

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201591074** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2016.02.29

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2013.12.05

(54) **РАСПОЗНАЮЩИЙ-ВЫСВОБОЖДАЮЩИЙ НАНОПОРИСТЫЙ СУБСТРАТ,
СОДЕРЖАЩИЙ АКТИВНЫЕ СРЕДСТВА, СПОСОБЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И
ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **61/733,611; 61/865,783**

(32) **2012.12.05; 2013.08.14**

(33) **US**

(86) **PCT/IL2013/051006**

(87) **WO 2014/087410 2014.06.12**

(71) Заявитель:

**ЙИССУМ РИСЕРЧ ДЕВЕЛОПМЕНТ
КОМПАНИ ОФ ДЕ ХЕБРИО
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ДЖЕРУСАЛЕМ
ЛТД. (IL)**

(72) Изобретатель:

**Виллнер Итамар, Жанскиа Жанг,
Балогх Дора (IL)**

(74) Представитель:

Поликарпов А.В. (RU)

(57) Изобретение касается контролируемого высвобождения вещества из пористого субстрата (такого как частицы мезопористого диоксида кремния). Данные частицы включают гостевую молекулу (например, фармацевтическое средство или контрастное средство), заключенную внутри пор указанного субстрата. Поры являются закупоренными по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты, и средство высвобождается за счет инициированной реакции указанной закупоривающей последовательности по меньшей мере с одним анализируемым веществом (биомаркером), таким образом давая указанной закупоривающей последовательности возможность отщепиться от указанной поры. Закупоривающим средством может быть ДНКзим, который расщепляет свой субстрат и высвобождает гостевые молекулы после связывания с анализируемым веществом. В качестве альтернативы закупоривающее средство может быть представлено олигонуклеотидом в конформации шпильки, который расщепляется под действием нуклеазы после гибридизации с комплементарной анализируемой нуклеиновой кислотой. Изобретение дополнительно касается способов получения указанного субстрата, его применения для контролируемого введения активных веществ и диагностики состояний у пациента.

A1

201591074

201591074

A1

РАСПОЗНАЮЩИЙ-ВЫСВОБОЖДАЮЩИЙ НАНОПОРИСТЫЙ СУБСТРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ АКТИВНЫЕ СРЕДСТВА, СПОСОБЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к пористым субстратам, в котором упаковано по меньшей мере одно активное средство в порах, закупоренных нуклеотидной последовательностью, способной контролировать высвобождение указанного средства при связывании с анализируемым веществом и формировать подверженную расщеплению конформацию, в том числе к способам их получения и применениям для безопасного и эффективного введения активных средств и диагностики.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ниже приводятся ссылки, рассматриваемые как релевантные в качестве предпосылок для раскрываемого в настоящем документе объекта.

1. Zhang et al. *ACS Nano*, 7(10), 8455–8468 (2013)
2. Zhang et al. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 1934–1940 (2013)
3. Yang, Q.; Wang, S.; Fan, P.; Wang, L.; Di, Y.; Lin, K.; Xiao, F.-S. *Chem. Mater.* **2005**, 17, 5999-6003.
4. Gao, Q.; Xu, Y.; Wu, D.; Shen, W.; Deng, F. *Langmuir* **2010**, 26, 17133-17138.
5. Zheng, H.; Wang, Y.; Che, S. *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 16803-16813.
6. Liu, N.; Dunphy, D. R.; Atanassov, P.; Bunge, S. D.; Chen, Z.; Lopez, G. P.; Boyle, T. J.; Brinker, C. J. *Nano Lett.* **2004**, 4, 551-554.
7. Aznar, E.; Casaus, R.; Garcia-Acosta, B.; Marcos, M. D.; Martinez-Manez, R.; Sancenon, F.; Soto, J.; Amoros, P. *Adv. Mater.* **2007**, 19, 2228-2231.
8. Liu, R.; Zhao, X.; Wu, T.; Feng, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14418-14419.
9. Luo, Z.; Cai, K.; Hu, Y.; Zhao, L.; Liu, P.; Duan, L.; Yang, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 640-643.
10. Wan, X.; Wang, D.; Liu, S. *Langmuir* **2010**, 26, 15574-15579.

11. Yu, A.; Wang, Y.; Barlow, E.; Caruso, F. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1737-1741.
12. Park, C.; Kim, H.; Kim, S.; Kim, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16614-16615.
13. Lei, C.; Shin, Y.; Liu, J.; Ackerman, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11242-11243.
14. Takahashi, H.; Li, B.; Sasaki, T.; Miyazaki, C.; Kajino, T.; Inagaki, S. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 3301-3305.
15. Nguyen, T. D.; Tseng, H.-R.; Celestre, P. C.; Flood, A. H.; Liu, Y.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10029-10034.
16. Nguyen, T. D.; Liu, Y.; Saha, S.; Leung, K. C.-F.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 626-634.
17. Li, D.; Wieckowska, A.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3927-3931.
18. Miyake, Y.; Togashi, H.; Tashiro, M.; Yamaguchi, H.; Oda, S.; Kudo, M.; Tanaka, Y.; Kondo, Y.; Sawa, R.; Fujimoto, T.; Machina-mi, T.; Ono, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2172-2173.
19. Ono, A.; Togashi, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4300-4302.
20. Freeman, R.; FINDER, T.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7818-7821.
21. Huang, W. T.; Shi, Y.; Xie, W. Y.; Luo, H. Q.; Li, N. B. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7800-7802.
22. Wang, Z.-G.; Elbaz, J.; Remacle, F.; Levine, R. D.; Willner, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21996-22001.
23. Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1948-1998.
24. Tombelli, S.; Minunni, M.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2424-2434.
25. Willner, I.; Zayats, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6408-6418.
26. Li, D.; Shlyahovsky, B.; Elbaz, J.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5804-5805.
27. Niazov, T.; Pavlov, V.; Xiao, Y.; Gill, R.; Willner, I. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1683-1687.
28. Liu, J.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12298-12305.

