



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2020.08); G01N 2223/00 (2020.08); G01N 2800/00 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020102930, 24.01.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.01.2020Дата регистрации:
07.10.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.01.2020

(45) Опубликовано: 07.10.2020 Бюл. № 28

Адрес для переписки:

121205, г. Москва, ИЦ "Сколково", ул. Нобеля,
5, оф. 125, Котлов Дмитрий Владимирович

(72) Автор(ы):

Ященко Алексей Михайлович (RU),
Чернышёв Василий Сергеевич (RU),
Рудаковская Полина Григорьевна (RU),
Мердалимова Анастасия Александровна (RU),
Шипунова Виктория Олеговна (RU),
Шульга Алексей Анатольевич (RU),
Деев Сергей Михайлович (RU),
Горин Дмитрий Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Автономная некоммерческая
образовательная организация высшего
образования Сколковский институт науки и
технологий (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: LEE C. et al. SERS analysis of
selectively captured exosomes using an
integrin-specific peptide ligand // J. Raman
Spectrosc., 2017, V.48, pp. 1771-1776. RU
2015132626 A, 25.04.2017. US 20190219578 A1,
18.07.2019. US 10376600 B2, 13.08.2019.
MIRONOVA K.E. et al. Highly Specific Hybrid
Protein DARPIn-mCherry for Fluorescent
Visualization of Cells (см. прод.)(54) НАНО- И МИКРОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ИЗОЛЯЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ
ЭКЗОСОМ И ИХ АНАЛИЗА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биологии и медицине. Раскрыта модифицированная частица для идентификации внеклеточной везикулы, содержащейся в образце биологической жидкости, имеющая сходство к по меньшей мере одному маркеру, присутствующему в составе внеклеточной везикулы, и состоящая из ядра из диоксида кремния, частиц золота, сорбированных на поверхности ядра, и направляющих дарпинов, иммобилизованных на частицах золота, и

имеющих сходство к по меньшей мере одному маркеру, присутствующему в составе внеклеточной везикулы. Также раскрыты применение указанных модифицированных частиц и способ для идентификации внеклеточных везикул. Группа изобретений обеспечивает повышение чувствительности и специфичности детекции экзосомных маркеров. 3 н. и 7 з.п. ф-лы, 6 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

Overexpressing Tumor Marker HER2/neu // Biochemistry, 2014, V.79, pp.1391-1396. TIAN Y.-F. et al. Highly sensitive detection of exosomes by SERS using gold nanostar@Raman reporter@nanoshell structures modified with a bivalent cholesterol-labeled DNA anchor // Analyst, 2018, V.143, pp.4915-4922.

R U 2 7 3 3 8 8 4 C 1

R U 2 7 3 3 8 8 4 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/50 (2020.08); G01N 2223/00 (2020.08); G01N 2800/00 (2020.08)(21)(22) Application: **2020102930, 24.01.2020**(24) Effective date for property rights:
24.01.2020Registration date:
07.10.2020

Priority:

(22) Date of filing: **24.01.2020**(45) Date of publication: **07.10.2020 Bull. № 28**

Mail address:

**121205, g. Moskva, ITS "Skolkovo", ul. Nobelya,
5, of. 125, Kotlov Dmitrij Vladimirovich**

(72) Inventor(s):

**Yashchenok Alexey Mikhailovich (RU),
Chernyshev Vasily Sergeevich (RU),
Rudakovskaya Polina Grigorevna (RU),
Merdalimova Anastasiia Aleksandrovna (RU),
Shipunova Victoria Olegovna (RU),
Schulga Alexey Anatolievich (RU),
Deev Sergey Mikhailovich (RU),
Gorin Dmitry Alexandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Skolkovo Institute of Science and Technology
(RU)**(54) **NANO- AND MICROPARTICLES FOR ISOLATING SPECIFIC SUBPOPULATIONS OF EXOSOMES
AND ANALYSIS THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biology and medicine. Disclosed is a modified particle for identifying an extracellular vesicle contained in a biological fluid sample having an affinity for at least one marker present in the extracellular vesicle, and consisting of a core of silicon dioxide, gold particles sorbed on the surface of the core, and guiding darpins

immobilized on gold particles, and having an affinity for at least one marker present in the extracellular vesicle. Also disclosed are use of said modified particles and a method for identifying extracellular vesicles.

EFFECT: group of inventions provides higher sensitivity and specificity of detecting exosomal markers.

10 cl, 6 dwg, 1 ex

Область техники

Изобретение относится к биологии и медицине, в частности, к методу и устройству для выделения внеклеточных везикул из биологических жидкостей животных и человека, а также идентификации молекул на их поверхности. Изобретение может быть

использовано для различных диагностических и терапевтических целей.

Уровень техники

Различные внеклеточные, окруженные мембраной везикулы, такие как экзосомы (диаметром 50-150 нм), простасомы (диаметром 50-500 нм) и микровезикулы (диаметром 100-1000 нм), выделяются в межклеточное пространство клетками различных тканей и органов в норме и при патологиях. Эти частицы можно обнаружить практически в любых биологических жидкостях, таких как (культуральная) среда для роста культур клеток, плазма крови, моча, синовиальная жидкость, спинномозговая жидкость, и др. Основной физиологической функцией экзосом считается перенос веществ и информации от клетки к клетке. Биохимический состав экзосом сохраняет черты сходства с клеткой-продуцентом, то есть эти везикулы содержат определенные специфические наборы молекул, включающие белки, липиды, метаболиты и нуклеиновые кислоты, характерные для материнских клеток. Неопластическая трансформация сопровождается активацией секреции экзосом, причем опухолевые экзосомы играют значимую роль в развитии заболевания. В настоящее время в многочисленных исследованиях продемонстрирована перспективность разработки методов диагностики различных заболеваний (в частности, онкологических) на основе анализа циркулирующих экзосом (Wan M, Ning B, Spiegel S, Lyon CJ, Hu TY. Tumor-derived exosomes (TDEs): How to avoid the sting in the tail. Med Res Rev. 2020 Jan;40(1):385-412; Lee S, Mankhong S, Kang JH. Extracellular Vesicle as a Source of Alzheimer's Biomarkers: Opportunities and Challenges. Int J Mol Sci. 2019 Apr 8;20(7). pii: E1728), при этом многие методологические аспекты анализа экзосом с целью диагностики нуждаются в дальнейшей проработке. В литературе также описан ряд подходов к диагностике различных заболеваний на основе наночастиц (US 10376600 B2, WO 2019144056 A1, WO 2019126182 A1, US 7371457 B2 и др.).

Несмотря на известность ряда способов диагностики онкологических заболеваний на основе анализа содержимого экзосом, на сегодняшний день на рынке сохраняется потребность в новых, специфичных и эффективных способах.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание нового подхода для анализа циркулирующих экзосом и экзосомальных компонентов с целью создания новых методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний.

