



(51) МПК  
*A61K 38/38* (2006.01)  
*A61K 38/39* (2006.01)  
*A61K 31/722* (2006.01)  
*A61K 9/70* (2006.01)  
*A61L 15/22* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015112383/15, 07.04.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 07.04.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.04.2015

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2016 Бюл. № 30

(45) Опубликовано: 20.11.2016 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
 поиске: US 20140046236 A1, 13.02.2014;RU  
 2404820 C2, 27.11.2010;WO 2013172788 A1,  
 21.11.2013. WO 0016817 A1, 30.03.2000.

Адрес для переписки:

124498, Москва, Зеленоград, пл. Шокина, 1,  
 МИЭТ, патентно-лицензионный отдел

(72) Автор(ы):

Морозов Роман Андреевич (RU),  
 Ромашкин Алексей Валентинович (RU),  
 Левин Денис Дмитриевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Акционерное общество "Зеленоградский  
 нанотехнологический центр" (RU)

(54) **БИОДЕГРАДИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛ БЕЛКОВ И ВОЛОКОН  
 БИОПОЛИМЕРОВ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ УСКОРЕННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ТКАНЕЙ И  
 СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биологии и медицине и заключается в биodeградируемом материале на основе белков и волокон биополимеров, который используется как клеточный каркас для роста клеток. Белок является альбумином, представляющим собой связующее, волокна биополимера являются хитозаном с молекулярной массой 70-1000 кДа и степенью деацетелирования 50-100%. Волокна биополимера диаметром 20-

500 нм формируют равномерный наноструктурированный клеточный каркас. Технический результат заключается в биорезорбируемости, сорбции жидкости не менее 100% от массы сухого материала, ускорении пролиферативной активности при культивации клеток, а также в ускорении регенерации тканей, механической прочности на разрыв не хуже 1 МПа. 4 з.п. ф-лы, 3 пр., 5 ил.

RU 2 602 775 C2

RU 2 602 775 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 38/38* (2006.01)  
*A61K 38/39* (2006.01)  
*A61K 31/722* (2006.01)  
*A61K 9/70* (2006.01)  
*A61L 15/22* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2015112383/15, 07.04.2015**(24) Effective date for property rights:  
**07.04.2015**

Priority:

(22) Date of filing: **07.04.2015**(43) Application published: **27.10.2016** Bull. № 30(45) Date of publication: **20.11.2016** Bull. № 32

Mail address:

**124498, Moskva, Zelenograd, pl. SHokina, 1, MIET,  
patentno-litsenzionnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Morozov Roman Andreevich (RU),  
Romashkin Aleksej Valentinovich (RU),  
Levin Denis Dmitrievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Aktsionernoe obshchestvo "Zelenogradskij  
nanotekhnologicheskij tsentr" (RU)**(54) **BIODEGRADABLE MATERIAL BASED ON PROTEIN MOLECULES AND FIBRES OF BIOPOLYMERS TO PROVIDE FOR FAST TISSUE REPAIR AND PRODUCTION METHOD THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to biology and medicine and consists in biodegradable material on the basis of proteins and fibres of biopolymers, which is used as cellular frame for cell growth. Protein is albumin which is a binder; biopolymer fibres are chitosan with molecular weight of 70-1,000 kDa and degree of deacetylation of 50-100 %. Biopolymer fibres with the diameter of 20-500 nm make a uniform nano

structured cell frame.

EFFECT: technical result consists in ability to bioresorption, liquid sorption of not less than 100 % of the weight of dry material, acceleration of proliferative activity during cell cultivation, as well as faster tissue regeneration, mechanical strength of not less than 1 MPa.

5 cl, 3 ex, 5 dwg

Изобретение относится к биологии и медицине, а именно к медицинским средствам для лечения ран различной этиологии внутренних органов, к области клеточной биотехнологии и биоинженерии, и может быть использовано для культивирования, ускорения пролиферативной активности клеток как биоразлагаемое адгезивное, способное сорбировать раневой экссудат покрытие для ускоренного восстановления поврежденных при проведении хирургических операций внутренних органов.

В настоящее время существуют многочисленные доступные биоразлагаемые материалы, которые могут быть использованы в качестве клеточных каркасов в регенеративной медицине. В настоящее время существует огромный интерес к формированию биоразлагаемых каркасов. Разрабатываемые материалы должны иметь определенные сочетания различных свойств с тем, чтобы соответствовать конкретным приложениям и обеспечивать увеличенную способность к восстановлению клеток тканей. Модификации клеточных каркасов могут быть осуществлены несколькими способами, в частности химической модификацией компонентов, применением волокон биополимеров различного диаметра, формируя различную морфологию поверхности, пористость. В дополнение к исходным материалам, которые выступают в роли компонентов клеточных каркасов, наиболее важным является формируемое в конечном изделии их взаимосвязь, определяющая процессы регенерации формируемого каркаса. Модифицированные материалы должны быть способны поддерживать выживание и рост различных типов клеток. Учет взаимодействия клеток при их росте с модифицированными биоматериалами способствуют улучшению материалов тканевой инженерии, что ведет к улучшению их возможностей и характеристик.

Важнейшим компонентом тканевой инженерии и регенеративной медицины, помимо проблемы культивации клеток определенных типов, является разработка клеточных каркасов, способствующих ускоренному восстановлению пораженной ткани. Каркас должен является временной матрицей, которая поддерживает прикрепление клеток (то есть является матриксом для вновь образующихся клеточных структур) и обеспечивает их ускоренную пролиферацию. Клеточный каркас должен обладать биосовместимостью, чтобы обеспечить выживание клеток и минимальный иммунный ответ после имплантации. Способность к биологическому разложению материалов, на основе которых сформирован клеточный каркас, является еще одним важным фактором при формировании клеточных каркасов. Биоразлагаемость ухудшается по мере улучшения механических свойств, которые при этом должны быть адекватны задачам, в которых применяется каркас. После имплантации каркас должен своевременно биодеградировать, чтобы обеспечить надлежащее восстановление ткани. Пористость и влагопоглощение при этом также играет важную роль в обеспечении взаимодействия материала с пораженным участком ткани. Клеточный каркас, являющийся результатом баланса между всеми этими факторами, идеально подходит для решения задач регенеративной медицины. Для этого недостаточно использовать какой-либо один материал.

Необходимо применение нескольких исходных материалов в различной форме с их физической или химической модификацией, достигая при этом связывания между собой, чтобы улучшить биологическую активность и механическую прочность изделия. Учитывая все вышеперечисленные факторы, наиболее оптимальный конструктив каркаса для тканевой инженерии и регенеративной медицины является по-прежнему актуальной проблемой (Khalil N. Bitar, Elie Zakhem, Design Strategies of Biodegradable Scaffolds for tissue regeneration // Biomedical Engineering and Computational Biology. 2014. №6. P. 13-20, doi: 10.4137/VecB.S10961).

