



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.03.29

(51) Int. Cl. C07K 14/435 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.04.04

(54) МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРА, ИМЕЮЩИЙ КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННЫЕ
ФЕРМЕНТАТИВНО ДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПЕПТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

(31) 16163667.5

(32) 2016.04.04

(33) EP

(86) PCT/DE2017/100260

(87) WO 2017/174071 2017.10.12

(71) Заявитель:

ЛЕИБНИЦ-ИНСТИТУТ ФЮР
ПОЛИМЕРФОРШУНГ ДРЕЗДЕН Е.
В. (DE)

(72) Изобретатель:

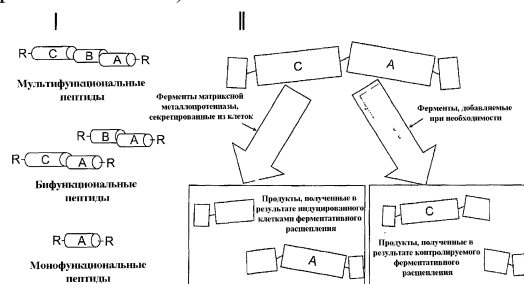
Цуркан Михаил, Таихманн Юлиане,
Вернер Карстен (DE)

(74) Представитель:

Виноградов С.Г. (BY)

(57) Настоящее изобретение относится к материалу на основе полимера, имеющему ковалентно связанные ферментативно деградируемые пептидные последовательности, которые являются неразлагаемыми под воздействием биологической или метаболической активности клеток и тканей, в котором каждая из пептидных последовательностей состоит из двух-пятнадцати аминокислот и включена в материал на основе полимера или конъюгирована к материалу на основе полимера. Таким образом, пептидная последовательность может являться частью либо трехмерной, либо двумерной структуры материала на основе полимера. За счет деградации ковалентной связи, контро-

лируемой путем добавления фермента, в пептидной последовательности либо биоортогональной деградации трехмерной структуры, либо в случае конъюгирования пептидной последовательности к материалу на основе полимера происходит высвобождение, по меньшей мере, части молекулы. Настоящее изобретение дополнительно относится к использованию такого материала на основе полимера в целях получения *in vitro* клеточных культур, либо тканей, либо органов, в целях стабилизации *in vivo* донорских клеток, тканей или органов и в целях воздействия *in vivo* или *in vitro* на живые клетки, ткани или органы. Адгезионная связь между материалом, с одной стороны, и образцом, с другой стороны, т.е. клетками, тканями или органами, является контролируемо деградируемой без разрушения целостности образца (внеклеточного матрикса или межклеточных взаимодействий и внеклеточных взаимодействий матрикс-клетка) (биоортогональность).



МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРА, ИМЕЮЩИЙ КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНО ДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПЕПТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Настоящее изобретение относится к материалу на основе полимера, имеющему ковалентно связанные ферментативно деградируемые пептидные последовательности. Кроме того, настоящее изобретение относится к использованию такого материала на основе полимера с целью получения клеточных культур, либо тканей, либо органов *in vitro*, стабилизации *in vivo* донорских культур, либо тканей, либо органов, а также с целью обработки *in vivo* или *in vitro* живых клеток, тканей и органов. В этом случае адгезионная связь между материалом, с одной стороны, и образцом, с другой стороны, а именно, клетками, тканями или органами, является контролируемо деградируемой, причем без разрушения целостности образца (внеклеточного матрикса, а также межклеточных и внеклеточных взаимодействий матрикс-клетка) (биоортогональность).

Существует ряд способов формирования клеточно-совместимых материалов и их индивидуальной функционализации различными биологически активными молекулами, такими как ковалентно связанные клеточно-адгезивные пептиды, белки и, в некоторых случаях, факторы роста и цитокины. При сравнении с указанными способами синтетические способы для осуществления реакций селективного разложения материала в основном являются неизученными. Используемые до настоящего времени ферментные способы отделения/диссоциации клеток, такие как способы с использованием трипсина, пепсина или коллагеназ, являются неприменимыми либо в отношении вновь создаваемых, либо донорских тканей и органов ввиду того, что указанные неселективные способы нарушают упорядоченность их внеклеточного матрикса. Кроме того, использование таких ферментов для высвобождения клеток в трехмерных материалах весьма ограничено, т.к. для этого требуется более высокая концентрация фермента и более длительное время воздействия, что в конечном счете может привести к нежелательному расщеплению поверхностных белков клетки. Было продемонстрировано, что более селективные матричные металлопротеиназы (MMPs), которые расщепляют определенные последовательности аминокислот, являются применимыми для аккуратного сбора клеток в трехмерных гидрогелевых материалах. Было обнаружено, что наиболее

широко используемые матричные металлопротеиназы оказывали слабое воздействие на поведение клеток. Тем не менее, использование матричных металлопротеиназ применительно к тканям и органам в целом является ограниченным, т.к. они вызывают расщепление белков семейства коллагенов во внеклеточном матриксе (ECM), что может привести к потере важных структурных элементов тканей и органов. Таким образом, современное состояние техники предусматривает создание практических способов извлечения клеток в целях их применения как в двумерных, так и трехмерных структурах, в то время как до настоящего времени отсутствуют приемлемые биотехнологические способы для аккуратного извлечения сложных клеточных комплексов, таких как ткани и органы, из материалов-носителей.

Дополнительно к классическим ферментативным способам ряд перспективных способов изъятия клеток на основе воздействия на физико-химические свойства материалов является многообещающим. Например, определенный прогресс был достигнут в разработке термочувствительных биогибридных материалов, вызывающих механическое напряжение при изменении температуры. Такое напряжение, например, набухание гидрогелевой структуры, вызывает отделение (деламинацию) адгезивных клеток и, таким образом, использовалось для получения однослойных пластов клеток, известного как инженерия клеточного пласта. Тем не менее, при использовании указанного способа необходимо сбалансировать адгезию клеток и индуцированное отделение клеток и создать определенные пользователем свойства носителя с целью применения указанного способа в отношении различных типов клеток. Без такого длительного по времени и ресурсоемкого генерирования/адаптации, вызываемое материалом напряжение может повредить внеклеточный матрикс, присоединенный к материалам, тем самым ограничивая воспроизводимость таких процессов.

Более того, указанный известный уровень техники ограничен применением простых двумерных структур, и приемлемость термолабильных носителей для многослойных или более сложных тканей представляется сомнительной. Такое ограничение применимости становится более жестким при транспортировке или терапии органов: термолабильные носители в таком случае не могут быть далее использованы, т.к. они не обеспечивают достаточно прочную адгезию (толщина полимерного слоя составляет всего лишь несколько сотен нанометров). Другой

недостаток термолабильных носителей заключается в изменении температурного режима, необходимого для деламинации: существуют клетки, исключительно чувствительные к температуре, и они не способны выдержать долговременные изменения температуры/перепады температур без повреждений.

В последнее время растущий интерес к ортогональным способам в области химии материалов привел к созданию гидрогелей, которые могут быть ортогонально расщеплены под воздействием света и клеток. Использование двухфотонной технологии позволяет использовать такие способы для управляемых светом миграции клеток из каркасных структур гидрогеля /расщепления. При определенных корректировках такие системы могли бы быть использованы для сбора клеток; однако, существующее ограничение двухфотонными устройствами и низкая биосовместимость соответствующих фотонных реакций ограничивают использование указанной многообещающей технологии областью применения одиночных клеток.

Таким образом, для реализации наиболее передовых способов в области физической химии, которыми в настоящее время располагают для обеспечения воздействия на материалы, отсутствуют необходимые технические средства для мягкого отделения клеток сложных клеточных комплексов, таких как ткани и органы, из материалов-носителей.

Разработка совместимых материалов для *нового* поколения тканей, технологии тканевой инженерии или для стабилизации донорских тканей или имплантатов органов является общим подходом в области регенеративной медицины и научных исследований имплантатов. Достигнутый прогресс в указанных областях исследований привел к пониманию на данном этапе важности методов саморегенерации, при реализации которых *ex vivo* ткани или органы могут быть регенерированы из небольшого количества исходных клеток. Указанные методы приносят ряд новых проблем в области разработки материалов для выращивания тканей и имплантатов органов – некоторые из указанных проблем являются проблемами самоисключения. С одной стороны, для клеточных культур требуются стабильные биофункционализированные поверхности, или подложки (клеточные каркасы), аналогичные трехмерному внеклеточному матриксу и способные деградировать в целях размножения клеток и последующего выращивания ткани с использованием этих клеток. Высокие клеточные адгезивные свойства таких материалов являются важной характерной

особенностью для успешного развития клеток или тканей. С другой стороны, для проведения успешной имплантации, сформированную ткань необходимо осторожно отделить от материала-носителя с целью предотвращения повреждения структуры ее клеточного и внеклеточного матрикса. Другими словами, степень адгезии между тканью и материалом должна быть ослаблена без разрушения внеклеточного матрикса, а также межклеточных связей и связей между внеклеточным матриксом и клеткой внутри ткани. Тем не менее, ввиду того, что указанные связи характеризуются идентичными или аналогичными химическими свойствами, для их селективного расщепления требуются новые нетривиальные биоортогональные способы для селективной деградации адгезионной связи между материалом и тканью.

Таким образом, целью настоящего изобретения является создание материала, в котором обеспечивается контролируемая и селективная деградация адгезионной связи между материалом и клетками, тканями или органами без разрушения связи между клетками и внеклеточным матриксом внутри ткани.

Достижение цели настоящего изобретения обеспечивается с помощью материала на основе полимера, имеющего ковалентно связанные ферментативно деградируемые пептидные последовательности по п. 1. Таким образом, деградируемые, предпочтительно расщепляемые пептидные последовательности являются инертными по отношению к общей биологической и метаболической активности клеток и тканей, следовательно, они не способны деградировать под воздействием биологической или метаболической активности клеток и тканей. Каждая из пептидных последовательностей состоит из двух до пятнадцати аминокислот, и таким образом, пептидные последовательности могут быть включены в материал на основе полимера или конъюгированы с материалом на основе полимера. Следовательно, пептидная последовательность может быть частью либо трехмерной, либо двумерной структуры материала на основе полимера. Биоортогональная деградация трехмерной структуры происходит либо за счет деградации ковалентной связи пептидной последовательности, контролируемой путем добавления (присоединения) фермента, либо за счет того, что, по меньшей мере, часть молекулы высвобождается, при конъюгации пептидной последовательности с материалом на основе полимера.

Предпочтительно, чтобы количество аминокислотных остатков на одну пептидную молекулу составляло от 5 до 10. Материал на основе полимера

обеспечивает формирование двумерных или трехмерных полимерных сетчатых структур с узлами сшивки и гранями, в котором, по меньшей мере, часть узлов и (или) граней имеют связующие молекулы. Материал на основе полимера может представлять собой, например, гидрогель либо предпочтительно твердый конденсационный полимер. В соответствии с предпочтительным примером осуществления настоящего изобретения материал на основе полимера может представлять собой полимерное покрытие, нанесенное на подложку-носитель (например, стекло).

В соответствии с исключительно предпочтительным примером осуществления настоящего изобретения материал на основе полимера включает, по меньшей мере, предпочтительно биоактивный компонент, выделение которого происходит в процессе деградации ковалентной связи пептидной последовательности, контролируемой путем добавления фермента. Указанный компонент принадлежит к группе компонентов, включающих активные ингредиенты, нуклеиновые кислоты, например, ДНК, РНК или аптамеры, белки, пептидные конъюгаты, сульфатированные и несulfатированные полисахариды и их конъюгаты. Белок или пептидный конъюгат может предпочтительно представлять собой цитокин, хемокин, фактор роста, гормон, антитело или компонент внеклеточного матрикса.