29. Liu, J.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9838-9839.
30. Dittmer, W. U.; Reuter, A.; Simmel, F. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3550-3553.
31. Shlyahovsky, B.; Li, D.; Weizmann, Y.; Nowarski, R.; Kotler, M.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3814-3815.
32. Liu, Y.; Lin, C.; Li, H.; Yan, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4333-4338.
33. Kang, H.; O'Donoghue, M. B.; Liu, H.; Tan, W. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 249-251.
34. Liu, J.; Lee, J. H.; Lu, Y. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4120-4125.
35. Seelig, G.; Soloveichik, D.; Zhang, D. Y.; Winfree, E. *Science* **2006**, *314*, 1585-1588.
36. Elbaz, J.; Lioubashevski, O.; Wang, F.; Remacle, F.; Levine, R. D.; Willner, I. *Nature Nanotech.* **2010**, *5*, 417-422.
37. Winfree, E. Qian, L. *Science* **2011**, *332*, 1196-1201.
38. Chen, C.; Pu, F.; Huang, Z.; Liu, Z.; Ren, J.; Qu, X. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1638-1644.
39. He, D.; He, X.; Wang, K.; Cao, J.; Zhao, Y. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, DOI: 10.1002/adfm.201201343
40. Zhang, Y.; Yuan, Q.; Chen, T.; Zhang, X.; Chen, Y.; Tan, W. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1956-1962.

Признание вышеуказанных ссылок в данном документе не подразумевает, что они каким-либо образом влияют на патентоспособность раскрываемого в настоящем документе объекта.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Мезопористый диоксид кремния (Si-MP) представляет собой пористую структуру, которая обеспечивает инкапсулирование субстратов в порах, и его поверхность может быть химически модифицирована. Эти свойства были применены при использовании Si-MP в качестве универсального гибридного материала для катализа, доставки лекарственных средств и визуализации. Кроме того, химическая модификация Si-MP позволяет сконструировать чувствительные

к сигналу матрицы для контролируемого высвобождения субстратов из пор матриц.

Различные раздражители, такие как рН [2-5], фотонные сигналы [6, 7], окислительно-восстановительные реагенты [8-10] или ферменты [11-14], использовали для запуска открытия пор, ведущего к контролируемому высвобождению инкапсулированных субстратов. Соответственно, поры Si-MP закупоривали элементами затвора, которые запирают субстрат в порах и обеспечивают чувствительное к раздражителю открытие затворов и высвобождение субстратов. Например, фотонное разрушение полу-ротаксановых закупоривающих пору наноструктур использовали для открытия пор и высвобождения хранящегося субстрата [15, 16].

Информация, закодированная в последовательностях оснований нуклеиновых кислот, предоставляет богатую сферу возможностей для развития области ДНК-нанотехнологий. Управляемая последовательностью и стимулируемая рН сборка одноцепочечной ДНК в структуры i-мотива или кооперативное связывание ДНК-дуплексов ионами металлов, например, посредством мостиков T-Hg²⁺-T была реализована при разработке различных ДНК-машин [17-19] и при разработке логических затворов [20, 21], а также логических машин с конечным числом состояний [22]. Аналогично, сайт-специфические цепи нуклеиновых кислот проявляют свойства специфического связывания в отношении низкомолекулярных или макромолекулярных субстратов (аптамеры) [23-25] или обладают каталитическими свойствами (ДНКзимы) [26-29]. Аптамеры были внедрены для разработки ДНК-машин [30, 31] или для сборки программируемых наноструктур [32-34], а каталитические нуклеиновые кислоты были использованы для разработки логических затворов и каскадов логических затворов [35-37].

Конъюгация нуклеиновых кислот с мезопористым SiO₂ позволила реализовать запускаемые сигналом функции ДНК, заключающиеся в “запирании” и “открытии” пор SiO₂. Например, в поры загружали краситель-субстрат, и их “запирали” с помощью C-квадруплексных закупоривающих элементов, представляющих собой i-мотивы, а затем “открывали” путем отделения крупной структуры i-мотива, с формированием случайно единичной цепи, при

нейтральных значениях pH, обеспечивая, таким образом, высвобождение субстратов [38]. В родственной системе изменение pH и открытие пор стимулировали фотохимическим способом [39]. Кроме того, поры мезопористого SiO₂ закупоривали дуплексными элементами ДНК и закупоривающие цепи отделяли путем способа замещения цепи в присутствии ионов Hg²⁺ с получением дуплексной структуры с мостиком T-Hg²⁺-T, обладающей повышенной стабильностью. Высвобождение заключенного в порах субстрата дало возможность выполнить флуоресцентное обнаружение ионов Hg²⁺ [40].

Большим шагом вперед стала бы возможность конструировать затворные системы, в которых биокаталитический процесс активируется путем первичного явления определения или распознавания анализируемого вещества или биомаркеров, представляющих особый интерес, для обеспечения безопасной и эффективной доставки лекарственных средств к определенным участкам.

ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает пористый субстрат, содержащий по меньшей мере одно активное средство, заключенное внутри указанных пор указанного субстрата; где указанные поры (т. е. отверстие пор) закупориваются по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей конформацию “замка”, когда внутри указанных пор заключено указанное по меньшей мере одно активное средство; указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты способна к формированию подверженной расщеплению конформации при связывании по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом; с обеспечением, тем самым, расщепления указанной закупоривающей последовательности нуклеиновой кислоты и осуществлением высвобождения указанного упакованного по меньшей мере одного активного средства.

