

Резюме проекта, выполняемого

в рамках ФЦП

«Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»

по этапу № 3

Номер Соглашения Электронного бюджета: 075-15-2019-1461, Внутренний номер соглашения 14.583.21.0066

Тема: «Клеточная модель гемато-энцефалического барьера человека в микрофлюидном устройстве»

Приоритетное направление: Науки о жизни (НЖ)

Критическая технология: Клеточные технологии

Период выполнения: 18.10.2017 - 30.06.2020

Плановое финансирование проекта: 21.00 млн. руб.

Бюджетные средства 9.00 млн. руб.,

Внебюджетные средства 12.00 млн. руб.

Получатель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева"

Иностраный партнер: Institut für Labortierkunde

Иностраный партнер: Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology

Ключевые слова: Микрофлюидика, транспорт лекарств через гематоэнцефалический барьер, белки-транспортёры, кинетика, экспрессия генов

1. Цель проекта

Гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) служит в качестве физического, функционального, метаболического и иммунологического барьера между кровью и тканями головного мозга. Такой барьер регулирует пассивный и активный транспорт веществ из капилляров в мозг и обратно. Использование микрофлюидной платформы позволяет создать наиболее приближенную к реальной *in vitro* модель ГЭБ, более тщательно воспроизводя геометрию ГЭБ, а также физиологическое касательное напряжение на поверхности клеток эндотелия. Кроме того, с помощью ГЭБ-на-чипе можно анализировать наличие специфических маркеров (например, белков адгезии и плотных контактов) для получения информации о структуре сформированного ГЭБ, а также изучать транспорт ксенобиотиков через ГЭБ. Таким образом, модели ГЭБ-на-чипе могут быть использованы для изучения сложных биологических процессов, совмещать в себе преимущества *in vitro* и *in vivo* моделей, обладать высокой предсказательной силой, и быть ценным исследовательским инструментом в дополнение к классическим *in vitro* и *in vivo* методам. Проект посвящен разработке клеточной модели гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) человека, культивируемой в микрофлюидном устройстве и предназначенной для изучения процессов транспорта химических веществ, биологически активных соединений и разработки нейротропных лекарственных средств с оптимальными параметрами фармакокинетики.

Целями проекта являются разработка микрофизиологической модели гемато-энцефалического барьера для изучения транспорта и токсичности лекарственных средств *in vitro*, разработка спектра методик работы с клеточным материалом и анализа состояния модели гемато-энцефалического барьера с помощью иммуногистохимии, спектrophотометрии, транскриптомики и масс-спектрометрии, а также разработка стандартных операционных процедур работы с моделью гемато-энцефалического барьера *in vitro* и их международная валидация с привлечением партнеров консорциума.

Основная цель третьего этапа - исследовать проницаемость модели ГЭБ, а также разработать методику тестирования химических веществ

2. Основные результаты проекта

Выбрано направление исследования. Разработана клеточная модель ГЭБ, 3Д культуры клеток. Осуществлено сокультивирование клеточных моделей. Исследована проницаемость модели ГЭБ. Разработана методика тестирования химических веществ через клеточный барьер в составе модели ГЭБ.

В ходе Iго этапа проекта проведен аналитический обзор современной научно-технической, нормативной, методической литературы, затрагивающей научно-техническую проблему, исследуемую в рамках прикладных научных исследований. Модели