В настоящее время ведутся исследования в области создания клеточных каркасов и

биodeградируемых изделий на их основе. В частности, известно использование их для восстановления кожных покровов, лечения ран и ожогов (RU 2513838, RU 2522216, WO 2014065772 A1), используемых как гемостатическое средство (RU 2487701), средство восстановления костных тканей (RU 2491960). При этом чаще всего используются материалы на основе природных биополимеров, например хитозана или коллагена. Также возможен синтез различных биоматериалов для формирования каркасов и использование различных методов модификации конструкции этих каркасов. Недостатком использования синтетических полимеров, является их неспособность поддерживать прикрепление клеток и обеспечивать биodeградацию изделия в целом. Необходима либо их химическая модификация для улучшения биосовместимости и ускорения роста клеток, либо добавление связующих материалов, в частности белков и биополимеров например коллагена различных типов, фибронектина и поли ( $\epsilon$ -капролактон), что дает улучшение биологического поведения данных материалов в клеточных каркасах и повышенный рост клеточных колоний (Declercq H.A., Desmet T., Berneel E.E., Dubruel P., Comelissen M.J., Synergistic effect of surface modification and scaffold design of bioplotting 3-D polyepsilon-caprolactone scaffolds in osteogenic tissue engineering. // Acta Biomater. 2013. V. 9 N 8. P. 7699-7708). Однако даже это не гарантирует их полную биосовместимость и не обеспечивает должную биodeградируемость. Этим обуславливается широкое использование в качестве исходных для образования клеточных каркасов материалов природного происхождения, причем как животного, так и иногда растительного происхождения.

При проектировании клеточных каркасов в тканевой инженерии важно учитывать, физиологическое состояние, в котором материал будет имплантирован, а вместе с ним и механические свойства при растяжении, прочность удержания хирургических швов, необходимую прочность на разрыв, выдерживаемое давление и сорбцию жидкости. Данные материалы должны иметь достаточную прочность, чтобы не разрушаться в процессе переноса их на поверхность раны, в процессе наложения швов или при воздействии давления, сгиба. Отдельные структурированные волокна коллагена и хитозана обладают сами по себе достаточной прочностью - до 200 МПа [Kadriye Tuzlakoglu, Catarina M. Alves, Joao F. Mano, Rui L. Reis, Production and Characterization of Chitosan Fibers and 3-D Fiber Mesh Scaffolds for Tissue Engineering Applications // Macromolecular Bioscience, 2004. V. 4, Iss. 8, P. 811-819], но изготовление материалов на их основе требует формирования определенных связей компонентов, в частности взаимосвязи между волокнами биополимеров, диаметр которых не должен быть слишком большим, т.к. это приведет к ухудшению сорбции жидкости и, соответственно, биорезорбции материала. При использовании волокон биополимеров большого диаметра также ухудшается эффективная площадь взаимодействия волокон биополимеров между собой, что также снижает механические свойства формируемого каркаса. В то же время при оптимальном диаметре волокон биополимеров сохраняется их структура, удельная механическая прочность, а скорость биodeградации остается приемлемой. Биodeградация связана с набуханием, ввиду сорбции жидкости и взаимодействием с различными молекулами и ферментами, появляющимися в процессе роста клеток. При этом увеличение диаметра волокон биополимеров при сохранении их структурированности ведет к уменьшению степени набухания [C. Cunha-Reis, K. TuzlaKoglu, Y. Yang, A. El Haj, R.L. Reis, A New Method for Tailoring the Degradation Rate of Chitosan Fibre-mesh Scaffolds // European Cells and Materials 2006. Vol.11. Suppl. 3. P. 35], величина которого в указанной работе составляла для использовавшихся волокон биополимеров 90 мкм и 200 мкм порядка 260 и 170 процентов соответственно. Таким

образом, увеличение диаметра волокон биополимеров приводит к существенному ухудшению степени набухания волокон биополимеров в материале, что, очевидно, также ведет и к увеличению времени резорбции. Обеспечение оптимального времени резорбции непосредственным образом влияет на функционирование каркаса (должна  
5 обеспечиваться ускоренная пролиферация клеток, а сам каркас должен служить матриксом для вновь образующихся клеточных структур, что очевидно будет малоэффективно при малой скорости биодеградации). Организация же взаимосвязи более тонких волокон биополимеров (до 500 нм в диаметре) меньшей длины в целостный материал, который обладал бы приемлемыми для его применения механическими  
10 свойствами, является на данный момент весьма актуальной задачей.

При регенерации тканей используются так называемые факторы роста - определенные вещества, стимулирующие рост клеток. Доставка полезных веществ, в том числе факторов роста, или антибиотиков, или иных биологически активных молекул, также является важной функцией, которую способны обеспечивать клеточные каркасы. Для  
15 обеспечения надлежащей доставки и необходимо контролируемое высвобождение функциональных биологически активных молекул из материала клеточного каркаса. Такие модифицированные полимерные матрицы используются для повышения терапевтической эффективности клеточных каркасов и изделий на их основе [Khalil N. Bitar, Elie Zakhem, Design Strategies of Biodegradable Scaffolds for tissue regeneration //  
20 Biomedical Engineering and Computational Biology. 2014. N6. P. 13-20, doi:10.4137/VecB.S10961]. Обеспечение данной функции возможно также лишь в случае высоких значений сорбируемой жидкости (100% по массе сухого каркаса).

Таким образом, в силу всех вышеприведенных причин общим недостатком входящих в существующий уровень техники и технологии формирования биодеградируемых  
25 материалов для ускоренного восстановления тканей является то, что совокупность их свойств и основных функций не является приемлемой для эффективного применения клеточных каркасов и изделий на их основе в широкой хирургической практике, отрасли регенеративной медицины ввиду как использования химической сшивки с использованием кислот (WO 2009049565 A2), что не способствует ускорению  
30 пролиферации клеток и даже снижающей показатели пролиферации клеток (см. Фиг. 1), волокон биополимеров большого (более 400 нм) диаметра (WO 2009049565 A2, RU 2522216), невозможность использования синтетических полимеров ввиду необходимости биодеградации всех материалов для применения при хирургических операциях внутренних органов, недостаточная механическая прочность (RU 2513838). Таким  
35 образом, известные в настоящее время варианты клеточного каркаса (КК) (биодеградируемых гемостатических материалов, имплантов, раневых покрытий) и способы формирования не обеспечивают сочетания в себе всего набора необходимых свойств.

