

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 № 3 в период с 01 июля 2015 года по 31 декабря 2015 года в соответствии с «Техническим заданием» и «План-графиком исполнения обязательств» были поставлены следующие цели и задачи:

Основная задача 3 этапа ПНИ – Проведение исследование в экспериментах *in vitro* и *in vivo* свойств экспериментальных образцов нового биорезорбируемого микроносителя для направленной доставки клеток (БМНДК), полученных в соответствии с научно-технической и конструкторской документацией, разработанной на предыдущих этапах.

Микроносители – это частицы от 50 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 в 1967 году van Wezel и соавт. 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. Таким образом, разработка биорезорбируемых материалов для создания суспензионных препаратов для эффективного лечения глубоких дефектов кожи является чрезвычайно актуальной задачей.

Для применения микроносителей в области регенеративной медицины большое значение имеют свойства материала, из которого они изготовлены. Фиброин – основной компонент шелка тутового шелкопряда - характеризуется высокой прочностью и эластичностью, не оказывает токсического эффекта и способен к биорезорбции *in vivo*, что обуславливает его применение для создания биомедицинских изделий. К числу таких изделий относятся фиброиновые матриксы и полученные на их основе микроносители. Такие изделия имеют пористую структуру с большой площадью поверхности на единицу объема и являются подходящим субстратом для культивирования клеток.

Использование клеточных технологий в терапии повреждений различных органов и тканей является перспективным направлением исследований, поскольку восстановление или замена поврежденного участка, а также нормализация функций происходит за счет оптимального соотношения вводимых клеточных факторов, что ускоряет этот процесс и делает его более эффективным. При лечении обширных повреждений методы клеточной терапии могут существенно сократить время заживления. Многими научными группами продолжается поиск адекватных носителей для трансплантируемых клеток, позволяющих упростить технологию трансплантации и усовершенствовать методики лечения заболеваний, обусловленных дефектами клеточных структур и тканей. Особое внимание уделяется разработке подходов к регенерации труднодоступных органов и тканей. Принципиальная возможность создания универсального биорезорбируемого изделия в виде суспензии пористого микроносителя, способного поддерживать жизнеспособность клеток разных типов, позволяет прогнозировать заметный

прорыв в области регенеративной медицины. С помощью этой технологии ведутся работы по восстановлению крупных костных фрагментов, утраченных в результате травмы или заболевания, а также по ускорению васкуляризации различных трансплантатов. Эта технология актуальна и для лечения нейродегенеративных заболеваний, поскольку центральная нервная система имеет очень ограниченные возможности для самовосстановления, и введение в нее здоровых клеток может существенно повысить успешность лечения. Поскольку проект направлен на разработку изделий медицинского назначения, предназначенных для заживления и регенерации ран, результаты проекта могут быть востребованы государственными и коммерческими организациями, деятельность которых связана с продвижением на рынок инновационных высокотехнологичных медицинских изделий и лекарственных препаратов. К таким организациям, например, можно отнести ЗАО НПП «МедИнж» и Центр Высоких Технологий "ХимРар". Основные направления деятельности включают научные исследования, разработку, внедрение и продвижение инновационных медицинских изделий, эндопротезов и имплантатов для человека.

Потребителем разрабатываемых изделий медицинского назначения могут быть специализированные медицинские учреждения и отделы лечебных учреждений общего профиля, деятельность которых связана с лечением заболеваний и повреждений различных органов. Примером таких учреждений являются: ГБУЗ МО "МОНИКИ имени М.Ф.Владимирского", ФГБУ "Российский онкологический научный центр имени Н.Н.Блохина", ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад В.И.Шумакова», НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, ФГБУ «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева» Российской академии медицинских наук, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Кроме того, на основе разрабатываемого прототипа изделия медицинского назначения впоследствии возможно создание линейки изделий, предназначенных для использования в различных областях тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Для выполнения работ третьего этапа проекта в соответствии с Лабораторным регламентом создания экспериментальных образцов биорезорбируемого микроносителя для направленной доставки клеток было синтезировано 20 г экспериментальных образцов. 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. Деградация материала предполагает также и биорезорбцию БМНДК в условиях выраженного клеточного ответа или при развитии воспалительных процессов. Исследование особенностей деградации экспериментальных образцов БМНДК в экспериментах *in vivo* при подкожном введении лабораторным животным показало, что и на 5 и на 21 сутки после имплантации наблюдаются введенные микрочастицы, на которых выявляются

многочисленные клетки, что свидетельствует о биорезорбции БМНДК. Показано, что поверхность БМНДК является прекрасным субстратом для адгезии и пролиферации как иммортализованных клеточных культур: фибробластов мыши 3Т3 и человеческих эпидермальных кератиноцитов HaCaT, так и первичных культур клеток: эмбриональных мышечных фибробластов (МЭФ), эпидермальных кератиноцитов мыши и мышечных макрофагов, полученных из костного мозга. При этом количество жизнеспособных клеток в течение 7 дней культивирования составляло не менее 90%.