Указанная задача решается путем создания модифицированной наночастицы, имеющей сходство к по меньшей мере одному маркеру, присутствующему в составе внеклеточной везикулы, содержащейся в образце биологической жидкости, состоящей из:

(а) ядра диаметром от 100 нм до 1 мкм, состоящего из частиц диэлектрических оксидов, выбранных из списка: оксид кремния, оксид титана, оксид вольфрама, оксид молибдена, или из органической полимерной частицы, состоящей из следующего материала: полистирол или поливинилпирролидон;

(б) наночастиц благородного металла, сорбированных на поверхности ядра;

(в) направляющих дарпинов, иммобилизованных на наночастицах благородного металла, и имеющих сходство к по меньшей мере одному маркеру, присутствующему в составе внеклеточной везикулы, содержащейся в образце биологической жидкости.

В некоторых вариантах изобретения модифицированная наночастица характеризуется

тем, что биологическая жидкость представляет собой кровь, плазму крови, сыворотку крови, слюну или мочу, и внеклеточной везикулой является экзосома.

В некоторых вариантах изобретения модифицированная наночастица характеризуется тем, что благородным металлом является золото или серебро, и ядро состоит из частиц диоксида кремния.

В некоторых вариантах изобретения модифицированная наночастица характеризуется тем, что ее размер находится в диапазоне от 100 нм до 350 нм.

В некоторых вариантах изобретения модифицированная наночастица характеризуется тем, что направляющие дарпины, иммобилизованные на наночастицах, имеют сродство к HER2 или EpCAM рецепторам.

В некоторых вариантах изобретения модифицированная наночастица характеризуется тем, что направляющие дарпины имеют последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине последовательности SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах изобретения модифицированная наночастица характеризуется тем, что направляющие дарпины, иммобилизованные на наночастицах, имеют сродство к двум различным маркерам, присутствующим в составе внеклеточной везикулы.

Указанная задача также решается путем применения указанных выше модифицированных наночастиц для идентификации внеклеточных везикул, содержащих по меньшей мере один специфичный маркер, в образце биологической жидкости.

Указанная задача также решается путем создания способа идентификации внеклеточных везикул, содержащих по меньшей мере один специфичный маркер, в образце биологической жидкости, включающего следующие стадии: (а) получают образец биологической жидкости; (б) осуществляют контакт указанного образца с модифицированной наночастицей по п. 1 таким образом, чтобы направляющие дарпины модифицированной наночастицы связались с по меньшей мере одним специфичным маркером, содержащимся во внеклеточной везикуле, образуя комплекс наночастица-везикула; (в) отделяют комплекс наночастица-везикула от несвязавшихся везикул и модифицированных наночастиц; (г) детектируют отделенный комплекс наночастица-везикула. Данный способ основан на выделении фракции патологических экзосом из общего популяции наноразмерных везикул, циркулирующих в биологических жидкостях.

В некоторых вариантах изобретения данный способ характеризуется тем, что дополнительно осуществляют контакт отделенного комплекса наночастица-везикула со второй модифицированной наночастицей по п. 1, отличающейся тем, что она содержит направляющие дарпины, обладающие сродством к другому специфичному маркеру, содержащемуся во внеклеточной везикуле.

В некоторых вариантах изобретения данный способ характеризуется тем, что детекцию отделенного комплекса наночастица-везикула осуществляют одним или несколькими методами, выбранными из: детекция флюоресценции, детекция поверхностно усиленного рамановского рассеяния (SERS), детекция оптоакустического сигнала.

В некоторых вариантах изобретения данный способ характеризуется тем, что детекцию отделенного комплекса наночастица-везикула осуществляют одновременно или последовательно при помощи детекции флюоресценции и при помощи детекции поверхностно усиленного рамановского рассеяния (SERS).

В некоторых вариантах изобретения исходной биологической жидкостью, из которой выделяются везикулы, является любая другая биологическая жидкость, выбранная из следующего списка: плазма или сыворотка крови, моча, синовиальная жидкость, спинномозговая жидкость, слюна, слеза, семенная жидкость, молоко. Также, везикулы

могут быть выделены из культуральной среды, используемой для роста клеток *in vitro*. В предпочтительных вариантах изобретения биологической жидкостью, из которой выделяются внеклеточные везикулы, является плазма или сыворотка крови.

В предпочтительных вариантах изобретения описываемый способ выделения
5 внеклеточных везикул может быть использован в процессе диагностики, прогнозирования развития или определения риска развития заболевания у субъекта. В некоторых вариантах изобретения медицинские показания для применения указанного способа выбирают из заболеваний кровеносной системы или онкологических заболеваний, например, злокачественных заболеваний кроветворной системы,
10 предстательной железы, рака яичника или других органов и тканей.

Техническим результатом настоящего изобретения является повышение чувствительности и специфичности детекции экзосомных маркеров.

Краткое описание рисунков

Фиг. 1. Общая структурная организация наночастицы и пример детекции ее
15 взаимодействия с экзосомой: 1 - Основа нано- или микрочастиц (оксид кремния, оксид титана, оксид вольфрама, оксид молибдена и т.д.), 2 - Наночастицы золота, 3 - Специфичные направляющие молекулы (антитела или дарпины/DARPin), 4 – экзосомы, взаимодействующие с направляющими молекулами, 5 – вторичные антитела с флуоресцентной меткой, специфичные к мембранному рецептору экзосом CD9, для
20 верификации специфичного взаимодействия экзосом с наночастицами методом флуоресценции.

Фиг. 2. Гель-электрофорез в полиакриламидном геле по Леммли (SDS-PAGE) образца дарпина (HE)3-EC1 в восстанавливающих условиях.

Фиг. 3. (А) Иллюстрация наночастицы: 1 - Основа наночастиц (оксид кремния, оксид
25 титана, оксид вольфрама, оксид молибдена и т.д.), 2 - Наночастицы золота, 3 - Специфичные направляющие молекулы (антитела или дарпины/DARPin);

(Б) Для примера представлено изображение, полученное сканирующим электронным микроскопом, частиц, состоящих из диоксида кремния, покрытого золотыми наночастицами и направляющими молекулами в виде дарпинов.

Фиг. 4. Результаты испытания специфичности разработанных частиц с анти-ЕрСАМ дарпинами с FITC меткой к клеткам MCF-7, SKOV3 и CHO, содержащим мембранные белки ЕрСАМ.
30

(А) Микроскопия в светлом поле клеток клеточной линии MCF-7;

(Б) Флуоресцентная микроскопия клеточной линии MCF-7 с использованием фильтра
35 FITC для определения клеток, на которых присутствуют частицы с антителом ЕрСАМ с FITC меткой;

(В) Наложенные изображения, полученные в светлом поле и флуоресцентном режиме. Красным обведены локации на клетках, где присутствуют разработанные частицы;

(Г) Результаты проточной цитометрии, которые предоставляют относительное
40 количество ЕрСАМ на клетках MCF-7, SKOV3 и CHO;

(Д) % клеток, на которых были обнаружены частицы с анти-ЕрСАМ ДАРПином.

