



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013143677/15, 27.09.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.09.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.09.2013

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2015 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 10.06.2015 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20120225435 A1, 06.09.2012. RU 2102750 C1, 20.01.1998. US 20100285210 A1, 11.11.2010. WO 2002033066 A1, 25.04.2002. RODOLFA et al. Nanoscale pipetting for controlled chemistry in small arrayed water droplets using a double-barrel pipet. // Nano Lett. 2006 Feb;6(2):252-7

Адрес для переписки:

119311, Москва, ул. Строителей, 4-5-47,
Яминскому И.В.

(72) Автор(ы):

Горелкин Петр Владимирович (RU),
Шевчук Андрей Игоревич (GB),
Актис Паоло (IT),
Ерофеев Александр Сергеевич (RU),
Яминский Игорь Владимирович (RU),
Новак Павел (GB),
Кленерман Девид (GB),
Лопез-Кордоба Айнара (ES),
Бабакинежад Бабака (GB),
Корчев Юрий Евгеньевич (GB)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"Медицинские нанотехнологии" (RU)

(54) СПОСОБ КОНТРОЛИРУЕМОГО ВВЕДЕНИЯ ВЕЩЕСТВ В МИКРООБЪЕКТЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биофизики и прикладной биохимии и может быть использовано для контролируемого введения веществ в микрообъекты. Для этого вводят в микрообъект нанокапилляр, содержащий не менее двух изолированных друг от друга каналов, с последующим введением вещества. При этом используют нанокапилляр, у которого, по крайней мере, один из каналов содержит электрохимически активный материал и, по крайней мере, один канал содержит вводимое или

генерирующее его вещество. Контроль за введением вещества осуществляют путем измерения изменения электрического потенциала и/или силы тока, обусловленных электрохимической реакцией на электрохимически активном материале в результате введения вещества. Изобретение позволяет повысить степень контроля за введением веществ в микрообъекты за счет определения дополнительных информативных параметров. 5 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 552 298** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

G01N 27/27 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2013143677/15, 27.09.2013**

(24) Effective date for property rights:
27.09.2013

Priority:

(22) Date of filing: **27.09.2013**

(43) Application published: **10.04.2015** Bull. № 10

(45) Date of publication: **10.06.2015** Bull. № 16

Mail address:

119311, Moskva, ul. Stroitelej, 4-5-47, Jaminskomu I.V.

(72) Inventor(s):

**Gorelkin Petr Vladimirovich (RU),
Shevchuk Andrej Igorevich (GB),
Aktis Paolo (IT),
Erofeev Aleksandr Sergeevich (RU),
Jaminskij Igor' Vladimirovich (RU),
Novak Pavel (GB),
Klenerman Devid (GB),
Lopez-Kordoba Ajnara (ES),
Babakinezhad Babak (GB),
Korchev Jurij Evgen'evich (GB)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"Meditsinskie nanotekhnologii" (RU)**

(54) METHOD OF CONTROLLED SUBSTANCE INJECTION TO MICRO OBJECTS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: nanocapillary containing at least two separated channels is introduced into a micro object, with further injection of a substance. Nanocapillary with at least one channel containing electrochemically active material and at least one channel containing injected substance or substance generating it is applied. Substance injection is controlled by measuring electric

potential and/or current changes caused by electrochemical reaction in electrochemically active material due to the substance introduction.

EFFECT: enhanced control over substance introduction into micro objects by determining additional informative parameters.

5 ex

R U 2 5 5 2 2 9 8 C 2

R U 2 5 5 2 2 9 8 C 2

Изобретение относится к области биофизики и прикладной биохимии, и может быть использовано, например, для изучения влияния вводимых веществ, таких как природные и синтетические добавки или лекарства, на параметры органических и неорганических микрообъектов.

5 Известен способ контролируемого введения веществ в микрообъект (клетку) путем введения наноиглы, модифицированной молекулами дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [Sung-Woong, H., et al., High-efficiency DNA injection into a single human mesenchymal stem cell using a nanoneedle and atomic force microscopy // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2008, p.215-25].

10 Известен способ контролируемого введения веществ в микрообъект (клетку) путем приложения электрического напряжения к клетке. При этом в результате явления электропорации происходит открытие каналов клетки и она становится доступной для ввода веществ [Wang M.Y., et al., Single-cell electroporation // Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2010, V.397, p.3235-3248].