Задача, на решение которой направлено настоящее изобретение, заключается в  
40 создании нового биодеградируемого в относительно короткие сроки материала (от 15 до 30 дней с возможностью увеличения времени биодеградации путем изменения соотношения компонентов) с биорезорбцией компонента его составляющих или продуктов их биодеградации. Данный материал должен обеспечивать одновременно как механические свойства (не хуже 1 МПа по прочности на разрыв), так и ускоренное  
45 восстановление тканей, а также иметь приемлемые показатели по сорбции жидкости (как минимум более 100% от массы исходного сухого материала), адгезии к тканям, которое исключает указанные выше недостатки биодеградируемых материалов и изделий на их основе.

Задача состоит в разработке растворимых суспензий биополимеров и их смесей, пригодных для формирования с их помощью микро- и наноструктурированных слоев в требуемой последовательности для обеспечения формирования биodeградируемых материалов, ускоряющих регенерацию тканей; а также предложении подхода к организации взаимодействия компонентов материала, обеспечивающего формирование материала с совокупностью свойств, необходимых для применения данного материала при ускоренном восстановлении поврежденных тканей при хирургических операциях на внутренних органах, а именно достаточную для применения механическую прочность (не хуже 1 МПа по прочности на разрыв), адгезию к тканям, обеспечение функции клеточного матрикса/каркаса для роста клеток в сочетании с увеличением пролиферативной активности клеток тканей, сорбции физиологических жидкостей на уровне не хуже 100% по массе, биodeградируемость (от 15 до 30 дней с возможностью увеличения времени биodeградации путем изменения соотношения компонентов материала) с биорезорбцией продуктов биodeградации.

Биodeградируемый материал, формируемый в результате реализации изобретения, характеризуется обеспечением совокупности следующих свойств:

- целостность при смачивании и механическая прочность (не хуже 1 МПа по прочности на разрыв);
- адгезионная способность к ране;
- биосовместимость;
- полная биodeградируемость (от 15 до 30 дней с возможностью увеличения времени биodeградации путем изменения соотношения компонентов материала) с биорезорбцией продуктов биodeградации.

При этом биodeградируемый материал, получаемый в результате реализации изобретения, характеризуется следующей функциональностью:

- являться матриксом для вновь образующихся клеточных структур;
- обеспечивать ускоренное восстановление поврежденных тканей при хирургических операциях на внутренних органах;
- обеспечивать сорбцию жидкости, в т.ч. раневого экссудата, а также растворов водорастворимых лекарственных средств в количестве не менее собственной массы.

Указанные свойства и функции достигаются в наноструктурированном биodeградируемом материале (см. Фиг. 4), формируемом на основе молекул белков и волокон биополимеров, который содержит волокна хитозана молекулярной массы от 70 до 1000 кДа со степенью деацетелирования от 50 до 100%; белок в виде биосовместимых и биodeградируемых и биорезорбируемых глобулярных водорастворимых молекул, в частности альбумина различного происхождения, например бычьего сывороточного альбумина, человеческого альбумина, альбумина яичного или их смеси, способных взаимодействовать с волокнами хитозана, обволакивать и/или связывать между собой волокна хитозана и/или коллагена, в том числе при температурной обработке раствора, в том числе при наличии коллагеновых волокон, стабилизируя исходный коллоидный раствор, в диапазоне от отношений по массе от не менее 0,3 до не более 2 относительно массы хитозана.

Волокна биополимеров, такие как хитозан и коллаген, сложно растворимые в воде, в том числе в виду высокой молекулярной массы, содержащие, тем не менее, полярные группы, способные взаимодействовать с внешними аминокислотными остатками, входящими в состав внешней нативной формы водорастворимых глобулярных белков, группы альбуминов, которые, в то же время, в своей нативной форме не достаточно эффективно могут связывать волокна между собой в растворе, и материала, в то же

время, в процессе частичной денатурации могут активно начать взаимодействовать с волокнами биополимеров в виду изменения своей вторичной и третичной структур. Что приводит к формированию частичного связывания и формированию целостного материала без использования предварительной химической модификации волокон биополимеров и глобулярных молекул белков.

Биодеградируемый материал также может содержать коллаген в виде волокон биополимеров малой длины (длина волокон не более 0,5 от длины волокон хитозана), образующего в водном растворе стабильный или медленно седиментирующий коллоидный раствор (в сравнении с водным коллоидным раствором чистого хитозана), в диапазоне от отношений по массе от 0,5 до 2 относительно массы хитозана.

Уменьшение длины волокон коллагена путем ультразвуковой обработки способствует формированию более стабильного водного коллоидного раствора коллагена относительно коллоидного раствора, необработанного ультразвуковым воздействием коллагена. С другой стороны, наличие фрагментов молекул фибриллярного белка коллагена, длина которых не более 0,5 от длины волокон хитозана, может выступать стабилизирующим коллоидный раствор неизмененных длинных волокон биополимеров (в том числе хитозана) фактором и может обеспечивать участие коротких фрагментов волокон биополимеров в процессе связывания длинных волокон биополимеров при термообработке, увеличивая эффективность связывания длинных волокон биополимеров при действии глобулярных молекул белков группы альбуминов в процессе частичной денатурации последних.

Предлагаемый способ формирования материала, в основе которого, в отличие от большинства известных аналогов, лежит не химический, без использования кислот, способ формирования материала, основанный на взаимодействии компонентов материала, а именно волокон хитозана, в том числе с короткими волокнами коллагена с белковыми молекулами, например альбумина или иных глобулярных молекул белка группы альбуминов, обеспечивающих функцию связывания компонентов посредством термообработки при температурах, находящихся в таком диапазоне, который обеспечивал бы, с одной стороны, - существенную перестройку формы связующего компонента, в результате которой образуются биоразлагаемые молекулы и соединения, в роли которого может выступать, например, альбумин, или иной белок, образованный водорастворимыми биосовместимыми и биодеградируемыми и биорезорбируемыми глобулярными молекулами группы альбуминов или их смеси; а, с другой стороны, - не нарушение структуры волокон хитозана и, в том числе, волокон коллагена, а также увеличение взаимодействия хитозановых волокон как с коллагеновыми волокнами, так и с молекулами связующего биополимера. При этом в материале концентрация каждого из компонентов может изменяться таким образом, что на поверхности может присутствовать один из компонентов, наиболее приемлемых с точки зрения формирования адгезионных свойств к тканям внутренних органов. В зависимости от типа тканей это может быть как коллаген, так и хитозан, так и связующий компонент.

Таким образом, заявленный материал и способ его получения обеспечивается получением композиции веществ в виде описанного раствора с формированием из него в процессе осаждения на подложку и термообработки описанного биодеградируемого материала.