Фиг. 5. Результаты флуоресцентного (Dot Blot) испытания специфичности частиц, содержащих анти-HER2 специфичные ДАРПины к экзосомам, полученным от клеточной линии SKOV3, обладающей повышенной экспрессией белка HER2.

(А) Фильтр FITC; (Б) Фильтр AF750:
45

1 - SiO₂ (1:10) + Skov3Kat + CD9AF750;

2 - SiO₂ (1:3) + Skov3Kat + CD9AF750;

3 - SiO₂ + Skov3Kat + CD9AF750;

4 - SiO₂/DARPinFITC (1:10) + Skov3Kat + CD9AF750;

5 - SiO₂/DARPinFITC (1:3) + Skov3Kat + CD9AF750;

6 - SiO₂/DARPinFITC + Skov3Kat + CD9AF750;

7 – Супернатант, полученный после осаждения центрифугированием SiO₂ + Skov3Kat и добавления к этому супернатанту CD9AF750; таким образом, состоящий из Skov3Kat + CD9AF750;

8 – Супернатант, полученный после осаждения центрифугированием SiO₂ + Skov3Kat + CD9AF750; таким образом, состоящий из CD9AF750.

(В) Изображение, полученное сканирующим электронным микроскопом. На изображении видны частицы диоксида кремния, локально покрытые золотыми нанокубами, которые, в свою очередь, функционализированы направляющими молекулами (ДАРПин) к мембранным белкам экзосом ЕрСАН (1); на поверхности частиц также видны экзосомы клеточной линии SKOV3, образовавшие иммунокомплекс с направляющими молекулами (2).

Фиг. 6. РСА гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) демонстрирует различия в спектрах комбинационного рассеяния для:

(А) Частиц золота (AuNP, Nanoparticles) без дарпинов (желтый маленький круг) и с дарпинами (большой фиолетовый овал);

(Б) Сфер диоксида кремния, полностью покрытых частицами золота (SiO₂+AuNSh, Nanoshell) без дарпинов (голубой овал слева) и с дарпинами (зеленый овал справа).

Подробное раскрытие изобретения

В описании данного изобретения термины «включает» и «включающий» интерпретируются как означающие «включает, помимо всего прочего». Указанные термины не предназначены для того, чтобы их истолковывали как «состоит только из». Если не определено отдельно, технические и научные термины в данной заявке имеют стандартные значения, общепринятые в научной и технической литературе. Сродством, или аффинностью, лиганда к белку-мишени (например, рецептору), называется сила связывания лиганда с белком-мишенью. Сила связывания лиганда с белком-мишенью определяется не только силой прямых взаимодействий лиганда с данным белком (например, рецептором), но и микроокружением белковой молекулы. В результате связывания направляющей молекулы частиц с маркером, присутствующем в составе внеклеточной везикулы, образуется комплекс частица-везикула. Маркером может служить как поверхностная молекула (например, мембранный рецептор), так и молекула, находящаяся внутри везикулы, и которая может экспонироваться при частичном лизисе везикулы. Маркером может быть белковая молекула, так и биомолекула небелковой природы, ассоциированная с каким-либо заболеванием, например, ганглиозид, ассоциированный с экзосомами. Благородными металлами являются золото, серебро, а также платина и остальные 5 металлов платиновой группы — рутений, родий, палладий, осмий, иридий.

Одной из задач настоящего изобретения является разработка диагностических подходов на основе анализа содержимого внеклеточных везикул (преимущественно, экзосом), существующих в биологических жидкостях субъекта, и выделяемых, например, клетками опухоли, при помощи биосенсора, состоящего из субмикронных частиц (предпочтительно, из диоксида кремния, SiO₂), поверхностно модифицированных частицами благородных металлов (золото, серебро), к которым прикреплены распознающие молекулы. Распознающие молекулы специфически связывают рецепторы на поверхности экзосом. Примерами распознающих молекул являются антитела или их антиген-распознающие фрагменты, или дарпины (DARPin - designed ankyrin repeat

proteins).

В настоящее время, антитела или их антиген-распознающие фрагменты являются стандартным подходом для распознавания биомолекул в диагностических целях. Однако в предпочтительных вариантах данного изобретения для распознавания рецепторов на внеклеточных везикулах использовались специфические дарпины, которые обладают рядом необходимых функциональных свойств, опережая фрагменты антител по таким показателям как стабильность, простота производства и специфичность.

Дарпины представляют собой класс неиммуноглобулиновых белков, которые имеют небольшой размер и очень высокую стабильность за счет своей структуры (Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;55:489-511). Дарпины состоят из плотно упакованных повторов, состоящих обычно из 33 аминокислотных остатков. Каждый повтор образует структурную единицу, состоящую из β -поворота (β -turn), за которым следуют две антипараллельные α -спирали; при этом белок может состоять из 3-10 повторов, включая 2 повтора с обоих краев, обладающих гидрофильной поверхностью и придающих стабильность всему белку. Специфичность дарпинов к конкретному лиганду на поверхности частицы может быть селектирована при помощи мутагенеза и методов, известных специалистам, таких как рибосомный или фаговый дисплей (Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPs): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;55:489-511), при этом специфичность дарпинов может достигать больших значений, чем стандартная для антител. Например, были отселектированы дарпины, которые специфически связываются с рецептором 2 человеческого эпидермального фактора роста (HER2), сверхэкспрессируемым при раке молочной железы и раке яичников (Jost, C., et al., (2013) Structural Basis for Eliciting a Cytotoxic Effect in HER2-Overexpressing Cancer Cells Via Binding to the Extracellular Domain of HER2. *Structure* 21, 1979–1991). Также, была продемонстрирована возможность связывания дарпинов с 5 нм наночастицами золота без потери их функциональных свойств; при этом такие конъюгаты эффективно взаимодействовали с клетками, содержащими распознающие рецепторы (Deyev S, et al., Synthesis, Characterization, and Selective Delivery of DARPin-Gold Nanoparticle Conjugates to Cancer Cells. *Bioconjug Chem.* 2017 Oct 18;28(10):2569-2574). Также существует возможность генерировать специфические дарпины в мультиспецифическом формате, соединяя несколько распознающих дарпинов вместе в одной структуре. Благодаря своей структуре (внутренние гидрофобные повторы фланкированы гидрофильными повторами, вместе образуя структуру типа «соленоид»), дарпины показывают высокую термодинамическую стабильность против разворачивания, вызванного нагреванием или химическими агентами, и стабильны в водных растворах в течение продолжительного времени в высоких концентрациях (> 100 мг/мл). Это выгодно отличает их от фрагментов антител, которые имеют склонность к агрегации. Далее, дарпины могут экспрессироваться с очень высоким выходом в растворимой форме в цитоплазме *E. coli*, составляя до 30% общего клеточного белка (до 10-20 г на литр жидкой культуры в ферментере, см. <http://www.molecularpartners.com>). Таким образом, производство дарпинов является простой и отлаженной процедурой, известной специалистам.