В соответствии с одним измененным примером осуществления настоящего изобретения молекулы, по меньшей мере, одного выделяемого компонента конъюгированы с материалом на основе полимера с помощью линкеров, при этом каждый линкер содержит ферментативно деградируемую пептидную последовательность.

В альтернативном варианте молекулы, по меньшей мере, одного выделяемого компонента могут быть физически заключены в трехмерной полимерной сетке и физически связаны с трехмерной полимерной сеткой. В этом случае высвобождение компонентов происходило бы за счет биоортогональной деградации полимерной сетки, включающей указанные компоненты.

В соответствии с настоящим изобретением пептидные последовательности являются ферментативно деградируемыми за счет наличия ферментативно расщепляемого протеазой сайта. Таким образом, контроль за высвобождением активных ингредиентов, нуклеиновых кислот, белков, пептидных

конъюгатов или полисахаридов может быть обеспечен путем добавления протеазы.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением расщепляемая пептидная последовательность имеет расщепляемый сайт, выбранный из группы сайтов расщепления, включающих сайт, расщепляемый протеазой вируса гравировки табака, сайт, расщепляемый протеазой риновируса 3С человека, сайт, расщепляемый протеазой фактора Ха, сайт, расщепляемый протеазой тромбина, сайт, расщепляемый энтерокиназой, сайт, расщепляемый сортазой-А-протеазой, сайт, расщепляемый протеазой каспаза-3, сайт, расщепляемый сериновой протеазой гранзима В, а также сайт, расщепляемый PreScission™. PreScission™ представляет собой гибридный белок, состоящий из глутатион-S-трансферазы (GST) и протеазы риновируса человека (HRV) типа 14-3С.

Предпочтительно, чтобы указанные пептидные последовательности были выбраны в виде ферментативно деградируемых пептидных последовательностей, не поддающихся деградации под воздействием биологической или метаболической активности клеток и тканей. Пептидную последовательность предпочтительно выбирают из группы, включающей ENLYFQ/X, ETVLFQ/GP, EVLFQ/GP, IEGR/IEGRX, DDDDK/, LVPRGS/FXRS, DXXD/, LPET/G, в которой наклонная черта вправо (/) обозначает соответствующий расщепляемый сайт, буквенные символы обозначают однобуквенный код протеиногенных аминокислот, и X обозначает любую аминокислоту природного происхождения.

В соответствии с другим примером осуществления настоящего изобретения материал на основе полимера дополнительно включает пептидные последовательности, которые деградируют под воздействием биологической или метаболической активности клеток и тканей, и которые включены в материал на основе полимера или конъюгированы с материалом на основе полимера, таким образом, чтобы пептидная последовательность являлась частью либо двумерной, либо трехмерной структуры материала на основе полимера. Биологическая и метаболическая активность клеток и тканей приводит к биоортогональной деградации трехмерной структуры, или в случае конъюгации пептидной последовательности к материалу на основе полимера, вызывает высвобождение, по меньшей мере, части молекулы. Указанные пептидные последовательности предпочтительно связаны с пептидными последовательностями, которые являются недеградируемыми под воздействием биологической или

метаболической активности клеток и тканей. Контролируемое добавление фермента, т.е. добавление фермента в случае необходимости, вызывает ускорение деградации материала или ускоренное высвобождение компонентов.

Настоящее изобретение может быть использовано со способами расщепления при необходимости, т.е. контролируемого по времени, ковалентной связи в материалах на основе полимера, при этом указанные способы могут быть осуществлены в присутствии живых клеток, тканей или органов *in vitro* или *in vivo* биоортогональным образом. Указанные применение/способы основаны на включении коротких ферментативных деградируемых/расщепляемых пептидных последовательностей в известные структуры материала на основе полимера в качестве молекулярных линкеров. Ферментативно контролируемая деградация ковалентной связи приводит к деградации материала при наличии деградируемой ковалентной связи внутри структуры материала. Ферментативно контролируемая деградация ковалентной связи вызывает высвобождение молекул в том случае, когда деградируемая связь в каждом случае является частью молекул, конъюгированных с материалом. Связи в материале, которые могут быть деградированы путем ферментативной реакции, позволяют использовать ортогональный способ применительно к ферментативной реакции в присутствии живой материи, такой как клетки, ткани или органы, и (или) в присутствии молекул внеклеточного матрикса.

Материал на основе полимера, содержащий деградируемую пептидную последовательность, может быть использован для контролируемого высвобождения *in vivo* или *in vitro* активного ингредиента или одного из других высвобождаемых биоактивных компонентов, упомянутых выше, при этом высвобождение происходит за счет контролируемой деградации ковалентной связи пептидной последовательности путем добавления фермента. Такой подход может быть применен, в частности, в контексте воздействия *in vivo* или *in vitro* на клетки, ткани или органы, при этом, при необходимости, происходит контролируемое высвобождение активного ингредиента и (или) иного из вышеупомянутых высвобождаемых биоактивных компонентов путем добавления фермента.

Кроме того, материал на основе полимера настоящего изобретения является приемлемым для культивирования клеток *in vitro* и (или) получения *in vitro* ткани или органов. Ферментативное расщепление материала не оказывает

влияния на внеклеточный матрикс или межклеточные взаимодействия и внеклеточные взаимодействия матрикс-клетка. Следовательно, благодаря этому обеспечивается недеструктивное отделение от материала-носителя живого образца, т.е. клетки, слоя клеток ткани или органа и их внеклеточного матрикса за счет деградации материала по мере необходимости в любой момент времени развития живого образца.

Материал на основе полимера, содержащий деградируемую пептидную последовательность, также может быть использован для стабилизации *in vitro* донорских клеток, а также донорских тканей или органов. Кроме того, в этом случае, ферментативное расщепление материала не оказывает воздействие на внеклеточный матрикс или межклеточные взаимодействия и внеклеточные взаимодействия матрикс-клетка. Контролируемое ферментативное расщепление пептидной последовательности обеспечивает мягкое/недеструктивное отделение клеток/ткани/органа от материала-подложки для проведения успешной имплантации.

Таким образом, применение вышеописанной ферментативной деградации в качестве биортогонального способа для деградации материала открывает принципиально новые перспективы в области применения биоматериалов *in vitro* или *in vivo*, включающих живые клетки, ткани и органы.

Дополнительная подробная информация, особенности и преимущества примеров осуществления настоящего изобретения являются очевидными из приведенного ниже описания иллюстративных примеров осуществления со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых:

Фиг. 1 – схематическое изображение структур материала на основе полимера с включенными в них короткими ферментативно расщепляемыми пептидными последовательностями в качестве молекулярных линкеров,

Фиг. 2 – примеры возможных покрытий функциональных поверхностей с использованием коротких ферментативно расщепляемых пептидных последовательностей в качестве молекулярных линкеров,

Фиг. 3 – примеры ферментативно расщепляемого пептидного линкера, а также части гидрогеля или материала из конденсационного полимера,

Фиг. 4 – использование активных ингредиентов, которые могут быть связаны с материалом пептидными линкерами,

- Фиг. 5 – блок-схема использования биоортогональной деградации материала для получения единичных слоев клеточных тканей или трансплантатов,
- Фиг. 6 – блок-схема использования биоортогональной деградации материала для получения клеток и тканей при применении трехмерных структур,
- Фиг. 7А – схема реакции формирования ПЭГ-пептидного конъюгата;
- Фиг. 7В – Анализ ПЭГ (малеимид)₄ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии,
- Фиг. 7С – Анализ реакционной смеси ПЭГ (малеимид)₄ с расщепляемым пептидом методом высокоэффективной жидкостной хроматографии,
- Фиг. 8А-8В – схематическое изображение формирования сетчатой структуры гидрогеля путем проведения реакции присоединения Михаэля,
- Фиг. 9 – микрофотографии с примером долгоживущей культуры FХа-деградируемых гидрогелей,
- Фиг. 10 – световые микрофотографии формирования слоев корнеальных эндотелиальных клеток человека (HCEC) при одновременной деградации гидрогеля,
- Фиг. 11А – световые микрофотографии формирования слоев корнеальных эндотелиальных клеток человека (HCEC) при одновременной деградации гидрогеля, и
- Фиг. 11В – световые микрофотографии различных примеров сформированных слоев корнеальных эндотелиальных клеток человека (HCEC).

Настоящее изобретение относится к способу расщепления при необходимости, т.е. контролируемого по времени, ковалентной связи в материалах на основе полимера, при этом указанный способ осуществляется в присутствии живых клеток, тканей или органов *in vitro* или *in vivo* биоортогональным образом, как схематически проиллюстрировано на Фиг. 1. Указанный способ основан на включении коротких ферментативно расщепляемых пептидных последовательностей в качестве молекулярных линкеров, т.е.

линкерных молекул, в широко используемых структурах материалов на основе полимера, таких как гидрогели или конденсационные полимеры.

На Фиг. 1 (схема I) схематически представлена многофункциональная пептидная молекула, имеющая общую структуру RCBAR, бифункциональная пептидная молекула, имеющая общие структуры RBAR и RCAR, и монофункциональная пептидная молекула, имеющая общую структуру RAR, где R обозначает полимерный остаток материала.

В данном контексте А означает ферментативно расщепляемую пептидную последовательность, которая может быть расщеплена путем контролируемого добавления фермента. Предпочтительно, чтобы указанные ферменты являлись протеазами, перечисленными в Таблице 1. Кроме того, как показано в Таблице 1, каждой расщепляемой пептидной последовательности, которая могут быть расщеплена соответствующими протеазами на сайтах расщепления (/), присвоена соответствующая протеаза.

Перечисленные пептиды являются примерами пептидов, проявляющими инертность к общей биологической и метаболической активности живой ткани, однако могут подвергнуться селективному ферментативному расщеплению специфическими ферментами. Ферменты, перечисленные в Таблице 1, способны расщеплять аминокислотные последовательности с исключительно высокой степенью избирательности, при этом они являются исключительно неактивными в отношении ферментативного расщепления белков как клеточного, так и внеклеточного матрикса.

Таблица 1 Протеазы

Протеазы (Аббревиатуры)	Расщепляемые пептидные последовательности с сайтом расщепления (/)
Протеаза вируса гравировки табака (TEV)	ENLYFQ/X
Протеаза риновируса 3С человека (3C)	ET(V)LFQ/GP
Фактор X _a (Xa)	IEGR/IEGRX
Протеаза тромбина (Thr)	LVPRGS/FXRS
Энтерокиназа (EntK)	DDDDK/
Каспаза (Caspase-3)	DXXD/
PreScission™	LEVLFQ/GP
Соратаза А	LPET/G
Гранзим В (сериновая протеаза) (высокий риск неспецифического расщепления)	DX, NX, MN, SX

Буква В в структурах Фиг. 1 обозначает мотивы биологически активных пептидов, отличающиеся от ферментативно расщепляемых пептидных последовательностей А, например, клеточно-адгезивной последовательностью RGD.

Буква С в структурах на Фиг. 1 обозначает мотивы биологически активных пептидов, отличающиеся от ферментативно расщепляемых пептидных последовательностей А, например, клеточно-реактивная последовательность MMP, т.е. пептидная последовательность, расщепляемая матриксной металлопротеиназой.

На Фиг. 1 (схема II) схематически представлен модуль Типа С в качестве клеточно-реактивной последовательности MMP и ортогональный ферментативно расщепляемый модуль с пептидной последовательностью Типа А, которые соединены, с одной стороны, друг с другом, и, с другой стороны, каждый с одним из двух модулей материала. Как показано на схеме II Фиг. 1, ферменты MMP, секретируемые клеткой, могут вызвать расщепление клеточно-реактивной последовательности модуля С. Что касается продуктов, на схематическом изображении (схема II, Фиг. 1) представлен продукт расщепления последовательности MMP модуля С вместе с модулем материала и нерасщепленной пептидной последовательностью А, которая соединена, с одной стороны, со вторым продуктом расщепления последовательности MMP и, с другой стороны, со вторым модулем связывания материала.

