

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490016 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.29

(22) Дата подачи заявки
2023.07.25

(51) Int. Cl. A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)

(54) НЕРВНЫЙ ТРАНСПЛАНТАТ КЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 202210982152.0

(32) 2022.08.16

(33) CN

(86) PCT/CN2023/109010

(71) Заявитель:
НАНЬТУН УНИВЕРСИТИ (CN)

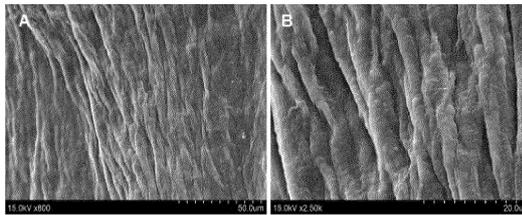
(72) Изобретатель:

Ли Мэйюань, Гу Синчжун, Сюй
Линчи, Гун Лэйлэй, Сунь Хуалинь,
Ван Шаньшань, Ван Хункуй, Цянь
Тяньмэй, Сюй Лай (CN)

(74) Представитель:

Забегаета У.Г., Мурашев П.М.,
Давыдова Е.Л. (RU)

(57) В настоящем изобретении раскрыт нервный трансплантат клеточного матрикса для восстановления повреждений периферических нервов и способ его получения. Нервные трансплантаты клеточного матрикса включают в себя бесклеточный матрикс и каркас, причем бесклеточный матрикс получают путем секретирования и образования децеллюляризирующих стволовых клеток, а бесклеточный матрикс обернут вокруг каркаса, что позволяет преодолеть недостатки восстановления после трансплантации аутологичного нерва и избежать иммуногенности восстановления после трансплантации аллогенных клеток, обеспечить нервный трансплантат клеточного матрикса, способствующий пролиферации и миграции нервных клеток, и создать благоприятную среду для роста аксонов, что позволяет достичь целей регенерации нервов и функционального восстановления, а также предоставляет реальные решения для лечения клинических неврологических дефектов.



A1

202490016

202490016

A1

Нервный трансплантат клеточного матрикса для восстановления поврежденных периферических нервов и способ его получения

1. Область техники

[0001] Изобретение относится к нервному трансплантату клеточного матрикса для восстановления поврежденных периферических нервов и способу его получения и относится к области техники медицинских биоматериалов, которые можно имплантировать в организм человека.

2. Уровень техники

[0002] Повреждение периферических нервов чрезвычайно распространено в клинической практике, что не только серьезно влияет на качество жизни пациентов, но и увеличивает их финансовую нагрузку. В предшествующем уровне техники для устранения дефектов периферических нервов на небольших расстояниях обычно используют микрохирургическое выравнивающее ушивание. Восстановление крупных дефектов периферических нервов на расстоянии достигается за счет аутологичной трансплантации нервов и трансплантации каркасного материала; среди них аутологичная трансплантация нервов является золотым стандартом для восстановления нервов при трансплантации, то есть для удаления сегмента аутологичного нерва, такого как медиальный или латеральный кожный нерв, локтевой нерв, бедренный нерв или ветвь лучевого нерва предплечья, используется хирургическое вмешательство, а затем трансплантация и восстановление поврежденного нерва, шванновские клетки в трансплантате активируются и выделяют большое количество нейротрофических факторов, что позволяет аксонам быстро регенерировать. Однако из-за ограниченного источника доноров, иммунного отторжения, непостоянного соответствия

диаметров нервов и необратимой потери нервов в донорской области клиническое применение аутологичной трансплантации нервов ограничено. Применение биологических строительных материалов заключается в том, чтобы заставить нервы расти в определенном направлении и предотвратить образование невром, однако процесс восстановления и регенерации занимает много времени, скорость регенерации нервов относительно медленная, а эффекторы и рецепторы быстро атрофируются.

[0003] Тканеинженерные нервные трансплантаты представляют собой органическое единство, состоящее из материалов каркаса, опорных клеток, внеклеточного матрикса, факторов роста нервов и других компонентов, они могут служить мостом, направляющим растяжение сломанных нервных волокон от проксимального конца повреждения к дистальному концу, однако их клиническое воплощение имеет множество проблем, например, тип и количество клеток или факторов, жизнеспособность клеток или активность факторов, стабильность клеточного фенотипа, время лечения, регуляторные вмешательства и высокие затраты.

[0004] Бесклеточный матрикс (АСМ) как возможный тканеинженерный трансплантат постепенно завоевывает популярность у исследователей и используется для восстановления поврежденных тканей. Аллогенная или разнородная нервная (или неневральная) ткань децеллюляризуется различными физическими, химическими и ферментативными методами гидролиза, которые позволяют привести к получению бесклеточного матрикса тканевого происхождения. Тканевый бесклеточный матрикс – это неклеточный биологический материал, пригодный для получения нервных каркасов, которые могут быть использованы в качестве замены аутологичных нервных трансплантатов для устранения дефектов периферических нервов. По сравнению

с каркасами, полученными из одного компонента внеклеточного матрикса, каркасы из бесклеточного матрикса тканевого происхождения (также известные как бесклеточные нервные трансплантаты) обладают лучшей способностью сохранять базовую структуру исходной ткани и способствовать регенерации периферических нервов. Хотя каркасы из бесклеточного матрикса тканевого или органического происхождения обладают биохимическими и физическими факторами, которые поддерживают рост тканей или клеток, получение донорской ткани постоянного качества по-прежнему является ключевым ограничением. Кроме того, они также имеют некоторые дефекты, такие как потенциальная иммуногенность, перенос патогенов, неконтролируемая деградация, высокие производственные затраты и другие связанные с этим проблемы. Таким образом, восстановление и регенерация клинических периферических нервов после травмы по-прежнему остается огромной проблемой.

Суть изобретения

[0005] Целью настоящего изобретения является преодоление недостатков предшествующего уровня техники и создание нервного трансплантата клеточного матрикса для восстановления повреждений периферических нервов и способа его получения, который способствует адгезии и миграции клеток, а также регенерации нервов и функциональному восстановлению.

[0006] Для достижения вышеуказанных целей технические решения, принятые в настоящем изобретении, заключаются в следующем/

[0007] В первом аспекте настоящее изобретение предлагает нервный трансплантат клеточного матрикса для восстановления повреждений периферических нервов, включающий в себя бесклеточный матрикс и каркас, причем бесклеточный матрикс получен путем секретирования и образования

децеллюляризирующих стволовых клеток, он сохраняет различные важные компоненты и каркасы внеклеточного матрикса, облегчает адгезию нервных клеток и направляет регенерацию аксонов, ускоряет регенерацию периферических нервов и функциональное восстановление; бесклеточный матрикс обернут вокруг каркаса.

[0008] Кроме того, в сочетании с первым аспектом стволовые клетки представляют собой мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека, которые облегчают клиническую трансформацию тканеинженерных нервных трансплантатов.

[0009] Кроме того, каркас представляет собой биоразлагаемый каркас, включающий в себя хитозан и рекомбинантный человеческий коллаген, который характеризуется хорошей биосовместимостью и способностью к разложению и играет важную роль в определении направления роста для регенерации аксонов.