В настоящем изобретении в состав биосенсора входят субмикронные частицы следующей структуры. Основа (ядро) частиц – неорганическая (например, диоксид кремния) или органические полимеры (например, полистирол, поливинилпирролидон). Также, помимо оксида кремния, в качестве основы могут быть использованы другие

диэлектрические оксиды (оксид титана, оксид вольфрама, оксид молибдена и др.; а также оксиды переходных металлов, таких как железо, марганец, кобальт и т.п.). В предпочтительном варианте, в качестве основы могут использоваться частицы диоксида кремния диаметром от 100 нм до 1 мкм. На первой стадии производства наночастиц происходит модификация поверхности диоксида кремния (частицы 300 нм) бифункциональными лигандами, например, использовался 3-меркаптопропилтриметоксисилан (бифункциональный лиганд, имеющий структуру: «функциональная группа 1 – линкер – функциональная группа 2»). С одной стороны лиганда расположена триметоксисилановая группа, которая при гидролизе связывается с поверхностью диоксида кремния, образуя прочные связи Si-O-Si. С другой стороны лиганда расположена функциональная группа для дальнейшей модификации (сорбции наночастиц золота или серебра) – амино- группа или тио- группа (также может использоваться карбоксильная, азидо- и другие группы). В качестве линкера может быть использован углеводородный фрагмент из трех атомов углерода (пропил). Линкер между двумя функциональными группами может быть различной природы, как углеводородный – различной длины, так и гидрофильный – полимерный (как, например, полиэтиленгликольный фрагмент). В качестве альтернативы бифункциональному лиганду могут использоваться полиэлектролитные слои. В этом случае происходит электростатическая сорбция полиэлектролитных слоев на поверхность основы, а золото сорбируется за счет электростатики на поверхность внешнего полиэлектролитного слоя с функциональными группами (карбокси- или амино-).

Следующий этап сборки наночастиц для биосенсора – сорбция наночастиц золота или серебра на поверхности наночастиц основы (в предпочтительном варианте, на поверхности диоксида кремния). Взаимодействие наночастиц золота с поверхностью происходит за счет либо ковалентного взаимодействия (S-Au) или за счет электростатического взаимодействия (бифункциональные лиганды с амино, карбокси-группами или функциональные группы полиэлектролита (амино-, карбокси-) - наночастицы золота). Наночастицы золота могут быть стабилизированы различными лигандами – цитрат ионы, цетилтриэтиламмонийбромид, аскорбат ионы и др. Наночастицы золота могут быть различного диаметра от 2 нм (зародыши) до 100 нм, а также иметь различную морфологию (стержни, сферы, кубики).

Далее, сферы диоксида кремния с адсорбированными наночастицами золота можно использовать напрямую или наращивать поверхность диоксида кремния золотом для получения максимально заполненной поверхности. Для увеличения концентрации наночастиц золота на поверхности основы применяется метод неэлектролитического восстановления золота. К суспензии частиц диоксида кремния добавляют раствор золотохлористоводородной кислоты в присутствии карбоната калия и последовательно добавляют восстановитель и стабилизатор. В качестве восстановителя используют гидрохинон, но также могут использоваться другие восстановители (формальдегид, лимонная кислота, аскорбиновая кислота, боргидрид натрия, литий алюмогидрид и т.п.). Непосредственно после восстановления (либо после сорбции) к суспензии добавляют стабилизатор содержащий меркапто группы для ковалентного связывания с поверхностью золота (например, 1-меркапто-ω-карбокси-полиэтиленгликоль).

Заключительный этап синтеза активных частиц для биосенсора – иммобилизация специфичных направляющих молекул (антител или дарпинов) к наночастицам золота. Иммобилизация может происходить двумя способами: 1) используя направляющие молекулы с серосодержащей группой в структуре, в этом случае антитела или дарпины взаимодействуют с поверхностью золота посредством связывания серы с золотом; 2)

используя метод карбодиимидного синтеза. В этом случае, сначала с поверхностью золота связывают лиганд, содержащий карбокси-группу и тио-группу. Затем карбокси-группу активируют при помощи 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и получают эфир N-гидроксисукцинимид, затем вводят в реакцию с антителом (или дарпином) с образованием амидной связи. В предпочтительном варианте в качестве направляющих молекул используются дарпины (генетически сконструированные белки-миметики антител, проявляющие высокоспецифичное и высокоаффинное связывание целевого белка), специфичные к HER2 и EpCAM рецепторам.

Метод детекции экзосомных маркеров при помощи получаемых наночастиц может быть реализован различными способами. После связывания специфического направляющего дарпина с маркером на экзосоме, комплекс наночастица-экзосома может быть отделен от несвязанных наночастиц и экзосом при помощи микрофлюидного устройства. Выделение несвязанных наночастиц и экзосом в микрофлюидном устройстве может происходить путем разделения на фракции в зависимости от размеров, за счет взаимодействия наночастиц с вискоэластичным потоком жидкости в микроканале или прохождением наночастиц через апертуру малого размера. Кроме того, выделение несвязанных наночастиц и экзосом может происходить путем использования особенностей движения наночастиц в массиве микростолбиков или самоорганизующиеся массивы наночастиц - метод детерминированного бокового сдвига. Различные методы разделения экзосом известны специалистам (см., например, Yang F, Liao X, Tian Y, Li G. Exosome separation using microfluidic systems: size-based, immunoaffinity-based and dynamic methodologies. *Biotechnol J.* 2017 Apr;12(4)). Те же методы могут быть использованы для отделения комплексов наночастица-везикула от несвязавшихся везикул и несвязавшихся модифицированных наночастиц.

Дальнейшую детекцию связавшейся везикулы/экзосомы можно проводить при помощи специфичных антител, содержащих флюоресцентную метку (Фиг. 1), либо другими способами, раскрытыми ниже (например, при помощи SERS). Для повышения специфичности распознавания опухоль-ассоциированной экзосомы в процессе детекции могут быть применены несколько различных наночастиц, содержащих специфические дарпины к разным опухоль-ассоциированным белкам, предположительно присутствующим в составе экзосомы. Такие наночастицы могут применяться как одновременно, так и последовательно, независимо друг от друга. Например, сперва инкубируют биологическую жидкость, содержащую экзосомы, с первым видом наночастиц, несущих специфические дарпины к первому онкогену; затем, комплексы наночастица-экзосома отделяют, и инкубируют со вторым видом наночастиц, несущих специфические дарпины ко второму онкогену. При получении положительного сигнала связывания как с первыми, так и со вторыми наночастицами, делается вывод о наличии опухоль-ассоциированных экзосом в тестируемой биологической жидкости.