На правой стороне схемы II на Фиг. 1 проиллюстрировано ортогональное расщепление ферментативно расщепляемой пептидной последовательности А. Контролируемое добавление фермента, т.е. добавление фермента в случае необходимости, вызывает ортогональное расщепление ферментативно расщепляемого модуля А и, следовательно, ускорение деградации материала. Полученный продукт расщепления является компонентом пептидного мотива ферментативно расщепленной пептидной последовательности А, которая соединена со связывающим материал модулем. Вторым полученным продуктом расщепления представляет собой пептидный мотив ферментативно расщепленной пептидной последовательности А, которая связана с последовательностью С, которая, в свою очередь, связана с модулем материала.

Ферментативно расщепляемые пептиды А, используемые в соответствии с настоящим изобретением, являются инертными к общей биологической и метаболической активности живой ткани, однако могут подвергнуться ферментативному расщеплению специфическими ферментами, как показано в Таблице 1. Ферментативное расщепление материала не оказывает негативного влияния на внеклеточный матрикс или межклеточные взаимодействия и внеклеточные взаимодействия матрикс-клетка. Таким образом, обеспечивается отделение живого образца и его внеклеточного матрикса от материала-носителя за счет деградации материала в случае необходимости в любой момент времени развития живого образца. Ниже также приведено описание различных синтетических методов для включения расщепляемой пептидной последовательности в известные мягкие и сконденсированные материалы на основе полимеров, обеспечивающие такое включение последовательностей в большинство материалов для их использования в биологических целях.

Как показано на Фиг. 2, линкер, имеющий ферментативно расщепляемую пептидную последовательность, может быть включен как часть покрытия, при этом расщепляемая пептидная последовательность обеспечивает отделение любого присоединенного к покрытию объекта с помощью линкера.

На схеме I (Фиг. 2) схематически проиллюстрировано нанесение известным способом покрытия на SiO_2 подложку: сначала наносят одно или более функционализированных полимерных покрытий с ковалентной или адгезионной связью (ковалентное или адгезионное связывание), которые затем покрывают пептидами. Пептиды с расщепляемыми пептидными последовательностями, выступающими в качестве молекулярных линкеров, соединяют функциональные группы полимерного слоя с активным соединением.

Как показано на нижней схеме II (Фиг. 2), структурированная биочувствительная поверхность может быть получена за счет создания второй частично покрытой поверхности, при этом при нанесении покрытия только часть пептидного покрытия с активными соединениями на поверхности остается непокрытой.

На Фиг. 3 схематически проиллюстрированы примеры I, II, III и IV включения ферментативно расщепляемых пептидных линкеров в гидрогель или конденсационный полимерный материал. Как показано в примерах на Фиг. 3, ферментативно расщепляемый линкер является частью гидрогеля или

конденсационного полимерного материала, при этом расщепляемый линкер при необходимости обеспечивает контролируемую деградацию гидрогеля или структуры конденсационного полимера. В результате деградации происходит высвобождение связанных с материалом или заключенных в материале объектов.

Пример I на Фиг. 3 схематически иллюстрирует формирование гидрогеля/конденсационного полимера из биогибридных полимеров. Биогибридные полимеры могут быть получены путем проведения реакции сочетания небιологических полимеров, таких как полиэтиленгликоль (PEG) или полиакриламид с биологическими компонентами, такими как сахарады, белковые модули и (или) элементы ДНК. В Примере I приведен звездообразный полимер, имеющий на каждом конце пептидную последовательность. Ковалентно связанные, ферментативно деградируемые пептидные последовательности взаимно связывают биогибридные полимеры путем присоединения каждого биологического компонента к нескольким пептидным последовательностям, расположенным на концах молекул звездообразного полимера. Таким образом, расщепляемые пептидные последовательности являются частью гидрогеля. Следовательно, биологические компоненты присоединены к материалу или включены в материал. При добавлении фермента, обеспечивающего отделение пептидной последовательности от биологического материала, происходит деградация гидрогеля с высвобождением биологического компонента, при этом пептидные последовательности остаются на небιологических молекулах.

В Примере II на Фиг. 3 схематически проиллюстрировано получение материала на основе полимера в гидрогеле или конденсационном полимере звездообразных полимеров, например, звездообразный ПЭГ, в котором ферментативно расщепляемые пептидные последовательности соединяют концы нескольких звездообразных полимерных молекул в сетчатую структуру, образующую узлы и грани. Добавление фермента, запускающее процесс расщепления пептидной последовательности, может в последующем привести к контролируемой деградации сетчатой структуры и ее распаду на отдельные звездообразные полимеры, при этом остатки расщепленной пептидной последовательности в форме пептидных мотивов расположены на каждом из концов.

В Примере III на Фиг. 3 ферментативно расщепляемые пептидные последовательности являются частью гидрогеля/конденсационного полимера,

имеющего разветвленные полимеры с короткими боковыми цепями, при этом разветвленные молекулы связаны вместе на концах своих боковых цепей расщепляемыми пептидными последовательностями. При добавлении фермента и последующего расщепления пептидной последовательности, контролируемая деградация сетчатой структуры на отдельные разветвленные полимеры с пептидными мотивами расщепленных пептидных последовательностей может иметь место на концах боковых цепей.

В Примере IV на Фиг. 3 ферментативно расщепляемые пептидные последовательности являются частью гидрогеля/конденсационного полимера с линейными полимерами, при этом линейные молекулы на концах своих боковых цепей связаны вместе расщепляемыми пептидными последовательностями, образуя сферу. При добавлении фермента и последующего расщепления пептидной последовательности может иметь место контролируемая деградация сферической структуры на отдельные линейные полимеры с пептидными мотивами расщепленных пептидных последовательностей на концах боковых цепей.

На Фиг. 4 схематически представлено применение настоящего изобретения для высвобождения активных ингредиентов, связанных с материалом молекулярным линкером, имеющим расщепляемую пептидную последовательность. За счет этого обеспечивается в случае необходимости контролируемое по времени высвобождение активного ингредиента, при этом активный ингредиент присоединен к поверхности материала или к каркасу материала в виде трехмерной структуры.

На схеме I Фиг. 4 схематически проиллюстрировано получение материала на основе полимера в форме гидрогеля или конденсационного полимера, в котором молекулы звездообразного полимера, например, звездообразного ПЭГ, соединены на концах полимерных молекул в трехмерные сетчатые структуры линкерными молекулами, содержащими ферментативно расщепляемые пептидные последовательности. При добавлении активного ингредиента в процессе формирования сетчатой структуры молекулы активного ингредиента физически включаются в сетчатую структуру. При добавлении фермента и последующего расщепления пептидной последовательности может иметь место контролируемая деградация сетчатой структуры на отдельные звездообразные полимеры, при этом соответствующие остатки расщепленной пептидной

последовательности далее располагаются на концах звездообразных полимеров в форме пептидных мотивов. В результате деградации сетчатой структуры происходит выделение активных веществ, ранее физически заключенных в сетчатой структуре.

На схеме II на Фиг. 4 схематически проиллюстрировано формирование материала трехмерной сетчатой структуры биогибридных полимеров, предпочтительно гидрогеля или конденсационного полимера, в котором молекулы имеют ферментативно расщепляемую пептидную последовательность, при этом ковалентно присоединенные активные ингредиенты прикреплены к поверхности материала сетчатой структуры. Добавление фермента вызывает расщепление ковалентной связи, что приводит к высвобождению молекул активных ингредиентов с ковалентно связанными пептидными мотивами расщепленных пептидных последовательностей. Таким образом, обеспечивается высвобождение активного ингредиента, контролируемое за счет добавления ферментов, в результате чего сохраняется трехмерная полимерная сетка (гидрогель или конденсационный полимер).

Способ биоортогональной деградации материала также может использоваться для получения однослойных клеток, тканей и трансплантатов или в виде трехмерных структур (Фиг. 5).

На Фиг. 5 представлено схематическое изображение применения биоортогональной деградации материала для получения клеток, тканей или трансплантатов в один слой, при которой выращиваемый материал представляет собой гидрогель. Указанный гидрогель включает полимерную сетку, которую, как показано на Фиг. 5, получают путем смешивания звездообразного полимерного компонента, второго компонента в форме сахара или глюкозаминогликана (GAGs) и расщепляемой короткой пептидной последовательности. Смесь указанных трех компонентов образует полимерную сетку с одной пептидной последовательностью на каждом конце звездообразного полимера. Несколько пептидных последовательностей, не связанных с одной и той же полимерной молекулой, присоединены к каждой из молекул сахара или глюкозаминогликана. В результате этого происходит формирование полимерной сетки для гидрогеля, часть из которой представляет собой расщепляемые пептидные последовательности. Являясь частью трехмерной структуры материала на основе полимера, расщепляемые пептидные последовательности

являются существенным фактором, определяющим наличие структуры таким образом, чтобы обеспечивалась биоортогональная деградация структуры в диапазоне от частичной до полной в случае расщепления или деградации связи пептидной последовательности. Клетки наносят на гидрогель после формирования гидрогеля, как показано в верхней части Фиг. 5, в результате чего обеспечивается рост клеток. После завершения формирования слоя клеток или ткани, либо после подготовки трансплантата, адгезионная связь между материалом на основе полимера и слоем клеток/тканью/трансплантатом/имплантатом может быть деградирована контролируемым добавлением фермента. Фермент обеспечивает расщепление/деградацию ковалентной связи пептидной последовательности, в результате чего происходит последующая биоортогональная деградация трехмерной структуры материала. Полимерная сетка разделяется на звездообразные полимерные молекулы полимеров с терминальными пептидными мотивами ранее расщепленной пептидной последовательности, а также на сахаридные или глюкозаминогликановые молекулы также с присоединенными пептидными мотивами расщепленной пептидной последовательности, в результате чего звездообразный полимер и сахарид или глюкозаминогликан легко и избирательно отделяют от слоя клеток или ткани, либо от трансплантата/имплантата.

На Фиг. 6 приведено схематическое изображение применения биоортогональной деградации материала для получения клеток и ткани при использовании трехмерных структур. В этом случае, полимерную сетку создают путем смешивания звездообразного полимерного компонента, на каждом из четырех концов которого расположена соответствующая короткая расщепляемая пептидная последовательность, а также сахарада или глюкозаминогликана. Несколько пептидных последовательностей, не связанных с одной и той же полимерной молекулой, связаны в сетке (формирование сетки) с каждой молекулой сахарада или глюкозаминогликана. Путем добавления клеток в процессе формирования сетчатой структуры клетки физически интегрируются в сетчатую структуру. Трехмерная полимерная сетчатая структура образует стабильный каркас для клеток, аналогичный трехмерному внеклеточному матриксу. После успешного получения ткани ткань может быть аккуратно и избирательно отделена от трехмерного материала-носителя методом

контролируемого ферментативного расщепления пептидных последовательностей, при этом трехмерная полимерная сетка разделяется на звездообразные полимерные молекулы с терминальными пептидными мотивами ранее расщепленной пептидной последовательности и на молекулы сахара или глюкозаминогликана также с присоединенными пептидными мотивами расщепленной пептидной последовательности.

Настоящее изобретение позволяет предоставить новое средство для исследователей или медицинских работников, предназначенное для осуществления процессов сбора, хранения и культивирования живых клеток, тканей и органов и отсутствующее в других способах.

Ниже приведено подробное описание дополнительных иллюстративных примеров осуществления настоящего изобретения:

Синтез PEG-(FXa)₄-конъюгатов осуществляли, как показано схематически на Фиг. 7А. Синтез PEG (FXa)₄ конъюгатов осуществили в соответствии с ранее приведенным описанием в публикации Tsurkan M.V. et al. Defined polymer-peptide conjugates to form cell-instructive starPEG heparin matrices in situ. Adv. Mater. 25, 2606-2610 (2013). Под FXa пептидом следует понимать пептид, имеющий сайт, расщепляемый протеазой фактора Ха.