15 Наиболее близким к заявляемому является известный способ контролируемой введения веществ в микрообъект (клетку) путем введения в микрообъект нанокапилляра, содержащего не менее двух изолированных друг от друга каналов, с последующим введением вещества [Патент США US 2002/0225435 A1, 2012, U.S. CL.435/7.1] - прототип. В данном способе используют нанокапилляр, в каждом из каналов которого находится
20 электрод. При этом введение вещества в клетку проводят путем электрохимического переноса вводимого вещества при подаче разности потенциалов на расположенные в разных каналах электроды. В данном способе контроль за введением вещества осуществляют путем регулирования величины разности потенциалов на электродах.

Недостатком известного способа является его недостаточная степень контроля за
25 введением веществ в микрообъекты, поскольку данный способ позволяет контролировать только один недостаточно информативный параметр - объем вводимого вещества.

Задачей изобретения является создание способа контролируемого введения веществ в микрообъекты, лишенного вышеуказанного недостатка.

30 Техническим результатом изобретения является повышение степени контроля за введением веществ в микрообъекты.

Указанный технический результат достигается тем, что в известном способе контролируемого введения веществ в микрообъекты путем введения в микрообъект нанокапилляра, содержащего не менее двух изолированных друг от друга каналов, с
35 последующим введением вещества, используют нанокапилляр, у которого, по крайней мере, один из каналов содержит электрохимически активный материал и, по крайней мере, один канал содержит вводимое или генерирующее его вещество, а контроль за введением вещества осуществляют путем измерения изменения электрического потенциала и/или силы тока, обусловленных электрохимической реакцией на
40 электрохимически активном материале в результате введения вещества.

В предлагаемом способе интересующее экспериментатора вещество может как само непосредственно вводиться внутрь микрообъекта, так и быть генерированно внутри микрообъекта при введении в него генерирующего вещества. При этом вводимое
45 вещество или генерирующее его вещество может иметь различное агрегатное состояние, т.е. быть как твердым, так и жидким, а также являться раствором, суспензией, эмульсией и т.д. интересующего экспериментатора вещества.

В предлагаемом техническом решении в качестве вводимых веществ можно использовать различные природные или синтетические соединения, например, такие

как красители, лекарства, антигены и т.д.

Методика получения нанокапилляров с изолированными каналами, содержащих электрохимически активный материал в одном из каналов, например, углерод, описана в статье [Yasufumi Takahashi, Andrew I. Shevchuk, Pavel Novak, Yanjun Zhang, Neil Ebejer, Julie V. Macpherson, Patrick R. Unwin, Andrew J. Pollard, Debdulal Roy, Charles A. Clifford, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, David Klenerman, and Yuri E. Korchev. Multifunctional Nanoprobes for Nanoscale Chemical Imaging and Localized Chemical Delivery at Surfaces and Interfaces // *Angewandte Chemie*, 2011, V.50, p.1-6].

Предлагаемое изобретение может быть использовано для контролируемого введения веществ в микрообъекты различной природы и размеров, например в бактериальные клетки, клетки тканей человека и животных, липосомы, микрокапли и т.д. При использовании в качестве микрообъектов клеток они могут быть как прокариотами, так и эукариотами. При этом микрообъекты не должны быть твердыми и должны позволять вводить внутрь себя нанокапилляр.

В данном техническом решении могут быть использованы капилляры с острием (наноострием) на конце, изготовленные из различных материалов, например из стекла, кварца, боросиликата и т.д. При этом поверхность нанокапилляра может быть как не модифицированной, так в зависимости от решаемой экспериментальной задачи она может быть предварительно обработана различными модификаторами (ферментами, антителами, низкомолекулярными веществами и т.д.). В данном техническом решении внутренний диаметр нанокапилляров может составлять, например, 1-1000 нанометров (нм). Внешний диаметр таких капилляров должен не превышать размер микрообъекта, и также может варьироваться в широких пределах, например, 10-10000 нм. Типичная длина острия нанокапилляра обычно не превышает 10 микрометров (мкм) и может варьироваться в зависимости от решаемой задачи. Ввиду того что в данном техническом решении все каналы находятся внутри нанокапилляра, то эти каналы сами фактически являются наноканалами.

В данном техническом решении нанокапилляр должен содержать не менее двух изолированных друг от друга каналов. При этом у него, по крайней мере, один из каналов должен содержать электрохимически активный материал и, по крайней мере, один канал должен содержать вводимое вещество или вещество, генерирующее интересующее экспериментатора вещество. Если каналы у нанокапилляра будут неизолированными друг от друга, а также если нанокапилляр будет иметь каналы, содержащие только электрохимически активный материал, или иметь каналы, содержащие только вводимое или генерирующее вещество, то данное изобретение утрачивает работоспособность.