Существенным параметром используемых в изобретении частиц является их размер - от 100 нм до 500 нм, сопоставимый с размером экзосом (диаметр 50-150 нм). Более крупные частицы обладают малой подвижностью, склонностью к спонтанной седиментации, что существенно уменьшает эффективность связывания с экзосомами. Более мелкие частицы могут иметь пониженную коллоидную стабильность (склонность образовывать агрегаты); также, связывание более мелких частиц с экзосомой приведёт к затруднению или невозможности их отделения от других экзосом (размер комплекса наночастица-экзосома не будет существенно отличаться от размера внеклеточных, везикул, присутствующих в растворе).

Описанная выше предпочтительная структура частиц для биосенсора (основа (SiO₂))

-Au-дарпины) обладает рядом преимуществ по сравнению с аналогами. Основными преимуществами являются: 1) возможность детекции экзосомных маркеров различными методами, в том числе их комбинациями (с помощью детекции флюоресценции, поверхностно усиленного рамановского рассеяния (SERS) и методом оптоакустики); 2) хорошая коллоидная стабильность частиц в буферных растворах (pH от 5,5 до 8,5) за счет свойств дарпинов; 3) возможность эффективного связывания с экзосомами, а также эффективного разделения комплексов частиц с экзосомами (за счет выбранного размера частиц - от 100 нм до 500 нм) с помощью микрофлюидных технологий; 4) возможность настраивать плазмонный резонанс (оптическое поглощение) биосенсоров в диапазоне от 520 нм до 1000 нм; 5) возможность использования широкого набора материалов основы биосенсора, а также наночастиц золота различного размера и морфологии в зависимости от задач применения; 6) возможность иммобилизации дарпинов на поверхность биосенсора, имеющих сродство к нескольким маркерам, присутствующих в составе внеклеточной везикулы.

Поверхностно усиленное рамановское (также обозначается как комбинационное) рассеяние (SERS) является спектроскопическим способом, который использует явление усиления интенсивности рамановского рассеяния при взаимодействии фотонов с шероховатой поверхностью металлической наноструктуры (увеличение до 10^6 - 10^8 раз). В результате рамановского (или комбинационного) рассеяния, часть падающих фотонов взаимодействует с молекулами вещества таким образом, что высвобождается энергия, или электроны возбуждаются до более высоких энергетических уровней, так что рассеянные фотоны обладают частотой, отличной от частоты у падающих фотонов (неупругое рассеяние оптического излучения). Частоты спектра рамановского рассеяния указывают на химические составы и структурные свойства поглощающих свет молекул в образце, таким образом, рамановскую спектроскопию успешно используют для высокочувствительного детектирования вещества.

Используемые металлические наночастицы демонстрируют локализованный плазмонный резонанс в ответ на падающее лазерное излучение вследствие коллективного возбуждения электронов проводимости в металле, осциллирующих вблизи поверхности наночастицы. Молекулы, локализованные вблизи этих частиц, оказываются в электрическом поле, являющегося суперпозицией падающего поля и поля диполя, наведенного в металлической частице, и вследствие этого обнаруживают гораздо большую чувствительность к рамановской спектроскопии.

Рамановская спектроскопия обладает преимуществами перед другими способами детекции (такими как инфракрасная спектроскопия), поскольку позволяет получить информацию о колебательных модах, исследуемых молекул в результате взаимодействия с поляризующимся электронным облаком исследуемой молекулы (вещества). Колебания, при которых не происходит нарушение симметрии химической связи, наиболее интенсивно проявляются в рамановских спектрах. Таким образом, записывая рамановские спектры можно довольно точно идентифицировать определенное вещество, в том числе и одиночную молекулу по специфическому колебанию химических связей, характерных для данного вещества или молекулы.

В данном изобретении нанооболочка из частиц золота или серебра наносится на поверхность неорганического ядра (диоксид кремния) для обеспечения усиленного рамановского рассеяния. Наночастицы золота или серебра могут быть приблизительно сферическими, но также могут иметь неправильную форму или какой-либо другой вид формы. Размер частиц предпочтительно составляет от 3 нм до 25 нм. При диаметре частиц менее 10 нм эффект SERS-усиления снижается.

Нижеследующие примеры осуществления способа приведены в целях раскрытия характеристик настоящего изобретения и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

Методика получения частиц

Модификация частиц диоксида кремния золотыми зародышами

0,5 мл тиол-модифицированных частиц диоксида кремния (2% по массе, 300 нм диаметром) были растворены в 4,5 мл ультрачистой воды (MilliQ system, удельное сопротивление 18 МОм см). Затем 5 мл золотых зародышей со средним размером 3 нм были добавлены к 5 мл водного раствора частиц диоксида кремния путем выкапывания при постоянном перемешивании раствора либо в ультразвуковой ванне, или на магнитной мешалке. Далее раствор оставляли при постоянном перемешивании на 12 часов. Далее следовала многократная промывка (3 раза) частиц диоксида кремния от непрореагировавших золотых зародышей с помощью центрифугирования (4000 обр/мин, 5 мин). После промывки объем модифицированных золотыми зародышами частиц диоксида кремния был доведен до 0,5 мл ультрачистой водой.

Неэлектролитическое восстановление золота на модифицированных золотыми зародышами частицах диоксида кремния

Для неэлектролитического восстановления был приготовлен раствор для восстановления: 100 мг K_2CO_3 был растворен в 94 мл ультрачистой воды, затем 6 мл 25 мМ водного раствора тетрахлороаурат(III) водорода ($HAuCl_4$) было добавлено. Раствор перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 минут. Далее к 2 мл раствора для восстановления было добавлено 2 мл ультрачистой воды, после чего к этому раствору было добавлено 0,05 мл модифицированных золотыми зародышами частиц диоксида кремния. Затем для инициации роста золота были последовательно добавлены 0,045 мл 2 мМ нитрат серебра ($AgNO_3$) и 0,1 мл 30 мМ гидрохинона. Немедленно после добавления восстановителя происходит рост золота на поверхности частиц, в результате которого происходит изменение цвета раствора с бесцветного на серо-сине-зеленый. После 10 секунд перемешивания к раствору был добавлен 0,1 мл (1 мг/мл) водного раствора смеси 1-меркапто-ω-карбокси-полиэтиленгликоль/1-меркапто-полиэтиленгликоль (5:1). После чего раствор встряхивался на вертикальном встряхивателе в течение 5 минут. Далее полученные частицы промывали от продуктов реакции несколько раз ультрачистой водой путем центрифугирования (4000 обр/мин, 5 мин). Для иммобилизации направляющих молекул на модифицированные золотом частицы кремния, вода заменялась на раствор фосфатного буфера (0,1 мМ, pH 7.4).