427 мг ПЭГ-малеимида быстро растворяли в 10 мл 50% (объемное содержание) смеси ацетонитрила/воды и смешивали с 300 мг пептида FXa (30% избыток), растворенного в 15 мл 50% (объемное содержание) смеси ацетонитрила/воды. Значение pH реакционной смеси корректировали, добавляя 1 М NaOH, до значения pH 7,5-8. Реакцию проводили в течение 5 часов в атмосфере азота, и завершение реакции контролировали с помощью аналитического метода ВЭЖХ. Реакционную смесь очищали методом препаративной ВЭЖХ. По завершению процесса ВЭЖХ продукт собирали и сублимировали в течение более 24 часов. Полученный порошок белого цвета хранили при -20 °С. Схема синтеза и контроль реакции методом ВЭЖХ проиллюстрированы на Фиг. 7А, 7В и 7С.

Формирование гидрогеля:

Схематическое изображение формирования гидрогеля и механические свойства в зависимости от степени поперечной сшивки гидрогеля приведены на Фиг. 8А и 8В. Сетчатую структуру гидрогеля формировали путем проведения реакции присоединения Михаэля посредством формирования пептидных

поперечных сшивок (узлов). Общее содержание растворённых и нерастворённых веществ всех гелевых смесей неизменно поддерживалось на уровне 5% (50 мг/мл) независимо от степени поперечной сшивки (что соответствует молярному соотношению $\text{PEG/CSMal}_6 = c$). Простая корректировка объемного соотношения $(\text{FXa})_4$ и CSMal_6 при одновременном поддержании постоянного общего объема обеспечивает корректировку набухания и упругости сформированных гидрогелей. CS в данном контексте является аббревиатурой для хондроитинсульфата, Mal является аббревиатурой для малеимида.

Формирование слоев корнеальных эндотелиальных клеток человека в процессе деградации гидрогеля:

Иммортиализованные корнеальные эндотелиальные клетки человека клеточной линии (HCEC)-line HCEC-B4G12 в соответствии с описанием в опубликованном документе Valtink M. et al. Two clonal cell lines of immortalized human corneal endothelial cells show either differentiated or precursor cell characteristics. *Cells. Tissues. Organs* 187, 286-94 (2008) культивировали в бессывороточной среде (SFM) для культивирования эндотелиальных клеток человека (SFM = бессывороточная среда органной культуры роговицы) с добавлением 10 нг/мл рекомбинантного основного фактора роста фибробластов человека (bFGF). Корнеальные эндотелиальные клетки человека высевали на FXa деградируемые гидрогели при плотности 1×10^5 клеток на cm^2 . Клетки выдерживали при 37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Среду меняли три раза в неделю. На Фиг. 9 проиллюстрированы процесс формирования гидрогеля и механические свойства в зависимости от степени поперечной сшивки. На Фиг. 9 проиллюстрированы микрофотографии долгоживущей культуры корнеальных эндотелиальных клеток человека на FXa деградируемых гидрогелях. Было обнаружено, что FXa-расщепляемые гидрогели со степенью поперечной сшивки $\gamma = 1.25$ являются подходящими для процедуры культивирования корнеальных эндотелиальных клеток человека, так как почти коалесцентный слой клеток был сформирован через 48 часов (2 суток).

После семи дней культивирования на FXa-деградируемых гидрогелях образцы инкубировали в бессывороточной среде (SFM) для культивирования эндотелиальных клеток человека с 900 нМ эндопротеазы фактора Ха в течение 45 минут при 37 °C. По истечении указанного периода времени клеточные монослои полностью выделяли, и с ними можно было аккуратно манипулировать с помощью

канюли размером 20 g (HSW Fine Ject, Tuttlingen, Germany). Световые микрофотографии формирования слоя корнеальных эндотелиальных клеток человека в процессе деградации гидрогеля показаны на дополнительных Фиг. 10 и 11А.

На Фиг. 10 световые микрофотографии позволяют проиллюстрировать формирование слоев корнеальных эндотелиальных клеток человека в процессе деградации гидрогеля в бессывороточной среде (SFM) для культивирования эндотелиальных клеток человека с 450 нМ эндопротеазы фактора Ха при 37 °С. Полную деградацию можно наблюдать спустя 120 минут.

На Фиг. 11А оптические микрофотографии позволяют проиллюстрировать формирование слоев корнеальных эндотелиальных клеток человека в процессе деградации гидрогеля в бессывороточной среде для культивирования эндотелиальных клеток человека SFM с 900 нМ эндопротеазы фактора Ха при 37 °С. Полная деградация происходит спустя 45 минут.

На Фиг. 11В проиллюстрированы различные световые микрофотографии различных примеров сформировавшегося слоя корнеальных эндотелиальных клеток человека.

SEQUENCE LISTING

<110> IPF Leibniz-Institut fuer Polymerforschung Dresden e.V.
 <120> Polymer-based material having covalently bonded, enzymatically degradable peptide Sequences
 <130> IPF17-15-EP-IP
 <140> PCT/DE2017/100260
 <141> 2017-04-04
 <150> EP16163667.5
 <151> 2016-04-04
 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> enzymatically cleavable peptide sequence, Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 1
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Xaa
 1 5
 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> enzymatically cleavable peptide sequence
 <400> 2
 Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
 1 5
 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> enzymatically cleavable peptide sequence
 <400> 3

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> enzymatically cleavable peptide sequence, Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 4

Asp Xaa Xaa Asp
1

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> enzymatically cleavable peptid sequence, Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 5

Ile Glu Gly Arg Ile Glu Gly Arg Xaa
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> enzymatically cleavable peptide sequence

<400> 6

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> enzymatically cleavable peptide sequence

<400> 7

Leu Pro Glu Thr Gly
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> enzymatically cleavable peptide sequence, Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 8

Leu Val Pro Arg Gly Ser Phe Xaa Arg Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> enzymatically cleavable peptide sequence

<400> 9

Glu Thr Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> enzymatically cleavable peptide sequence

<400> 10

Cys Trp Gly Gly Gly Ile Glu Gly Arg Met Gly Gly Cys Gly
1 5 10

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> enzymatically cleavable peptide sequence

<400> 11

Cys	Gly	Gly	Gly	Ile	Glu	Gly	Arg	Met	Gly	Gly	Trp	Cys	Gly
1				5				10					

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Материал на основе полимера с ковалентно связанными, ферментативно деградируемыми пептидными последовательностями, включающими, по меньшей мере, один сайт, ферментативно расщепляемый протеазами, при этом сайт выбран из группы расщепляемых сайтов, включающих сайт, расщепляемый протеазой вируса гравировки табака, сайт, расщепляемый протеазой риновируса 3С человека, сайт, расщепляемый протеазой фактора Ха, сайт, расщепляемый протеазой тромбина, сайт, расщепляемый энтерокиназой, сайт, расщепляемый сортазой-А-протеазой, сайт, расщепляемый протеазой каспазы-3, сайт, расщепляемый сериновой протеазой гранзимы В, сайт, расщепляемый слитым белком глутатион-S-трансферазы (GST) и протеазой риновируса человека (HRV) типа 14-3С, в котором каждая из пептидных последовательностей состоит из двух-пятнадцати аминокислот и включена в материал на основе полимера или конъюгирована к материалу на основе полимера таким образом, чтобы они являлись линкерными молекулами либо в двумерной, либо в трехмерной структуре материала на основе полимера и чтобы в процессе деградации ковалентной связи пептидной последовательности, контролируемой путем добавления фермента, либо имела место биоортогональная деградация трехмерной структуры, либо в случае конъюгирования пептидной последовательности к материалу на основе полимера происходило высвобождение, по меньшей мере, части молекулы.

2. Материал на основе полимера по п. 1, отличающийся тем, что материал на основе полимера является двумерной или трехмерной сшитой структурой с узлами сшивки и гранями, в котором, по меньшей мере, часть узлов и (или) граней содержит сшивающие молекулы.

3. Материал на основе полимера по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что материал на основе полимера является гидрогелем или конденсационным полимером.

4. Материал на основе полимера по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что материал на основе полимера включает, по меньшей мере, один биоактивный компонент, выделяемый за счет деградации ковалентной связи пептидной последовательности, контролируемой путем добавления фермента и относящейся к группе компонентов, включающих активные ингредиенты,

нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК, аптамеры), белки, пептидные конъюгаты, сульфатированные и несulfатированные полисахариды и их конъюгаты.

5. Материал на основе полимера по п. 4, отличающийся тем, что молекулы, по меньшей мере, одного выделяемого компонента конъюгированы с материалом на основе полимера с помощью линкеров, при этом каждый линкер содержит ферментативно деградируемую пептидную последовательность.

6. Материал на основе полимера по п. 4, отличающийся тем, что молекулы, по меньшей мере, одного выделяемого компонента физически заключены в трехмерную полимерную сетку и (или) физически связаны с трехмерной полимерной сеткой.

7. Материал на основе полимера по одному из пп. 1-6, отличающийся тем, что ферментативно деградируемые пептидные последовательности являются неразлагаемыми под воздействием биологической или метаболической активности клеток и тканей.

8. Материал на основе полимера по п. 7, отличающийся тем, что расщепляемая пептидная последовательность, имеющая расщепляемый протеазой сайт, выбрана из группы, содержащей ENLYFQ/X, ETVLFQ/GP, EVLFQ/GP, IEGR/IEGRX, DDDDK/, LVPRGS/FXRS, DXXD/, LPET/G, где наклонная черта вправо (/) обозначает соответствующий расщепляемый сайт, буквенные символы обозначают однобуквенный код протеиногенных аминокислот, и X означает любую аминокислоту природного происхождения.

9. Материал на основе полимера по п. 7 или п. 8, дополнительно включающий пептидные последовательности, которые являются деградируемыми под воздействием биологической или метаболической активности клеток и тканей и которые включены в материал на основе полимера или конъюгированы с материалом на основе полимера таким образом, чтобы они являлись линкерными молекулами либо в двумерной, либо в трехмерной структуре материала на основе полимера, с тем, чтобы биологическая и метаболическая активность клеток и тканей привела к биоортогональной деградации трехмерной структуры, либо в случае конъюгирования пептидной последовательности к материалу на основе полимера, к высвобождению, по меньшей мере, части молекулы.

10. Материал на основе полимера по любому из пп. 4-9, предназначенный для использования в целях контролируемого высвобождения *in-vivo* или *in-vitro* выделяемого компонента, которое происходит за счет деградации

ковалентной связи пептидной последовательности, контролируемой путем добавления протеазы.

