



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A61F 2/04 (2018.02); A61F 2/10 (2018.02)

(21)(22) Заявка: 2016152317, 29.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
29.12.2016

Дата регистрации:  
19.07.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.12.2016

(43) Дата публикации заявки: 02.07.2018 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 19.07.2018 Бюл. № 20

Адрес для переписки:

119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2, ФГБОУ  
ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова,  
технопарк

(72) Автор(ы):

Люндуп Алексей Валерьевич (RU),  
Дюжева Татьяна Геннадьевна (RU),  
Крашенинников Михаил Евгеньевич (RU),  
Клабуков Илья Дмитриевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования Первый Московский  
государственный медицинский университет  
им. И.М. Сеченова Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.  
Сеченова Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: ЕА 201070324 А1, 29.10.2010. RU  
2463971 С1, 20.10.2012. Т.Г. ДЮЖЕВА и др.  
Перспективы создания тканеинженерного  
желчного протока// Гены & Клетки, 2016,  
Том XI, N1, с. 43-47. ANTHONY D  
METCALFE et al. Tissue engineering of  
replacement skin: the crossroads of  
biomaterials, wound healing, embryonic  
development, stem cells and regeneration// J R  
Soc (см. прод.)

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к медицине и может быть использовано для получения тканеинженерной конструкции. Для этого фрагмент нативной кожи, полученный при биопсии, резекции, удалении органа и аспирации, в стерильных условиях помещается в контейнер с транспортной средой, фрагмент ткани вне организма помещают в полную питательную среду, состоящую из полной питательной среды

DMEM/F12 и 10% фетальной бычьей сыворотки, на дно чашки Петри дермальной стороной вверх, последнюю соединяют с мембраной из биосовместимого материала. Изобретение обеспечивает получение тканеинженерных конструкций с включением клеток кожи, для которых стадия культивирования in vitro является нежелательной. 1 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

Interface. 2007 Jun 22; 4(14): 413-437.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61F 2/04* (2013.01)  
*A61F 2/10* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*A61F 2/04 (2018.02); A61F 2/10 (2018.02)*

(21)(22) Application: **2016152317, 29.12.2016**

(24) Effective date for property rights:  
**29.12.2016**

Registration date:  
**19.07.2018**

Priority:

(22) Date of filing: **29.12.2016**

(43) Application published: **02.07.2018** Bull. № 19

(45) Date of publication: **19.07.2018** Bull. № 20

Mail address:

**119991, Moskva, ul. Trubetskaya, 8, str. 2, FGBOU  
VO Pervyj MG MU im. I.M. Sechenova, tekhnopark**

(72) Inventor(s):

**Lyundup Aleksej Valerevich (RU),  
Dyuzheva Tatyana Gennadevna (RU),  
Krashennnikov Mikhail Evgenevich (RU),  
Klabukov Ilya Dmitrievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya Pervyj Moskovskij  
gosudarstvennyj meditsinskij universitet im. I.M.  
Sechenova Ministerstva zdravookhraneniya  
Rossijskoj Federatsii (FGBOU VO Pervyj  
MG MU im. I.M. Sechenova Minzdrava Rossii)  
(RU)**

(54) **METHOD OF OBTAINING TISSUE ENGINEERING STRUCTURE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present invention relates to medicine and can be used to produce a tissue engineering construct. To do this, a fragment of native skin obtained by biopsy, resection, removal of the organ and aspiration, is placed under sterile conditions in a container with a transport medium, a piece of tissue outside the body is placed in a complete nutrient

medium consisting of the complete DMEM/F12 culture medium and 10 % fetal bovine serum at the bottom of the Petri dish with the dermal side up, the latter connected to a membrane of biocompatible material.

EFFECT: invention provides tissue engineering structures with inclusion of skin cells for which the in vitro cultivation stage is undesirable.

1 cl, 1 dwg, 1 ex

Настоящее изобретение относится к медицине и ветеринарии, а именно к способам создания тканеинженерных конструкций.

5 Тканеинженерные конструкции представляют собой биомедицинский клеточный продукт, который состоит из клеток (клеточных линий), биосовместимого материала и вспомогательных веществ.

Термин «тканеинженерная конструкция» означает любой биомедицинский клеточный продукт, который состоит из клеточной линии (клеточных линий) и биосовместимого материала (Atala A, Kasper FK, Mikos AG. Engineering complex tissues. Sci Transl Med. 2012; Nov 14; 4(160): 160rv12).

10 Термин «биосовместимый материал» означает любой биосовместимый материал природного или синтетического происхождения. Например, к таким материалам относятся биосовместимые полимеры (полилактат и полиглюконат), биосовместимые металлы и сплавы (титан, платина, золото), биосовместимые природные полимеры (коллаген).