Под выражением "*пористый субстрат*" следует понимать основу из любого нанопористого материала (который является органическим, металлическим, полу-металлическим или неорганическим и имеет либо естественное, либо искусственное происхождение), поддерживающего

постоянную, пористую структуру. Размер пор обычно составляет 100 нанометров или менее. Указанный субстрат может быть в любой доступной форме, в том числе наночастиц, пленок, мембран и так далее. Неограничивающие примеры пористого субстрата включают активированный уголь, цеолиты, диоксид кремния, диоксид циркония, оксид алюминия и любые их комбинации. Указанный пористый субстрат может быть микропористым материалом (с размером пор приблизительно 0,2-2 нм), мезопористым материалом (с размером пор приблизительно 2-50 нм) или макропористым материалом (с размером пор приблизительно 50-1000 нм) или любыми их комбинациями.

Поры указанного субстрата *заключают* внутри себя по меньшей мере одно активное средство, таким образом упаковывая внутри указанных пор указанное по меньшей мере одно активное средство. Для того, чтобы заключить и запирать (т. е. содержать и удерживать) указанное по меньшей мере одно активное средство внутри указанной поры, указанное отверстие поры (т. е. та часть указанной поры, которая с наружной стороны подвергается воздействию окружающей среды) закупорена по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты. Указанное закупоривание обеспечивается химической модификацией отверстия поры, т. е. химическим связыванием указанной по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты с указанным пористым материалом в отверстии поры.

Закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты (называемая в настоящем документе также *закупоривающей последовательностью* или *закупоривающей последовательностью нуклеиновой кислоты*) имеет конформацию (называемую в настоящем документе конформацией “замка”), которая обеспечивает заключение указанного по меньшей мере одного активного средства внутри указанных пор, позволяя, таким образом, указанному по меньшей мере одному активному средству удерживаться внутри указанных пор без вытекания в окружающую среду указанного субстрата. Указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты является биостойкой последовательностью, которая

содержит по меньшей мере 5 нуклеотидов, образующих макромолекулу, имеющую конформацию, которая до связывания по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом может закупоривать углубление поры, к которой она присоединена, и предупреждать диффузию указанного по меньшей мере одного активного средства из пор указанного субстрата, запирая указанное активное средство внутри поры.

После связывания указанной закупоривающей последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом, указанная закупоривающая последовательность способна к формированию подверженной расщеплению конформации, т. е. конформации, отличной от конформации “замка”, где указанная закупоривающая последовательность доступна для расщепления (в некоторых вариантах осуществления указанное изменение конформации на подверженную расщеплению конформацию обеспечивает гидратацию указанной последовательности, расщепление указанной последовательности под действием биокатализатора и так далее). Только когда закупоривающая последовательность образует указанную подверженную расщеплению конформацию становится возможным обнаружение последовательности (например, посредством воздействия биокатализатора на нуклеотид, входящий в состав этой последовательности). Расщепление закупоривающей последовательности приводит к отсоединению указанной последовательности от отверстия поры путем разрушения по меньшей мере одной химической связи в закупоривающей последовательности под действием указанного биокатализатора. После расщепления закупоривающей последовательности указанное по меньшей мере одно активное средство, заключенное внутри указанных пор субстрата, высвобождается непосредственно в окружающую среду указанного субстрата.

В некоторых вариантах осуществления указанные поры закупорены по меньшей мере двумя независимыми последовательностями нуклеиновых кислот.

В других вариантах осуществления указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты является либо одно-, либо двухцепочечной.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты включает последовательность ДНКзима. *Последовательности ДНКзимов* (которые также называют дезоксирибозимами, ДНК-ферментами или каталитической ДНК) представляют собой молекулы ДНК, которые имеют способность осуществлять химическую реакцию, такую как каталитическое действие, запускаемое связыванием с ионом металла. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления указанное расщепление указанной закупоривающей последовательности обеспечивается самой указанной закупоривающей последовательностью ДНКзима. Таким образом, после расщепления указанной последовательности ДНКзима происходит регенерация целевого по меньшей мере одного первого анализируемого вещества, запускающая высвобождение указанного активного средства. Таким образом, высвобождение указанного средства из субстрата достигается за счет присутствия даже небольших количеств анализируемого вещества (биомаркера), что делает указанный субстрат по настоящему изобретению чувствительным к состоянию, отражающемуся присутствием указанного биомаркера.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления указанная последовательность ДНКзима удлиняется за счет чужеродного (дополнительного) нуклеотидного домена (с по меньшей мере еще 5 нуклеотидами) со свободной конформацией (т. е. такой конформацией, которая не содержит и не связывается ни с каким соединением) и активной конформацией, которая достигается за счет связывания указанного чужеродного участка по меньшей мере с одним вторым анализируемого вещества (который может быть таким же или отличным от указанного первого анализируемого вещества); указанный чужеродный или дополнительный нуклеотидный домен может быть аптамер-связывающей последовательностью или ион-связывающей последовательностью, таким

образом, после связывания указанного дополнительного домена по меньшей мере с одним аптамером или по меньшей мере с одним ионом указанная конформация последовательности ДНКзима подвергается аллостерическому изменению. Только после достижения указанной активной конформации вся указанная последовательность ДНКзима целиком способна к формированию подверженной расщеплению конформации при связывании с указанным по меньшей мере одним первым анализируемым веществом, с обеспечением, тем самым, расщепления указанной закупоривающей последовательности нуклеиновой кислоты и осуществления высвобождения указанного упакованного по меньшей мере одного активного средства.

В других вариантах осуществления указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность РНКзима.

В других вариантах осуществления указанная закупоривающая по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность петли “шпильки”. Указанная *петля “шпилька”* (или внутримолекулярное спаривание оснований с образованием конфигурации стебель-петля) представляет собой паттерн, который может возникать в одноцепочечных ДНК- или РНК-последовательностях. Структура или конформация по типу петли “шпильки” формируется тогда, когда два участка одной цепи, обычно имеющие комплементарность в нуклеотидной последовательности при чтении с противоположных концов, спариваются с образованием двойной спирали, которая заканчивается петлей из неспаренных оснований.

