина и их сополимеров, в частности хитин-глюкана.

3. Протез по п.1, отличающийся тем, что гликозаминогликан (GAG) выбран из гиалуроната, сульфата хондроитина, гепарина и их смесей.

4. Протез по п.2 или 3, отличающийся тем, что полимерный материал содержит по меньшей мере один другой биосовместимый и биоразлагаемый полимер, выбранный из группы, состоящей из гликозаминогликанов (GAG), в частности гиалуроната, сульфата хондроитина или гепарина, коллагенов, алгинатов, декстранов и их смесей.

5. Протез по п.1, отличающийся тем, что полимер скомбинирован по меньшей мере с одним биосовместимым и биоразлагаемым синтетическим полимером, выбранным из группы, состоящей из синтетических биоразлагаемых полиэфиров, таких как гомополимеры и сополимеры на основе молочной кислоты, гликолевой кислоты, эпислон-капролактона и п-диоксанона, или природного полиэфира, в частности из полигидроксиалканоев, таких как гомо- и сополимеры на основе гидроксибутирата, гидроксивалерата, полиортоэфиров и полиуретанов.

6. Протез по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что полимер представляет собой хитозан или его сополимер.

7. Протез по п.6, отличающийся тем, что хитозан получен путем деацетилирования хитина, причем источником хитина предпочтительно являются панцири ракообразных, эндоскелеты головоногих, кутикулы членистоногих, диатомеи или грибы, например клеточные оболочки грибов, и предпочтительным является хитин грибкового происхождения.

8. Протез по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что диаметр пор пористой части составляет более 10 мкм, предпочтительно от 10 до 200 мкм.

9. Протез по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что внутренний диаметр и толщина трубчатой основы выполнены в соответствии с внутренним диаметром и толщиной полого органа.

10. Протез по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что полый орган является пищеварительным, желчным, панкреатическим, мочевым, половым или кровеносным каналом, в частности пищеводом, кишечником, желудком, желчным протоком, протоком поджелудочной железы, уретрой, мочеточником, мочевым пузырем, фаллопиевыми трубами, маткой и кровеносными сосудами.

11. Протез по п.10, отличающийся тем, что полый орган является пищеводом.

12. Протез по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что биологический материал содержит клетки ткани органа, подлежащего восстановлению, или низкодифференцированные или недифференцированные клетки, предпочтительно фетальные клетки человека.

13. Протез по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что биологический материал является материалом фетального происхождения.

14. Протез по п.13, отличающийся тем, что материал фетального происхождения является органом, сегментом органа или клеточной эмульсией фетального происхождения.

15. Протез по п.14, отличающийся тем, что материал фетального происхождения находится во влажном и вязком состоянии, позволяющем улучшить его адгезию к поверхности основы.

16. Способ получения протеза по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что включает получение биоразлагаемой трубчатой основы, содержащей пористый наружный слой, обеспечивающий пролиферацию клеток, и непористый внутренний слой, и введение биологического материала, предназначенного для формирования протеза, на наружную поверхность, и/или внутрь по меньшей мере части пористого слоя основы, и/или на поверхность непористого слоя, обращенную к пористому слою, причем биологический материал не происходит от эмбриона или эмбрионов человека.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что получение пористого наружного слоя осуществляют путем лиофилизации.

18. Биоразлагаемая трубчатая основа по любому из пп.1-15 для восстановления по меньшей мере части полого органа.

19. Биосовместимый и биоразлагаемый пористый полимерный материал для хирургии полого органа трубчатой формы, выполненный из биосовместимого и биоразлагаемого полимера, определенного в любом из пп.1-7, причем указанный полимерный материал предназначен для формирования пористого слоя биоразлагаемой полой трубчатой основы, содержащей пористый наружный слой и непористый внутренний слой или состоящей из указанных слоев.