Для обеспечения изменяемой по толщине материала концентрации компонента предлагается следующий способ формирования материала. Формирование медленно седиментирующего (время образования видимого осадка от минуты до 5 суток) водного коллоидного раствора исходных компонентов путем сочетания способов перемешивания

и/или ультразвуковой обработки, который затем наносится на подложку, в том числе средствами аэрозольного распыления. Концентрация раствора в процессе нанесения может быть изменена посредством дополнительного добавления одного или нескольких исходных компонентов раствора с заданной концентрацией в виде коллоидного или  
5 обычного раствора, в случае растворимого связующего компонента. При этом в процессе нанесения раствора подложка может нагреваться до температур, необходимых для связывания компонентов вблизи подложки и/или во всем объеме нанесенного материала в зависимости от типа нагрева (с одной из сторон формируемого материала или всего объема биоматериала), либо одного компонента между собой по описанному  
10 способу.

Применение глобулярных водорастворимых молекул белков группы альбуминов в составе коллоидных растворов, содержащих волокна биополимеров, позволяет достичь большей стабильности коллоидного раствора в отсутствие химической модификации волокон биополимеров по сравнению со стабильностью коллоидного раствора не  
15 модифицированных волокон биополимеров, т.е. большего времени его седиментации, что, с одной стороны, препятствует неравномерному распределению волокон биополимеров в объеме материала в процессе термообработки раствора непосредственно на подложке, а с другой стороны, - позволяет применять принципы аэрозольного нанесения раствора на поверхность подложки. Применение  
20 пневматического аэрозольного распыления возможно только при условии достаточной стабильности коллоидных растворов, а также отсутствия крупных конгломератов волокон биополимеров в растворе и отсутствия тенденции к осаждению волокон биополимеров на внутренних каналах и/или поверхностях распылительного узла. С другой стороны, применение альбумина способствует как увеличению стабильности,  
25 так и снижению степени коагуляции волокон биополимеров, взаимодействующих с водорастворимыми молекулами альбумина.

За счет применения аэрозольного нанесения реализуется возможность осуществлять термообработку раствора в объеме микрокапель, обеспечивающую как связывание, так и уход растворителя из объема микрокапли, которая формируется в процессе  
30 аэрозольного нанесения. Данное обстоятельство дает два преимущества. Первое преимущество заключается в большей удельной в единицу времени массе формируемого материала за счет большей скорости ухода растворителя из объема микрокапель (размером от 0,3 до 30 мкм) в сравнении со скоростью ухода растворителя из объема нанесенного слоя коллоидного раствора. Изменение размера микрокапель в  
35 аэрозольном методе определяется условием микро- и наноструктурированности слоев латерально в толщине слоя, а также требованием скорости ухода растворителя из объема слоя, т.е. скорости формирования самого материала, при том, что нижний предел размера микрокапель ограничен необходимостью присутствия растворителя в течение времени, достаточного для начала процессов денатурации, а также связывания  
40 глобулярными молекулами белка молекул биополимеров в объеме микрокапли до устранения жидкой фазы растворителя. Верхний предел размера микрокапель обусловлен условиями структурированности, а также нивелированием эффективности ухода растворителя из объема микрокапель в сравнении с объемом формируемого слоя. Второе преимущество заключается в возможности послойного формирования  
45 материала с контролируемым изменением взаимной концентрации компонентов раствора при переходе от одного слоя к последующему слою, в частности снижении до нуля массовой доли волокон хитозана и/или волокон коллагена в одном или нескольких слоях, сформированных подобным образом при создании материала. Таким



образом, применение аэрозольного послойного формирования биodeградируемого материала возможно для формирования покрытий (Фиг. 5) для тканых и нетканых перевязочных средств и/или поверхностей культивации различных клеток, обеспечивая ускоренную пролиферацию клеток. Нижний предел толщины определяется диаметром  
5 используемых волокон биополимеров и размером микрокапель, достижимых при аэрозольном нанесении, в то время как верхний предел толщины ограничен особенностями проникновения растворителя в уже сформированные ранее слои в совокупности с ограничением по температурному воздействию в процессе аэрозольного нанесения, обусловленному частичной денатурации молекул глобулярных белков.

10 Использование в качестве сшивающего агента био-полимера/олигомера, в качестве которого используется глобулярные молекулы группы альбуминов, который ввиду взаимодействия как посредством образования ван-дер-ваальсовых связей, так и водородных связей, может даже в отсутствии температурной обработки достаточно эффективно связывать волокна хитозана/коллагена между собой, обладает рядом  
15 преимуществ. В большинстве способов формирования подобных материалов используются модифицированные волокна хитозана/коллагена посредством использования кислот, а также непосредственное использование кислот для сшивки волокон биополимеров. Однако такой подход не способствует ускоренной пролиферации клеток ввиду, во-первых, изменения структуры волокон биополимеров, и, во-вторых,  
20 содержания кислотных функциональных групп, имеющих рН, отличный от необходимого для благоприятного роста клеток, что в совокупности не только не способствует формированию нужной для деления клеток морфологии поверхности (исходных тонких волокон биополимеров практически нет) на микро- и наноуровне, но и приводит к существенному ухудшению таких характеристик исходных волокон  
25 биополимеров как: сорбция жидкости, гибкость, высокая скорость и степень биodeградации с возможностью биорезорбции (исходные волокна биополимеров меньшего диаметра биodeградируют быстрее и практически полностью, в отличие от их возможных модификаций), а вместе с ними и ухудшению параметров материала в целом, не обеспечивая нужного сочетания свойств.

30 При использовании по предлагаемому способу и составу температурного воздействия приводит к денатурации белковых молекул или иных молекул, претерпевающих существенные структурные изменения в диапазоне температур, необходимых для такого изменения, и при этом значения температуры должны быть таковы, чтобы не изменять структуры волокон хитозана и коллагена или лишь незначительно изменять их, не  
35 влияя на их свойства по сорбции влаги и биорезорбции. Известно, что температура денатурации (начала изменения и разложения), например, белковых молекул, содержащих достаточно большое разнообразие функциональных групп, способных при их высвобождении из исходной молекулярной структуры белковой молекулы выходить на эффективные позиции для взаимодействия с наиболее выгодными по  
40 энергии функциональными группами волокон коллагена и хитозана, находится в диапазоне от 40 до 90°C в зависимости от строения конкретной молекулы белка, потери третичной, вторичной и частично первичной структуры исходной белковой молекулы. Для бычьего сывороточного альбумина температура существенной перестройки его молекулы, при этом существенно необратимой, лежит в диапазоне от 70 до 100°C (А.  
45 Michnik, Thermal stability of bovine serum albumin DSC study // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2003. V. 71, Iss. 2, P. 509-519), при этом полная необратимость достигается именно при температурах даже несколько выше 100°C (при циклическом нагреве возвращается к исходному состоянию менее 8% по массе). С другой стороны,

температурная стабильность хитозана (до начала существенных изменений) составляет около 200°C (Sakurai K.; Maegawa T.; Takahashi T., Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends // Polymer, 2000, V. 41, N19, P. 7051-7056). Таким образом, есть существенный диапазон температур, обеспечивающий сохранение исходной структуры изначально биосовместимого биodeградируемого материала - хитозана и в то же время эффективное связывание его волокон активированным термическим процессом перестройки белковой структуры молекулы - началом денатурации белковых молекул.

