

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 27 ноября 2014 года № 14.604.21.0148 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 № 2 в период с 01 января 2015 года по 30 июня 2014 года в соответствии с «План-графиком исполнения обязательств» по Соглашению выполнялись следующие работы:

1 Разработка Лабораторного регламента создания экспериментальных образцов биорезорбируемого микроносителя для направленной доставки клеток (БМНДК);

2 Разработка Плана исследований *in vivo* экспериментальных образцов БМНДК;

3 Разработка Программы и методик испытаний экспериментальных образцов БМНДК;

4 Нарботка экспериментальных образцов БМНДК;

5 Проведение анализа деградации экспериментальных образцов БМНДК в модельных системах *in vitro*;

6 Разработка методики витализации экспериментальных образцов БМНДК.

При этом были получены следующие результаты:

Использование микроносителей является альтернативной технологией заполнения и активации регенерации обширных повреждений кожи. Микроносители – это частицы от 100 до 400 мкм в диаметре, которые изготавливаются из различных материалов и могут использоваться для прикрепления клеток и последующего введения в рану. Впервые такой подход был описан van Wezel и соавт. [van Wezel, A.L. The large-scale cultivation of diploid cell strains in microcarrier culture. Improvement of microcarriers. Dev Biol Stand 37, 143, 1976]. Первые микроносители были изготовлены из DEAE Sephadex A-50. В настоящее время до клинических испытаний были доведены только микроносители из модифицированного желатина [Liu, J.Y., Hafner, J., Dragieva, G., Seifert, B., and Burg, G. Autologous cultured keratinocytes on porcine gelatin microbeads effectively heal chronic venous leg ulcers. Wound Repair Regen 12, 148, 2004] и было достоверно показано, что они способствуют реэпителизации и уменьшению размера ран. В последнее время для изготовления микроносителей используют различные материалы: полистирен, коллаген, желатин, полилактид и др. [Microcarriers and their potential in tissue regeneration. [Martin Y, Eldardiri M, Lawrence-Watt DJ, Sharpe JR. Tissue Eng Part B Rev. 2011 Feb; 17(1):71-80]. Данные последних исследований в этой области показывают, что введение в кожные раны пористых биорезорбируемых микроносителей, загруженных культивированными кератиноцитами человека, способствовало не только оптимальной реэпителизации раны, но и стимулировало регенерацию всех поврежденных слоев кожи [Gustafson CJ, Birgisson A, Junker J, Huss F, Salemark L, Johnson H, et al. Employing human keratinocytes cultured on macroporous gelatin spheres to treat full thickness wounds: an *in vivo* study on athymic rats. Burns 2007; 6: 726–35]. Таким образом, разработка биорезорбируемых материалов для создания суспензионных препаратов для

эффективного лечения глубоких дефектов кожи является чрезвычайно актуальной задачей. Использование микроносителей для культивирования клеток и их последующей трансплантации способствуют поддержанию их жизнеспособности и пролиферативного потенциала. Культивирование клеток на микроносителях позволяет нарастить достаточное для терапевтического применения количество клеток, при малом объеме введенных биоматериалов. Многочисленные исследования показывают большую выживаемость клеток, трансплантируемых на трехмерных носителях [Sun LY, Lin SZ, Li YS, Harn HJ, Chiou TW. Functional cells cultured on microcarriers for use in regenerative medicine research. *Cell Transplant.* 2011;20(1):49-62]. Трехмерная среда, создаваемая микроносителями является важным фактором для дифференцировки некоторых типов клеток, применяемых для регенеративной медицины, в том числе остеобластов [Park, J.-H., Lee, E.-J., Knowles, J. C., & Kim, H.-W. (2014). Preparation of in situ hardening composite microcarriers: Calcium phosphate cement combined with alginate for bone regeneration. *Journal of Biomaterials Applications*, 28(7), 1079–1084]. Наиболее близким аналогом предлагаемого изобретения на территории Российской Федерации является заменитель живой кожи, включающий биосовместимый носитель и культуру клеток кожи, отличающийся тем, что он содержит в качестве биосовместимого носителя микросферы из ресорбирующего *in vivo* материала, имеющие средний диаметр 50 - 500 мкм, предпочтительно 80 - 250 мкм, и культуру клеток кожи в виде покрытия, нанесенного на поверхность этих микросфер. Существенным недостатком является использование в качестве материала микросфер полигидроксibuтирата, сополимера полигидроксibuтирата и полигидроксивалериата, полимеров лактидогликолидов, полилактонов, полиэфиров, полилактидов, полиглюколидов, полиангидридов, коллагена и желатина, поскольку использование биостабильных материалов отрицательно сказывается на их биосовместимости и удорожает их. Недостатком использования коллагеновых матриц является быстрое и нерегулируемое время биодegradации, ограничивающее срок функционирования коллагеновых изделий до 1 месяца. Разрабатываемые в рамках проекта изделия будут более технологичны и лишены недостатков, указанных выше, т.к. синтезируются на основе биополимера - фиброина шелка. Разрабатываемые микроносители на основе фиброина шелка обладают высокими показателями биосовместимости, возможностью стерилизации, долгосрочной биостабильностью. Используемые технологии получения отличаются простотой и невысокой стоимостью. Помимо этого, также важны параметры разрабатываемых микроносителей - размер частиц и их распределение, пористость, структура пор, и площадь поверхности.