20. Полимерный материал по п.19, отличающийся тем, что биоразлагаемая полая трубчатая основа размещена таким образом, что пористый наружный слой расположен на наружной поверхности полого органа, а непористый внутренний слой расположен на внутренней поверхности полого органа.

21. Полимерный материал по п.19 или 20, отличающийся тем, что полимерный материал помещен в трубчатую форму и содержит дистальный конец и проксимальный конец, причем проксимальный конец предназначен для размещения на конце полностью или частично рассеченного полого органа, а дистальный конец предназначен для размещения на другом конце полностью или частично рассеченного полого органа.

22. Биосовместимый и биоразлагаемый непористый полимерный материал для хирургии полого органа трубчатой формы, выполненный из биосовместимого и биоразлагаемого полимера, определенного в любом из пп.1-7, причем указанный полимерный материал предназначен для формирования непористого слоя биоразлагаемой полой трубчатой основы, содержащей пористый наружный слой и непористый внутренний слой или состоящей из указанных слоев.

23. Применение полимерного материала по любому из пп.19-22 для получения протеза для восстановления полого органа.

24. Применение трубчатой основы по п.18 для получения протеза для восстановления полого органа.

25. Применение по п.23 или 24 для восстановления частей пищевода, пораженных патологическим процессом.

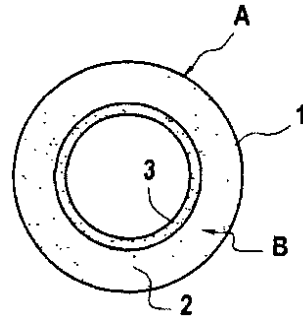
26. Применение по п.23 или 24, отличающееся тем, что орган выбран из кишечника, желчного протока, желудка, протока поджелудочной железы, мочевых протоков, таких как уретра и мочеточник, мочевого пузыря, кровеносных сосудов, фаллопиевых труб и матки.

27. Применение по любому из пп.23-26, отличающееся тем, что полый орган содержит часть, пораженную патологическим процессом или раком.

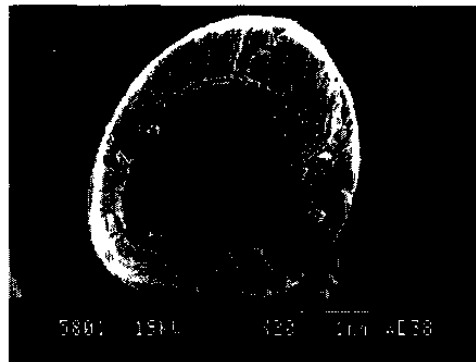
28. Способ хирургического лечения патологии, требующий рассечения или удаления по меньшей мере части сечения полого трубчатого органа, отличающийся тем, что включает рассечение или удале-

ние полного или частичного сечения полого трубчатого органа и размещение вблизи области рассечения или удаления протеза по любому из пп.1-15, трубчатой основы по п.18 или полимерного материала по любому из пп.19-22 для восстановления *in vivo* удаленной части.

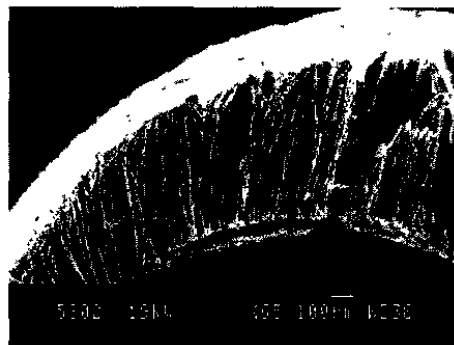
29. Способ по п.28, отличающийся тем, что его осуществляют в рамках хирургического лечения рака или ожога с образованием значительного стеноза.