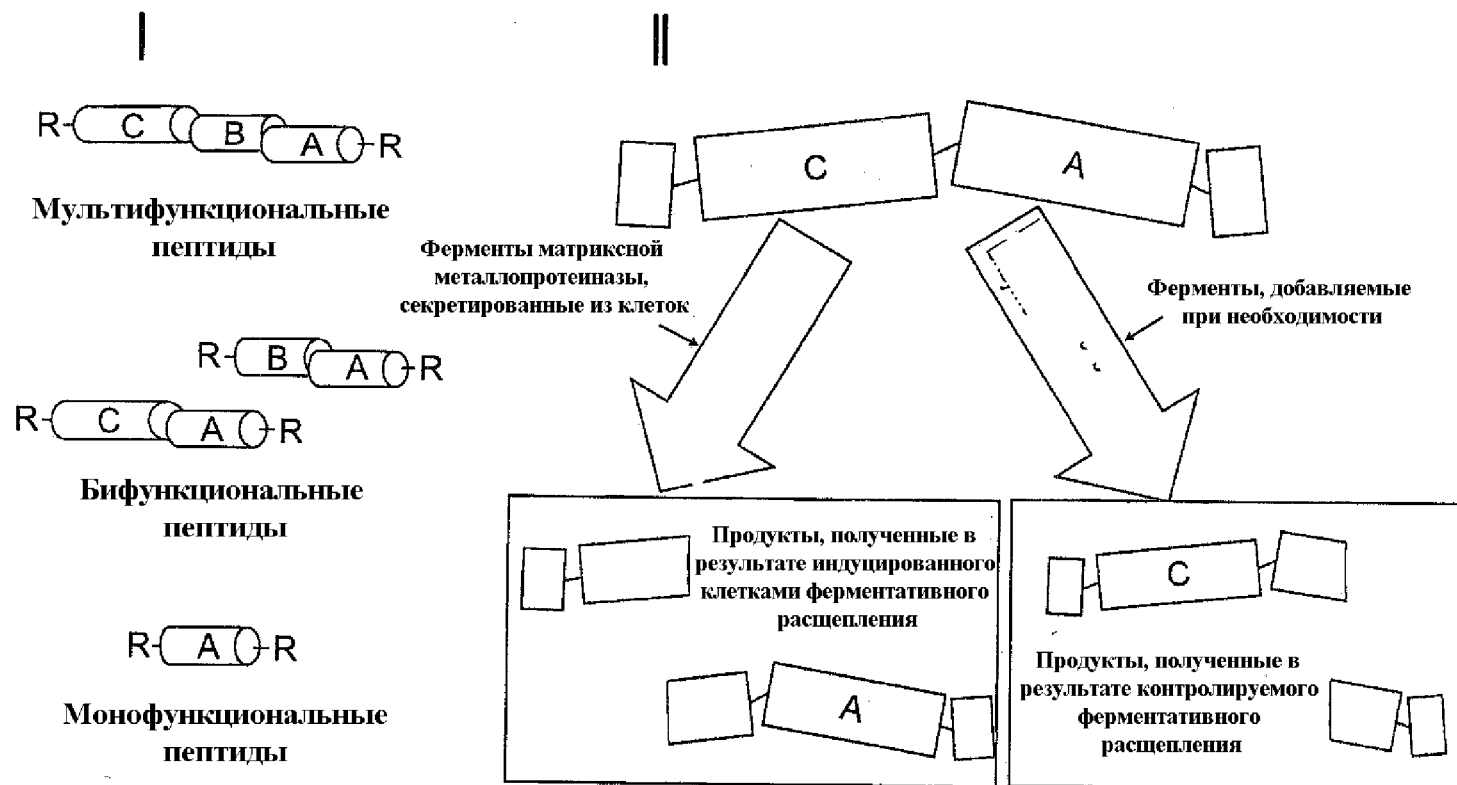
11. Материал на основе полимера, предназначенный для использования по п. 10 в целях воздействия *in vivo* или *in vitro* на клетки, ткани или органы, в котором, при необходимости, активный ингредиент и (или) другой из вышеуказанных высвобождаемых биоактивных компонентов контролируемо высвобождается путем добавления протеазы.

12. Применение материала на основе полимера по любому из пп. 1-9 в целях культивирования культуры клеток *in vitro* или получения тканей или органов *in-vitro*.

13. Применение материала на основе полимера по любому из пп. 1-9 в целях стабилизации *in vitro* донорских клеток, тканей и органов.

14. Применение материала на основе полимера по любому из пп. 1-9 в целях осуществления способа *in vitro*, при котором, в случае необходимости, происходит деградация ковалентной связи пептидной последовательности, контролируемая путем добавления протеазы, и как результат высвобождение выделяемого компонента.

15. Применение материала на основе полимера по п. 14 при воздействии *in-vitro* на живые клетки, ткани или органы, при котором, в случае необходимости, активный ингредиент и (или) иной из вышеуказанных высвобождаемых биоактивных компонентов контролируемо выделяется за счет добавления протеазы.

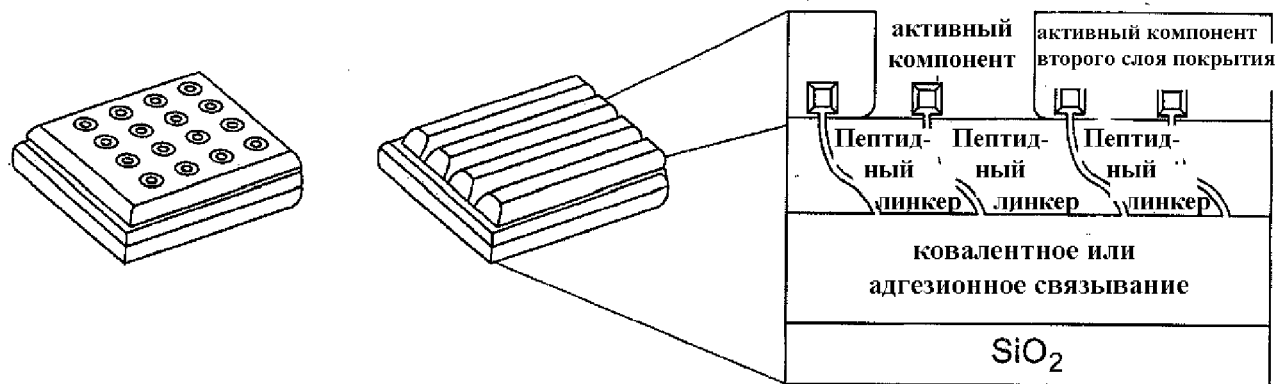


Фиг. 1

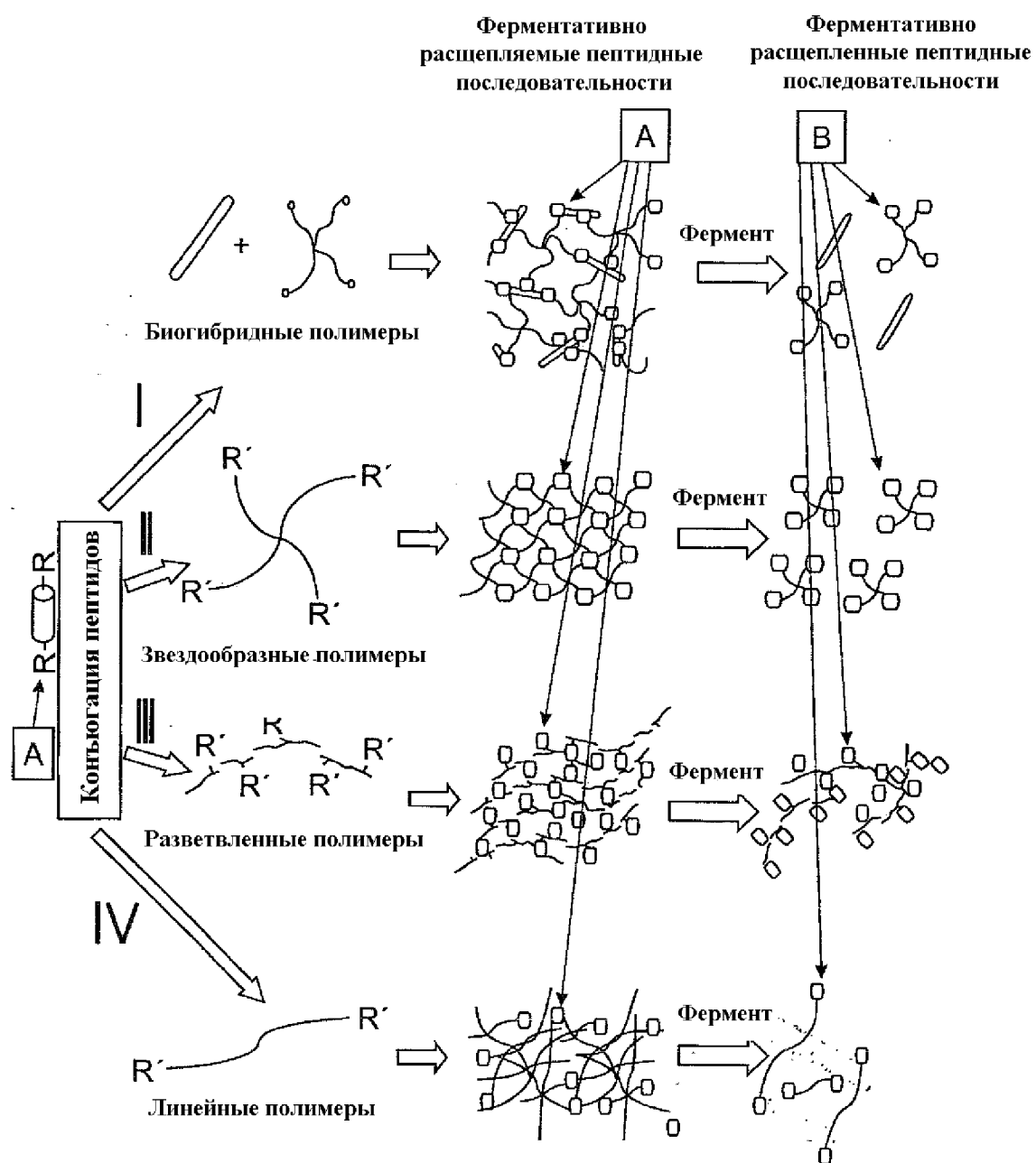
Нанесение покрытий для создания биочувствительных поверхностей



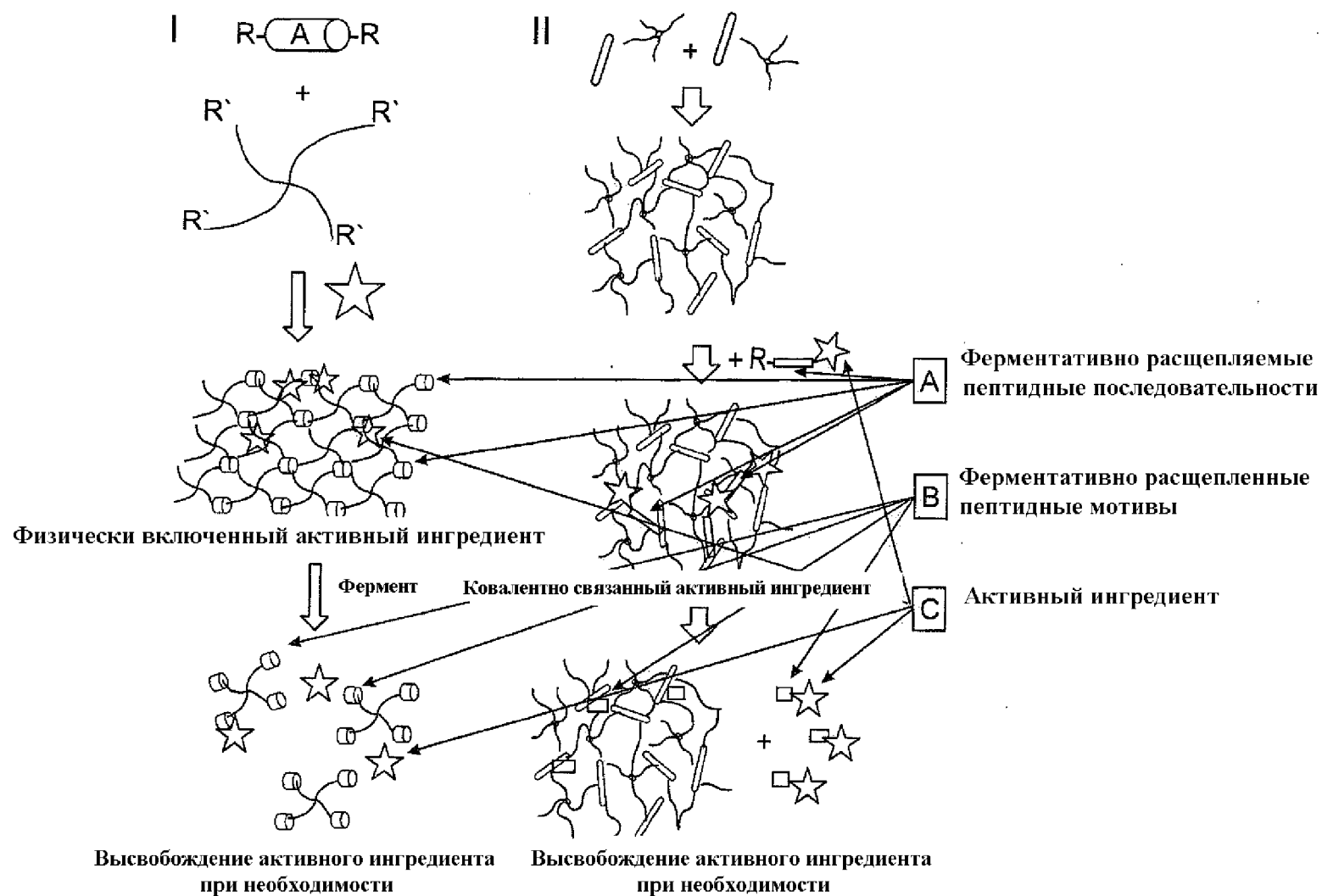
Нанесение покрытий для создания биочувствительных структурированных поверхностей