[0010] Во втором аспекте настоящее изобретение также предлагает способ получения нервного трансплантата клеточного матрикса для восстановления повреждений периферических нервов в соответствии с любым из вышеперечисленных пунктов, включающий в себя следующие этапы:

[0011] получение бесклеточного матрикса;

оборачивание бесклеточного матрикса вокруг каркаса для построения исходной формы нервного трансплантата клеточного матрикса;

[0012] размещение исходной формы нервного трансплантата клеточного матрикса при температуре 2-6°C по меньшей мере на 24 часа для самосборки с образованием трубчатой структуры;

[0013] обработка трубчатой структуры с помощью лиофилизации для создания нервного трансплантата клеточного матрикса. Нервные трансплантаты клеточного матрикса, полученные этим методом, не содержат экзогенных

токсичных веществ, поступающих в процессе получения, и обладают хорошей биосовместимостью и биоразлагаемыми свойствами, а также хорошими механическими свойствами.

[0014] Кроме того, в сочетании со вторым аспектом бесклеточный матрикс оборачивают вокруг биоразлагаемого каркаса в несколько слоев, причем указанный каркас является осью, и может самособираться с образованием трубчатой структуры, обеспечивая необходимый путь для роста нервных клеток, направляя и ориентируя на рост.

[0015] Кроме того, бесклеточный матрикс наматывают до 6, 9 или 12 слоев вокруг биоразлагаемого каркаса, причем биоразлагаемый каркас служит в качестве оси.

[0016] Кроме того, температура лиофилизации составляет -80°C .

[0017] Кроме того, процесс получения бесклеточного матрикса заключается в следующем:

[0018] мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека разводят в большой чашке, когда насыщение клеток будет $\geq 90\%$, добавляют бессывороточную культуральную среду, содержащую аскорбиновую кислоту, для стимуляции в течение 7-14 дней, чтобы стимулировать клетки к секреции внеклеточного матрикса;

[0019] промывают фосфатным буфером, добавляют стерилизованную сверхчистую воду для обеспечения низкой проницаемости, удаляют стерилизованную сверхчистую воду, добавляют клеточный лизат для экстракции, а затем промывают фосфатным буфером для получения бесклеточного матрикса.

[0020] По сравнению с предшествующим уровнем техники положительные эффекты, достигаемые настоящим изобретением, заключаются в следующем.

[0021] Настоящее изобретение позволяет получить природный внеклеточный

матрикс путем культивирования клеток и их децеллюляризации, сохраняя различные важные компоненты и каркасы внеклеточного матрикса, что способствует адгезии нервных клеток и управлению регенерацией аксонов, ускоряя регенерацию периферических нервов и функциональное восстановление;

[0022] нервные трансплантаты клеточного матрикса не содержат экзогенных токсичных веществ, поступающих в процессе получения, и обладают хорошей биосовместимостью и биоразлагаемыми свойствами, а также хорошими механическими свойствами;

[0023] отбор мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека и использование бессывороточной культуральной среды для облегчения клинической трансформации тканеинженерных нервных трансплантатов;

[0024] бесклеточный матрикс обернут вокруг биоразлагаемого каркаса и может самособираться с образованием трубчатой структуры, обеспечивая необходимый путь для роста нервных клеток, направляя и ориентируя на рост;

[0025] нервный трансплантат клеточного матрикса, полученный способом настоящего изобретения, позволяет избежать иммуногенности трансплантации аллогенных клеток и пригоден для использования в крупномасштабных популяциях.

Описание прилагаемых чертежей

[0026] Фиг. 1 представляет собой изображение, полученное с помощью светового микроскопа до и после получения бесклеточного матрикса, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, при этом фиг. А представляет собой изображение стволовых клеток, полученное с помощью светового микроскопа до децеллюляризации, фиг. В представляет собой изображение матрикса, полученное с помощью светового микроскопа после

децеллюляризации.

[0027] Фиг. 2 представляет собой иммунохимическую диаграмму коллагена IV и фибронектина бесклеточного матрикса, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, при этом фиг. А показывает окрашивание коллагена IV, а фиг. В показывает окрашивание фибронектина.

[0028] Фиг. 3 представляет собой изображение бесклеточного матрикса, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, при этом фиг. А представляет собой изображение, полученное электронным микроскопом с увеличением в 2500 раз, а В — изображение, полученное электронным микроскопом с увеличением в 5000 раз.

[0029] Фиг. 4 представляет собой изображение нервного трансплантата клеточного матрикса, полученного с помощью сканирующего электронного микроскопа, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, при этом фиг. А представляет собой изображение, полученное электронным микроскопом с увеличением в 800 раз, В — изображение, полученное электронным микроскопом с увеличением в 2500 раз.

[0030] Фиг. 5 представляет собой схематическую диаграмму результатов электрофизиологического обнаружения регенеративных нервов, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, левая сторона представляет собой диаграмму формы сигнала сложного потенциала действия мышц каждой группы, при этом фиг. А представляет собой группу клеточного матрикса, В представляет собой аутологичную группу, а С — группу фиктивных операций; справа показан сравнительный график амплитуд потенциалов действия регенерированных нервных соединений мышц разных образцов в каждой группе, **** $p < 0,0001$.

[0031] Фиг. 6 представляет собой изображение поперечного сечения средней части регенерированного нерва, полученное с помощью трансмиссионного электронного микроскопа, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, верхняя часть представляет собой изображение каждой группы миелиновых оболочек, полученное трансмиссионным электронным микроскопом, увеличенное в 20000 раз, при этом фиг. А представляет собой группу клеточного матрикса, В представляет собой аутологичную группу, а С — группу фиктивных операций; нижняя часть представляет собой сравнительный график количества миелиновых пластинок в каждой группе, **** $p < 0,0001$.

[0032] Фиг. 7 представляет собой схематическую диаграмму результатов соотношения сырой массы целевой мышцы, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, верхняя часть представляет собой морфологическую диаграмму внешнего вида икроножной мышцы каждой группы, при этом фиг. А представляет собой группу клеточного матрикса, В представляет собой аутологичную группу, а С — группу фиктивных операций; в нижней части показан анализ соотношения сырой массы икроножных мышц в каждой группе, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

[0033] Фиг. 8 представляет собой диаграмму результатов реконструкции подвижной концевой пластины, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, при этом верхняя часть представляет собой схематическое изображение зрелости подвижной концевой пластины; средняя часть представляет собой наблюдение подвижной концевой пластины каждой группы, при этом фиг. А представляет собой группу клеточного матрикса, В представляет собой аутологичную группу, а С — группу фиктивных операций; нижняя часть — гистограмма статистического анализа пропорций подвижной концевой пластины на разных стадиях.

[0034] Фиг. 9 представляет собой диаграмму, показывающую результаты площади поперечного сечения целевых мышечных волокон, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, при этом верхняя часть представляет собой поперечное сечение волокон икроножной мышцы в каждой группе, при этом фиг. А представляет собой группу клеточного матрикса, В представляет собой аутологичную группу, а С — группу фиктивных операций; нижняя часть представляет собой сравнительный график площади поперечного сечения волокон икроножной мышцы в каждой группе, $**p<0,01$, $****p<0,0001$.

Конкретные примеры осуществления

[0035] Настоящее изобретение будет дополнительно описано ниже со ссылкой на прилагаемые чертежи. Следующие примеры осуществления используются исключительно для более наглядной иллюстрации технической схемы настоящего изобретения и не могут быть использованы для ограничения объема защиты настоящего изобретения.