ГЭБ-на-чипе могут быть использованы для изучения сложных биологических процессов, совмещать в себе преимущества *in vitro* и *in vivo* моделей, обладать высокой предсказательной силой, и быть ценным исследовательским инструментом в дополнение к классическим *in vitro* и *in vivo* методам. В существующих моделях ГЭБ-на-чипе использованы в основном клетки животных (крысы, мыши). В ряде работ использованы клетки человека: так, для формирования эндотелиального барьера использованы клетки эндотелия hCMEC/D3, HUVEC, первичные клетки hBMES, иммортализованные hBMES, а также клетки эндотелия дифференцированные из iPSC. Также в ходе 1го этапа проекта проведены патентные исследования. В ходе первого этапа проекта проведено математическое моделирование транспорта ксенобиотиков через ГЭБ с использованием описанного в литературе алгоритма. Использована модель для анализа проницаемости веществ через ГЭБ с применением классификационных экспериментальными значениями $\log BB$, с $\log BB < 0$ для соединений, относительно плохо проникающих через ГЭБ, и с $\log BB > 0$ для соединений, относительно хорошо проникающих через ГЭБ. Для обучающей выборки использовано 381 соединение, для тестовой выборки - 116 соединений. Модель правильно предсказывает (аккуратность модели) проницаемость для 87,6% соединений из обучающей выборки. Модель валидирована с использованием процедуры 10-кратной перекрестной проверки (аккуратность 86,1%), а также с помощью тестовой выборки (аккуратность 87,9%). Также в ходе первого этапа проекта с участием иностранного партнера были выбраны культуры клеток для формирования клеточной модели ГЭБ, описаны методики их культивирования и оценки жизнеспособности. Методики культивирования составлены для каждой линии клеток в коллекции в соответствии с рекомендациями производителей и правилами надлежащей практики культивирования клеток. Для анализа жизнеспособности клеток в составе культур подробно изложены следующие методы: MTT, TUNEL, LDH assay, ADP/ATP assay. В ходе первого этапа после получения иммортализованные и индуцированные плюрипотентные клетки были выведены из заморозки, размножены и заморожены на ранних пассажах для формирования пула/банка клеток. Часть клеток была лизирована, выделена суммарная РНК для последующего ПЦР анализа. Данные работы были выполнены на оборудовании УФ-ВИД спектрометр Cintra 303 и флуоресцентном микроскопе ЦКП им. Д.И. Менделеева (РХТУ им. Д.И. Менделеева).

В ходе второго этапа проекта были разработаны методики анализа состояния клеточных культур ГЭБ. Были использованы методы ПЦР и микроскопии для исследования характеристик клеточных культур, входящих в коллекцию. По результатам ПЦР и иммунофлуоресцентного анализа, клетки, выбранные для формирования микрофлюидной клеточной модели ГЭБ, обладают ярко выраженной экспрессией всех характерных маркеров: клетки эндотелия микрососудов головного мозга iPSC-EC, дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток IMR90-4, обладают ярко выраженной экспрессией vFW, CD31, ZO1, GLUT1, BCRP, MDR1; иммортализованные перicytes сосудов головного мозга imHBVP - ярко выраженной экспрессией α SMA, PDGFR β ; иммортализованные астроциты hNA-hTERT - ярко выраженной экспрессией GFAP, S100 β , A2B5, O4. Была разработана методика сокультивирования клеток эндотелия iPSC-EC, перicytes и астроцитов для формирования клеточного барьера в составе модели ГЭБ.

Для сокультивирования клеток эндотелия, перicytes и астроцитов проведен выбор и экспериментальная оценка микропористых мембран и внеклеточного матрикса. Для адгезии клеток выбраны компоненты ВКМ, близкие к составу базальной мембраны микрососудов головного мозга человека: коллаген IV, агрин, энтактин, ламинин 511, ламинин 411 для адгезии клеток эндотелия и перicytes, ламинин 211 для адгезии астроцитов. Для нанесения ВКМ и адгезии клеток выбрана микропористая мембрана из полкарбоната (PC) в составе мембранных вставок Transwell, с площадью мембраны 0,143 см², толщиной мембраны 10 мкм, диаметром пор 3 мкм.

Для культивирования клеточной модели ГЭБ в условиях циркуляции питательной среды был выбран микробиореактор (МБР) Novusculis (ООО НТЦ БиоКлиникум). Теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены оптимальные параметры циркуляции питательной среды, наиболее приближенные к физиологическим.

Для анализа проницаемости клеточного барьера в составе модели ГЭБ в качестве модельных веществ были выбраны [13C]сахароза, FITC-декстран 4 кДа, FITC-декстран 70 кДа. Полученные значения проницаемости [13C]Сахарозы через клеточный барьер в условиях циркуляции питательной среды близки к физиологическим значениям коэффициента проницаемости сахарозы. Наиболее плотный, малопроницаемый для FITC-декстранов в течение длительного времени клеточный барьер формируется при культивировании моделей ГЭБ в условиях циркуляции питательной среды при режиме 1,5 Гц, ± 10 кПа. Проницаемость для FITC-декстранов на 1-2 порядка ниже проницаемости FITC-декстранов через клеточный барьер в составе известных микрофлюидных и статических клеточных моделей ГЭБ, а также на порядок ниже проницаемости ГЭБ для FITC-декстранов *in situ*.