В предлагаемом изобретении могут быть использованы нанокапилляры, содержащие два или более каналов, при этом число каналов может быть как четным, так и нечетным. Соотношение заполненных и незаполненных электрохимически активными материалами каналов может варьироваться в зависимости от конкретной решаемой задачи.

В данном способе введение вещества можно осуществлять различными методами, например, путем создания повышенного давления в канале, путем электрохимического переноса вещества, путем комбинации вышеописанных способов и т.д.

В предлагаемом изобретении использование одного либо нескольких каналов, содержащих вводимые вещества, позволяет в ходе одного эксперимента последовательно или одновременно вводить в микрообъект несколько интересующих экспериментатора веществ. При этом введение нескольких веществ можно осуществлять через один общий наноканал, либо путем введения каждого вещества через свой отдельный наноканал.

В предлагаемом техническом решении использование одного либо нескольких дополнительных каналов, содержащих электрохимически активный материал, позволяет в ходе одного эксперимента контролировать введение различных веществ. При этом в предложенном способе в отличие от прототипа можно контролировать концентрацию вводимого в микрообъект вещества, а также контролировать биохимический отклик клетки на вводимое или генерируемое вещество, что повышает степень контроля (информативность контроля) за введением вещества. В зависимости от решаемой экспериментальной задачи для заполнения каналов могут быть использованы различные электрохимически активные материалы. При этом электрохимически активные материалы могут как состоять из одного вещества (углерода, платины, золота и т.д.), так и быть композитными, т.е. состоять из двух и более веществ различной химической природы.

В данном изобретении электрохимически активный материал для заполнения канала в наноканале подбирают таким образом, чтобы при введении вещества в микрообъект на межфазной границе электрохимически активный материал - заполняющий микрообъект раствор происходила электрохимическая реакция. Если вводимое вещество не приводит к электрохимической реакции на электрохимически активном материале, то можно использовать смесь такого вещества с одним или несколькими стандартными электрохимическими медиаторами в известной пропорции.

В предлагаемом изобретении контролируемое введение веществ целесообразно проводить в микрообъекты, расположенные на твердой подложке. Для улучшения адгезии микрообъектов можно проводить дополнительную химическую модификацию поверхности подложки, либо использовать закрепление микрообъектов на подложке физическими методами, например, путем создания гидродинамического потока.

Процесс введения наноканала в микрообъект можно осуществлять механически «в ручном режиме» под контролем соответствующих оптических систем. Также возможно проводить ввод наноканала в микрообъект с помощью автоматизированных инструментальных средств. Например, с помощью системы сканирующего ионного микроскопа можно определять положение исследуемого объекта, а затем с помощью системы трехмерного позиционирования проводить контролируемый ввод наноканала в микрообъект.

В предлагаемом техническом решении детекцию электрохимической реакции можно осуществлять по измерению электрического потенциала и/или силы тока между электродами, один из которых представляет собой электрохимически активный материал, содержащийся, по крайней мере, в одном канале наноканала. При этом другой электрод может располагаться как внутри одного из каналов наноканала, так и быть вынесен в раствор, окружающий микрообъект.

В данном изобретении измерять изменение электрического потенциала и/или силы тока между электродами можно с использованием приборов, традиционно используемых для снятия вольт-амперных характеристик в аналогичных системах. Данные приборы могут быть различных типов и моделей. При этом до введения вещества в микрообъект величина потенциала и/или силы тока может быть как равной нулю, так и иметь какое-либо конкретное экспериментально определяемое значение. Поэтому в предлагаемом способе целесообразно фиксировать именно изменение этих параметров в ходе эксперимента.

В данном техническом решении объем вводимого вещества в микрообъект можно контролировать путем изменения продолжительности введения жидкого вещества и/или величины давления, под действием которого оно вводится, а также путем изменения

величины и/или продолжительности прикладываемого напряжения при вводе вещества за счет электрохимического переноса. В отличие от прототипа данное изобретение также позволяет измерять концентрацию веществ в микрообъектах, что дает возможность осуществлять дополнительный контроль за введением вещества. Введение вещества в микрообъект приводит к электрохимической реакции на электрохимически активном материале, что вызывает изменение величины электрического потенциала и/или силы тока. По величине изменения электрического потенциала и/или силы тока определяют концентрацию контролируемых веществ в микрообъекте. Кроме того, предлагаемый способ позволяет определять объем микрообъектов путем введения вещества с известной массой и последующим определением концентрации этого вещества в микрообъекте.

Преимущества предложенного способа иллюстрируют следующие примеры.