В некоторых вариантах осуществления указанные по меньшей мере две независимые закупоривающие последовательности нуклеиновых кислот представляют собой по меньшей мере две независимые последовательности петель “шпилек” (которые могут быть одинаковыми или различными).

В некоторых вариантах осуществления указанная закупоривающая последовательность с указанной по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты в виде петли “шпильки” образует подверженную расщеплению конформацию при объединяющем связывании по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом, которое представляет собой цепь нуклеиновой кислоты с имеющую комплементарной последовательностью, таким образом образуя двойную цепь.

В некоторых вариантах осуществления указанная закупоривающая последовательность выбрана из следующего неограничивающего списка:

- (1) 5'-SH(CH₂)₆CAACAACATrAGGACATAGAAGAAGAAG-3' (SEQ № 1);
- (4) 5'-CTTCTTCTTCTATGTCAGCGATCCGGAACGGCACCCATGTTGTTGTTG-3' (SEQ № 2);
- (5) 5'-CTTCTTCTTCTATGTCTCCGAGCCGGTCGAAATGTTGTTG-3' (SEQ № 3);
- (6) 5'-CTTCTTCTTCTATGTCAGCGATCCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGCACCCATGTTGTTGTTG-3' (SEQ № 4);
- (7) 5'-CTTCTTCTTCTATGTCAGCGATCTTTTCGGAAACGTTTAGCACCCATGTTGTTGTTG-3' (SEQ № 5);
- (8) 5'-CTTCTTCTTCTATGTCTCATGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGTCGA AATGTTGTTG-3' (SEQ № 6).

В других вариантах осуществления указанная закупоривающая последовательность выбрана из следующего неограничивающего списка:

- (1) 5'-SH(CH₂)₆ CAA GGG CAG AAG TCT TCA CTG CCC TTG CAC ACT-3' T.п.=67,3°C (SEQ № 7);
- (2) 5'-AGT GTG CAA GGG CAG TGA AGA CTT GAT TGT-3' (SEQ № 8);
- (3) 5'-AGT GTG CAA GAG CAG TGA AGA CTT GAT TGT-3' (SEQ № 9);
- (4) 5'-AGT GTG CTA GAG CAG TGA AGA CTT GAT TGT-3' (SEQ № 10);
- (5) 5'-AGT GTG CTA GAG CAG TTA AGA CTT GAT TGT-3' (SEQ № 11);
- (6) 5'-SH(CH₂)₆AACGAAGCTGAGGATGTGTTTCGTT-3', T. п.=58,9°C (SEQ № 12);
- (7) 5'-ATCCTCAGCTTCG-3' (SEQ № 13);
- (8) 5'-ATCCTGAGCTTCG-3' (SEQ № 14);

(9) 5'-ATCATGAGCTTCG-3' (SEQ № 15);

(10) 5'-ATCATGAGCGTCG-3'(SEQ № 16);

(11) 5'-SH(CH₂)₆CCTCCGCTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGTA-3',
T. п.=69,8°C (SEQ № 17);

(12) 5'-SH(CH₂)₆CCTCCGCAATACTCCGCTGAGGCCTGGGGGAGTATTGCG
GAGGAAGGCCTCAGC-3', T. п.=74,9°C (SEQ № 18).

Каждое из *по меньшей мере одного первого анализируемого вещества* и/или *по меньшей мере второго первого анализируемого вещества* независимо представляет собой биологическое вещество, являющееся по меньшей мере одной цепью нуклеиновой кислоты, по меньшей мере одним пептидом, по меньшей мере одним аптамером (ДНК-, РНК- или пептидным аптамером), по меньшей мере одним ионом металла (таким как, например, Mg⁺², Zn⁺², Hg⁺²) или любыми их комбинациями.

В некоторых вариантах осуществления указанное по меньшей мере одно первое анализируемое вещество и/или по меньшей мере второе первое анализируемое вещество представляет собой биомаркер для по меньшей мере одного заболевания или состояния. **Биомаркер**, или биологический маркер, представляет собой любое вещество, соединение или анализируемое вещество, которое служит индикатором определенного биологического статуса, состояния или заболевания. Измерение и оценка уровня биомаркеров производится для изучения нормальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологических ответов на терапевтическое воздействие. Таким образом, при связывании указанной закупоривающей последовательности с указанным по меньшей мере одним первым анализируемым веществом и/или по меньшей мере одним вторым анализируемым веществом распознавание состояния, ассоциированного с такими анализируемыми веществами, осуществляется указанным субстратом по настоящему изобретению. Только при таком событии распознавания закупоривающая последовательность приобретает склонность к расщеплению, высвобождая, таким образом, активное средство, заключенное в порах указанного субстрата, только при необходимости. Таким образом, субстрат

по настоящему изобретению обеспечивает более безопасный способ введения активного средства (у пациента менее выражены побочные эффекты, поскольку данное средство не выделяется в том случае, если не происходит распознавания) и более эффективный способ введения, поскольку высвобождение осуществляется в участке, в котором присутствует анализируемое вещество/биомаркер.

В некоторых вариантах осуществления указанная последовательность в виде петли “шпильки” содержит нуклеотидный домен, который делает возможным образование указанной подверженной расщеплению конформации при связывании по меньшей мере с одним анализируемым веществом.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления указанная последовательность в виде петли “шпильки” дополнительно содержит нуклеотидный домен со свободной конформацией и активной конформацией при связывании по меньшей мере с одним вторым анализируемым веществом.