В результате выполнения 2 этапа проекта была разработана следующая научно-техническая и конструкторская документация: С учетом требований ОСТ 64-02-003- 2002 был разработан Лабораторный регламент создания экспериментальных образцов биоресорбируемого микроносителя для направленной доставки клеток (БМНДК). По данному регламенту в дальнейшем будет производиться наработка экспериментальных образцов для осуществления исследований. С учетом основных положений «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под ред. Хабриева Р.У. и на основании полученных на первом этапе результатов теоретических и предварительных экспериментальных изысканий был разработан План исследований *in vivo* экспериментальных образцов БМНДК и Программа и методики испытаний экспериментальных образцов БМНДК. Методика витализации

экспериментальных образцов БМНДК. В соответствии с утвержденным регламентом была наработана партия экспериментальных образцов БМНДК. Для синтезированных образцов был проведен анализ деградации в модельных системах *in vitro*: в нейтральных условиях (в фосфатно-солевом буфере) и в окисляющих условиях (в реактиве Фентона).

В соответствии с п. 4.3 Технического задания "Требования к объектам экспериментальных исследований" синтезированные экспериментальные образцы БМНДК имеют следующие параметры: концентрация фиброина шелка в растворе 20 мг/мл, размер микроносителей варьируется от 50 до 400 мкм. Анализ данных показал, что при продолжительной инкубации в нейтральной среде образцы БМНДК были стабильны, после 21 дня инкубации их масса изменялась не более, чем на 15%. Под воздействием гидроксильных радикалов реактива Фентона образцы БМНДК разрушаются к 3-й неделе менее, чем на 50%. Таким образом, можно считать образцы БМНДК устойчивыми к деградации в окисляющей среде в течение 3 недель (рисунок 1). Деградация материала предполагает также и биорезорбцию БМНДК в условиях выраженного клеточного ответа или при развитии воспалительных процессов.

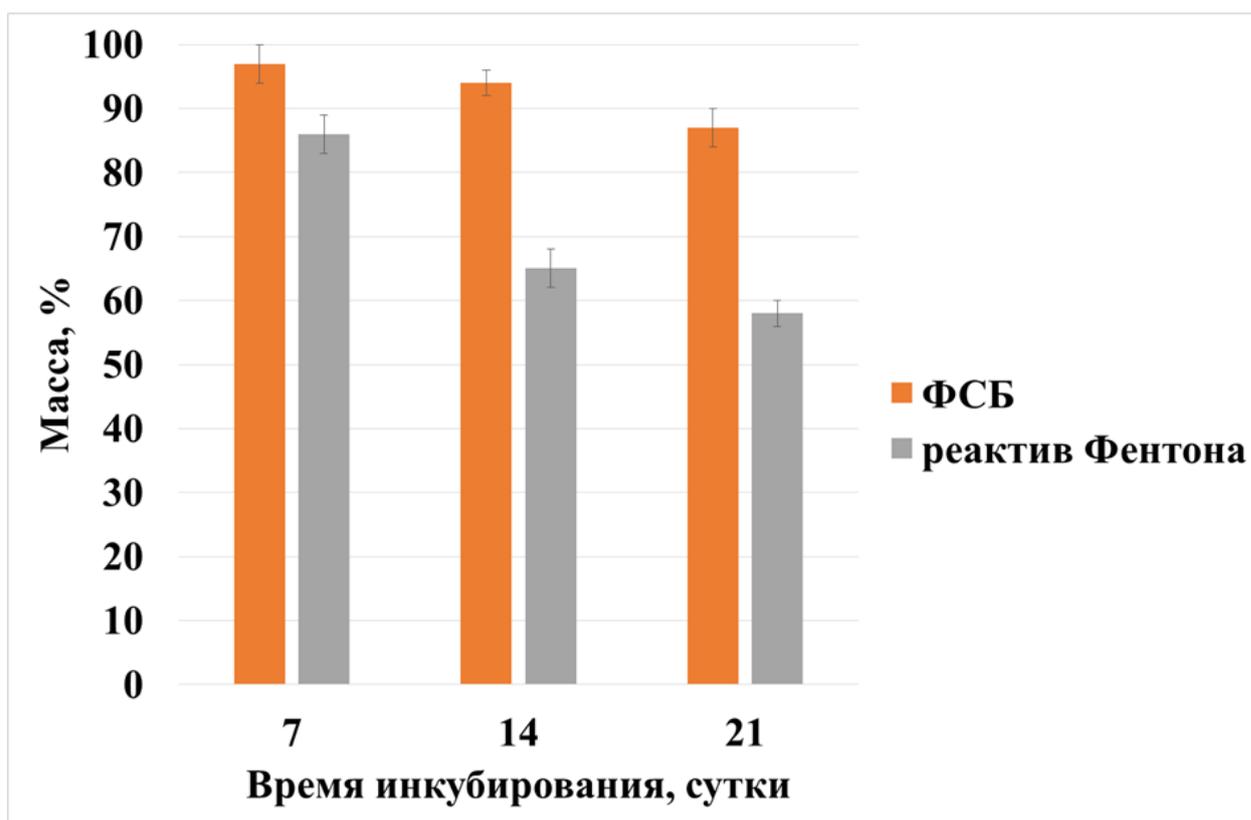


Рисунок 1 – Деструкция образцов БМНДК в модельных системах *in vitro*

Все полученные на 2 этапе данные и документы, содержащие конструктивные и технологические (методические) решения, будут использованы для реализации последующих этапов и выполнения ПНИ в целом.

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

Использование средств субсидии в размере 3 000 000 (Три миллиона) рублей, предоставленных Получателю субсидии по Соглашению с Минобрнауки России от 27 ноября 2014 г. №14.604.21.0148 на этапе № 1 Плана-графика исполнения обязательств условиям Соглашения с Минобрнауки России соответствует.

Работы по Соглашению о предоставлении субсидии от 27 ноября 2014 г. №14.604.21.0148 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