Пример 1

В опыте используют боросиликатный нанокapилляр с внутренним диаметром 30 нм, содержащий два отделенных друг от друга одинаковых по размеру канала. Один канал в нанокapилляре содержит электрохимически активный материал - платину, которая является одним из электродов, другой канал в нанокapилляре пустой. Такой нанокapилляр получают путем предварительного введения платиновой проволоки в один из каналов боросиликатной цилиндрической заготовки с последующим ее вытягиванием с помощью пуллера марки P-2000 Sutter Instrument (США).

Второй канал в нанокapилляре заполняют жидким вводимым генерирующим веществом, в качестве которого используют онкопромоутер 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate, введение которого в клетку приводит к генерации в ней активных форм кислорода. Такие формы кислорода вызывают электрохимическую реакцию на платиновом электроде. В качестве объекта в опыте используют иммобилизованную на стеклянной подложке клетку меланоцита.

Для измерений используют два хлорсеребряных электрода, один из которых приводят в соприкосновение с платиной в широкой стороне капилляра, а другой электрод погружают в окружающий клетку меланоцита натрий-фосфатный буферный раствор. Для измерения вольтамперных характеристик используют устройство MultiClamp700B марки Axon Instruments (США).

Перед введением генерирующего вещества проводят предварительную калибровку платинового электрода в вышеназванном буферном растворе путем введения калибровочного соединения перекиси водорода, являющегося аналогом образующихся в клетке активных форм кислорода. При этом при постоянном напряжении в 200 милливольт (мВ) измеряют зависимость силы тока (0,1-200 пикоампер (пА)) от концентрации перекиси водорода (1-100 микромоль/литр (мкМ)).

Перед вводом нанокapилляра в клетку на электроды подают напряжение величиной 200 мВ. Затем осуществляют ввод нанокapилляра с помощью автоматизированной микроподвижки под оптическим наблюдением, которое проводят с помощью оптического микроскопа марки Olympus (Япония) с помощью объектива модели LUMPLFN 40XW.

После этого онкопромоутер за счет диффузии вводится в клетку и изменяет концентрацию активных форм кислорода в клетке, что сопровождается изменением силы тока между электродами. При этом по ранее полученному калибровочному графику определяют изменение концентрации активных форм кислорода внутри клетки. В любой момент времени введение онкопромоутера может быть приостановлено путем извлечения капилляра из клетки, что позволяет осуществлять контроль за введением

вещества, генерирующего активные формы кислорода в клетке.

Таким образом, в данном опыте фактически определяют отклик (реакцию) клетки на введение онкопромоутера.

Пример 2

5 В опыте используют кварцевый нанокapилляр с внутренним диаметром 60 нм, содержащий 4 отделенных друг от друга канала. Перед экспериментом два канала нанокapилляра заполняют углеродом путем сжигания газообразного бутана при недостатке кислорода. Затем в одном из каналов производят модификацию поверхности углерода со стороны острия нанокapилляра электрохимически активным материалом
10 - иридием путем его электрохимического осаждения в водном растворе основного карбоната иридия, при приложении постоянного потенциала величиной 0,68 вольт. Второй, заполненный углеродом канал, остается не модифицированным.

Для проведения эксперимента используют две пары электродов. Одна из пар содержит электрод, помещенный в один из двух незаполненных углеродом каналов, и электрод,
15 соединенный с модифицированным иридием углеродом. Другая пара состоит из электрода, помещенного в другой незаполненный углеродом канал, и электрода, соединенного с не модифицированным углеродом. Такое устройство нанокapилляра позволяет при его введении в микрообъект генерировать на углеродном не модифицированном электроде ионы гидроксония, являющегося продуктом
20 присоединения протона к молекуле воды, и тем самым менять pH (кислотность) внутри микрообъекта.

Для количественного определения pH внутри объекта с помощью модифицированного иридием углеродного электрода проводят его калибровку в емкости, заполняемой различными водными растворами с известными значениями pH и строят градуировочную
25 прямую зависимости измеряемого напряжения на электродах от величины pH, которая описывается уравнением прямой с наклоном 79 ± 2 мВ/pH.

В опыте в качестве объекта используют клетку сенсорного нейрона, иммобилизованную на кварцевой подложке в натрий-фосфатном буферном растворе.

Ввод нанокapилляра в клетку осуществляют аналогично примеру 1.

30 После введения нанокapилляра в нейрон через пару электродов с не модифицированным углеродом пропускают импульсный электрический ток величиной 20-100 пА, затем после выключения тока измеряют величину электрического потенциала (от -0,4 до 0,4 В) и соответствующую ему силу тока на паре электродов, содержащей модифицированный иридием углерод. Таким образом, удастся осуществлять
35 количественный контроль за генерируемым в ходе эксперимента веществом внутри микрообъекта.