В некоторых вариантах осуществления указанная закупоривающая последовательность содержит нуклеотид, специфический по отношению к надрезающему ферменту (т. е. специфический нуклеотидный участок, склонный к надрезанию или расщеплению под действием надрезающего фермента).

В некоторых вариантах осуществления указанное расщепление осуществляется под действием биокатализатора (т. е. фермента, который катализирует расщепление или надрезание указанной закупоривающей последовательности путем каталитического взаимодействия с указанной последовательностью, таким образом, что она выводится химическим путем из отверстия поры). В некоторых других вариантах осуществления указанный биокатализатор представляет собой экзонуклеазу или эндонуклеазу. В некоторых дополнительных вариантах осуществления указанный биокатализатор представляет собой надрезающий фермент.

Эксонуклеазы представляют собой ферменты, функция которых заключается в расщеплении нуклеотидов по одному, начиная с конца (экзо-) полинуклеотидной цепи. Происходит реакция гидролиза, в результате которой возникает разрыв фосфодиэфирных связей либо на 3'-, либо на 5'-конце. *Эндонуклеазы* являются ферментами, которые расщепляют фосфодиэфирные связи в середине (эндо-) полинуклеотидной цепи. *Надрезающий фермент* (или надрезающая эндонуклеаза) является ферментом, который разрезает одну цепь двухцепочечной ДНК в определенных распознаваемых нуклеотидных последовательностях, называемых сайтом рестрикции. Такие ферменты гидролизуют (разрезают) только одну цепь ДНК-дуплекса, чтобы получить молекулы ДНК, которые "надрезаны", а не расщеплены.

В некоторых вариантах осуществления указанный субстрат представляет собой наночастицы из оксида полуметалла. В других вариантах осуществления указанный субстрат представляет собой наночастицы мезопористого диоксида кремния.

Выражение *активное средство* следует понимать как охватывающее любое вещество с биологической активностью, которое оказывает полезный эффект в отношении лечения и/или диагностики пациента, которому его вводят, после его высвобождения из пор указанного субстрата. В некоторых вариантах осуществления указанное по меньшей мере одно активное средство является фармацевтическим ингредиентом, таким как противораковое лекарственное средство, противовоспалительное лекарственное средство, антимикробное лекарственное средство, антигипертензивное лекарственное средство, нейропротективное средство, средство с активностью против HIV и тому подобные и любые их комбинации. В других вариантах осуществления указанное активное средство является диагностическим средством, которое может обнаруживаться после его высвобождения из пор указанного субстрата. Обнаружение указанного диагностического средства может осуществляться с применением любого способа, известного в данной области, такого как, например, техники магнитного резонанса, СТ, ПЕТ или любые их комбинации.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение представляет способ введения активного средства, высвобождение которого зависит от состояния, пациенту, нуждающемуся в этом, при этом указанный способ включает введение указанному пациенту пористого субстрата, содержащего по меньшей мере одно активное средство, упакованное внутри указанных пор указанного субстрата; где указанные поры закупорены по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей конформацию “замка”, когда внутри указанных пор заключено указанное по меньшей мере одно активное средство; указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты способна к формированию подверженной расщеплению конформации при связывании по меньшей мере с одним первым биомаркером, ассоциированным с указанным состоянием; с обеспечением, тем самым, расщепления указанной закупоривающей последовательности нуклеиновой кислоты и осуществлением высвобождения указанного упакованного по меньшей мере одного активного средства.

Настоящее изобретение предусматривает пористый субстрат, содержащий по меньшей мере одно активное средство, упакованное внутри указанных пор указанного субстрата; где указанные поры закупорены по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты с конформацией “замка”, когда по меньшей мере одно указанное активное средство является заключенным внутри указанных пор; указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты способна к формированию подверженной расщеплению конформации при связывании по меньшей мере с одним первым биомаркером, ассоциированным по меньшей мере с одним заболеванием, состоянием или болезнью или любыми их симптомами; с обеспечением, тем самым, расщепления указанной закупоривающей последовательности нуклеиновой кислоты и осуществления высвобождения указанного упакованного по меньшей мере одного активного средства; для применения в лечении указанного по меньшей мере одного заболевания, состояния или болезни или любых их симптомов.

Используемое в настоящем документе выражение *лечение* означает ведение и терапию пациента с целью борьбы с болезнью, заболеванием, расстройством или состоянием или любыми их симптомами. Выражение подразумевает включение отсрочки прогрессирования болезни, заболевания, расстройства или состояния или любых их симптомов, уменьшение или облегчение симптомов и осложнений и/или излечение или устранение болезни, заболевания, расстройства или состояния или любых их симптомов. Пациент, подлежащий лечению, предпочтительно является млекопитающим, в частности человеком.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает аспект способа диагностики состояния или заболевания пациента, включающий введение указанному пациенту пористого субстрата, содержащего по меньшей мере одно средство, упакованное внутри указанных пор указанного субстрата, где указанные поры закупорены по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты с конформацией “замок”, где указанное по меньшей мере одно средство заключено внутри указанных пор; при этом указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты способна к формированию подверженной расщеплению конформации при связывании по меньшей мере с одним первым биомаркером указанного состояния или заболевания; с обеспечением, тем самым, расщепления указанной закупоривающей последовательности нуклеиновой кислоты и осуществлением высвобождения указанного упакованного по меньшей мере одного средства в жидкость организма указанного пациента, и обнаружением указанного по меньшей мере одного средства в указанных жидкостях организма указанного пациента.