При этом было показано, что при подобной термообработке материала на основе волокон хитозана с содержанием коротких волокон коллагена, где использовался сшивающий агент в виде молекул бычьего сывороточного альбумина, сорбционные свойства сохранялись на уровне лучше, чем 100% сорбции жидкости от массы сухого материала (проверялось взвешиванием образца сухого и впитавшего жидкость после вымачивания в воде), а также в проведенных экспериментах с лабораторными животными на поврежденной печени в рамках предклинических исследований материала (см. Фиг. 2) была выявлена биodeградация материала оценочно за 20-30 дней пребывания в живом организме. Эти обстоятельства указывают на отсутствие существенных изменений характеристик волокон хитозана и, в том числе, коллагена. При наличии сшивающего агента в виде белка в отличие от высушенных при аналогичных температурах порошков хитозана и коллагена в любых массовых сочетаниях была выявлена достаточная для переноса материала на ткани органов механическая прочность (как минимум на порядок отличие по прочности на разрыв - порядка 0,1 МПа против порядка 1 МПа и выше при наличии белковых молекул при термообработке). При этом в материале присутствовали исходные волокна хитозана (см. Фиг. 3), образующие распределенную сетчатую структуру. Значение pH растворов и итогового материала, полученного из них ввиду отсутствия кислот, используемых при формовке итогового материала, также обеспечивался приемлемым для применения на тканях внутренних органов без их повреждения. Совокупность факторов морфологии (сохранение исходных волокон биополимеров) и приемлемого значения pH у поверхности материала и отсутствие молекул кислот обеспечивает ускоренную пролиферацию клеток тканей как минимум печени (см. Фиг. 1). Таким образом, вышеуказанный функционал обеспечивается предлагаемым составом и способом формирования материала.

Известно изобретение US 6992172 B1 - gels comprising hydroxylated amino acid sequences used as capsules, stabilizing agents, film-forming agents, moisturizers, emulsifiers, thickeners, colloids, adhesive agents, flocculants, coatings or carriers (гели, содержащие гидроксильированные аминокислотные последовательности, используемые в виде капсул, стабилизирующих агентов, пленкообразующих веществ, увлажнители, эмульгаторы, загустители, коллоиды, адгезивные агенты, флокулянты, покрытий или носителей). В нем предлагается использование в качестве стабилизирующих агентов коллаген и полипептиды схожие с коллагеном, а также измененные коллагены с помощью синтезированных за счет измененных последовательностей ДНК, а также их гидролизатов. Данные модификации коллагена могут отличаться лучшими свойствами и иметь некоторые дополнительные свойства позволяющие применять их в задачах медицины, пищевой промышленности. Однако предполагаемый синтез измененных коллагеновых молекул различного молекулярного веса достаточно сложен и дорог. В отличие от указанного патента в настоящем изобретении предлагается использование неизмененного химическими модификациями природного коллагена 1 и 3 типов

(возможно для специфического применения и других типов) выделенного из материалов переработки крупного рогатого скота либо иных доступных естественно-природных исходных источников сырья. При этом предлагается лишь его физическая модификация посредством обработки в ультразвуке в растворе для обеспечения размера частиц (в виде кусков исходно длинных волокон биополимеров) меньших в сравнении с размерами используемых волокон хитозана. При этом предлагаемый материал может содержать как коллаген, в качестве впитывающего влагу добавки наряду с хитозаном, а также для формирования наряду со сшивающим агентом более стабильной коллоидной системы, так и не иметь коллагена в своем составе, сохраняя при этом на приемлемом уровне всю совокупность указанных выше свойств и функций.

Известно изобретение WO 2009049565 A2 - Method for production of nanofibres (Способ производства нановолокон). Изобретение относится к способу производства нановолокон методом электростатического формования волокна из полимерных матриц, приготовленных из биополимеров хитозана или коллагена. Биополимер перед формованием растворяют в чистой воде или в смеси со вспомогательным нетоксичным полимером в системе растворителей, которая содержит органическую или

неорганическую кислоту, выбранную из группы, включающей уксусную кислоту в концентрации от 30% до 90% от веса, молочную кислоту, яблочную кислоту, фосфорную кислоту и их смеси, и этот раствор вводят в электростатическом поле между волокнообразующим электродом и коллекторным электродом, в то время как полученные из биополимеров нановолокна включают в себя более чем 90% от веса биополимера в сухой массе. Применение кислот в указанном изобретении необходимо для сшивки волокон коллагена и хитозана, однако ведет, как указывалось выше, к потере ряда свойств. Принципиальное отличие от указанного изобретения состоит не только в отсутствии применения электроформования волокон, но также в применении принципиально другого вещества для сшивки волокон в материале. Применении не кислот, а белковых молекул или любого другого водорастворимого биосовместимого и биodeградируемого био-полимера/-олигомера или смеси нескольких различных биополимеров/-олигомеров или их производных, способного взаимодействовать с волокнами хитозана обволакивать и/или связывать между собой волокна хитозана и/или коллагена в том числе при температурной обработке раствора, что в отличие от указанного изобретения не только не увеличивает диаметра волокон биополимеров, но и обеспечивает улучшенные свойства по параметру пролиферативной активности клеток на материале, сформированном по описанному механизму из указанных компонентов.

