

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 17 июня 2014 года № 14.604.21.0017 с Минобрнауки России в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014- 2020 годы» на этапе № 1 в период с 17 июня 2014 года по 31 декабря 2014 года в соответствии с «План-графиком исполнения обязательств» по Соглашению **выполнялись следующие работы:**

Выполнен анализ научно-технической литературы, нормативно-технической документации и других материалов, относящихся к разрабатываемой теме.

Сделано обоснование выбора направления исследований по созданию препаратов на основе пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, иммобилизованного в полимерные носители, сравнительный анализ оптимальных условий направленного действия на различные клетки, вовлекаемые в процессы воспаления, нейродегенерации и репарации тканей (*in vitro*).

Оптимизирована методика синтеза пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС.

Синтезирован пептид – агонист рецепторов PAR1, освобождаемого АПС.

Выявлено противовоспалительное влияние синтезированного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, на перитонеальные тучные клетки крыс в условиях воспаления *in vitro*. Сопоставлено действие синтезированного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, с противовоспалительным действием эндогенного белка АПС в аналогичных условиях.

Проведен поиск оптимальной, эффективной концентрации нативного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, по его способности детерминировать высвобождение гистамина тучными клетками в модели воспаления *in vitro* на основе зависимости доза-эффект.

Выбраны оптимальный состав и способ формирования разных форм биосовместимого и биodeградируемого полимерного носителя на основе фиброина шелка: покрытие, пленка, трёхмерный матрикс.

Проведен анализ деградации полимерного носителя на основе фиброина шелка в модельных системах нейтральных и окисляющих условий.

Разработаны способы иммобилизации пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, на разных формах биосовместимого и биodeградируемого полимерного носителя на основе фиброина шелка.

Выполнено материально-техническое обеспечение работ.

#### **При этом были получены следующие результаты:**

В результате теоретической работы 1 этапа проведены обзор научных информационных источников и систематизация сведений по тематике исследуемой проблемы. Приведены варианты возможных решений исследуемой проблемы с учетом результатов исследований, проводившихся по аналогичной тематике, разработаны научные и технологические основы для решения отдельных экспериментальных задач: подбор материала и способа для формирования

полимерных носителей, разработка способа иммобилизации пептида в полимерный носитель и прочее. В результате экспериментальной работы наработаны образцы препарата пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, и три типа полимерного носителя на основе фиброина шелка: покрытие, пленка и трехмерный матрикс. Разработана методика иммобилизации пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, на разных формах биосовместимого и биodeградируемого полимерного носителя. Проведен анализ выявления противовоспалительного влияния синтезированного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, на перитониальные тучные клетки крыс в условиях воспаления *in vitro*. Изучена деградации полимерной матрицы в модельных системах нейтральных и окисляющих условий. Полученные результаты будут использованы при выполнении следующих этапов.

Одним из ключевых направлений исследований и разработок по созданию и совершенствованию технологий, которые предполагается развивать в рамках Технологической платформы «Медицина будущего» и которые объективно отражают современные мировые тенденции в медицинских науках, является создание нового поколения инновационных нейропротекторных препаратов, обладающих протекторной активностью.

Основание и исходные данные для разработки ПНИ. Основанием для проведения ПНИ, выполняемой в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы», является Соглашение о предоставлении субсидии от 17 июня 2014 г. №14.604.21.0017 по теме «Новые средства для лечения травматических и ишемических повреждений тканей на основе биodeградируемых материалов с иммобилизованными пептидами-агонистами рецепторов, активируемых протеиназами». Большинство используемых в терапии разных заболеваний лекарств имеют серьёзные недостатки, связанные с наличием многочисленных побочных эффектов и противопоказаний. Кроме того, лечение острых тяжелых заболеваний часто связано с ограничением терапевтического окна, в течение которого необходимо использовать лекарства. Это часто сопровождается невысокой эффективностью лечебного процесса и нежелательными осложнениями и дальнейшей инвалидизацией.

Сложная ситуация складывается при лечении инсультов и тяжелых воспалительных заболеваний и травм. Ишемический инсульт - острое нарушение мозгового кровообращения, сопровождается гибелью клеток мозга и нарушением его функций вследствие тромбоза или тромбоэмболии сосудов мозга. По данным ВОЗ от инсультов в мире ежегодно умирают около 6,4 млн человек. Ежегодная смертность от инсульта в нашей стране - одна из наиболее высоких в мире. Летальность в остром периоде инсульта в России достигает 35%, возрастая на 15% к концу первого года после перенесенного инсульта. Инсульт - лидирующая причина инвалидизации населения. Оптимизация лечения ишемического инсульта и тяжелых воспалительных заболеваний - одна из самых актуальных проблем медицины и патофизиологии.

При анализе научно-технической литературы было установлено, что в настоящее время для лечения ишемического инсульта, который вызван окклюзией сосуда, кроме классического применения антиоксидантов, антикоагулянтов и антиагрегантов, используют технологию или механического удаления тромба (ов) в сосудах мозга или тромболитическую терапию с помощью тканевого активатора

плазминогена (ТАП). Однако, как показали эксперименты на животных с экспериментальной ишемией мозга и первые доклинические исследования (в США), введение вместе с ТАП в острый период инсульта белка крови - активированного протеина С (АПС), блокирует вызванную ТАП гибель нейронов и стабилизирует ГЭБ. Однако, недавно обнаружено, что ведение высоких концентраций рАПС на раннем этапе реперфузии не вызывало устойчивую нейропротекцию и не улучшало исход после глобальной ишемии головного мозга, остановки сердца и острого воспаления.