[0036] Пример осуществления 1:

[0037] Получение бесклеточного матрикса

[0038] Клетки hBMSC поколения P3 (приобретенные из банка клеток ATCC) отбирают и высевают в большую чашку в концентрации 10^5 клеток/мл, когда насыщение клеток достигает $\geq 90\%$, для стимуляции добавляют бессывороточную культуральную среду, содержащую аскорбиновую кислоту, в этом примере осуществления стимуляция выбрана на 7-14 дней, чтобы стимулировать секрецию клетками внеклеточного матрикса;

[0039] после 3-кратной промывки фосфатным буфером добавляют стерилизованную сверхчистую воду и поддерживают гипотоничность при $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ не менее 10 мин;

[0040] удаляют стерилизованную сверхчистую воду, добавляют клеточный лизат, состоящий из 3% Тритон X-100 и 2% SDS, экстрагируют при $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение не более 5 минут, 3 раза промывают фосфатным буфером до получения бесклеточного матрикса.

[0041] В этом примере осуществления мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека стимулируют аскорбиновой кислотой в течение 10 дней, со временем секретиремый ими внеклеточный матрикс постепенно утолщается, на более поздней стадии клетки стареют, и их адгезионные характеристики снижаются, внеклеточный матрикс имеет «скручивающиеся края», что приводило к получению некалтифицированных образцов.

[0042] Бесклеточный матрикс, полученный в этом примере осуществления, пропитывают фосфатным буфером и хранят в диапазоне низких температур $2\text{--}6\text{ }^{\circ}\text{C}$, в этом примере осуществления было выбрано хранение при низкой температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение примерно 2 недель. Полученный бесклеточный матрикс показан на снимке светового микроскопа В на фиг. 1, причем А на фиг. 1 представляет собой изображение светового микроскопа предварительно децеллюляризованных стволовых клеток.

[0043] Частичные компоненты бесклеточного матрикса идентифицировали с помощью иммунохимии с коллагеном IV и фибронектином: полученный бесклеточный матрикс стабилизировали 4% параформальдегидом при комнатной температуре в течение 30 минут, 3 раза промывали фосфатным буфером, а затем первичным антителом: кроличьим антиколлагеном IV (1:100), овечий антифибронектин (1:100), инкубированный при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение ночи;

[0044] после 3-кратной промывки фосфатным буфером добавляют вторичные антитела: СуЗ-козий антикроличий IgG (H+L) (1:600) и анти-овечий (AF647) (1:500) и инкубируют при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение ночи;

[0045] промывают 3 раза фосфатным буфером, запечатывают предметные стекла окрашиванием DAPI и детектируют с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии (DMR, Leica), как показано на фиг. 2, это иммунохимическая диаграмма коллагена IV и фибронектина бесклеточного матрикса, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, при этом на фиг. А показано окрашивание коллагена IV, а на фиг. В – окрашивание фибронектином.

[0046] В настоящем изобретении используется бесклеточный матрикс, полученный из культивируемых клеток, который, по сравнению с бесклеточным матриксом тканевого происхождения, устраняет перенос патогенов во время культивирования и размножения; он может преодолевать исходные структурные ограничения внеклеточного матрикса тканевого или органного происхождения, а комбинация инженерных биоматериалов обеспечивает контролируемую скорость биоразложения и эффективные механические свойства, сохраняя при этом геометрию и гибкость, необходимые для каркаса.

[0047] Клеточный матрикс в тканеинженерном нервном трансплантате, используемом в настоящем изобретении, получают путем децеллюляризации после секреции и образования культивируемыми клетками, новый нервный трансплантат клеточного матрикса создается путем объединения бесклеточного матрикса, полученного из hBMSC, с биоразлагаемым каркасом. Иммуногенность снижается или устраняется после трансплантации, что делает ее пригодной для использования в крупных популяциях; более того, BMSC согласно настоящему изобретению имеют человеческое происхождение и культивируются в бессывороточной среде в течение этого периода, закладывая прочную основу для клинической трансформации тканеинженерных нервных трансплантатов.

[0048] Пример осуществления 2

[0049] Электронная микроскопия бесклеточного матрикса

[0050] На фиг. 3 показано изображение бесклеточного матрикса, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, при этом фиг. А представляет собой изображение, полученное электронным микроскопом с увеличением в 2500 раз, а В — изображение, полученное электронным микроскопом с увеличением в 5000 раз. Результаты сканирующей электронной микроскопии показали, что бесклеточный матрикс имел плотную волокнистую сетчатую структуру, со сферическими веществами разного размера, распределенными между волокнами сетки, и расположение волокон имело определенную направленность.

[0051] Конкретный способ электронной микроскопии бесклеточного матрикса в этом примере осуществления заключается в следующем:

[0052] бесклеточный матрикс помещают на круглое предметное стекло диаметром 14 мм, стабилизируют его 4% глутаровым альдегидом в холодильнике при 4°C в течение 2-4 часов и промывают фосфатным буфером 3 раза по 10 минут каждый раз;

[0053] стабилизируют в 1% осмиевой кислоте при комнатной температуре в темноте в течение 2 часов, промывают водой двойной дистилляции 3 раза по 10 минут;

[0054] затем проводят градиентную дегидратацию этанола (концентрация этанола составляет 30%, 50%, 70%, 80%, 95%) в течение минимум 10 минут каждый раз и, наконец, выдерживают в абсолютном этаноле на ночь, заменяют свежим абсолютным этанолом на следующий день, заменяют абсолютный этанол изоамилацетатом (соотношение 1:1, 1:2, чистый изоамилацетат), а затем сушат с помощью сушилки с критической точкой, после золочения наблюдают под

сканирующим электронным микроскопом Хитачи S-3400II.

[0055] Пример осуществления 3

[0056] Создание нервных трансплантатов клеточного матрикса

[0057] Используя штангенциркуль для измерения, желеобразный мембраноподобный бесклеточный матрикс толщиной около 0,12 мм сворачивают вокруг биоразлагаемого каркаса в три слоя по 6, 9 или 12 слоев и оборачивают вокруг биоразлагаемого каркаса для создания первоначальной формы нервного трансплантата клеточного матрикса. Исходную форму нервного трансплантата клеточного матрикса помещают при 2-6°C на по меньшей мере 24 часа для самосборки с образованием трубчатой структуры, в этом примере осуществления выбрана температура 4°C для самосборки на 24 часа, затем лиофилизируют при -80°C для создания нервного трансплантата клеточного матрикса.

[0058] Фиг. 4 представляет собой изображение нервного трансплантата клеточного матрикса, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, при этом фиг. А представляет собой изображение, полученное электронным микроскопом с увеличением в 800 раз, В — изображение, полученное электронным микроскопом с увеличением в 2500 раз; результаты сканирующей электронной микроскопии показали, что трансплантат обладал определенной направленностью, а между волокнами были распределены сферические вещества разного размера.

[0059] Конкретными способами сканирующей электронной микроскопии являются следующее:

[0060] нервный трансплантат клеточного матрикса разрезают продольно от середины, стабилизируют его 4% глутаровым альдегидом в холодильнике при температуре 4°C в течение 2-4 часа и промывают его фосфатным буфером три 3

раза по 10 минут каждый раз;

[0061] стабилизируют в 1% осмиевой кислоте при комнатной температуре в темноте в течение 2 часов, промывают водой двойной дистилляции 3 раза по 10 минут;

[0062] затем проводят градиентную дегидратацию этанола (концентрация этанола составляет 30%, 50%, 70%, 80%, 95%) в течение 10 минут каждый раз, выдерживают в абсолютном этаноле на ночь, заменяют свежим абсолютным этанолом на следующий день, заменяют абсолютный этанол изоамилацетатом (соотношение 1:1, 1:2, чистый изоамилацетат), а затем сушат с помощью сушилки с критической точкой, после золочения наблюдают под сканирующим электронным микроскопом Хитачи S-3400II.