Иммобилизация направляющих молекул на модифицированные золотом частицы диоксида кремния

Для демонстрации осуществления изобретения в качестве направляющей молекулы был выбран дарпин (HE)3-EC1, специфичный к рецептору EpCam (полученный и охарактеризованный в Deyev SM, et al., Effect of a radiolabel biochemical nature on tumor-targeting properties of EpCAM-binding engineered scaffold protein DARPIn Ec1. Int J Biol Macromol. 2019 Dec 18), имеющий следующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1: SHEHEHEGSDLGKKLLEAARAGQDDEVRIIVANGADVNAAYFGTTPLHLAAAHGRLEIVEVLLKNGADVNAQDVWGITPLHLAAYNGHLEIVEVLLKYGADVNAHDTRGWTPLHLAAYNGHLEIVEVLLKNVADVNAQDRSGKTPFDLAIDNGNEDIAEVLQKA AKLN

В других вариантах изобретения могут быть использованы другие дарпины, антитела или их антиген-распознающие фрагменты, специфичные к различным структурам,

присутствующих в экзосомах.

Методика получения дарпина: Бактериальная индуцируемая экспрессия рекомбинантного гена; штамм хозяина: *E coli* В штамм BL21(DE3). Дарпин был эксперссирован в клетках *E coli* и очищен из клеточного лизата при помощи последовательных металлохелатной аффинной и ионнообменной хроматографий. Степень очистки дарпина составила более 98% в соответствии с данными электрофореза в 15% денатурирующем ПААГ в восстанавливающих условиях (Фиг. 2).

Для синтеза частиц использовали раствор дарпина в концентрации 4,0 мг/мл в буфере 20 mM NaPi, pH 7.4, без видимых примесей. Физико-химические параметры: расчетная молекулярная масса 17980,11 Да; оптическая плотность раствора белка с концентрацией 1 г/л составляет 0,85; расчетная величина изоэлектрической точки 4,89.

Для иммобилизации направляющих молекул (в предпочтительном варианте - дарпинов) на модифицированные золотом частицы диоксида кремния был использован метод карбодиимидного синтеза. Для этого вначале были активированы карбоксильные группы 1-меркапто-ω-карбокси-полиэтиленгликоля добавлением к суспензии частиц 0,1 мл 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (50 мл/мл в фосфатном буфере, pH 7.4), и встряхивались в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее к этому же раствору добавляли 0,1 мл N-Гидроксисукцинимид (50 мл/мл в фосфатном буфере, pH 7.4) и встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре. После этого 0,05 мл раствора дарпина, специфичного к рецептору ErCam (4 мг/мл в фосфатном буфере, pH 7.4) было добавлено к частицам, и вся смесь встряхивалась в течение 12 часов при комнатной температуре. После этого частицы несколько раз промывались в фосфатном буфере путем центрифугирования (4000 обр/мин, 5 мин). Для верификации иммобилизации дарпинов на поверхность модифицированных золотом частиц диоксида кремния проводили маркирование дарпинов флуоресцентным красителем (изотиоцианат флуоресцеина).

Флуоресцентный дот-блоттинг анализ

Для верификации взаимодействия экзосом с направляющими молекулами на поверхности модифицированных золотом частиц диоксида кремния использовали модифицированный метод дот-блоттинга. Частицы диоксида кремния, модифицированные золотом и флуоресцентно-меченными дарпином инкубировали с экзосомами, выделенных из клеточных линий (рака яичника - SKOV3) при 4 ° C в течение ночи с последующим трехстадийным центрифугированием при 4000 обр/мин, 5 минут. Осадок ресуспендировали в 0,03 мл фосфатного буфера. Далее 0,002 мл выкапывали на нитроцеллюлозную мембрану (или кварцевое стекло) для измерения флуоресценции с использованием системы флуоресцентной томографии (IVIS SpectrumCT In Vivo Imaging System). Для выявления экзосомных антител против CD9 человека применяли вторичные антитела (анти-CD9AlexaFluor750).

SERS измерения

SERS спектры экзосом были записаны на частицах диоксида кремния, модифицированных золотом и дарпинами с использованием Рамановского микроспектрометра компании Jobin-Yvon LabRam HR800 (HORIBA, Япония) на длинах волн лазера 633 нм и 785 нм. SERS спектры были записаны для образцов, которые ранее верифицировались методом флуоресцентного дот-блоттинга, а также на кварцевой подложке выкапыванием соответствующей аликвоты на кварцевую подложку. Спектральный фон был удален с помощью инструмента BEADS Matlab. Для выявления пиков экзосом в SERS спектрах был применен анализ основных компонентов (PCA анализ). С помощью PCA анализа было выявлено различия в значения спектральных

интенсивностей элементов от разных групп. Отображение каждого спектра комбинационного рассеяния было построено в виде точки на 2D графиках. РСА анализ был также применен для дифференциации соотношения экзосомы/частицы на кварцевой подложке.

5 Характеризация разработанных частиц

На Фиг. 3А представлено изображение получаемых наночастиц. 1 - Основа наночастиц (оксид кремния, оксид титана, оксид вольфрама, оксид молибдена и т.д.), 2 - Наночастицы золота, 3 - Специфичные направляющие молекулы (антитела или дарпины/DARPin). На Фиг. 3Б для примера представлено изображение, полученное сканирующим электронным микроскопом, частиц, состоящих из диоксида кремния, покрытого золотыми наночастицами и направляющими молекулами в виде дарпинов. Представленный в настоящем описании метод позволяет синтезировать нано- и микрочастицы, полностью покрытые золотом и содержащие на поверхности направляющие молекулы.

15 Результаты испытания специфичности разработанных частиц с анти-ЕрСАМ дарпинами с FITC меткой к клеткам MCF-7, SKOV3 и СНО, содержащим мембранные белки ЕрСАМ, представлены на Фиг. 4 и в подписи к Фиг. 4.

Клетки MCF-7, которые имеют наибольшее количество мембранного белка ЕрСАМ исходя из результатов цитометрии, также показали наибольшее количество мембранного белка ЕрСАМ при использовании разработанных частиц, что показывает специфичность данных частиц.

На Фиг. 5 представлены результаты флуоресцентного (Dot Blot) испытания специфичности частиц, содержащих анти-HER2 специфичные дарпины к экзосомам, полученным от клеточной линии SKOV3, обладающей оверэкспрессией белка HER2. На Фиг. 5В представлено изображение, полученное сканирующим электронным микроскопом. На изображении видны частицы диоксида кремния, локально покрытые золотыми нанокубами, которые, в свою очередь, функционализированы направляющими молекулами (дарпинами) к мембранным белкам экзосом ЕрСАМ (1); на поверхности частиц также видны экзосомы клеточной линии SKOV3, образовавшие иммуннокомплекс с направляющими молекулами (2).

В этом эксперименте сферы с золотыми частицами были взяты в разных концентрациях относительно экзосом. Точки 4,5,6 на фильтре FITC показывают, что дарпин с красителем FITC присутствует на поверхности золотых частиц. Точки 1-3 и 8 на фильтре AF750 показывают наличие антител к CD9 в отсутствие специфического взаимодействия между экзосомами и золотыми частицами (посредством дарпинов), что может означать сорбцию анти-CD9 как на экзосомы, севшие, в свою очередь, на золотые частицы без модификации их поверхности дарпинами, так и сорбцию анти-CD9 напрямую на золотые частицы (неспецифическое взаимодействие).