Известно изобретение WO 1994027630 A1 - Cross-linked gelatin gel preparation containing basic fibroblast growth factor (Приготовление геля в виде сшитого желатина, содержащего фактор роста фибробластов). Приготовление сшитого желатина в виде геля, содержащего фактор роста фибробластов (bFGF), где гель используют в качестве носителя устойчивого высвобождения и содержания влаги с возможностью деградации в естественных условиях, при этом параметры поглощения могут изменяться при изменении условий получения геля. В одном из вариантов предлагается использовать в качестве сшивающего агента для желатина - глутаральдегид или водорастворимый карбодимид. В отличие от указанного изобретения в предлагаемом изобретении используются существенно иные органические молекулы - белковые молекулы или любой другой водорастворимый биосовместимый и биodeградируемый био-полимер/-олигомер или смесь нескольких различных био-полимеров/-олигомеров или их производных, способный взаимодействовать с волокнами хитозана обволакивать и/

или связывать между собой волокна хитозана и/или коллагена, в том числе при температурной обработке раствора. При этом структура материала также может содержать остаточную жидкость, в том числе содержащую различные препараты, а также и факторы роста, однако основным каркасообразующим материалом при этом является не коллаген, а волокна хитозана в сочетании с различным количеством коллагена, в том числе и в отсутствии последнего. Применение же связующего материала на основе веществ, предлагаемых в указанном патенте, приводит к существенным изменениям исходных волокон биополимеров и образует даже в малых концентрациях слои, морфология которых принципиально отличается от предлагаемой. Кроме того, предлагаемый материал обеспечивает ускоренную пролиферацию клеток даже в отсутствие факторов роста за счет неизменной структуры волокон биополимеров и других факторов, влияющих на рост клеток. Таким образом, описанные выше функционал и свойства обеспечиваются иным механизмом, чем в указанном патенте.

Наиболее близким аналогом является изобретение WO 2008072379 A1 - Method for producing modified biopolymer and method for crosslinking biopolymers (Способ получения модифицированного биополимера и способ сшивания биополимеров). В нем предлагается способ химической модификации структуры, полученной из желатина или ему подобных, используя химическое соединение с низкой летучестью без растворения желатина в растворах, а также к способу сшивания биополимеров для производства биополимера с высокой прочностью (высокой степени сшивки).

В приведенном изобретении предложен 1) - способ получения модифицированного биополимера, включающий стадию взаимодействия структуры из биополимера с соединением, которое имеет температуру плавления 50°C или выше и находится в твердом состоянии при влажности 50% и выше, и также 2) - способ сшивания биополимеров, включающий стадию обработки биополимера со сшивающим агентом, отличающийся тем, что концентрация сшивающего агента в реакционной смеси составляет от 1,0 до 10% по весу, и сшивание осуществляется в присутствии фторорганических соединений. В первом способе предлагается в указанном патенте несколько вариантов целевых биополимеров или их сочетания, сшивку которых можно осуществлять сшивающим соединением с температурой плавления выше 50°C, при этом альбумин в данном изобретении наряду с коллагеном и хитозаном отнесен к ряду целевых биополимеров, которые сшиваются неким другим соединением посредством термообработки. В отличие от указанного изобретения в настоящем изобретении альбумин (может быть различного происхождения - от переработки крупного рогатого скота, свиней, рыб, а также человеческий и также полученный с использованием измененного генома) используется как сшивающий агент для волокон хитозана и, в том числе, в присутствии коллагена. Температуры, при которых производится сшивка, превышают температуру денатурации альбумина, однако процесс денатурации белка существенно отличен от плавления в достаточно общем смысле этого термина, приводимого в указанном патенте. Кроме того, в отличие от указанного патента, где предполагается использование модифицированного желатина, коллагена или хитозана и его последующей сшивки, в настоящем изобретении термообработку предлагается проводить в исходно водных растворах, а исходная структура хитозана и коллагена не изменена химически. Во втором способе указанного патента предлагается несколько отличный от описанного в указанном патенте первого способа - способ сшивки, однако в нем также альбумин упоминается как целевой биополимер для сшивки, а реакции предлагается проводить в присутствии фторорганических соединений. В отличие от упомянутого способа из указанного патента в настоящем изобретении альбумин

используется в качестве сшивающего агента, а не объекта сшивки (им являются волокна коллагена и хитозана), а реакция происходит в водной среде при термообработке и, что существенно, в отсутствии фторорганических соединений.

Известно изобретение WO 200511121 A2 - Method for producing shaped bodies made from crosslinked gelatine (Метод создания формованных изделий из сшитого желатина), в котором предлагается термообработка уже частично сшитого биополимера - желатина для придания формы с целью создания различной формы биосовместимых имплантов. В отличие от указанного изобретения предлагаемый способ подразумевает формирование увеличения взаимодействия между волокнами хитозана и, в том числе, в присутствии волокон коллагена, которое следует интерпретировать как сшивку непосредственно в процессе термообработки исходно жидкого раствора в форме на подложке, что, во-первых, в отличие от указанного патента происходит в одном процессе, а не многостадийно, и, во-вторых, позволяет в отличие от материалов на основе желатина формировать за счет наличия в составе неизменных волокон хитозана и, в том числе, коллагена более прочные пластинчатые листовые структуры, способные к изгибу при содержании остаточной воды в составе и/или при смачивании.

Известно изобретение RU 2522216 - многослойный материал с хитозановым слоем из нано- и ультратонких волокон, в котором материал состоит из нескольких слоев: внутренний слой выполнен из хитозановых нано/ультратонких волокон, а наружные слои играют роль подложки для электроформования и осуществляют защитную функцию. Трехслойный материал с хитозановым слоем из нано/ультратонких волокон предназначен для местного лечения ран и ожогов является устойчивым к механическим воздействиям, однако нет возможности к его полной биосовместимости и биодegradируемости, формирование которой как минимум затруднено наличием дополнительного полимера, в частности полиэтиленоксида в количестве как минимум 0,5% массовых от содержания хитозана, и сильно ограничивает применения материала при хирургических операциях на внутренних органах. Также диаметр волокон материала, указанного в патенте, хотя и может не превышать 1 мкм, тем не менее очевидно на порядок выше, чем у исходных волокон хитозана до процесса электроформования, что ввиду описанного выше в настоящем патенте ухудшает параметры материала как по сорбции жидкости, так и по биодegradируемости.

Известно изобретение RU 2513838 - Гистозэквивалент-биопластический материал. Гистозэквивалент-биопластический материал получают путем смешивания 1,5% раствора гиалуроновой кислоты и 5% раствора пептидного комплекса при следующем количественном соотношении: 80-90 мл и 10-20 мл, соответственно, до образования вязкого эластичного геля, который помещают на форму-основу и подвергают ультрафиолетовой фотополимеризации. В отличие от указанного патента предлагаемый материал не содержит кислот, в том числе гиалуроновых, содержание которых существенно меняет механизмы действия такого материала на приповерхностные слои тканей органов, наоборот предлагается использование коллагена и хитозана в неизменной форме, которые выступают строительным материалом и механической матрицей для роста вновь образующихся клеточных структур, то есть предлагаемый материал и способ его получения в отличие от указанного изобретения является клеточным каркасом, и может быть использован при различном массовом соотношении компонент не только для восстановления кожных покровов, но и тканей внутренних органов, в частности как минимум печени. При этом в отличие от указанного изобретения процесс сшивки осуществляется термически, а не воздействием ультрафиолетового или иного типа излучения с энергией частиц, превышающей энергию

ковалентных связей, а также имеющих фотохимическую природу активации, что позволяет формировать материал практически любой толщины в более короткие сроки по сравнению с процессами фотохимической сшивки, которые ограничены проникновением излучения вглубь материала, и требуют длительной обработки.