Настоящее изобретение предусматривает способ получения пористого субстрата по настоящему изобретению, при этом указанный способ включает стадии: (a) связывания (т. е. образования химической связи на отверстиях поры) пористого субстрата по меньшей мере с одной первой последовательностью одноцепочечной нуклеиновой кислоты с образованием, таким образом, функционализированного субстрата; (b) приведение указанного

функционализированного пористого субстрата в контакт по меньшей мере с одним активным средством с упаковыванием, таким образом, указанного средства в поры указанного субстрата; (с) приведение указанного упакованного функционализированного в контакт с комплементарной второй последовательностью одноцепочечной нуклеиновой кислоты с закупориванием, таким образом, указанных пор (отверстия поры) указанного пористого субстрата указанной закупоривающей последовательностью и заключением указанного по меньшей мере одного активного средства в указанные поры; где указанная закупоривающая последовательность способна к формированию подверженной расщеплению конформации после связывания по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом.

В одном варианте осуществления способа настоящего изобретения указанная вторая комплементарная последовательность одноцепочечной нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидный домен со свободной конформацией и активной конформацией после связывания по меньшей мере с одним вторым анализируемым веществом; где активная конформация указанной второй цепи делает возможным формирование указанной закупоривающей последовательностью подверженной расщеплению конформации после связывания по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ получения пористого субстрата по настоящему изобретению, при этом указанный способ включает стадии: (а) связывания пористого субстрата по меньшей мере с одной последовательностью одноцепочечной нуклеиновой кислоты в виде шпильки с образованием, таким образом, функционализированного субстрата; (b) приведения указанного функционализированного пористого субстрата в контакт по меньшей мере с одним активным средством под действием температуры, где указанная последовательность в виде шпильки имеет случайную конформацию; с упаковыванием, таким образом, указанного средства в поры указанного субстрата; (с) понижения температуры указанного функционализированного

субстрата с упакованным средством с образованием, таким образом, указанной конформации шпильки, и закупориванием указанных пор указанного пористого субстрата, и заключения указанного по меньшей мере одного активного средства в указанные поры; где указанная закупоривающая последовательность способна к формированию подверженной расщеплению конформации после связывания по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом.

В некоторых вариантах осуществления указанная по меньшей мере одна последовательность в виде шпильки содержит нуклеотидный домен со свободной конформацией и активной конформацией после связывания по меньшей мере с одним вторым анализируемым веществом; где активная конформация делает возможным формирование указанной закупоривающей последовательностью подверженной расщеплению конформации при связывании по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом.

В дополнительном варианте осуществления способа настоящего изобретения указанная закупоривающая последовательность содержит нуклеотид, специфический по отношению к надрезающему ферменту.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один пористый субстрат по настоящему изобретению.

При упоминании фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один пористый субстрат по настоящему изобретению, ее следует понимать как содержащую указанный по меньшей мере один пористый субстрат по настоящему изобретению в смеси с фармацевтически приемлемыми вспомогательными средствами и, факультативно, другими терапевтическими средствами. Вспомогательные средства должны быть “приемлемыми” в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции и не оказывать вредного воздействия на организм, в который их вводят.

Фармацевтические композиции включают такие, которые пригодны для перорального, ректального, назального, топического (в том числе трансдермального, трансбуккального и сублингвального), вагинального или парентерального (в том числе подкожного, внутримышечного, внутривенного и внутрикожного) введения или введения с помощью имплантата. Композиции могут быть получены любым способом, хорошо известным в области фармации.

Такие способы включают этап объединения по меньшей мере одного пористого субстрата по настоящему изобретению с любым вспомогательным средством. Вспомогательное(ые) средство(а), также называемые вспомогательным(и) ингредиентом(ами), включают те, которые являются традиционными в данной области, такие как носители, наполнители, связующие вещества, разбавители, разрыхлители, смазывающие вещества, красители, вкусовые средства, антиоксиданты и смачивающие средства.

Фармацевтические композиции, пригодные для перорального введения могут быть представлены в виде отдельных единиц дозирования, таких как пилюли, таблетки, драже или капсулы, или в виде порошка или гранул, или в виде раствора или суспензии. Фармацевтический ингредиент может быть также представлен в виде шарика или пасты. Композиции могут подвергаться дополнительной технологической обработке для включения в состав суппозиторий или клизм для ректального введения.

Настоящее изобретение дополнительно включает фармацевтическую композицию, которая описана выше, в сочетании с упаковочным материалом, включая инструкции по применению композиции, для использования в соответствии с представленным выше описанием.

Композиции, подходящие для парентерального введения включают водные и неводные стерильные растворы для инъекций. Композиции могут быть представлены в контейнерах с единичной дозой или многодозовых контейнерах, например, в герметично упакованных флаконах и ампулах, и могут храниться в

высушенном путем замораживания (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды, перед применением. Для трансдермального введения могут применяться, например, гели, пластыри или спреи. Композиции или составы, которые подходят для введения в легкие, например, путем назальной ингаляции, включают мелкодисперсные порошки или растворы, которые могут быть получены с применением аэрозолей под давлением, вводимых в виде дозированных доз, небулайзеров или инсуффляторов.

Точная доза и режим введения композиции обязательно будут зависеть от терапевтического или питательного эффекта, который необходимо достичь, и могут варьировать в зависимости от конкретной формулы, способа введения, и от возраста, и состояния отдельного субъекта, которому должна быть введена композиция.

Авторы настоящей заявки ввели новые концепции применения наночастиц мезопористого SiO_2 в качестве нано-контейнера для контроля высвобождения заключенных в порах субстратов.

(i) Металл-зависимые ДНКзимы в качестве функциональных компонентов для "запираания" и "открытия" пор. Обуславливаемые ионами металла каталитические свойства ДНКзимов обеспечили запуск и контроль высвобождения заключенных в порах субстратов.

(ii) Внедрение смеси двух мезопористых SiO_2 -матриц, которые были функционализированы с применением Mg^{2+} - или Zn^{2+} -зависимых ДНКзимов в качестве каталитических триггеров для мультиплексированного открытия соответствующих пор. Кроме того, поскольку различные ион-зависимые ДНКзимы работают при различных значениях pH, можно запрограммировать ДНКзим-опосредованное открытие пор за счет изменений pH окружающей среды. Такие изменения pH можно модулировать также с применением электрохимических или фотохимических средств.