Через 3, 7, 14 и 30 дней после начала культивирования клеточных моделей ГЭБ в МБР (при режиме циркуляции 1,5 Гц, ± 10 кПа) были определены следующие параметры клеточного барьера: TEER клеточного барьера; жизнеспособность клеток в составе модели ГЭБ; фенотип клеток в составе модели ГЭБ; проницаемость клеточного барьера для модельных веществ. В результате проведенного экспериментального анализа установлено, что клеточный барьер в составе немодифицированной микрофизиологической клеточной модели ГЭБ обладает следующими характеристиками, сохраняющимися в течение 30 дней после начала культивирования в МБР: высокой жизнеспособностью клеток (более 80%) в составе клеточного барьера; плотными контактами (ZO1) между клетками эндотелия; TEER, приближенным к физиологическому (>2000 Ом*см²); коэффициентом проницаемости для сахарозы, приближенным к физиологическому ($3-12 \cdot 10^{-8}$ см/с или $0,18-0,72 \cdot 10^{-5}$ см/мин); осуществляет транспорт низкомолекулярных и высокомолекулярных веществ (модельных веществ) между апикальной и базальной стороной клеточного барьера; в клетках эндотелия, перicytes и астроцитах в составе клеточного барьера сохраняется высокая экспрессия характерных маркеров.

Проведены дополнительные патентные исследования.

За счёт внебюджетных средств проведена валидация методики сокультивирования клеточных культур, входящих в ГЭБ. В соответствии с методикой сокультивирования получали образцы клеточной модели ГЭБ. В каждом из повторов в полученных образцах анализировали TEER и проницаемость сахарозы через клеточный барьер в составе сформированных образцов клеточной модели ГЭБ. Результаты валидации указывают на то, что получение клеточной модели ГЭБ приводит к формированию клеточного барьера со стабильно воспроизводимыми характеристиками.

Также за счёт внебюджетных средств была проведена модификация клеточных культур с использованием технологии CRISPR/Cas для создания модели ГЭБ с заданными свойствами. Для модификации были выбраны астроциты hNA-hTERT. С помощью технологии CRISPR/Cas был проведен нокаут гена GFAP в астроцитах, проведена селекция и выбран и клон, у которого отсутствует достоверная экспрессия GFAP.

В ходе третьего этапа проекта были разработаны методики оценки проницаемости модели ГЭБ, основанные на анализе трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER), анализе проницаемости модельных веществ (FITC-декстрана 4

кДа, FITC-декстрана 70 кДа и Сахарозы).

Также в ходе третьего этапа Проекта разработана методика оценки функционального состояния модели ГЭБ. Оценку функционального состояния ГЭБ проводят, анализируя плотность, проницаемость, жизнеспособность клеточного барьера в составе ГЭБ, а также физиологический ответ ГЭБ

на воспалительные, фармакологические и трофические (nutritional) стимулы. На втором этапе разработана методика для оценки еще одной характеристики функционального состояния модели ГЭБ: физиологического ответа клеточного барьера в составе модели ГЭБ на воспалительный стимул (IL-1 β).

В ходе третьего этапа проекта разработана методика оценки локализации мембранных транспортеров в составе модели ГЭБ с помощью иммунофлуоресцентного анализа. В методике указаны два основных транспортера (MDR1 и BCRP), препятствующих проникновению большого числа ксенобиотиков через ГЭБ. Однако данная методика применима для иммунофлуоресцентного анализа любых транспортеров, для которых существуют коммерчески доступные антитела.

Разработана методика тестирования транспорта лекарственных препаратов и биологически активных соединений через модель ГЭБ. Данная методика состоит из двух этапов: 1) анализ влияния исследуемых соединений на жизнеспособность клеток в составе модели ГЭБ (MTT-test и LDH assay) и плотность клеточного барьера в составе модели ГЭБ (TEER), выбор оптимальной концентрации исследуемого соединения для последующего анализа транспорта; 2) анализ транспорта исследуемого соединения через клеточный барьер в составе модели ГЭБ.

В соответствии с методикой проведено тестирование выбранных химических веществ на прохождение клеточного барьера в составе разработанной микрофизиологической модели ГЭБ и изменение его функциональной активности.

Для тестирования было выбрано 8 хорошо изученных лекарственных соединений: амитриптилин, метадон, диазепам, кофеин, празозин, колхицин, циметидин, сахароза. Четыре из выбранных соединений (амитриптилин, метадон, диазепам, кофеин) проникают через ГЭБ *in vivo*, другие четыре соединения (празозин, колхицин, циметидин, сахароза) не проникают/плохо проникают через ГЭБ *in vivo*.