15 Термин «клетка» означает любую живую клетку, содержащуюся в биологической ткани млекопитающего, например человека.

Тканеинженерные конструкции используются при создании биологических заместителей для восстановления или улучшения функционирования тканей (Skalak, R., and C.F. Fox. 1988. Tissue engineering. New York: Liss). Клетки как компонент конструкции  
20 могут быть получены из разных источников и находиться на разных стадиях дифференцировки от малодифференцированных клеток до высокодифференцированных специализированных клеток. Биосовместимые материалы могут быть природного или синтетического происхождения.

Известные способы получения тканеинженерных конструкций требуют приготовления  
25 суспензии клеток и нанесения этой суспензии на биосовместимый материал.

Патент EP 1002859 A1 раскрывает способ создания тканеинженерной конструкции, в котором пористый волокнистый материал заполняется суспензией клеток.

30 Патент EP 2075015 B1 раскрывает способ получения мышечной тканеинженерной конструкции путем заселения пористого биоматериала суспензией гладкомышечных клеток.

Патент US 5716404 A раскрывает тканеинженерную конструкцию для реконструкции молочной железы, в которой клетки (мезенхимальные стволовые клетки, миоциты, хондроциты, адипоциты, миофибробласты) соединяются с полимерным матриксом.

35 Патент US 5861313 A раскрывает тканеинженерную конструкцию, в которой выделенные эпителиальные и мезенхимальные клетки желчного протока млекопитающих используются для заселения трехмерного матрикса.

Патент CA 2351396 раскрывает тканеинженерную конструкцию для реконструкции кожи, в которой выделенные кератиноциты и фибробласты дермы производят биосовместимый материал в качестве компонента конструкции.

40 Общим недостатком всех вышеуказанных способов является наличие стадии культивирования клеток *in vitro*. Культивация *in vitro* некоторых специализированных клеток, в частности эпителиоцитов желчного протока, может приводить к потере их функций и ограничивать последующую экспансию клеток в составе тканеинженерной конструкции (Culture of Epithelial Cells, Second Edition. Edited by R. Ian Freshney and Mary  
45 G. Freshney. P.8).

Чтобы избежать стадии выделения клеток, в альтернативных способах получения тканеинженерных конструкций биосовместимый материал имплантируется в ткани организма *in vivo*.

Патент US 6309635 B1 раскрывает способ получения тканеинженерной конструкции внутри организма с целью улучшения условий прорастания сосудов и соединительной ткани путем имплантации биосовместимого материала в организм млекопитающего. Конструкция представляет собой гибридный органоид, состоящий из паренхиматозных 5 клеток, взятых из одной ткани, и сосудистых, а также внеклеточных элементов, взятых из другой ткани того же организма, на полимерной матрице. Недостатком метода является необходимость проведения дополнительных операций по имплантации биосовместимого материала в организм и по его дальнейшему извлечению с целью повторной имплантации в область предполагаемого использования конструкции. 10 Данная особенность значительно ограничит клиническое применение тканеинженерных конструкций, полученных описанным способом, т.к. увеличит травматизацию больных, сроки лечения и дальнейшего восстановления, а также риски послеоперационных осложнений.

Проблемой, решаемой изобретением, является способ создания тканеинженерной 15 конструкции, в котором фрагмент нативной кожи соединяется с биосовместимым материалом вне организма.

Указанная проблема решается способом получения тканеинженерной конструкции, заключающимся в том, что фрагмент нативной кожи соединяют с биосовместимым 20 материалом вне организма.

Технический результат состоит в улучшении функции клеток на материале каркаса за счет выхода клеток из ткани-источника клеток непосредственно на биосовместимый материал, увеличении популяции выделенных клеток и устранении риска повреждения 25 клеток при их ферментативном снятии с культуральной поверхности, что позволяет сократить объем забираемой ткани-источника клеток, а также общие сроки создания тканеинженерной конструкции.

Способ осуществляют следующим образом, выполняя последовательные этапы.

1. Фрагмент нативной кожи, полученный при биопсии, резекции, удалении органа и аспирации, в стерильных условиях помещают в контейнер с транспортной средой, состоящей из специализированных питательных сред с добавлением высокой дозы 30 антибиотиков для снижения рисков контаминации выделяемой культуры клеток. Транспортировку контейнера с фрагментом нативной ткани осуществляют в специальном медицинском термоконтейнере с хладоэлементами, исключающем значительные колебания температуры. Время транспортировки не должно превышать 24 часа с момента забора нативной ткани, т.к. более длительные сроки транспортировки 35 приводят к снижению жизнеспособности клеток в забранной ткани.