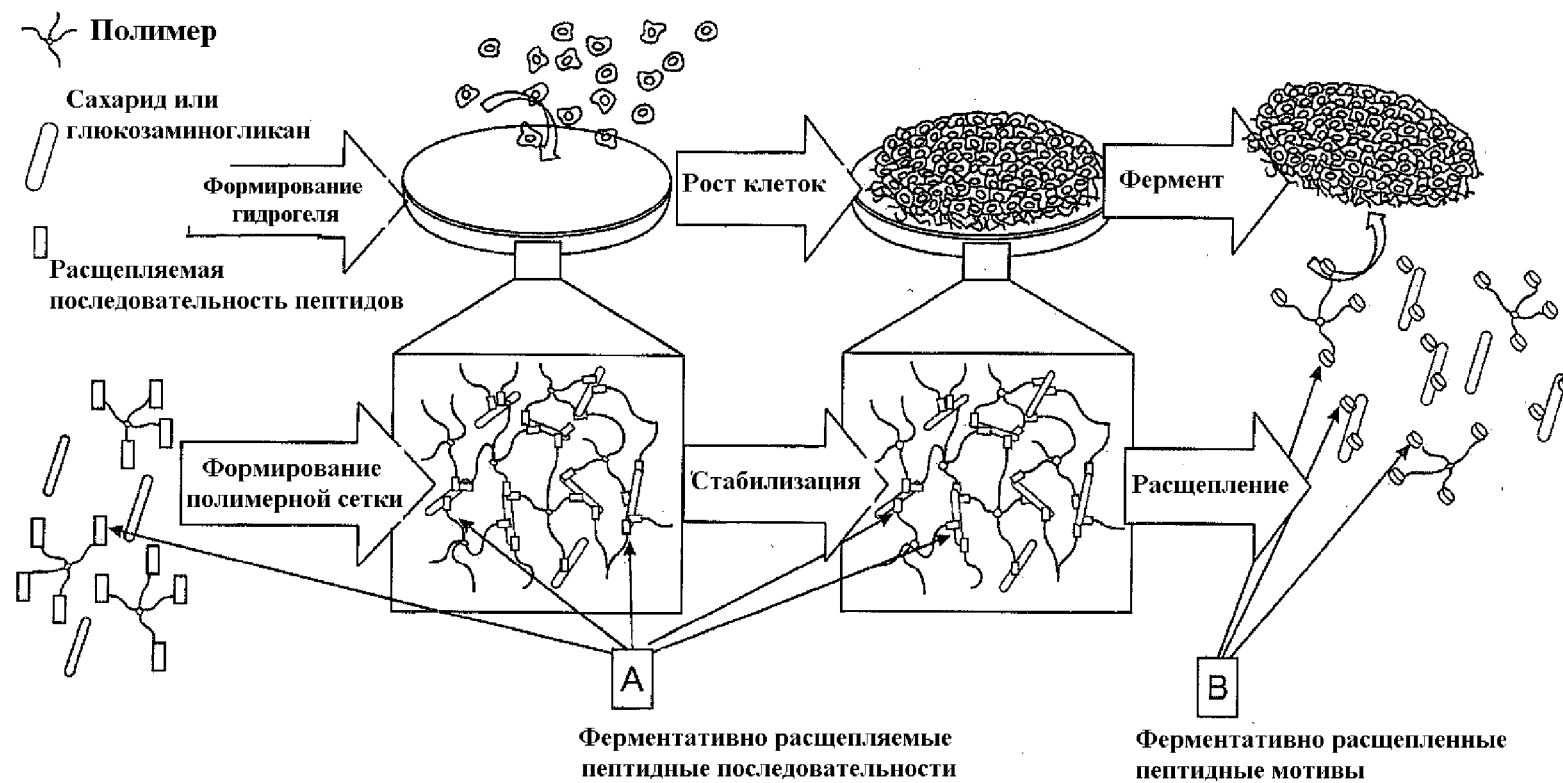
Фиг. 2



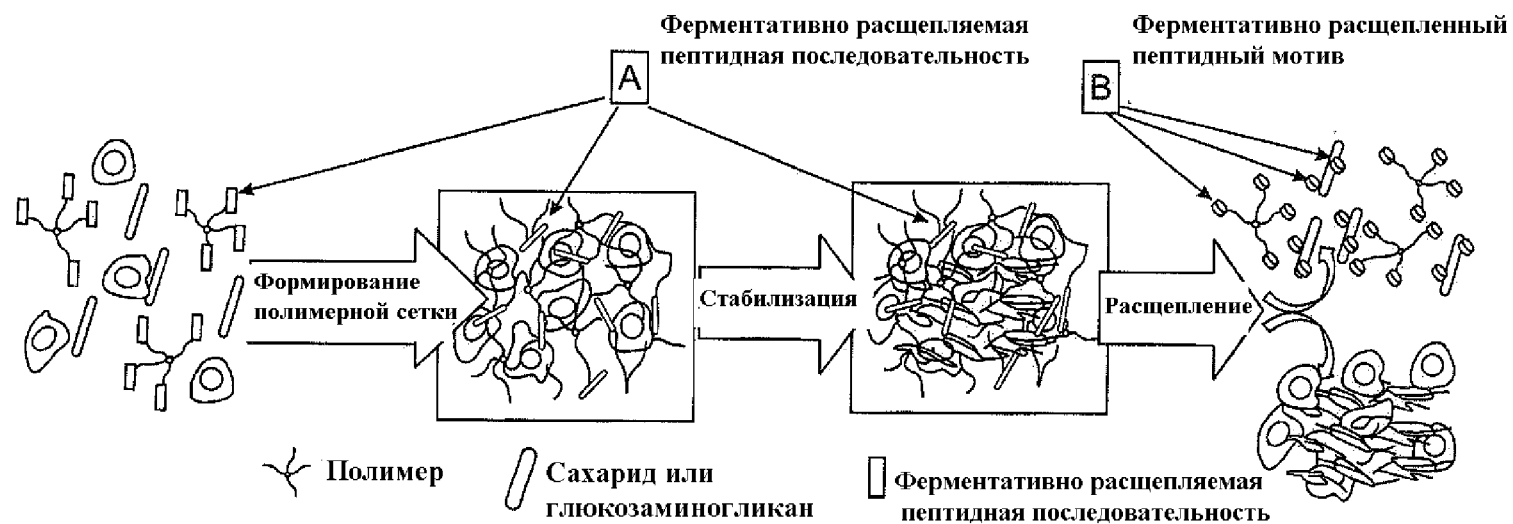
Фиг. 3



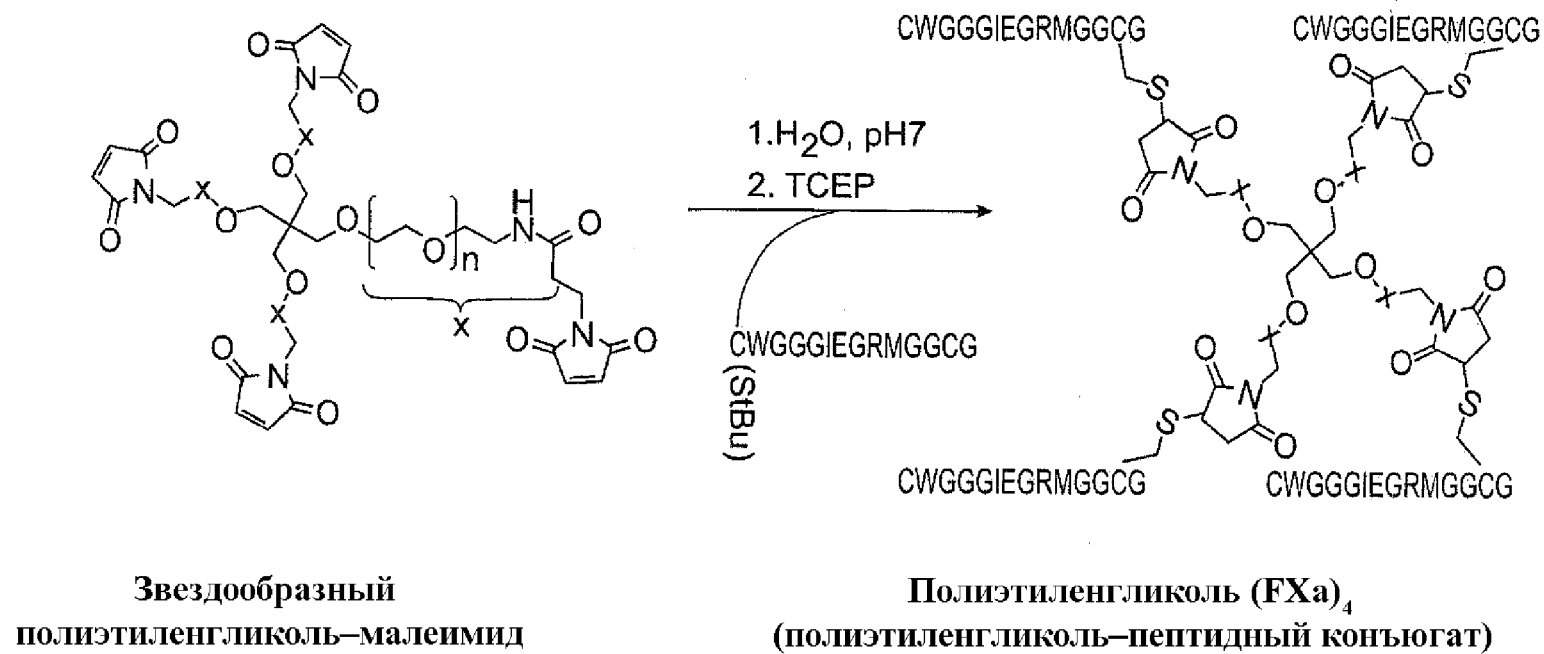
Фиг. 4



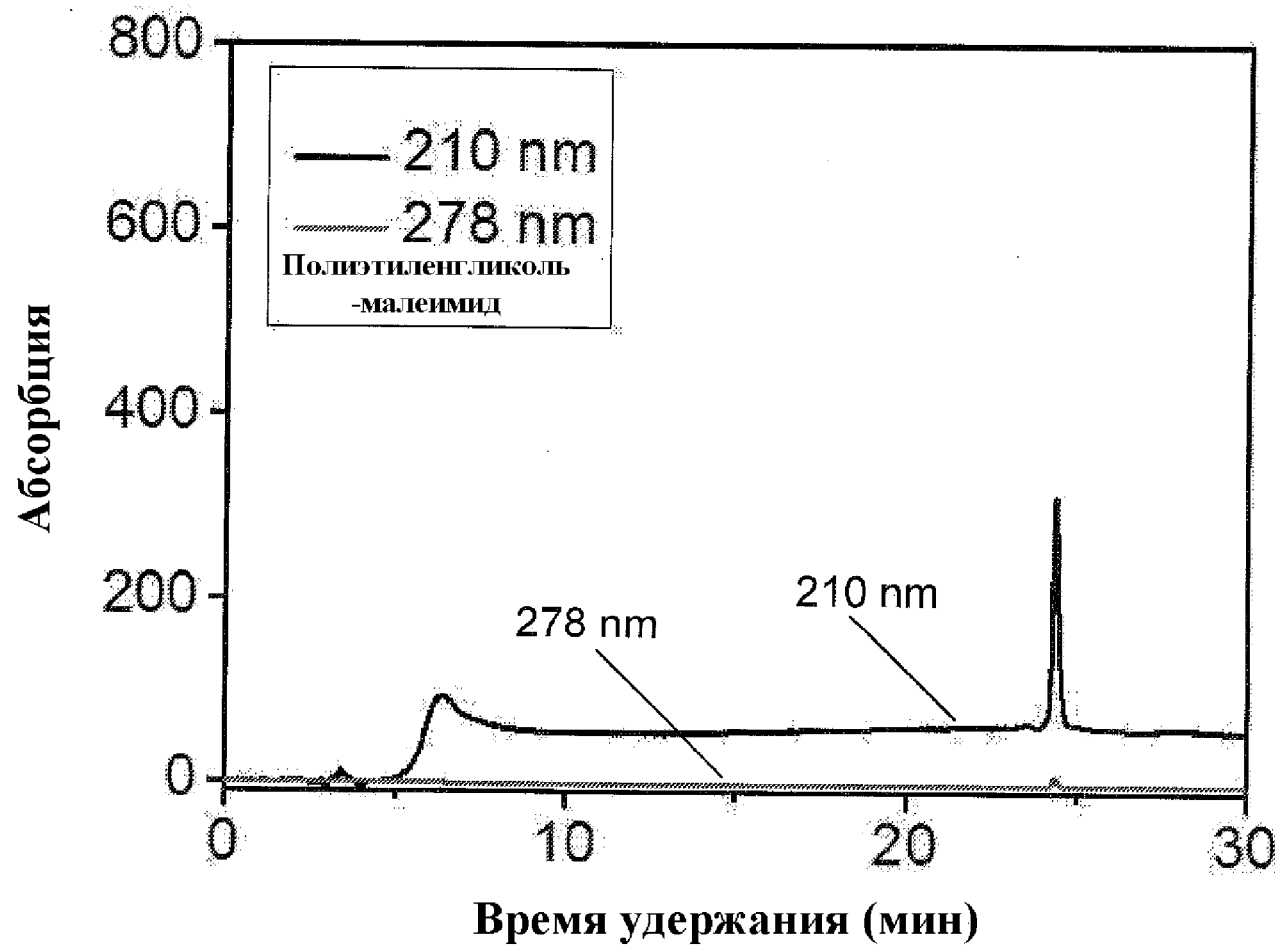
Фиг. 5



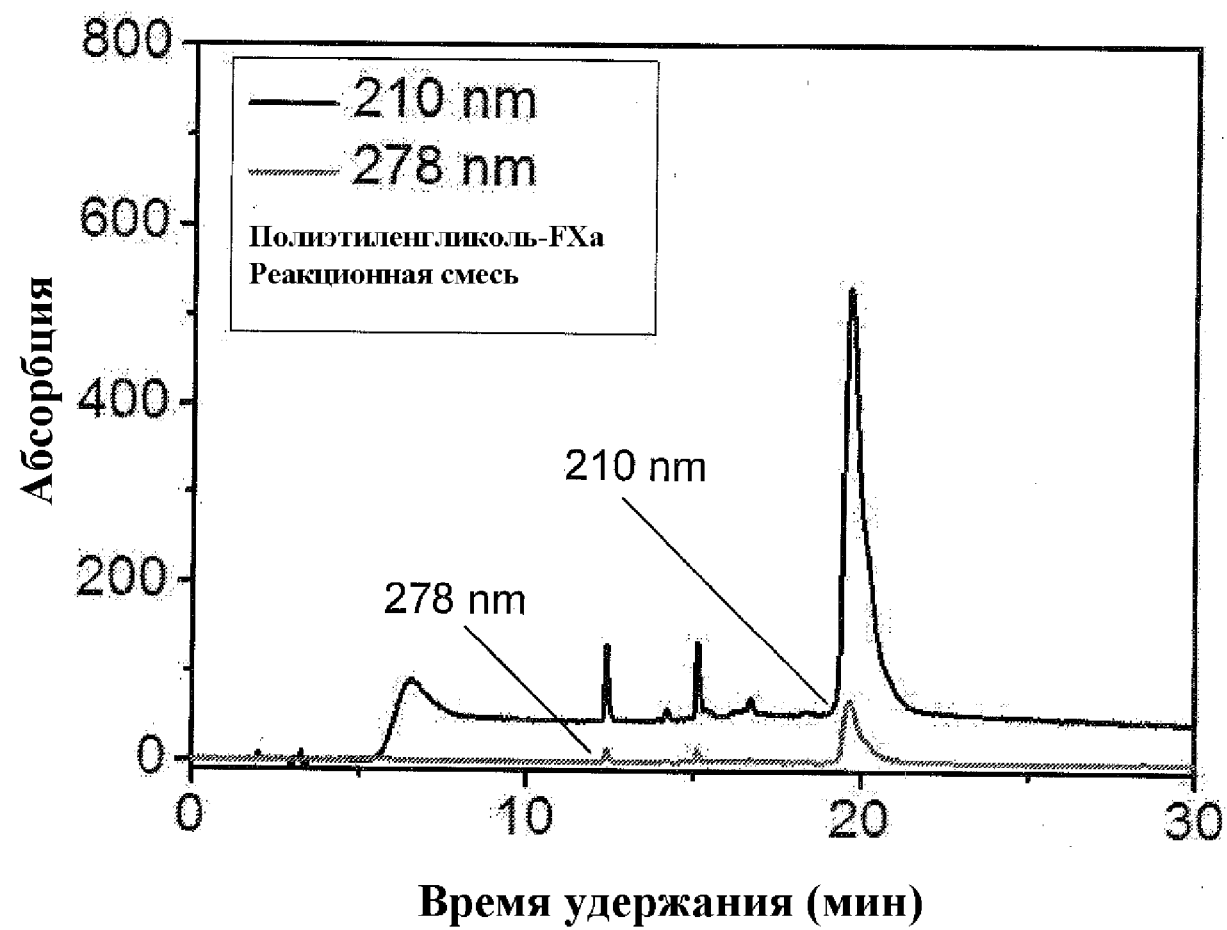