На Фиг. 6 представлены результаты РСА гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), которые демонстрируют различия в спектрах комбинационного рассеяния для: (А) Частиц золота (AuNP, Nanoparticles) без дарпинов (желтый маленький круг) и с дарпинами (большой фиолетовый овал); (Б) Сфер диоксида кремния, полностью покрытых частицами золота (SiO₂+AuNSh, Nanoshell) без дарпинов (голубой овал слева) и с дарпинами (зеленый овал справа). Таким образом, ГКР позволяет детектировать посадку дарпинов на золотые частицы. Однако, чем сложнее система, т.е. при добавлении сфер в качестве ядер, качество идентификации ухудшается.

Несмотря на то, что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные

подробно описанные случаи приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

5 ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования Скол

<120> Нано- и микрочастицы для изоляции специфических субпопуляций экзосом и их анализ

<130> 1

<160> 1

10 <210> 1

<211> 167

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

15 <223> дарпин

<400> 1

Ser His Glu His Glu His Glu Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu

1 5 10 15

Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Val Ala

20 20 25 30

Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Tyr Phe Gly Thr Thr Pro Leu His Leu

35 40 45

Ala Ala Ala His Gly Arg Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn

50 55 60

25 Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Val Trp Gly Ile Thr Pro Leu His

65 70 75 80

Leu Ala Ala Tyr Asn Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys

85 90 95

Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala His Asp Thr Arg Gly Trp Thr Pro Leu

30 100 105 110

His Leu Ala Ala Ile Asn Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu

115 120 125

Lys Asn Val Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Arg Ser Gly Lys Thr Pro

130 135 140

35 Phe Asp Leu Ala Ile Asp Asn Gly Asn Glu Asp Ile Ala Glu Val Leu

145 150 155 160

Gln Lys Ala Ala Lys Leu Asn

165

40 (57) Формула изобретения

1. Модифицированная частица для идентификации внеклеточной везикулы, содержащейся в образце биологической жидкости, имеющая сродство к по меньшей мере одному маркеру, присутствующему в составе внеклеточной везикулы, и состоящая из:

45 (а) ядра диаметром от 100 нм до 1 мкм, состоящего из частиц диоксида кремния;

(б) частиц благородного металла, сорбированных на поверхности ядра, где благородным металлом является золото;

(в) направляющих дарпинов, иммобилизованных на частицах благородного металла,

и имеющих сродство к по меньшей мере одному маркеру, присутствующему в составе внеклеточной везикулы, содержащейся в образце биологической жидкости.

2. Модифицированная частица по п. 1, характеризующаяся тем, что биологическая жидкость представляет собой кровь, плазму крови, сыворотку крови, слюну или мочу, и внеклеточной везикулой является экзосома.

3. Модифицированная частица по п. 2, характеризующаяся тем, что направляющие дарпины, иммобилизованные на частицах, имеют сродство к HER2 или EpCAM рецепторам.

4. Модифицированная частица по п. 3, характеризующаяся тем, что направляющие дарпины имеют последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную по всей длине последовательности SEQ ID NO: 1.

5. Модифицированная частица по п. 1, характеризующаяся тем, что направляющие дарпины, иммобилизованные на частицах, имеют сродство к двум различным маркерам, присутствующим в составе внеклеточной везикулы.

6. Применение модифицированной частицы по п. 1 для идентификации внеклеточных везикул, содержащих по меньшей мере один специфичный маркер, в образце биологической жидкости.

7. Способ идентификации внеклеточных везикул, содержащих по меньшей мере один специфичный маркер, в образце биологической жидкости, включающий следующие стадии:

(а) получают образец биологической жидкости;

(б) осуществляют контакт указанного образца с модифицированной частицей по п. 1 таким образом, чтобы направляющие дарпины модифицированной частицы связались с по меньшей мере одним специфичным маркером, содержащимся во внеклеточной везикуле, образуя комплекс частица-везикула;

(в) отделяют комплекс частица-везикула от несвязавшихся везикул и модифицированных частиц;

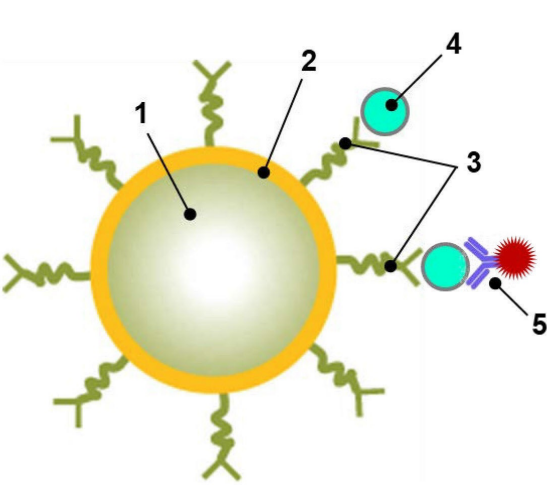
(г) детектируют отделенный комплекс частица-везикула.

8. Способ идентификации внеклеточных везикул по п. 7, характеризующийся тем, что на стадии (б) осуществляют контакт указанного образца с первой модифицированной частицей по п. 1, а после стадии (в) дополнительно осуществляют контакт отделенного комплекса частица-везикула со второй модифицированной частицей по п. 1, отличающейся от первой модифицированной частицы тем, что она содержит направляющие дарпины, обладающие сродством к другому специфичному маркеру, содержащемуся во внеклеточной везикуле.

9. Способ идентификации внеклеточных везикул по п. 7, характеризующийся тем, что детекцию отделенного комплекса частица-везикула осуществляют одним или несколькими методами, выбранными из: детекция флюоресценции, детекция поверхностно усиленного рамановского рассеяния (SERS), детекция оптоакустического сигнала.

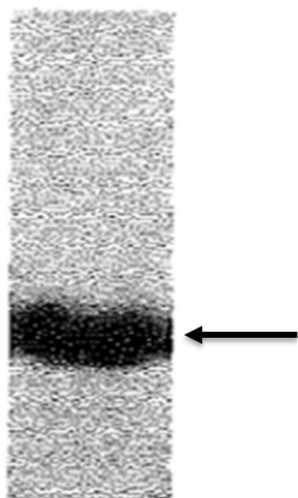
10. Способ идентификации внеклеточных везикул по п. 9, характеризующийся тем, что детекцию отделенного комплекса частица-везикула осуществляют одновременно или последовательно при помощи детекции флюоресценции и при помощи детекции поверхностно усиленного рамановского рассеяния (SERS).