Пример 3

В опыте используют кварцевый нанокapилляр, содержащий три изолированных друг от друга наноканала. Один из каналов предварительно заполняют электрохимически
40 активным материалом - углеродом аналогично примеру 2. Два других канала не содержат углерода.

Перед введением нанокapилляра в исследуемый объект не содержащие углерод каналы заполняют раствором смеси ДНК, выделенной из *E. coli*, с электрохимическим медиатором (ferricyanide) в натрий фосфатном буферном растворе. При этом
45 концентрация ДНК равна 100 нМ, а концентрация электрохимического медиатора составляет 1 миллимоль.

Для проведения эксперимента используют три электрода. Один электрод соединен с углеродом, другой электрод помещен в канал, заполненный раствором смеси ДНК

с электрохимическим медиатором. Третий электрод находится в канале, заполненном вышеописанным буферным раствором, не содержащим ДНК и медиатора, и соединен с каждым из двух ранее описанных электродов.

5 Перед введением смеси в микрообъект проводят предварительную калибровку углеродного электрода в серии растворов, содержащих различные известные концентрации электрохимического медиатора, и на основе полученных данных строят график зависимости силы тока (0-10 пА) от концентрации электрохимического медиатора (0-1 миллимоль). Измерения проводят при напряжении 300 мВ.

10 Введение нанокапилляра в микрообъект, в качестве которого используют микрокаплю натрий-фосфатного буферного раствора в жидком масле, проводят аналогично примеру 1.

Введение смеси ДНК с электрохимическим медиатором осуществляют путем электрохимического переноса вещества при подаче электрического напряжения на электроды, находящиеся в незаполненных углеродом каналах. Затем измеряют величину 15 силы тока между электродом, соединенным с углеродом и электродом, расположенном в канале, первоначально не содержащем смесь ДНК с медиатором. По градуировочному графику определяют концентрации медиатора и осуществляют расчет концентрации ДНК внутри микрокапли. При этом путем изменения величины и продолжительности приложения напряжения к электродам, которые используются для электрохимического 20 переноса вещества, можно изменять концентрацию ДНК в микрокапле, и тем самым осуществлять контролируемое введение вещества в микрообъект.

Пример 4

Опыт проводят аналогично примеру 1, однако в качестве электрохимически активного материала используют золото, и в качестве исследуемого объекта используют 25 клетку нейрона гиппокампа, а в качестве генерирующего вещества используют фермент глюкозооксидазу.

Градуировку золотого электрода проводят аналогично примеру 1.

Введение нанокапилляра в исследуемый микрообъект осуществляют с помощью сканирующего ионного микроскопа, для создания ионного тока используют 30 незаполненный углеродом канал. При этом проводят первичное сканирование поверхности подложки для определения положения и топографии клетки, а затем производят автоматический ввод нанокапилляра с помощью трехмерной системы позиционирования.

Ввод раствора фермента в клетку осуществляют путем прикладывания давления 35 величиной в 1 килопаскаль. Варьируя продолжительность введения, изменяют введенный объем вещества (10-100 фемтолитров).

В опыте также осуществляют контроль за концентрацией перекиси водорода, образующейся в исследуемом микрообъекте под воздействием вводимого фермента. При этом проводят измерение силы тока при постоянном напряжении ($V=400$ мВ, $I=$ 40 $0.01-200$ пА), затем по градуировочному графику определяют соответствующий диапазон концентраций перекиси водорода внутри микрообъекта (100 пикамоль - 100 микромоль).

Пример 5

Опыт проводят аналогично примеру 3, однако в качестве исследуемого объекта используют липосому, образованную бислоем из фосфолипидов, внешний диаметр 45 которой составляет 3 мкм.

В опыте изменяют концентрацию ДНК внутри липосомы и тем самым осуществляют контролируемое введение вещества в микрообъект.

Таким образом, из приведенных примеров видно, что предложенный способ

действительно позволяет повысить степень контроля за введением веществ в микрообъекты за счет определения более информативных параметров.

Формула изобретения

5 Способ контролируемого введения веществ в микрообъекты путем введения в микрообъект нанокapилляра, содержащего не менее двух изолированных друг от друга каналов, с последующим введением вещества, отличающийся тем, что используют нанокapилляр, у которого, по крайней мере, один из каналов содержит электрохимически активный материал и, по крайней мере, один канал содержит вводимое или
10 генерирующее его вещество, а контроль за введением вещества осуществляют путем измерения изменения электрического потенциала и/или силы тока, обусловленных электрохимической реакцией на электрохимически активном материале в результате введения вещества.

15

20

25

30

35

40

45