Фиг. 6



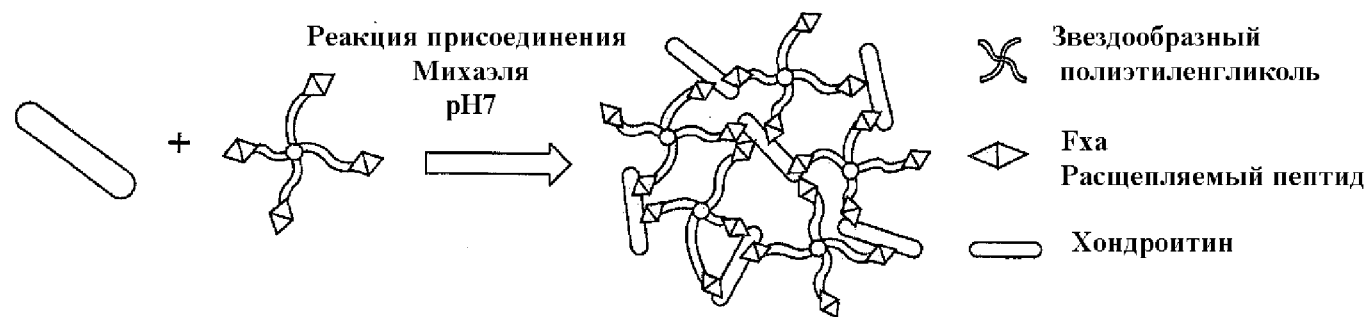
Фиг. 7А



Фиг. 7В

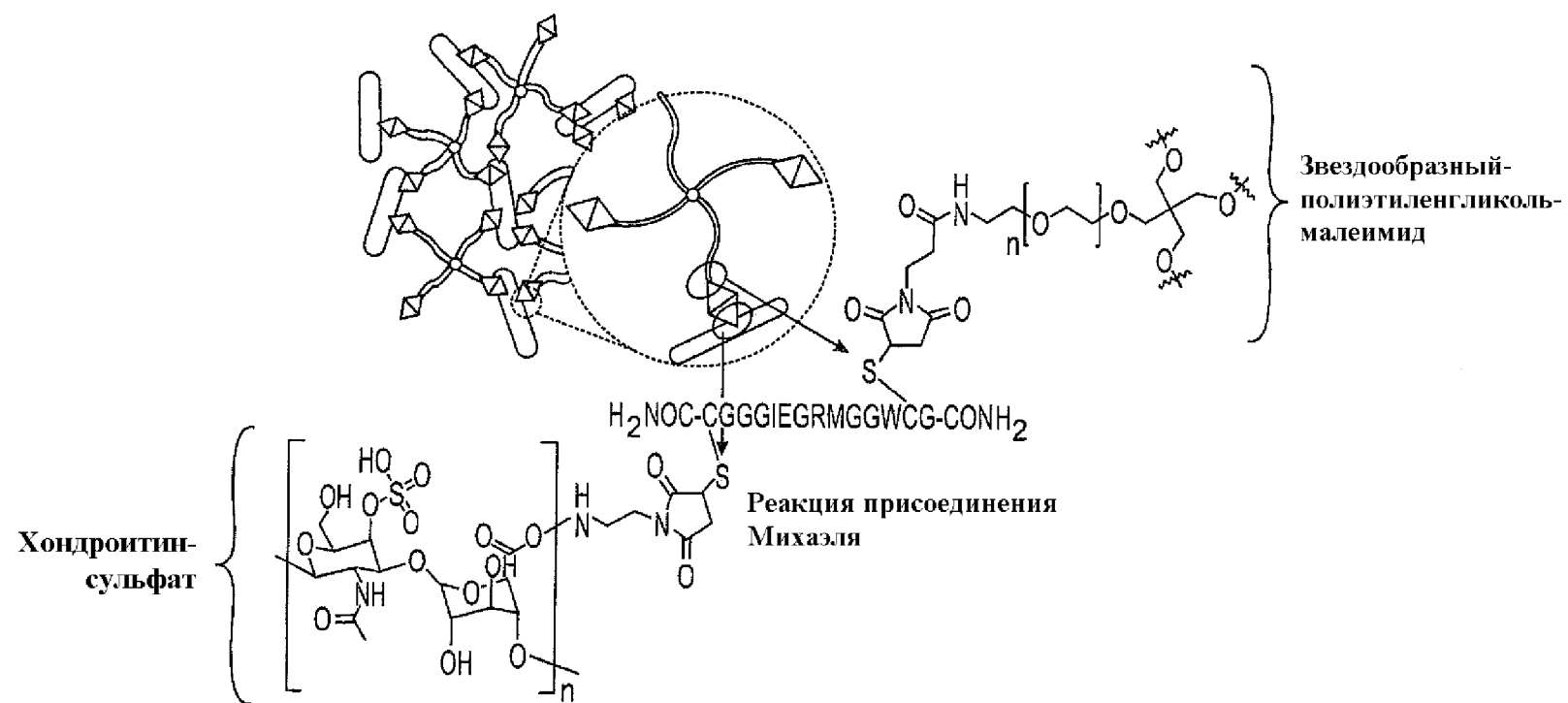


Фиг. 7С

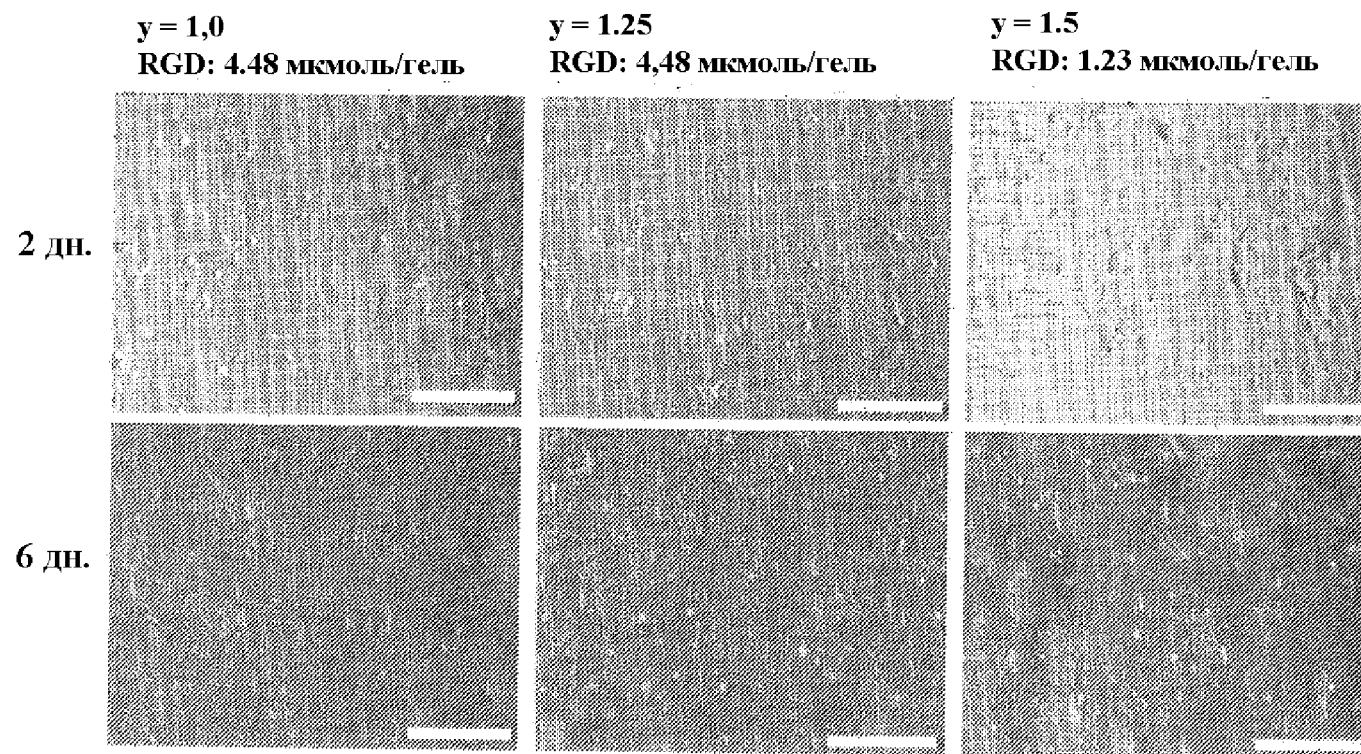


10/15

Фиг. 8А

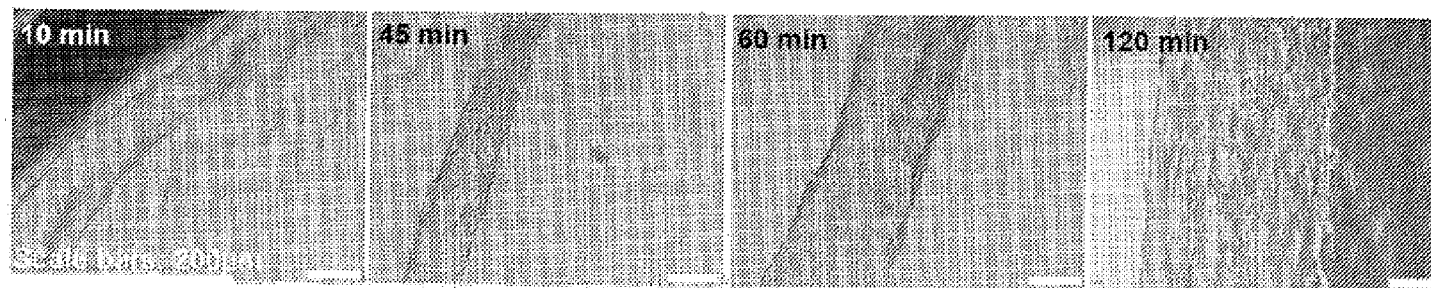