5 Примеры осуществления изобретения

Пример 1.

Состав волокон: Хитозан 50% и Коллаген 50%.

Диаметр волокон и волокнистых образований от 20 до 500 нм (Фиг. 4).

Массовое отношение альбумина к хитозану 2:3.

10 Обработка раствора коллагена с помощью ультразвукового диспергирования коллоидного раствора до исчезновения конгломератов исходного сырья.

Смешивание в единый раствор коллагена, хитозана, альбумина.

Заливка в плоскую форму нужных размеров.

Термообработка структуры при температуре 110°C.

15 Изделие стерилизуется с помощью гамма-стерилизации.

Полученный материал предназначен для использования в качестве быстро биodeградирующего, гибкого раневого покрытия, ускоряющего восстановление тканей, и при первичном размачивании в физрастворе, сохраняющего целостность.

Пример 2.

20 Состав волокон: Хитозан 100%.

Диаметр волокон и волокнистых образований от 20 до 500 нм.

Массовое отношение альбумина к хитозану 5:3.

Смешивание в единый раствор хитозана, альбумина.

Заливка в плоскую форму нужных размеров.

25 Термообработка при температуре от 70 до 120°C, в зависимости от необходимых прочностных характеристик материала.

Изделие стерилизуется с помощью гамма-стерилизации.

Полученный материал предназначен для использования в качестве медленно биodeградирующего раневого покрытия, обладающего свойствами ускоренного восстановления тканей, а также повышенной механической прочностью, сохраняющего прочностные свойства и целостность структуры при размачивании в физрастворе.

30 Пример 3.

Состав волокон: Хитозан 50% и Коллаген 50%.

Диаметр волокон и волокнистых образований от 20 до 500 нм (Фиг. 5).

35 Массовое отношение альбумина к хитозану 5/3.

Смешивание в единый раствор коллагена, хитозана, альбумина.

Подача к распылительному соплу разбавленного коллоидного раствора с изменением по ходу распыления соотношения компонент для формирования лучшей адгезии к различным тканям.

40 Распыление на нагреваемую поверхность при температуре от 70 до 100°C в зависимости от необходимой прочности и степени резорбируемости материала.

Изделие стерилизуется гамма-стерилизацией.

Полученный материал предназначен для использования в качестве быстро биodeградирующего нано- и микроструктурированного тонкого покрытия, ускоряющего восстановление тканей, а также возможного к применению в задачах культивации клеток, обеспечивая их ускоренную пролиферацию.

Формула изобретения

1. Биодegradуемый материал, использующийся в качестве клеточного каркаса для роста клеток, на основе молекул белков и волокон биополимеров, отличающийся тем, что в качестве молекул белков используется альбумин, представляющий собой связующее, а в качестве волокон биополимера используется хитозан с молекулярной массой от 70 до 1000 кДа, со степенью деацетелирования от 50 до 100%, не проходящий химической искусственной модификации, волокна биополимера взаимодействуют между собой, формируя равномерный наноструктурированный клеточный каркас, содержащий волокна биополимера диаметром от 20 до 500 нм, обеспечивающий одновременно совокупность следующих свойств: биорезорбируемость, сорбцию жидкости на уровне не менее 100% от массы сухого материала, ускорение пролиферативной активности при культивации клеток, а также ускорение регенерации тканей при хирургии внутренних органов, механическую прочность на разрыв не хуже 1 МПа.

2. Биодegradуемый материал по п. 1, в котором в качестве волокон биополимера дополнительно может использоваться коллаген, при этом альбумин способен взаимодействовать как между собой, так и с волокнами хитозана, обволакивать и/или связывать между собой волокна хитозана и/или коллагена, в том числе при температурной обработке раствора в диапазоне температур, с одной стороны, обеспечивающих начало процесса денатурации белковых молекул, а с другой, - сохранение свойств волокон как минимум одного из используемых биополимеров, в том числе при наличии коллагеновых волокон, стабилизируя исходный коллоидный раствор, при этом альбумин содержится в диапазоне отношений по массе от не менее 0,3 до не более 2 относительно массы хитозана.

3. Биодegradуемый материал по п. 1, в котором при этом материал может содержать также неизмененные химические волокна коллагена, производимого из крупного рогатого скота, свиней, рыб, человека, или коллагена растительного происхождения, количество коллагена находится в диапазоне отношений по массе от 0,5 до 2 относительно массы хитозана.

4. Биодegradуемый материал по п. 3, который может содержать коллаген в виде волокон малой длины, длина которых не более 0,5 от длины волокон хитозана, количество коллагена находится в диапазоне отношений по массе от 0,5 до 2 относительно массы хитозана.

5. Биодegradуемый материал по п. 4, который может быть изготовлен средствами аэрозольного распыления на подогреваемую до температуры, с одной стороны, обеспечивающей начало процесса денатурации белковых молекул, а с другой, - сохранение свойств волокон биополимеров, подложку, на которой исходный раствор в виде микрокапель от 0,3 до 30 мкм проходит температурную обработку, формируя материал, который может быть выполнен в виде последовательно формируемых слоев и который может быть использован, в том числе, в качестве покрытия для тканых и нетканых перевязочных средств и/или поверхностей культивации различных клеток, обеспечивая ускоренную пролиферацию клеток.

МПК: А61К 38/38, С08Н 1/00, С08Н 1/06, А61К 38/39, А61К 8/64, А61К 8/65, А61К 47/42, А61К 8/73, А61К 47/36, С08J 3/24, С08J 3/205

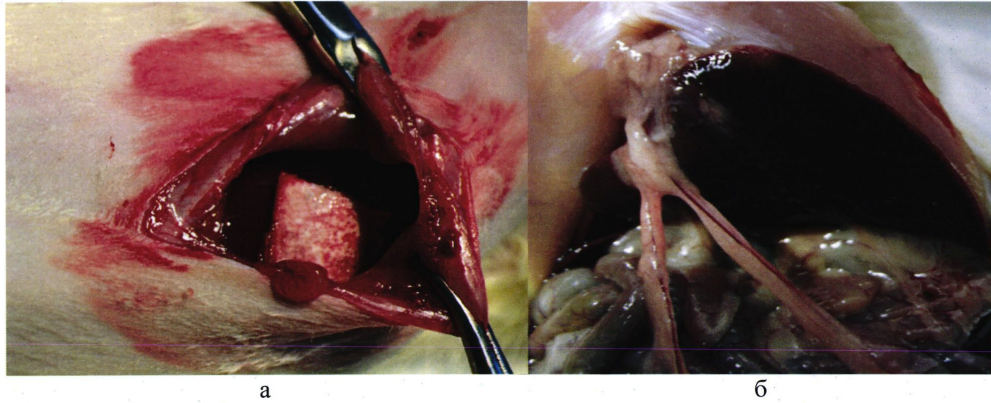
Биодеградируемый материал на основе молекул белков и волокон биополимеров для обеспечения ускоренного восстановления тканей и способ его получения