[0063] Пример осуществления 4

[0064] Восстановление дефектов седалищного нерва у крыс с использованием нервного трансплантата клеточного матрикса

[0065] Трансплантаты клеточного матрикса нерва были использованы для устранения дефектов седалищного нерва у крыс, а скорость регенерации нервов и состояние восстановления функции седалищного нерва определяют с помощью электрофизиологии, трансмиссионной электронной микроскопии, иммуногистохимии и др., конкретные этапы заключаются в следующем:

[0066] сначала была создана модель дефекта седалищного нерва толщиной 10 мм у крыс и случайным образом разделена на 3 группы А, В и С, в группе А, которая называется группой клеточного матрикса, использовались нервные трансплантаты клеточного матрикса для устранения дефекта седалищного нерва крысы; в группе В, которая называется аутологичной группой, использовались аутологичные нервы для устранения дефекта седалищного нерва у крыс; в группе С, которая была названа группой фиктивных операций, был обнажен седалищный

нерв без каких-либо дефектов. Через 12 недель после операции интраоперационный седалищный нерв был обнажен под умеренной анестезией для нейрофизиологического тестирования.

[0067] Как показано на фиг. 5, это схематическая диаграмма результатов электрофизиологического обнаружения регенеративных нервов, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, левая сторона представляет собой диаграмму формы сигнала составного потенциала действия мышц каждой группы, А представляет собой группу клеточного матрикса, В — аутологичная группа, С — группа фиктивных операций; на изображении справа показан сравнительный график амплитуд потенциалов действия регенерированных нервных соединений мышц в каждой группе, **** $p < 0,0001$, символы разной формы на изображении представляют разные группы, а число представляет количество образцов. Из изображений видно, что средние амплитуды СМАР в группе клеточного матрикса, аутологичной группе и группе фиктивных операций составляют: $15,49 \pm 1,82$ мВ, $15,33 \pm 2,98$ мВ и $21,56 \pm 1,67$ мВ соответственно. Среди них не было статистической разницы между группой клеточного матрикса и аутологичной группой ($P > 0,05$).

[0068] Возьмем срез средней части регенерированного нерва для исследования с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, как показано на фиг. 6, это изображение поперечного сечения средней части регенерированного нерва, полученное с помощью трансмиссионного электронного микроскопа, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, верхняя часть представляет собой изображение каждой группы миелиновых оболочек, полученное трансмиссионным электронным микроскопом, увеличенное в 20000 раз, фиг. А представляет собой группу клеточного матрикса, В представляет собой аутологичную группу, а С — группу фиктивных операций,

нижняя часть представляет собой сравнительный график количества миелиновых пластинок в каждой группе, **** $p < 0,0001$. Из рисунка видно, что количество миелиновых пластинок в группе клеточного матрикса, аутологичной группе и группе фиктивных операций составляет соответственно: 41 ± 5 , 46 ± 6 , 90 ± 17 . Среди них не было статистической разницы между группой клеточного матрикса и аутологичной группой ($P > 0,05$).

[0069] Коэффициент влажного веса целевой мышцы и обнаружение подвижных концевых пластин после операции являются важными показателями для оценки восстановления функции иннервации целевой мышцы регенерированными нервами. Происходит ранняя денервация мышц, и со временем регенерированные нервы повторно иннервируют целевые мышцы. Как показано на фиг. 7, это схематическая диаграмма результатов соотношения сырой массы целевых мышц, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, верхняя часть представляет собой морфологическую диаграмму внешнего вида икроножной мышцы каждой группы, А представляет собой группу клеточного матрикса, В — аутологичная группа, С — группа фиктивных операций; в нижней части показан анализ соотношения сырой массы икроножных мышц в каждой группе, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; из изображений видно, что через 12 недель после операции соотношение сырой массы икроножной мышцы в группе клеточного матрикса, аутологичной группе и группе фиктивных операций составляло: $0,48 \pm 0,22$, $0,58 \pm 0,16$ и $0,88 \pm 0,06$ соответственно. Среди них не было статистической разницы между группой клеточного матрикса и аутологичной группой ($P > 0,05$).

[0070] Подвижная концевая пластина представляет собой нервно-мышечное соединение, расположенное на нервных окончаниях и иннервируемых ими мышцах-мишенях, с синаптической структурой, яд змеи с α -серебряным кольцом

специфически метит рецепторы ацетилхолина на постсинаптической мембране. Через 12 недель после мостовой операции икроножную мышцу на хирургической стороне брали у крыс из группы клеточного матрикса, аутологичной группы и группы фиктивных операций, после фиксации и обезвоживания замораживали и разрезали в продольном направлении, а подвижные концевые пластины окрашивали и анализировали на зрелость.

[0071] Зрелость подвижных концевых пластин делится на различные стадии: (1) ранняя стадия: «бляшка» с небольшой морфологией и без пористой структуры; (2) зрелая стадия: «кольцо», с крупной сетчатой формой и пористой структурой; (3) средняя стадия: «промежуточная» (между зрелой и ранней стадиями). Как показано на фиг. 8, это диаграмма результатов реконструкции подвижной концевой пластины, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, при этом верхняя часть представляет собой схематическое изображение зрелости подвижной концевой пластины, кольцо — зрелая стадия, промежуточный — переходная стадия, а бляшка — незрелая стадия; средняя часть представляет собой наблюдение подвижной концевой пластины каждой группы, фиг. А представляет собой группу клеточного матрикса, В представляет собой аутологичную группу, а С — группу фиктивных операций; нижняя часть — гистограмма статистического анализа пропорций подвижной концевой пластины на разных стадиях.

[0072] Подвижные концевые пластины в группе фиктивных операций находились в основном на зрелой стадии, а бляшки были крупнее, имели форму крыльев бабочки и сетчатую пористость, область подвижной концевой пластины, иннервируемая регенерированными нервами в группе клеточного матрикса и аутологичной группе, была меньше и удлинена. Количественная статистика подвижных концевых пластин через 12 недель после операции показала, что по

сравнению с двумя другими группами большинство подвижных концевых пластин в группе фиктивных операций находились в зрелой стадии (52%); в доле подвижных концевых пластин на зрелой стадии в группе клеточного матрикса (44%) не было статистически значимой разницы по сравнению с аутологичной группой (46%) ($P > 0,05$).

[0073] Фиг. 9 представляет собой диаграмму, показывающую результаты площади поперечного сечения целевых мышечных волокон, согласно примеру осуществления настоящего изобретения, через 12 недель после мостовой операции икроножные мышцы на хирургической стороне брали у крыс из группы клеточного матрикса, аутологичной группы и группы фиктивных операций, стабилизировали и обезвоживали, после чего замораживали и пересекали, а внеклеточный матрикс мышечных волокон окрашивали ламинином, верхняя средняя часть фиг. 9 представляет собой поперечное сечение волокон икроножной мышцы в каждой группе, при этом фиг. А представляет собой группу клеточного матрикса, В представляет собой аутологичную группу, а С — группу фиктивных операций; нижняя часть представляет собой сравнительный график площади поперечного сечения волокон икроножной мышцы в каждой группе, $**p < 0,01$, $****p < 0,0001$. Статистические данные, представленные на изображении, показывают, что площади поперечного сечения мышечных волокон в группе клеточного матрикса, аутологичной группе и группе фиктивных операций составляют: $923,4 \pm 98,85$ мкм^2 , $1131 \pm 92,23$ мкм^2 , $1606 \pm 229,9$ мкм^2 соответственно, статистически значимой разницы ($P > 0,05$) между группой клеточного матрикса и аутологичной группой не наблюдалось.