(iii) Обуславливаемое ионами открытие пор и высвобождение двух различных флуоресцентных красителей было обосновано в критериях логической

операции, где ионы действуют как входные, а высвобожденные флуорофоры обеспечивает выходные сигналы считывания. Таким образом, эти системы могут рассматриваться как "умные" материалы для высвобождения субстратов, зависящего от входных сигналов. Такая система может быть использована в системе контролируемой доставки лекарственных средств, направленного высвобождения лекарственных средств и запускаемой сигналом активации лекарственных средств, приводимой к получению катализатора.

(iv) Аллостерическая активация ДНКзимов, связанных с контейнерами $MP-SiO_2$, под действием комплексов аптамерного субстрата и/или токсических Hg^{2+} -ионов. Эти системы, таким образом, предусмотрены для использования в качестве автономных систем "определения и лечения", которые предоставляют новую грань в области нано-медицины. Управляемое биомаркером образование аптамерного комплекса или активация ДНКзима, стимулированная воздействием токсичного металла, может обеспечить информативные явления определения (распознавания) при автономном высвобождении лекарственных средств с противоположным действием.

Субстрат по настоящему изобретению обеспечивает значительный прогресс, поскольку были сконструированы затворные системы, где биокаталитический процесс активируется первичным явлением определения или распознавания анализируемого вещества или биомаркера, представляющего особый интерес, и где биокаталитический процесс перерабатывает и восстанавливает анализируемое вещество. Такие системы высвобождают субстрат (лекарственное средство) в результате обнаружения незначительных количеств биомаркеров.

Настоящее изобретение представило новый механизм закупоривания и высвобождения для субстратов, заключенных в $MP-SiO_2$ NP. Этот механизм основан на специальных кэпах на основе нуклеиновой кислоты, которые блокируют субстраты в порах NP, и на открытии пор за счет индуцированных анализируемым веществом (биомаркером) перестроек в кэпах на основе нуклеиновой кислоты, которые подвергаются каталитической фрагментации в

присутствии Eho III или надрезающего фермента. Эти связанные процессы определения/каталитической фрагментации ведут к регенерации анализируемых веществ (биомаркеров). Закупоривающие единицы, являющиеся нуклеиновой кислотой, узнают гены или молекулярные биомаркеры посредством образования комплементарных дуплексных структур или комплексов аптамер-субстрат. Системы представляют наноструктуры, способные к определению и выделению субстрата, и имеют средства для расширения процесса определения, которые высвобождают заключенный субстрат путем регенерации анализируемого вещества (биомаркера).

Биокаталитический процесс высвобождения субстрата из MP-SiO₂ NP затем применяли, чтобы стимулировать высвобождение противоракового лекарственного средства, камптотецина, СРТ, из соответствующих запертых пор с применением нуклеиновой кислоты или АТФ в качестве триггеров для открытия пор в присутствии Eho III или надрезающего фермента, Nb. BbvCI. Так как метаболический синтез АТФ усиливается в раковых клетках по сравнению с нормальными клетками, и с учетом того, что биокатализатор EndoGI, демонстрирующий активность типа Eho III, присутствует в раковых клетках, были исследованы эффекты СРТ-загруженных MP-SiO₂ NP, запертых посредством АТФ-зависимой шпильки (6) на жизнеспособность клеток рака молочной железы линии MDA-231 и нормальных клеток молочной железы линии MCF-10A. Было показано, что после промежутка времени, составлявшего 48 часов, наблюдалась гибель 65% раковых клеток, тогда как среди нормальных клеток погибали только 25% клеток. Более высокий показатель СРТ-индуцированной гибели раковых клеток хорошо коррелировал с повышенным синтезом АТФ в раковых клетках. Эти результаты обращают внимание на разработку "умных" нанопористых наночастиц, с загруженным в них лекарственным средством, которые открываются и высвобождают химиотерапевтическое лекарственное средство на раковых клетках-мишенях с помощью внутриклеточного биомаркера (АТФ).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Для лучшего понимания объекта настоящего изобретения, раскрытого в данном документе, и для того, чтобы проиллюстрировать, как он может быть осуществлен на практике, далее будут описаны варианты осуществления, изложенные только в качестве неограничивающего примера, со ссылкой на прилагаемые графические материалы, на которых изображено следующее.

На фиг. **1A-1B** показано схематическое изображение варианта осуществления настоящего изобретения. На фиг. 1A показаны SiO₂-нанопоры, функционализированные при помощи тиолированной последовательности **(1)** с применением водорастворимого amino-сульфгидрильного сшивающего средства на основе сложного эфира N-ε-малеимидокапроил-окисульфосукцинимид (сульфо-EMCS). На фиг. 1B показано схематическое изображение ион-опосредованного высвобождения MB⁺ или Th⁺ из наноконтейнеров с применением Mg²⁺-зависимого или Zn²⁺-зависимого ДНКзима, соответственно.

На фиг. **2A-2D** показаны спектры флуоресценции MB⁺ в растворе после добавления различных концентраций Mg²⁺-иона к загруженным красителем SiO₂-NP: (a) 0 мМ, (b) 0,1 мМ, (c) 0,5 мМ, (d) 1 мМ, (e) 5 мМ, (f) 10 мМ, (g) 25 мМ, (h) 50 мМ; с последующим высвобождением MB⁺ в раствор в течение периода времени, составляющего 60 минут (фиг.2A). На фиг. 2B показана калибровочная кривая для высвобождения MB⁺ из пор **(1)/(4)**-функционализированных SiO₂-NP в зависимости от концентрации ионов Mg²⁺. На фиг. 2C показаны изменения флуоресценции в зависимости от времени при высвобождении MB⁺. Кривая (a) - после обработки **(1)/(4)**-функционализированных SiO₂-NP Mg²⁺-ионами при концентрации 10 мМ; кривая (b) - после обработки **(1)/(4)**-функционализированных SiO₂-NP при отсутствии ионов Mg²⁺. На фиг. 2D показаны изменения флуоресценции MB⁺ после обработки **(1)/(4)**-функционализированных SiO₂-NP ионами различных металлов (10 мМ) в течение периода времени, составляющего 60 минут.