№	Тип образца	Средний индекс пролиферации клеток относительно контрольной не модифицированной поверхности, %	Диаметр волокон, нм
1	Хитозан (600-800 кДа) из 2% водного раствора аскорбиновой кислоты	25	20-500
2	Хитозан (600-800 кДа) из 0,2% водного раствора аскорбиновой кислоты	100	
3	Волокна хитозана осажденные из коллоидного раствора	260	
4	Хитозан из коллоидного раствора с альбумином, в соотношении 2:1 по массе	310	

Фиг. 1. Сравнительные данные по пролиферативной активности клеток печени линии Chang liver на подложках, модифицированных хитозаном, осажденным из различных растворов.

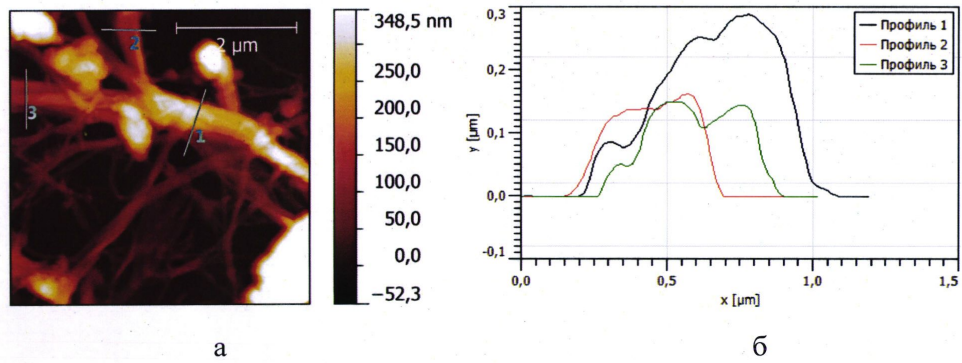


**Биодеградируемый материал на основе молекул белков и волокон биополимеров для обеспечения ускоренного восстановления тканей и способ его получения**



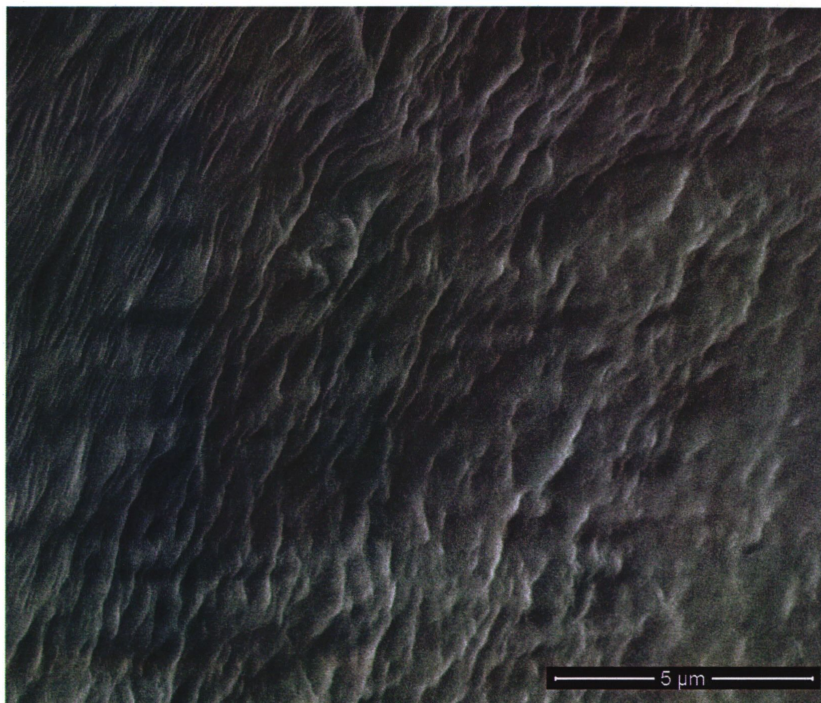
Фиг. 2. Использование материала при операции на печени лабораторной крысы для наблюдения биорезорбции материала, а – в начале накладывания на печень крысы, б – после 21 суток.

**Биодеградируемый материал на основе молекул белков и волокон биополимеров для обеспечения ускоренного восстановления тканей и способ его получения**



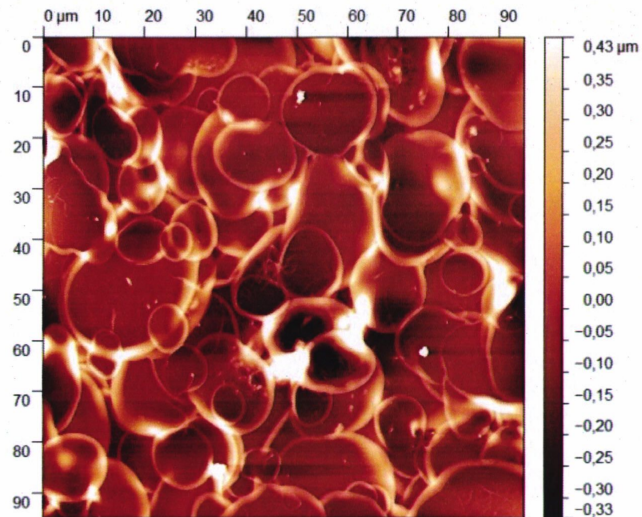
Фиг. 3. Полученная средствами атомно-силовой микроскопии топография поверхности образца слоя, содержащего исходные волокна хитозана; а – топография поверхности; б – профили сечения.

**Биодеградируемый материал на основе молекул белков и волокон биополимеров для обеспечения ускоренного восстановления тканей и способ его получения**



Фиг. 4. Морфология поверхности полученного материала после термообработки.

**Биодеградируемый материал на основе молекул белков и волокон биополимеров для обеспечения ускоренного восстановления тканей и способ его получения**



Фиг. 5. Полученная средствами атомно-силовой микроскопии топография поверхности материала, формируемого при аэрозольном нанесении водного коллоидного раствора хитозана с альбумином при одновременном нагреве подложки.