Добавление каждого из этих соединений в концентрации 1 мкМ к клеточному барьеру в составе модели ГЭБ на 1 час не влияло на плотность клеточного барьера и жизнеспособность клеток в его составе.

Полученные коэффициенты проницаемости исследуемых соединений через разработанную микрофизиологическую модель ГЭБ в значительной степени коррелировали с *in vivo* данными ($R^2 = 0,9917$).

Результаты указывают на то, что разработанная в ходе Проекта микрофизиологическая модель ГЭБ может быть использована для анализа проницаемости/транспорта лекарственных соединений и биологически активных веществ через гематоэнцефалический барьер.

Подготовлено ТЗ на ОКР. Цель выполнения опытно-конструкторской работы - создание *in vitro* эффективной микрофлюидной клеточной модели гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для оценки проникающей способности лекарственных средств. Полное наименование разрабатываемых в рамках ОКР видов продукции: микрофлюидная клеточная модель ГЭБ.

Проведено дополнительное патентное исследование. По результатам проведенной в ходе Проекта научно-исследовательской работы и проведенного в ходе 3 этапа Проекта дополнительного патентного поиска, принято решение о создании объекта интеллектуальной собственности: Изобретение «Способ сокультивирования клеток для формирования *in vitro* модели гематоэнцефалического барьера» (патент № RU2724956C1 от 29.10.19г.); Изобретение «Микрофизиологическая модель гематоэнцефалического барьера для оценки проникновения ксенобиотиков и лекарственных средств в центральную нервную систему» (Заявка № 2019144259 от 26.12.19 г.).

Результаты исследований и разработок опубликованы в научных журналах, индексируемых в базе данных Scopus и базе данных Web of Science. Результаты исследований были представлены на научных конференциях и выставках.

За счёт внебюджетных средств при участии иностранных партнеров проведена валидация методики тестирования транспорта лекарственных препаратов и биологически активных соединений через модель ГЭБ.

Методика тестирования транспорта лекарственных препаратов и биологически активных соединений через модель ГЭБ (далее, Методика) основана на количественном определении аналитов в питательной среде в ячейке с клеточной моделью ГЭБ методами ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (UPLC-MS/MS), и дальнейшем расчёте по полученным концентрациям коэффициентов проницаемости исследуемых соединений через клеточный барьер.

При разработке стандартизированной процедуры валидации UPLC-MS/MS методик количественного определения аналитов в среде культивирования клеточной модели ГЭБ использованы типичные параметры валидации и приведены критерии приемлемости валидационных характеристик, которые апробированы на примере количественного определения Кофеина в среде культивирования модели ГЭБ. Была разработана простая, быстрая, селективная UPLC-MS/MS методика количественного определения аналитов в среде культивирования модели ГЭБ с кофеином в качестве тестового соединения. UPLC-MS/MS методика была валидирована. Полученные значения всех параметров валидации находились в установленных допустимых пределах. UPLC-MS/MS методика точная, правильная, и может быть использована для тестирования транспорта соединений через клеточный барьер в составе микрофлюидной модели ГЭБ, как показано на примере кофеина. 'Методика тестирования транспорта лекарственных препаратов и биологически активных соединений через модель ГЭБ', как показано на примере кофеина, точная и правильная (accurate).

Также при участии иностранных партнеров была создана клеточная модель ГЭБ с модифицированными методами CRISPR/CAS клеточными культурами. В состав модифицированной клеточной модели ГЭБ входят немодифицированные клетки эндотелия и перидиты, а также астроциты, модифицированные с помощью CRISPR/Cas системы. Для модификации выбран ген GFAP. С помощью CRISPR/Cas системы был осуществлен нокаут гена GFAP.

Для сравнения свойств клеточного барьера в составе "здорового" и "мутантного" гематоэнцефалического барьера, были сформированы модифицированные клеточные модели ГЭБ (с fNA-KO-GFAP астроцитами) и немодифицированные клеточные модели ГЭБ (с fNA-hTERT астроцитами) в соответствии с разработанной Методикой сокультивирования клеточных культур, входящих в ГЭБ.

Нокаут гена GFAP в астроцитах приводит к формированию менее плотного клеточного барьера в составе модели ГЭБ, что согласуется с *in vivo* данными. Наличие GFAP+ астроцитов в составе клеточной модели ГЭБ способствует длительному поддержанию жизнеспособности клеток в составе клеточного барьера. Астроциты с нокаутом GFAP не способны поддерживать жизнеспособность клеточного барьера в составе модели ГЭБ. Эти результаты также согласуются с данными, полученными *in vivo*.