На основании результатов проекта, полученных за 12 месяцев (2015 г, 2 и 3 этапы), были опубликованы две статьи в российских журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus:

1. Архипова А.Ю., Котлярова М.С., Новичкова С.Г., Агапова О.И., Куликов Д.А., Куликов А.В., Друцкая М.С., Агапов И.И., Мойсенович М.М. Новые биорезорбируемые микроносители на основе фиброина шелка, в журнале Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, Издательство Российской академии медицинских наук (Москва), том 160, № 10, с. 497-501.

2. Мойсенович М.М., Куликов Д.А., Архипова А.Ю., Малюченко Н.В., Котлярова М.С., Гончаренко А.В., Куликов А.В., Машков А.Е., Агапов И.И., Палеев Ф.Н., Свистунов А.А., Кирпичников М.П. Фундаментальные основы использования биорезорбируемых микроносителей на основе фиброина шелка в терапевтической практике на примере регенерации кожи, в журнале Терапевтический архив, Издательство «Медиа Сфера» (Москва), том 87, № 12, с. 66-72.

Также результаты проекта были представлены на трех мероприятиях (российских и с международным участием) по демонстрации и популяризации результатов и достижений науки.

По условиям Соглашения о предоставлении субсидии в отчетный период необходимо было подать 1 патентную заявку по результатам выполненных прикладных исследований. Анализ выявленных в соответствии с заданием патентного поиска по определению патентоспособности и патентной чистоты предполагаемого изобретения документов показал следующее: на дату проведения дополнительных патентных исследований объект «Биорезорбируемые микроносители для доставки клеток в область заживления и регенерации ран» на территории стран, в отношении которых проводился данный поиск абсолютно идентичных решений найдено не было, поскольку все действующие на сегодняшний день на территории Российской Федерации патенты раскрывают решения, значительно отличающиеся от предлагаемого и, соответственно, не препятствуют его производству.

При подготовке заявки на патент данное изобретение было признано патентоспособным, поскольку настоящее изобретение не имеет недостатков, присущих ниже представленному прототипу. Наиболее близким аналогом предлагаемого изобретения на территории Российской Федерации является документ RU 2104039 C1 (Нэшнл Ресеч Консил оф Канада (СА)), прекративший действие 24.04.2007, раскрывающий 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 биodeградации, ограничивающее срок функционирования коллагеновых изделий до 1 месяца.

При сравнении с наиболее близкими аналогами, выявленными в патентных базах США (US), Китая (CN), Великобритании (GB), Европейского патентного ведомства настоящее изобретения также имеет ряд преимуществ, которые могут выступить в качестве технического результата изобретения:

- размер микроносителей составляет 50 - 300 мкм, что позволяет вводить препарат в виде инъекций и, соответственно, повышать потенциал регенерации участков глубоких повреждений органов и тканей;

- применение в качестве материала частиц фиброина шелка позволяет добиться высокой биосовместимости, определяет биodeградируемость и биостимулирующие свойства препарата;

- способ получения микроносителей является простым и эффективным, а также имеет экономическое преимущество перед известными аналогами.

Таким образом, по итогам выполненных исследований в отчетном периоде был получен следующий охраноспособный РИД "Биорезорбируемые микроносители для доставки клеток в область заживления и регенерации ран". Документы, подтверждающие подачу заявки, а также текст самой заявки входят в состав этапной отчетной документации.

Все полученные на 3 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 выполненными надлежащим образом:

Использование средств субсидии в размере 1 800 000 (Один миллион восемьсот тысяч) рублей, предоставленных Получателю субсидии по Соглашению с Минобрнауки России от 27 ноября 2014 г. №14.604.21.0148 на этапе №3 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 №3 Плана-графика исполнения обязательств выполнены в установленный срок и удовлетворяют условиям данного Соглашения, в том числе Техническому заданию и Плану-графику исполнения обязательств