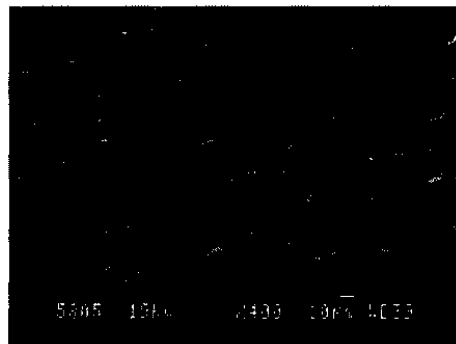
Фиг. 1



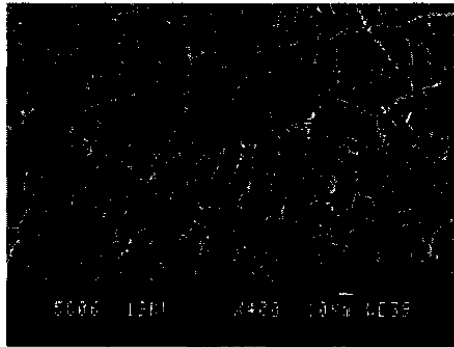
Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 2С

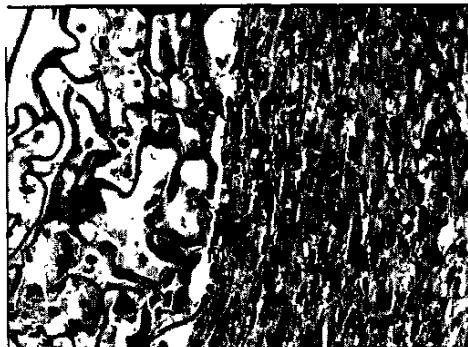


Фиг. 2D



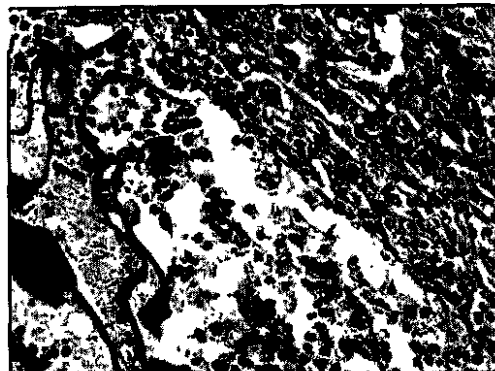
7 дней -X2.5

Фиг. 3A



7 дней -X40

Фиг. 3B



14 дней -X40

Фиг. 3C



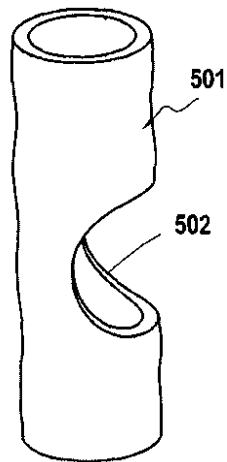
2 месяца -X20

Фиг. 4А

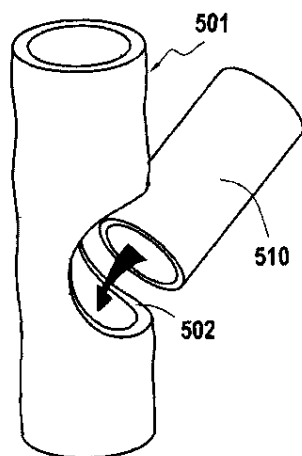


3 месяца -X5

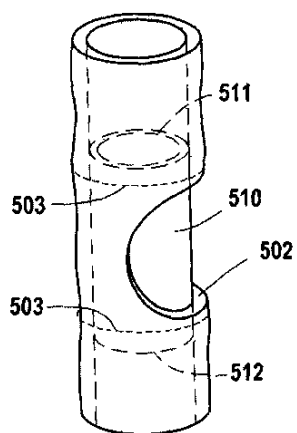
Фиг. 4В