Астроциты с нокаутом GFAP не способны формировать контакты с клетками эндотелия в составе "мутантной" клеточной модели ГЭБ. В целом, полученные результаты указывают на то, что GFAP в астроцитах необходим для формирования

полноценных взаимодействий/синапсов между астроцитами и клетками эндотелия.

Научно-технический уровень полученных в Проекте результатов в сравнении с лучшими достижениями в данной области: в области моделирования барьерных тканей (в том числе, ГЭБ) сопоставим с разработками Hesperos Inc. (<https://hesperosinc.com/technology/>).

Поставленные перед Проектом цели были достигнуты в полном объеме. Полученные результаты соответствуют требованиям Плана-графика и Технического задания.

3. Охраноспособные результаты интеллектуальной деятельности (РИД), полученные в рамках прикладного научного исследования и экспериментальной разработки

- Изобретение "Способ сокультивирования клеток для формирования IN VITRO модели гемато-энцефалического барьера", Патент на изобретение №RU2724956C1 от 29.10.2019 г.
- Изобретение "Микрофизиологическая модель гематоэнцефалического барьера для оценки проникновения ксенобиотиков и лекарственных средств в центральную нервную систему", заявка в ФИПС №2019144259 от 26.12.2019 г., РФ
- Секреты производства (ноу-хау) "Клеточная модель гемато-энцефалического барьера человека в микрофлюидном устройстве", приказ №96А от 22.02.2018 г.
- Программа для ЭВМ «Программа для оценки проницаемости гемато-энцефалического барьера», свидетельство о государственной регистрации №2018612985 от 01.03.2018 г.

4. Назначение и область применения результатов проекта

Полученные результаты могут использоваться в области биотехнологии, тканевой инженерии, медицины, например, для культивирования и/или формирования многослойных клеточных моделей со статическим и/или динамическим движением ростовой среды для изучения свойств барьерных тканей, фармакокинетики и токсичности препаратов и др. В частности, полученные результаты могут быть использованы для формирования двухслойных клеточных моделей из различных типов клеток, например, модели гемато-энцефалического барьера, с последующим изучением процессов ГЭБ in vitro. При использовании полученных результатов возможно имитировать на микроуровне структуру и функцию ГЭБ и моделировать перенос питательных веществ из кровотока в мозг. Также возможно более широкое применение для изучения миграции клеток или совместимости культивирования нескольких типов клеток, а также для исследования влияния различных химических веществ на клетки в условиях in vitro.

5. Эффекты от внедрения результатов проекта

Разработанная клеточная модель ГЭБ в микрофлюидном устройстве позволит на начальном этапе разработки лекарственных средств тестировать потенциальное проникновение веществ через ГЭБ и оценивать нейротоксичность.

Внедрение клеточной модели ГЭБ в организациях - разработчиках лекарственных средств позволит сократить затраты на тестирование заведомо нейротоксичных препаратов и ускорить вывод на рынок новых безопасных для человека лекарственных средств

6. Формы и объемы коммерциализации результатов проекта

Разработанная клеточная модель гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) человека, культивируемая в микрофлюидном устройстве, предназначена для изучения процессов транспорта химических веществ, биологически активных соединений и разработки нейротропных лекарственных средств с оптимальными параметрами фармакокинетики.

В дальнейшем клеточная модель ГЭБ будет использована для разработки методики оценки транспорта лекарственных средств через клеточный барьер в составе модели ГЭБ и токсичности лекарственных средств в отношении клеток в составе модели ГЭБ.

После завершения проекта планируется внедрение в партнерских организациях фармацевтического блока. Предполагаемые формы коммерциализации - это инжиниринг, промышленная кооперация, передача технологий в рамках совместных предприятий.

Предварительные оценки объема коммерциализации проекта после 2020 года - 10 млн. руб в год, с последующим ростом на 5-10% ежегодно.

7. Наличие соисполнителей

Соисполнители не привлекались

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева"

Ректор
(должность)

(подпись)

Мажуга А.Г.
(фамилия, имя, отчество)

Руководитель работ по проекту

проект по экономике и инновациям

(должность)

(подпись)

Сахаров Д.А.
(фамилия, имя, отчество)