Фиг. 8В

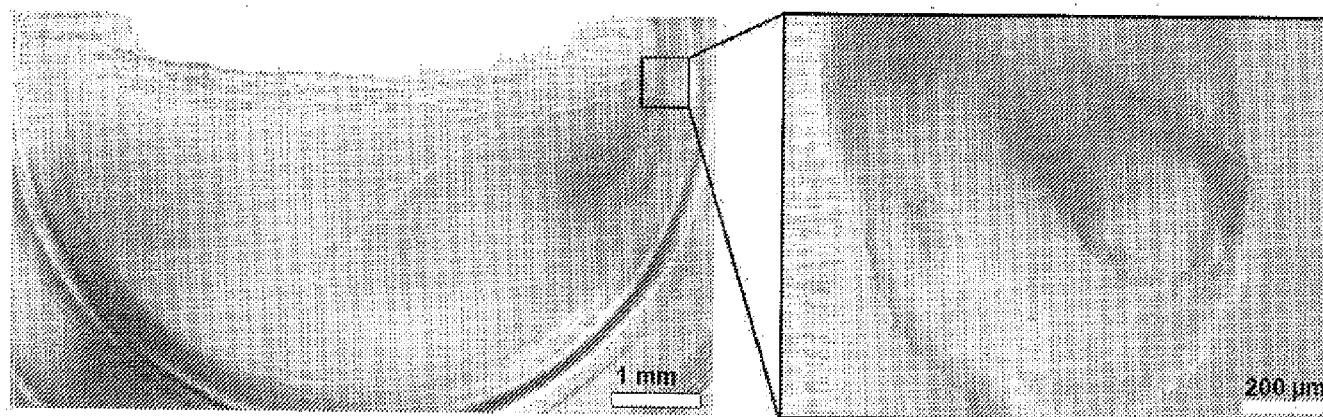


Масштабная полоска: 200 мкм

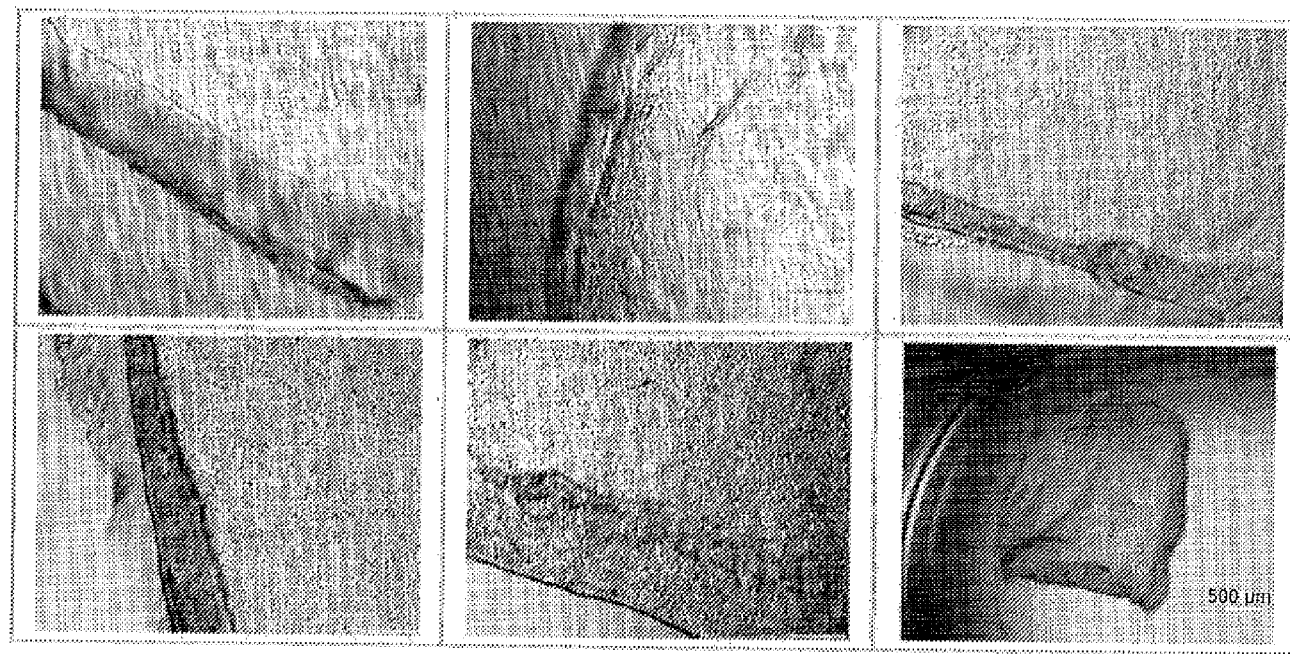
Фиг. 9



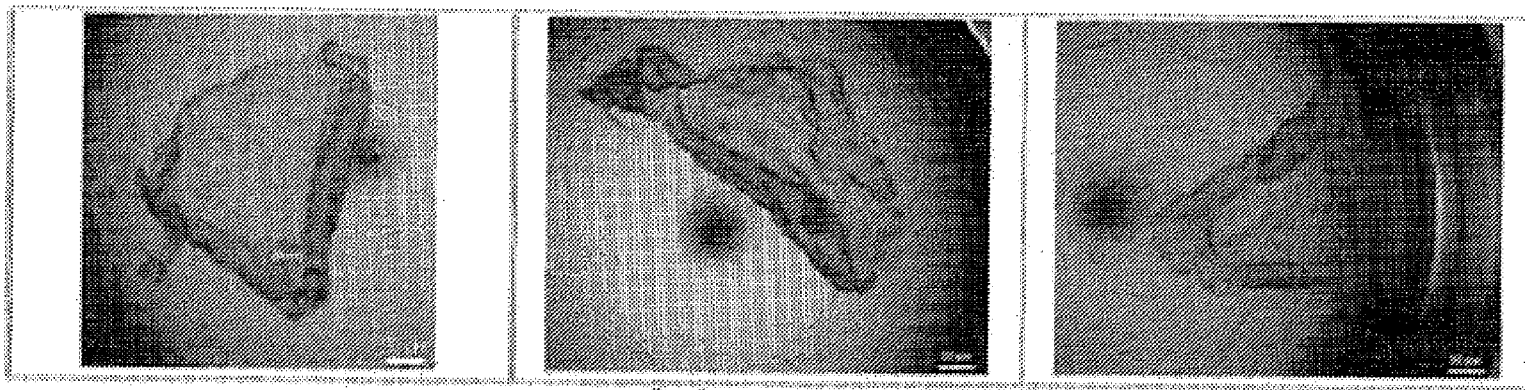
Масштабная полоска: 200 мкм



Фиг. 10



Фиг. 11А



Фиг. 11В