[0074] Нервные трансплантаты клеточного матрикса не содержат экзогенных токсичных веществ, поступающих в процессе получения, и обладают хорошей биосовместимостью и биоразлагаемыми свойствами, а также хорошими

механическими свойствами. Использование биоразлагаемых каркасов и формирование трубчатых структур обеспечивают необходимый путь для роста нервных клеток и необходимую направленность и ориентацию для роста; используемый бесклеточный матрикс может эффективно способствовать регенерации нервов и функциональному восстановлению.

[0075] Ввиду недостатков предшествующего уровня техники настоящее изобретение предлагает нервный трансплантат клеточного матрикса, который благоприятен для адгезии и миграции клеток и может способствовать регенерации нерва, а также способ его получения; стволовые клетки удаляются с использованием технологии децеллюляризации *in vitro* для получения бесклеточного матрикса, который затем оборачивают вокруг биоразлагаемого каркаса, формируется нервный трансплантат клеточного матрикса для восстановления дефектов периферических нервов. Настоящее изобретение позволяет преодолеть недостатки аутологичной трансплантации нервов, избегая при этом иммуногенности аллогенной трансплантации клеток, обеспечить определенный ориентированный бесклеточный матрикс, способствующий пролиферации и миграции нервных клеток, и создать локальную среду, способствующую росту регенерированных аксонов для достижения идеальных целей быстрого роста нервов и функционального восстановления, а также предоставить осуществимое решение для клинического лечения.

[0076] Приведенное выше является лишь предпочтительными примерами осуществления настоящего изобретения, следует отметить, что для обычного технического персонала в области технологии, не выходя за рамки технического принципа настоящего изобретения, может быть выполнен ряд улучшений и модификаций, и эти улучшения и модификации также следует учитывать как объем защиты настоящего изобретения.

Формула изобретения

1. Нервный трансплантат клеточного матрикса для восстановления повреждений периферических нервов, характеризующийся тем, что он включает в себя бесклеточный матрикс и каркас, причем бесклеточный матрикс получен путем секретирования и образования децеллюляризирующих стволовых клеток, а бесклеточный матрикс обернут вокруг каркаса.

2. Нервный трансплантат клеточного матрикса для восстановления повреждений периферических нервов по п. 1, отличающийся тем, что стволовые клетки представляют собой мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека.

3. Нервный трансплантат клеточного матрикса для восстановления повреждений периферических нервов по п. 1, отличающийся тем, что каркас представляет собой биоразлагаемый каркас, включающий в себя хитозан и рекомбинантный человеческий коллаген.

4. Способ получения нервного трансплантата клеточного матрикса для восстановления повреждений периферических нервов по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что включает в себя следующие этапы:

получение бесклеточного матрикса;

оборачивание бесклеточного матрикса вокруг каркаса для построения исходной формы нервного трансплантата клеточного матрикса;

размещение исходной формы нервного трансплантата клеточного матрикса при температуре 2-6°C по меньшей мере на 24 часа для самосборки с образованием трубчатой структуры;

обработка трубчатой структуры с помощью лиофилизации для создания нервного трансплантата клеточного матрикса.

5. Способ получения нервного трансплантата клеточного матрикса для

восстановления повреждений периферических нервов по п.4, отличающийся тем, что температура лиофилизации составляет -80°C .

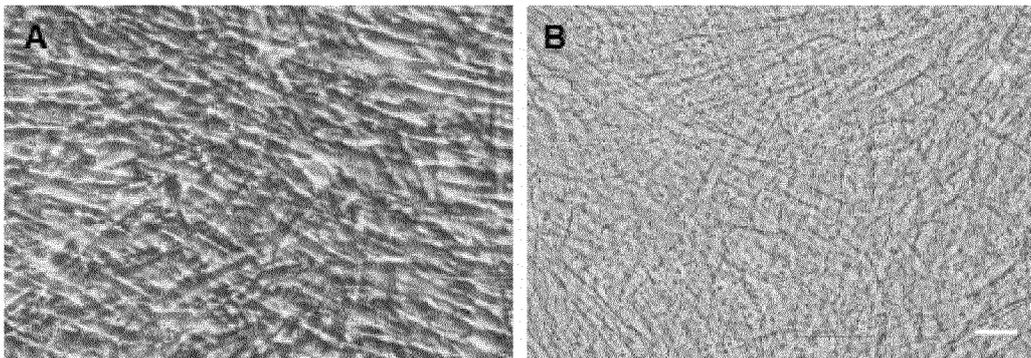
6. Способ получения нервного трансплантата клеточного матрикса для восстановления повреждений периферических нервов по п.4, отличающийся тем, что бесклеточный матрикс наматывают в несколько слоев вокруг биоразлагаемого каркаса, причем указанный каркас служит в качестве оси.

7. Способ получения нервного трансплантата клеточного матрикса для восстановления повреждений периферических нервов по п.4, отличающийся тем, что бесклеточный матрикс наматывают до 6, 9 или 12 слоев вокруг биоразлагаемого каркаса, причем биоразлагаемый каркас служит в качестве оси.

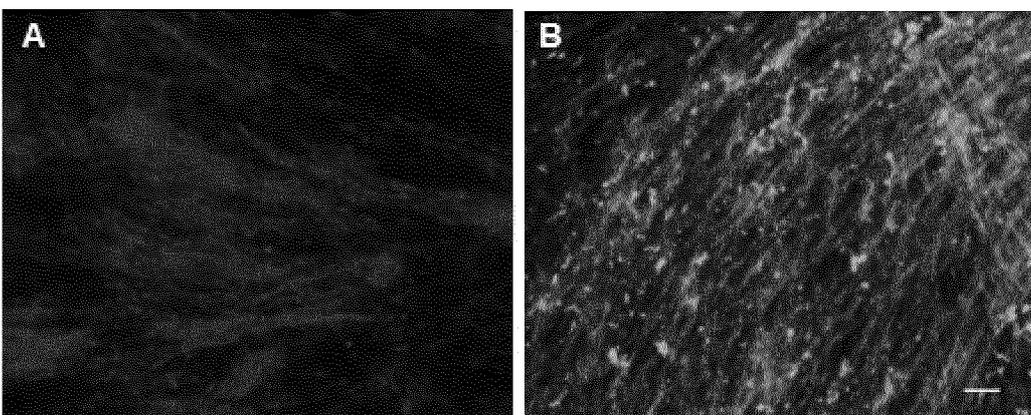
8. Способ получения нервного трансплантата клеточного матрикса для восстановления повреждений периферических нервов по п.4, отличающийся тем, что процесс получения бесклеточного матрикса выполняют следующим образом:

мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека разводят в большой чашке, когда насыщение клеток будет $\geq 90\%$, добавляют бессывороточную культуральную среду, содержащую аскорбиновую кислоту, для стимуляции в течение 7-14 дней;