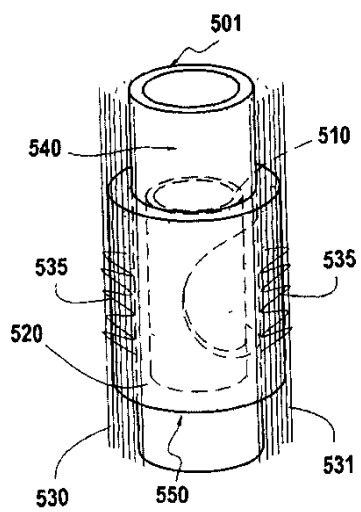
Фиг. 5А



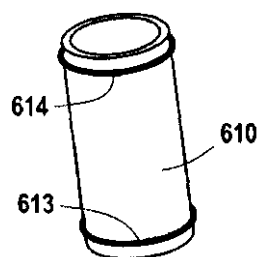
Фиг. 5В



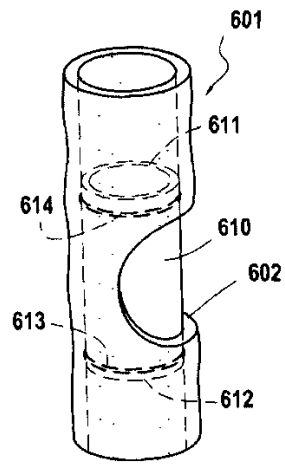
Фиг. 5С



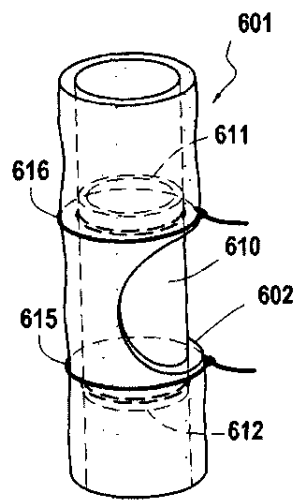
Фиг. 5D



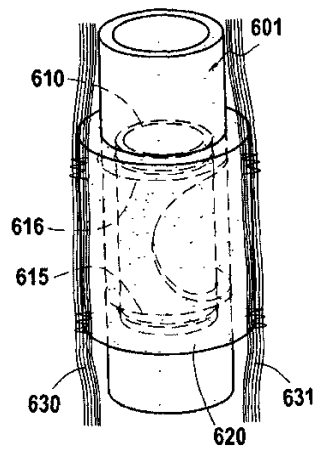
Фиг. 6А



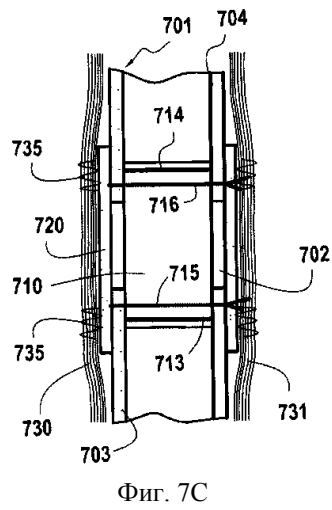
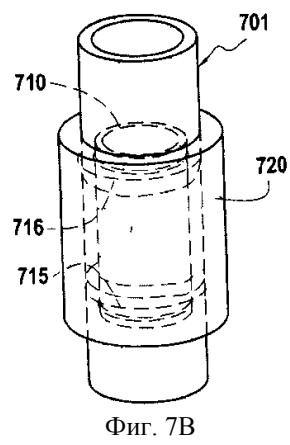
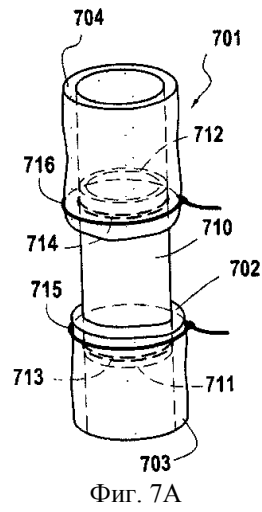
Фиг. 6В



Фиг. 6С



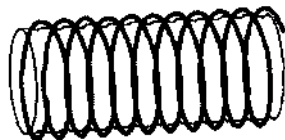
Фиг. 6D



Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 8С