1

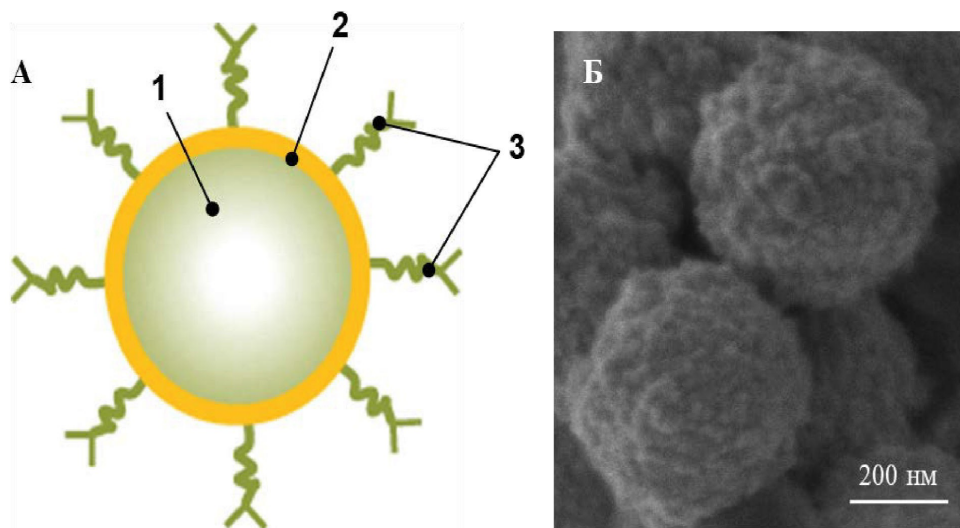


Фиг. 1

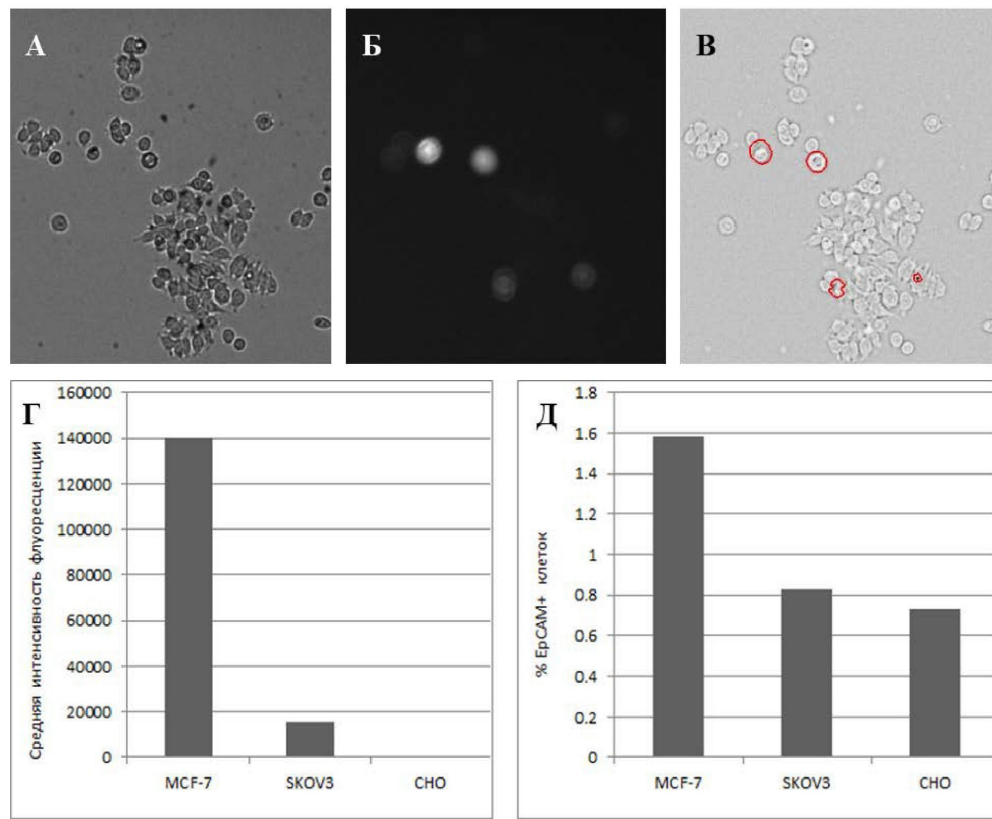
2



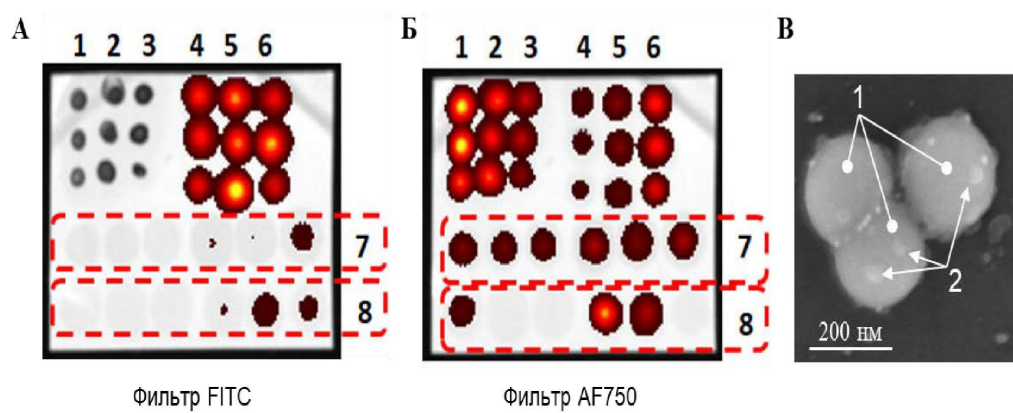
Фиг. 2



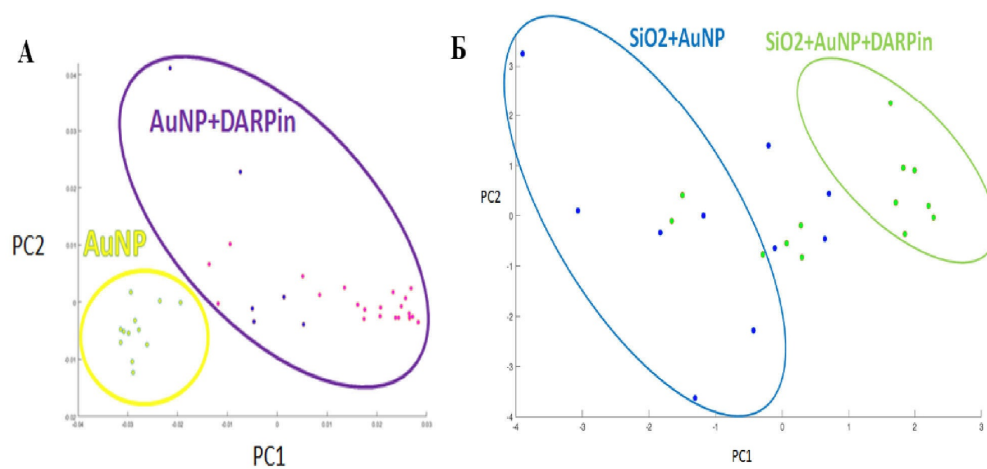
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6