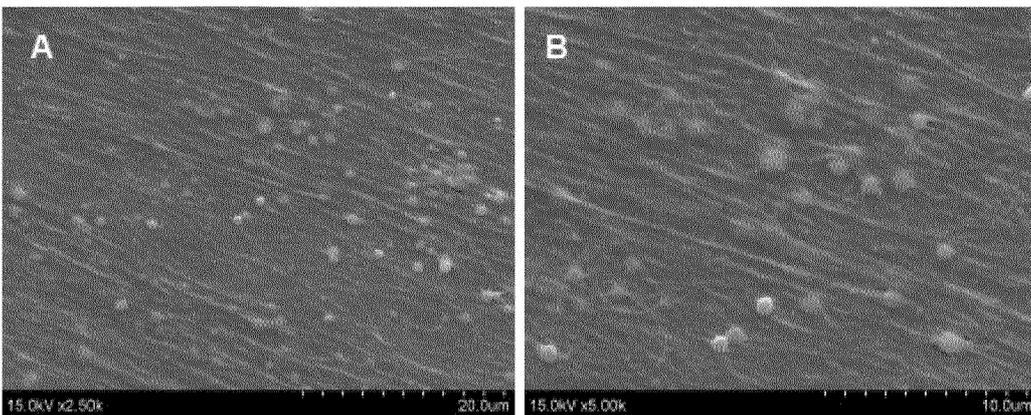
промывают фосфатным буфером, добавляют стерилизованную сверхчистую воду для обеспечения низкой проницаемости, удаляют стерилизованную сверхчистую воду, добавляют клеточный лизат для экстракции, а затем промывают фосфатным буфером для получения бесклеточного матрикса.



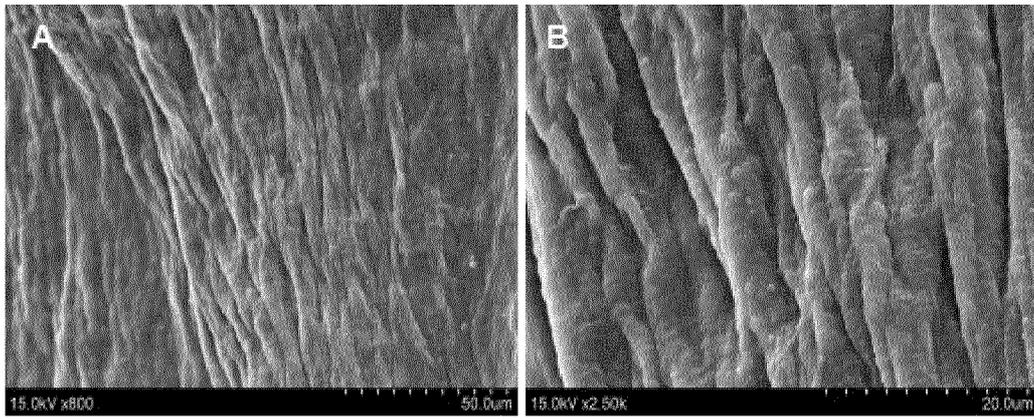
Фиг.1



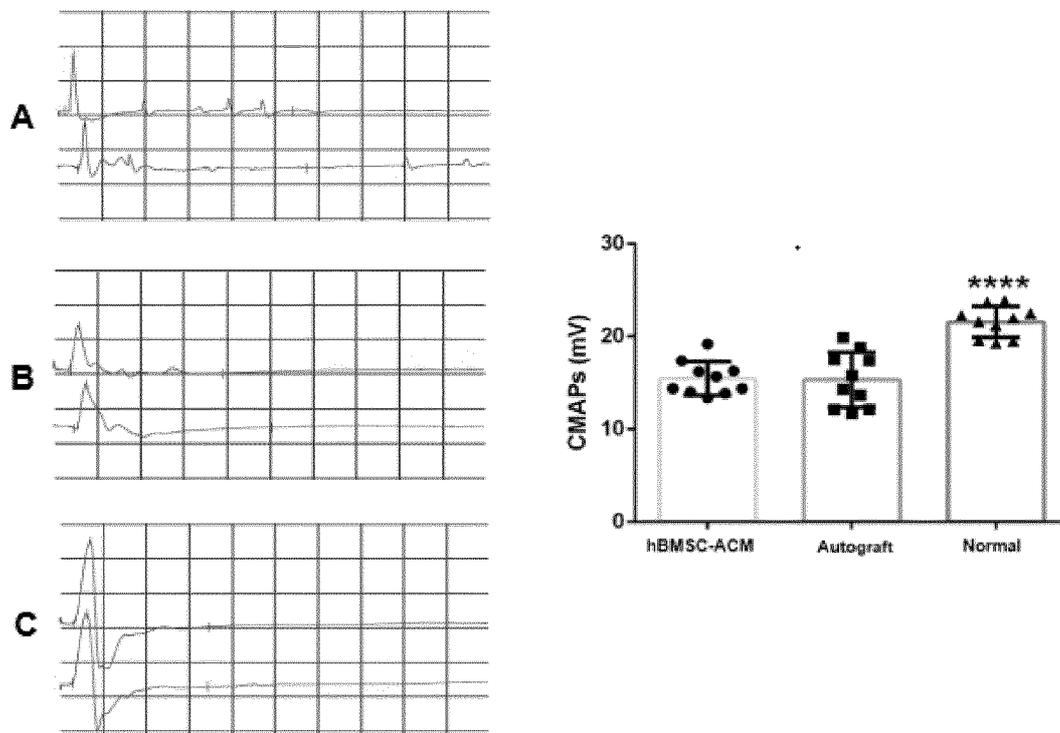
Фиг.2



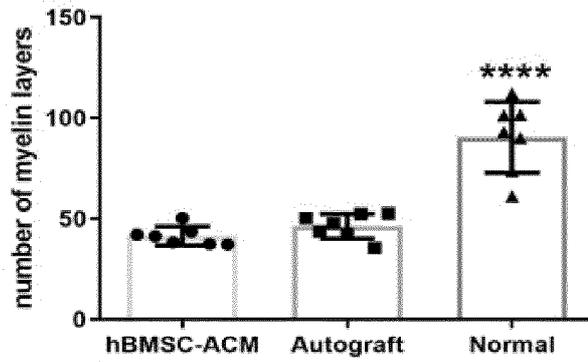
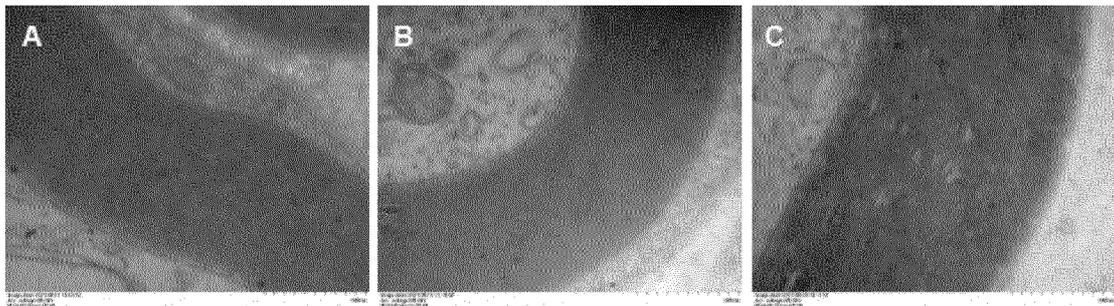
Фиг.3