Анализ документов, выявленных в соответствии с заданием патентного поиска по определению технического уровня и тенденций развития научной разработки по теме и ее патентоспособности, показал следующее: на дату проведения патентных исследований объект «Новые средства для лечения травматических и ишемических повреждений тканей на основе биodeградируемых материалов с иммобилизованными пептидами-агонистами рецепторов, активируемых протеиназами» абсолютно идентичных решений найдено не было, поскольку все действующие на сегодняшний день патенты раскрывают решения, значительно отличающиеся от предлагаемого и, соответственно, не препятствуют его разработки и дальнейшему производству.

Актуальность и новизна. Ранее обнаружено, что высокие концентрации АПС не оказывают цитопротекторного действия, а вызывают гибель культивируемых нейронов мозга крыс при эксайтотоксичности (модель ишемии мозга), также как высокие концентрации тромбина, тогда как низкие концентрации АПС защищают нейроны от гибели при нейротоксичности. АПС в низких концентрациях блокировал освобождение гистамина и других медиаторов воспаления тучными клетками, активированными острым воспалением, через активацию ПАР1 (*in vitro*) и ускорял репаративные процессы при заживлении экспериментальной язвы желудка у крыс (*in vivo*).

Остается не выясненным вопрос, будет ли рАПС использоваться для терапии острых воспалительных реакций и инсульта. Поскольку использование рАПС ограничено вследствие его антикоагулянтной активности, возможности кровотечений, аллергических реакций и отсутствия цитопротекторного действия в высоких концентрациях были созданы модифицированные препараты рАПС, лишённые антикоагулянтной активности, но сохраняющие цитопротекторные свойства. Однако их преclinical исследования только начинаются и сохраняются возможности тяжелых побочных реакций на вводимый белок.

В связи с этими данными весьма актуальными являются поиски новых эффективных цитопротекторов с противовоспалительными и репаративными свойствами как у АПС, но лишенных антикоагулянтной активности. Таковыми могли бы быть пептиды с цитопротекторными и противовоспалительными свойствами АПС. Разработка и создание инкапсулированных в биodeградируемые полимерные матрицы препаратов пептидов с заданными свойствами позволит решить эту задачу.

Недавно обнаружено, что пептид – аналог “привязанного лиганда“, освобождаемого АПС при активации рецептора ПАР1, стимулирует цитопротекторный ответ клеток эндотелия и стабилизацию эндотелиального барьера при провокации воспаления.

Для повышения эффективности цитопротекторного, противовоспалительного и репаративного действия АПС можно использовать пептид – агонист PAR1, освобождаемого АПС, что позволит снизить действующую концентрацию препарата и возможные токсические воздействия. Весьма перспективным из возможных путей достижения этой цели представляется разработка препаратов с постепенным высвобождением пептида, иммобилизованного на полимерном матриксе.

Цели и задачи этапа. Основная цель первого этапа – разработка экспериментальных основ создания новых эффективных средств для лечения травматических и ишемических повреждений тканей.

Для достижения цели I этапа ПНИ решались следующие задачи:

1) Синтез пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС.

Для решения данной задачи на основе анализа научно-технической литературы была определена аминокислотная последовательность для синтеза пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС и методами биорганической химии проведен синтез препарата в количествах, необходимых для выполнения этапа проекта.

2) Исследование протекторного, противовоспалительного и пролиферативного действия синтезированного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, в экспериментах *in vitro*;

Для проведения исследований протекторного, противовоспалительного и пролиферативного действия синтезированного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, проведены эксперименты *in vitro* на нескольких типах первичных культур клеток животных и человека.

3) Выбор оптимальной биосовместимой и биodeградируемой полимерной матрицы на основе фиброина и способа иммобилизации синтезированного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, на носителях;

Для решения данной задачи на основе фиброина создано три типа носителя: покрытие, пленка и трехмерный матрикс. Для осуществления иммобилизации синтезированного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, на носителе было подобрано несколько способов.

Таким образом, на первом этапе были разработаны экспериментальные основы создания новых эффективных средств для лечения травматических и ишемических повреждений тканей. Полученные в результате выполнения этапа научно-техническая и технологическая документация (Промежуточный отчет о ПНИ, в частности разработанные научные и технологические основы создания препаратов на основе пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, иммобилизованного в полимерные носители, протоколы исследований, методика синтеза пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС и методика иммобилизации пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, на разных формах биосовместимого и биodeградируемого полимерного носителя на основе фиброина шелка) будут использованы при проведении следующих этапов.

Комиссия Минобрнауки России признала обязательства по Соглашению на отчетном этапе исполненными надлежащим образом:

Использование средств субсидии в размере 4 000 000 (Четыре миллиона) рублей, предоставленных Получателю субсидии по Соглашению с Минобрнауки

России от 17 июня 2014 г. №14.604.21.0017 на этапе № 1 Плана-графика исполнения обязательств условиям Соглашения с Минобрнауки России соответствует.

Работы по Соглашению о предоставлении субсидии от 17 июня 2014 г. №14.604.21.0017 на этапе №1 Плана-графика исполнения обязательств выполнены в установленный срок и удовлетворяют условиям данного Соглашения, в том числе Техническому заданию и Плану-графику исполнения обязательств