2. Вне организма, в стерильных условиях, фрагмент нативной кожи помещают в полную питательную среду, состоящую, например, из полной питательной среды DMEM/F12 и 10% фетальной бычьей сыворотки, на дно чашки Петри эпителиальной стороной 40 вверх. Дополнительным действием может быть обработка ферментами (коллагеназы, трипсин, диспазы и др.) нативной ткани для облегчения дальнейшей миграции клеток на поверхность биосовместимого материала.

3. Далее фрагмент кожи соединяют с поверхностью биосовместимого материала путем создания физического контакта, например, помещая сверху на дермальную 45 сторону кожи каркас из биосовместимого материала в присутствии полной питательной среды. Соединение фрагмента ткани с поверхностью биосовместимого материала также может быть осуществлено не только на плоскости, но и в трехмерном пространстве в присутствии полной питательной среды. Соединенные фрагменты помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и повышенной влажности.

4. Создание тканеинженерной конструкции вне организма может быть подтверждено с помощью проведения морфологического (гистологического) исследования или с помощью различных методов микроскопии. Предпочтительным методом является конфокальная микроскопия, которая может быть осуществлена без фиксации

5 исследуемого образца тканеинженерной конструкции с оценкой жизнеспособности клеток, входящих в ее состав, что необходимо для оценки качества планируемой для имплантации тканеинженерной конструкции. Также конфокальная микроскопия позволяет определять особенности распределения клеток внутри трехмерных конструкций.

10 Приводим конкретный пример осуществления способа. Пример является иллюстративным и не ограничивает охват изобретения.

#### Пример 1

Настоящий пример иллюстрирует способ получения тканеинженерной конструкции на основе фрагмента нативной кожи.

15 Фрагмент кожи был забран после получения информированного согласия в условиях процедурного кабинета и помещен в контейнер с транспортной средой, состоящей из DMEM/F12 с 3% пенициллина-стрептомицина (Gibco). Вне организма, в стерильных условиях фрагмент поместили в полную питательную среду, состоящую из DMEM/F12 и фетальной бычьей сыворотки (Gibco), на дно чашки Петри эпителиальной стороной

20 вниз. Фрагмент нативной кожи был соединен с мембраной из хитозана путем создания физического контакта - сверху на дермальный слой кожи был помещен каркас из биосовместимого материала в присутствии полной питательной среды.

На 7-е сутки дермальные фибробласты вышли из эпителия фрагмента кожи и заполнили мембрану из биосовместимого материала, что было определено с помощью

25 световой микроскопии при фазовом контрасте. Таким образом, была получена тканеинженерная конструкция-заменитель для использования в качестве искусственной кожи на основе соединения нативной биологической ткани с биосовместимым материалом вне организма. Представлено на рис. 1, где 1 - тканеинженерная конструкция, состоящая из фрагмента нативной кожи - 2, соединенной с биосовместимым

30 материалом хитозаном - 3.

Таким образом, в предлагаемом способе фрагмент нативной кожи соединяется с биосовместимым материалом вне организма.

Способ по изобретению позволяет создавать тканеинженерную конструкцию с включением любых типов клеток, для которых стадия культивирования *in vitro* является

35 нежелательной, в том числе и дермальных фибробластов.

#### (57) Формула изобретения

Способ получения тканеинженерной конструкции, заключающийся в том, что фрагмент нативной кожи соединяют с биосовместимым материалом вне организма.

40

45

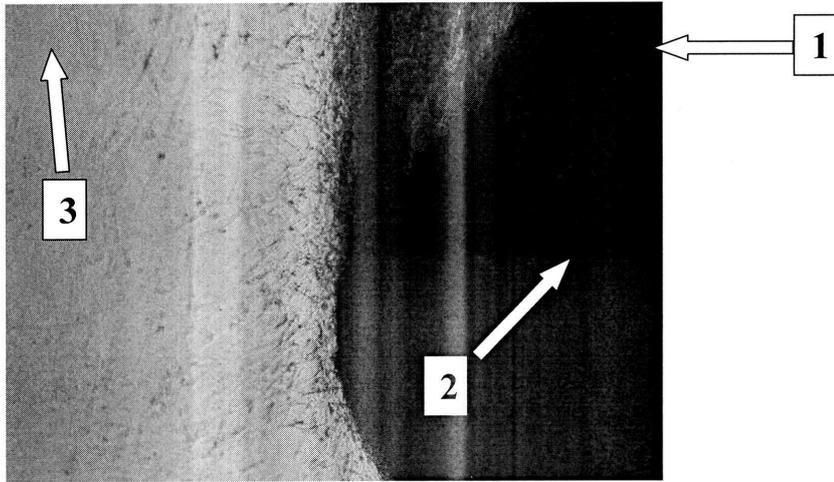


Рис. 1. Фазовый контраст, увел.  $\times 100$ .