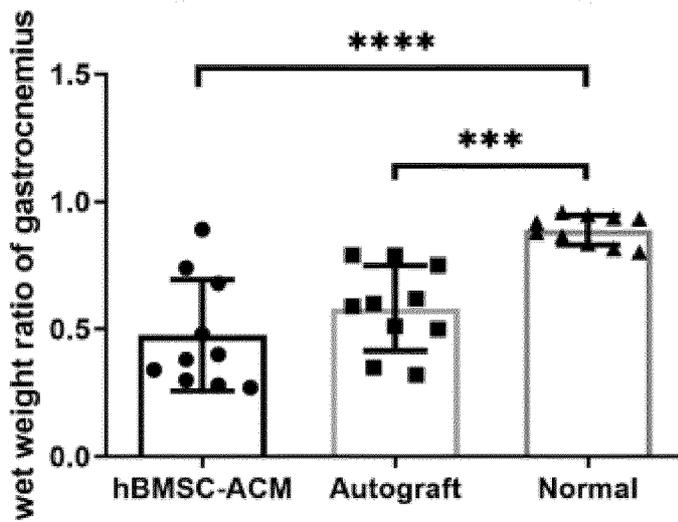
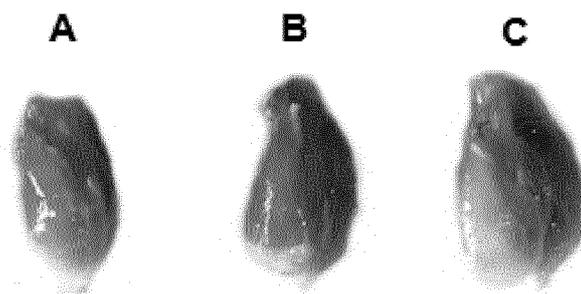
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

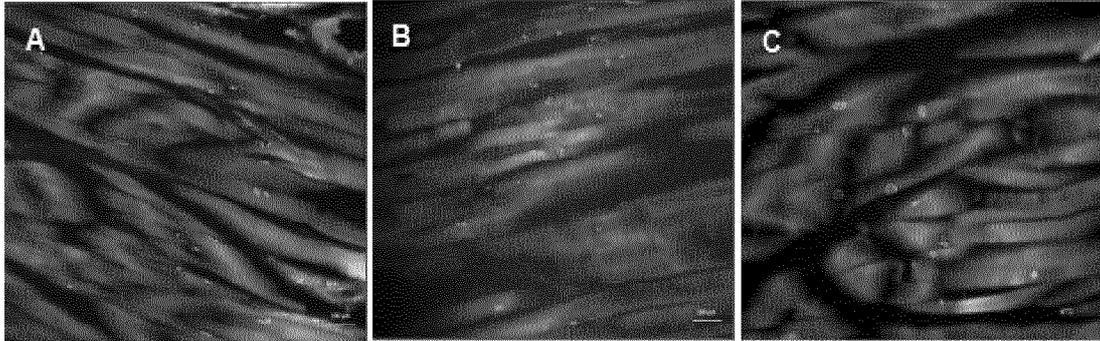
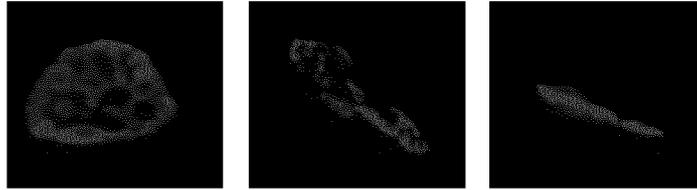


Фиг. 7

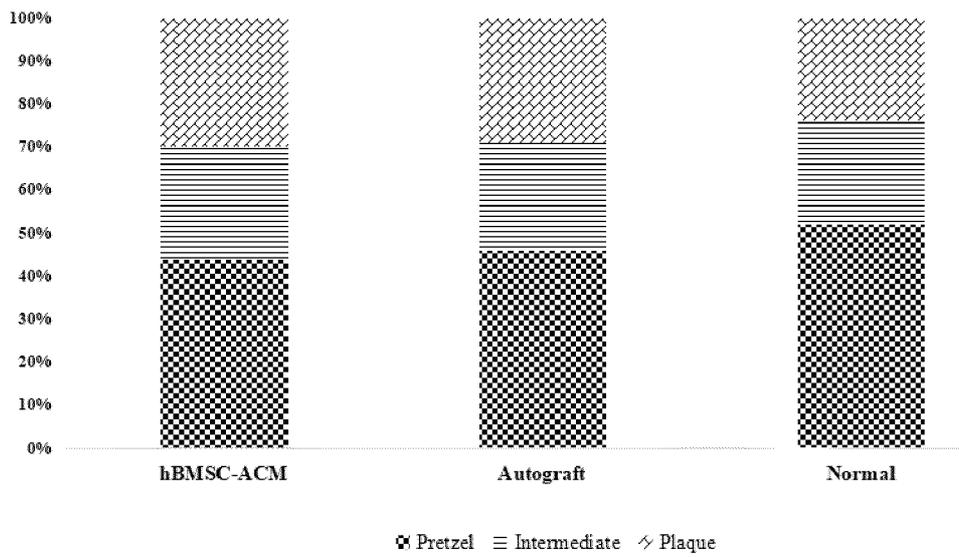
pretzed

Intermediate

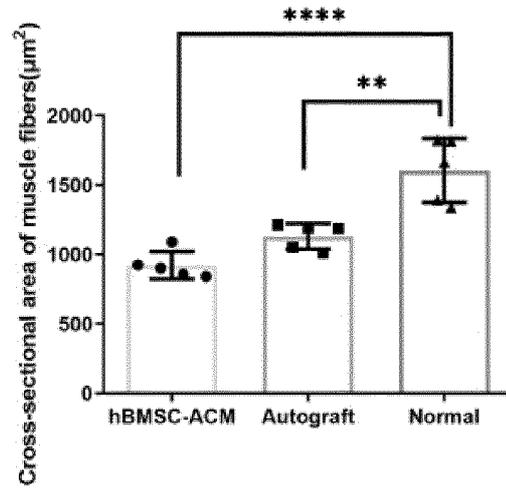
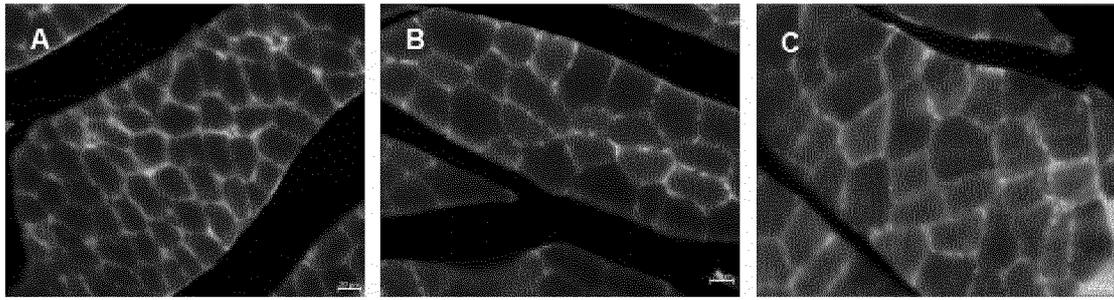
plaque



Percentage of total reception(%)



Фиг. 8



Фиг. 9

专利合作条约

PCT

国际检索报告

(PCT第18条和细则43和44)

