Резюме проекта, выполняемого

в рамках ФЦП

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

по этапу № 1

Номер Соглашения о предоставлении субсидии: 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"

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

1. Цель проекта

Разработка 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.
Цели проекта:
1) разработка микрофизиологической модели гемато-энцефалического барьера для изучения транспорта и токсичности лекарственных средств *in vitro*;
2) разработка спектра методик работы с клеточным материалом и анализа состояния модели гемато-энцефалического барьера с помощью иммуногистохимии, спектрофотомерии, транскриптомики и масс-спектрометрии;
3) разработка стандартных операционных процедур работы с моделью гемато-энцефалического барьера *in vitro* и их международная валидация с привлечением партнеров консорциума.

2. Основные результаты проекта

В ходе 1го этапа проекта проведен аналитический обзор современной научно-технической, нормативной, методической литературы, затрагивающей научно-техническую проблему, исследуемую в рамках прикладных научных исследований.
Относительно недавно был разработан новый класс in vitro моделей: органы-на-чипе, которые совмещают в себе преимущества как in vivo, так и in vitro моделей. Эти так называемые чипы - это микрофлюидные устройства, в которых ткани культивируются в таких спроектированных условиях, которые наилучшим образом отражают in vivo микроокружение этих тканей.
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.
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 hBMEC, иммортализованные hBMEC, а также клетки эндотелия дифференцированные из iPSC. Наиболее плотный, близкий к физиологическому барьер получался из первичных и дифференцированных из iPS клеток.
Недостаток использования первичных клеток - потеря фенотипа уже после нескольких пассажей при культивировании и отличия клеток от лота к лоту (в зависимости от донора), что приводит в проблеме стандартизации. Существуют иммортализованные линии клеток эндотелия микрососудов головного мозга, но они также теряют, в некоторой степени,

исходный фенотип (и, вероятно, генотип) в результате процесса иммортализации. Значительный успех был достигнут в получении "ГЭБ-специфичных" клеток (клеток микроваскулярного эндотелия головного мозга, перицитов, астроцитов и нейронов) из индуцированных плюрипотентных клеток человека (hiPSC). Преимущества использования такого подхода: все клетки в составе модели ГЭБ могут быть получены из одного источника (от одного донора), iPSC клетки способны к длительному культивированию, при использовании стандартных методик дифференцировки можно добиться получения воспроизводимых результатов. С использованием iPSC клеток возможно развитие такого направления, как персонализированная (или прецизионная) медицина, поскольку клетки могут быть получены как от здорового, так и от больного донора.
Также в ходе 1го этапа проекта проведены патентные исследования.
Проведенные исследования показали, что в последние годы ведутся активные исследовательские работы по тематике проекта, что подтверждается высокой публикационной активностью, приходящейся на 2015-2017 гг., свидетельствующей о высокой степени интереса к области исследования со стороны субъектов рынка во всем мире.
Ведущей страной, обладающей наибольшим количеством приоритетных патентных документов по направлению исследований являются США. Среди российских заявителей наблюдается достаточно низкая изобретательская активность и низкие темпы патентования разработок по тематике проекта.
В ходе первого этапа проекта проведено математическое моделирование транспорта ксенобиотиков через ГЭБ с использованием описанного в литературе алгоритма. Данная математическая модель впоследствии может быть использована для предсказания проницаемости исследуемых веществ через модель ГЭБ.
Модели in silico имеют ряд преимуществ по сравнению с in vivo методами для изучения транспорта веществ. Например, такие модели и методы дешевле, быстрее, нет необходимости в использовании животных. Большинство вычислительных методов для анализа проницаемости ГЭБ основаны на взаимосвязи структуры вещества с его активностью (structure activity relation - SAR), статистическом анализе, генетических алгоритмах и нейронных сетях.
Использована модель для анализа проницаемости веществ через ГЭБ с применением классификационных деревьев. Для разработки модели использована опубликованная выборка из 497 охарактеризованных соединений с известными экспериментальными значениями logBB (логарифм отношения концентрации в мозге к концентрации в крови), 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.
В коллекцию культур клеток, предназначенных для создания клеточной модели ГЭБ, вошли:
- первичные клетки эндотелия микрососудов головного мозга человека HBMEC (ScienCell);
- первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека HUVEC (ScienCell);
- первичные астроциты коры головного мозга человека HA-CC (ScienCell);
- иммортализованные астроциты человека fHA-hTERT (abm),
- первичные перициты сосудов головного мозга человека HBVP (ScienCell);
- иммортализованные перициты сосудов головного мозга человека imHBVP (Celther);
- индуцированные плюрипотентные клетки человека iPS IMR90-4 (WiCell);
- индуцированные плюрипотентные клетки человека iPS BIONi010-B (Bioneer, SigmaAldrich).
Методики культивирования составлены для каждой лини 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).

1. Проведен обзор и анализ современной научно-технической литературы в области научно-технической проблемы
2. Проведены патентные исследования
3. Проведено теоретическое обоснование выбора клеточных культур, входящих в ГЭБ
4. Создан банк клеточных культур для использования в проекте
5. Проведено математическое моделирование транспорта химических веществ через модели ГЭБ

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

-

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 препартов 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 ЛС позволит сократить затраты на тестирование заведомо нейротоксичных препаратов и ускорить вывод на рынок новых безопасных для человека ЛС.

6. Формы и объемы коммерциализации результатов проекта

После завершения проекта планируется патентование разработки и внедрение ее в партнерских организациях фармацевтического блока. Предварительные оценки объема коммерциализации проекта после 2020 года - 10 млн. руб в год с ростом ежегодно на 5-10%.

7. Наличие соисполнителей

Соисполнители не привлекались

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

Исполняющий обязанности ректора		Мажуга А.Г.
(должность)	*(подпись)*	*(фамилия, имя, отчество)*

Руководитель работ по проекту

Проректор по экономике и инновациям		Сахаров Д.А.
(должность)	*(подпись)*	*(фамилия, имя, отчество)*

М.П.