申请人或代理人的档案号 AJ2307250001		关于后续行为 见PCT/ISA/220表和适用时，见下面第5项	
国际申请号 PCT/CN2023/109010	国际申请日 (年/月/日) 2023年7月25日	(最早的)优先权日 (年/月/日) 2022年8月16日	
申请人 南通大学			

按照条约第18条，本国际检索报告由本国际检索单位做出并送交申请人。报告副本送交国际局。

本国际检索报告总计 4 页。

它还附有本报告所引用的各现有技术文件的副本。

1. 报告的基础

a. 关于语言，进行国际检索基于：

国际申请提交时使用的语言。

该国际申请的____语言译文，为了国际检索的目的提供该种语言的译文(细则12.3(a)和23.1(b))。

b. 本国际检索报告考虑了本单位许可或被通知的根据细则91所做出的明显错误更正(细则43.6之二(a))。

c. 关于国际申请中公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列，见第I栏。

2. 某些权利要求被认为是不能检索的(见第II栏)。

3. 缺乏发明的单一性(见第III栏)。

4. 关于发明名称，

同意申请人提出的发明名称。

发明名称由本单位确定如下：

5. 关于摘要，

同意申请人提出的摘要。

根据细则38.2(b)，摘要由本单位制定，如第IV栏中所示。自本国际检索报告发文日起一个月内，申请人可以向本单位提出意见。

6. 关于附图，

a. 随摘要一起公布的附图是：4

按照申请人建议的。

由本单位选择的，因为申请人没有建议一幅图。

由本单位选择的，因为该图能更好地表示发明的特征。

b. 没有与摘要一起公布的附图

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61L27/36(2006.01)i; A61L27/20(2006.01)i; A61L27/24(2006.01)i; A61L27/50(2006.01)i; A61L27/58(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC: A61L27</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNTEXT,CNKI,ENTXT,DWPI: 神经, 支架, 导管, 脱细胞, 细胞外基质, 缠绕, 包裹, 层, 引导, 定向, 取向, nerve, implant+, bracket, scaffold, graft, conduit, remov+ cell, decellula+, ECM, around, layer?, guide? guiding, orient+</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 115337458 A (尧舜泽生物医药(南京)有限公司) 2022年11月15日 (2022 - 11 - 15) 权利要求第1-8项</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 103041450 A (南通大学) 2013年4月17日 (2013 - 04 - 17) 说明书第6-16段</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103041450 A (南通大学) 2013年4月17日 (2013 - 04 - 17) 说明书第6-16段</td> <td>4-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 112546303 A (深圳兰度生物材料有限公司) 2021年3月26日 (2021 - 03 - 26) 说明书第8-15和74-78段</td> <td>4-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 110584829 A (深圳兰度生物材料有限公司) 2019年12月20日 (2019 - 12 - 20) 说明书第4-19段</td> <td>4-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2003171824 A1 (ORGANOGENESIS INC) 2003年9月11日 (2003 - 09 - 11) 说明书第18-24段</td> <td>4-8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102218160 A (卢世璧) 2011年10月19日 (2011 - 10 - 19) 全文</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 115337458 A (尧舜泽生物医药(南京)有限公司) 2022年11月15日 (2022 - 11 - 15) 权利要求第1-8项	1-8	X	CN 103041450 A (南通大学) 2013年4月17日 (2013 - 04 - 17) 说明书第6-16段	1-3	Y	CN 103041450 A (南通大学) 2013年4月17日 (2013 - 04 - 17) 说明书第6-16段	4-8	Y	CN 112546303 A (深圳兰度生物材料有限公司) 2021年3月26日 (2021 - 03 - 26) 说明书第8-15和74-78段	4-8	Y	CN 110584829 A (深圳兰度生物材料有限公司) 2019年12月20日 (2019 - 12 - 20) 说明书第4-19段	4-8	Y	US 2003171824 A1 (ORGANOGENESIS INC) 2003年9月11日 (2003 - 09 - 11) 说明书第18-24段	4-8	A	CN 102218160 A (卢世璧) 2011年10月19日 (2011 - 10 - 19) 全文	1-8
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
PX	CN 115337458 A (尧舜泽生物医药(南京)有限公司) 2022年11月15日 (2022 - 11 - 15) 权利要求第1-8项	1-8																								
X	CN 103041450 A (南通大学) 2013年4月17日 (2013 - 04 - 17) 说明书第6-16段	1-3																								
Y	CN 103041450 A (南通大学) 2013年4月17日 (2013 - 04 - 17) 说明书第6-16段	4-8																								
Y	CN 112546303 A (深圳兰度生物材料有限公司) 2021年3月26日 (2021 - 03 - 26) 说明书第8-15和74-78段	4-8																								
Y	CN 110584829 A (深圳兰度生物材料有限公司) 2019年12月20日 (2019 - 12 - 20) 说明书第4-19段	4-8																								
Y	US 2003171824 A1 (ORGANOGENESIS INC) 2003年9月11日 (2003 - 09 - 11) 说明书第18-24段	4-8																								
A	CN 102218160 A (卢世璧) 2011年10月19日 (2011 - 10 - 19) 全文	1-8																								
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																										
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“D” 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																										
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年11月1日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年11月3日</p>																									
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>	<p>授权官员</p> <p>杨金辉</p> <p>专利审查业务章</p> <p>电话号码 (+86) 010-62084764</p>																									



C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	JP 2009045221 A (UNIV OSAKA PREFECTURE) 2009年3月5日 (2009 - 03 - 05) 全文	1-8
A	US 2008213389 A1 (UNIV DREXEL) 2008年9月4日 (2008 - 09 - 04) 全文	1-8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/109010

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	115337458	A	2022年11月15日	无			
CN	103041450	A	2013年4月17日	BR	112015017174	A2	2017年7月11日
				BR	112015017174	B1	2020年9月24日
				WO	2014114043	A1	2014年7月31日
				US	2015352255	A1	2015年12月10日
				US	9492589	B2	2016年11月15日
				EP	2949349	A1	2015年12月2日
				EP	2949349	A4	2016年11月2日
				EP	2949349	B1	2018年10月31日
				EA	201591373	A1	2016年1月29日
				EA	038957	B1	2021年11月15日
				AU	2013375655	A1	2015年7月23日
				AU	2013375655	B2	2016年11月17日
CN	112546303	A	2021年3月26日	无			
CN	110584829	A	2019年12月20日	无			
US	2003171824	A1	2003年9月11日	AT	423577	T	2009年3月15日
				MXPA	00012064	A	2003年4月22日
				ES	2323099	T3	2009年7月6日
				EP	1082057	A2	2001年3月14日
				EP	1082057	A4	2005年6月8日
				EP	1082057	B1	2009年2月25日
				DE	69940466	D1	2009年4月9日
				JP	2002516701	A	2002年6月11日
				JP	4341049	B2	2009年10月7日
				CA	2334368	A1	1999年12月9日
				CA	2334368	C	2011年5月24日
				WO	9962424	A2	1999年12月9日
				WO	9962424	A3	2000年6月15日
				AU	4330099	A	1999年12月20日
				AU	754437	B2	2002年11月14日
				US	7214242	B2	2007年5月8日
CN	102218160	A	2011年10月19日	无			
JP	2009045221	A	2009年3月5日	无			
US	2008213389	A1	2008年9月4日	US	8932620	B2	2015年1月13日
				WO	2006138718	A2	2006年12月28日
				WO	2006138718	A3	2007年4月12日
				US	2015079143	A1	2015年3月19日
				US	9725693	B2	2017年8月8日