На фиг. **3A-3D** показаны спектры флуоресценции Th⁺ в растворе после добавления различных концентраций Zn²⁺-иона к загруженным красителем SiO₂-NP: (a) 0 мМ, (b) 0,05 мМ, (c) 0,1 мМ, (d) 0,5 мМ, (e) 1 мМ, (f) 5 мМ, (g) 10 мМ, (h) 20 мМ; с последующим высвобождением Th⁺ в раствор в течение периода

времени, составляющего 40 минут. (B) Калибровочная кривая для высвобождения Th^+ из пор (1)/(5)-функционализированных $\text{SiO}_2\text{-NP}$ в зависимости от концентрации ионов Zn^{2+} . (C) Изменения флуоресценции в зависимости от времени при высвобождении Th^+ . Кривая (a) - после обработки (1)/(5)-функционализированных $\text{SiO}_2\text{-NP}$ Zn^{2+} -ионами при концентрации 5 мМ; кривая (b) - после обработки (1)/(5)-функционализированных $\text{SiO}_2\text{-NP}$ при отсутствии Zn^{2+} -ионов. (D) Изменения флуоресценции Th^+ после обработки (1)/(5)-функционализированных $\text{SiO}_2\text{-NP}$ ионами различных металлов (5 мМ) в течение периода времени, составляющего 40 минут. (Концентрация PDCA для устранения интерференции Pb^{2+} составляла 10 мМ).

На фиг. 4A-4D показано получение двойственной флуоресценции MB^+ и Th^+ (фиг. 4A) при отсутствии какого-либо входного сигнала, (0,0); на фиг. 4B в присутствии Mg^{2+} (10мМ) и Zn^{2+} (0 мМ), (1,0); на фиг. 4C в присутствии Mg^{2+} (0 мМ) и Zn^{2+} (5 мМ), (0,1) и на фиг. 4D в присутствии Mg^{2+} (10 мМ) и Zn^{2+} (5 мМ), (1,1).

Фиг. 5A-5C относится к ион-опосредованному высвобождению MB^+ из наноконтейнеров с применением Mg^{2+} -зависимого ДНКзима, содержащего последовательность АТФ-связывающего аптамера. На фиг. 5A изображено ион-опосредованное высвобождение MB^+ из наноконтейнеров с применением Mg^{2+} -зависимого ДНКзима, содержащего последовательность АТФ-связывающего аптамера. На фиг. 5B показаны спектры флуоресценции MB^+ в растворе после добавления (a) 0 Mg^{2+} , 0 АТФ; (b) 0 Mg^{2+} , 100 мкМ АТФ; (c) 20 мМ Mg^{2+} , 0 АТФ; (d) 20 мМ Mg^{2+} , 100 мкМ АТФ, по истечении периода времени, составляющего 90 минут. На фиг. 5C показаны изменения флуоресценции в зависимости от времени при высвобождении MB^+ с применением 0 Mg^{2+} , 0 АТФ (кривая (a)); 0 Mg^{2+} , 100 мкМ АТФ (кривая (b)); 20 мМ Mg^{2+} (кривая (c)), 0 АТФ; 20 мМ Mg^{2+} , 100 мкМ АТФ (кривая (d)).

Фиг. 6A-6C относится к ион-опосредованному высвобождению MB^+ из наноконтейнеров с применением Mg^{2+} -зависимого ДНКзима, содержащего чужеродную последовательность, способную к образованию шпильковой структуры в присутствии Hg^{2+} -ионов. На фиг. 6A изображено ион-опосредованное высвобождение MB^+ из наноконтейнеров с применением Mg^{2+} -

зависимого ДНКзима, содержащего чужеродную последовательность, способную к образованию шпильковой структуры в присутствии Hg^{2+} -ионов. На фиг. 6B представлены спектры флуоресценции MB⁺ в растворе после добавления (a) 0 Mg^{2+} , 0 Hg^{2+} ; (b) 0 Mg^{2+} , 1 мкМ Hg^{2+} ; (c) 20 мМ Mg^{2+} , 0 Hg^{2+} ; (d) 20 мМ Mg^{2+} , 1 мкМ Hg^{2+} , по истечении периода времени, составляющего 60 минут. На фиг. 6C представлены изменения флуоресценции в зависимости от времени при высвобождении MB⁺ с применением 0 Mg^{2+} , 0 Hg^{2+} (кривая (a)); 0 Mg^{2+} , 1 мкМ Hg^{2+} (кривая (b)); 20 мМ Mg^{2+} (кривая (c)), 0 Hg^{2+} ; 20 мМ Mg^{2+} , 1 мкМ Hg^{2+} (кривая (d)).

На фиг. 7A-7B показаны спектры флуоресценции доксорубина в растворе по истечении периода времени, составляющего 60 минут, с применением (1)/(4)-модифицированных MP-SiO₂-NP, при отсутствии (a) или в присутствии (b) 10 мМ Mg^{2+} -иона (фиг. 7A). На фиг. 7B показаны спектры флуоресценции доксорубина в растворе по истечении периода времени, составляющего 90 минут, с применением (1)/(6)-модифицированных MP-SiO₂-NP в присутствии 0 Mg^{2+} , 0 АТФ (кривая (a)); 0 Mg^{2+} , 100 мкМ АТФ (кривая (b)); 20 мМ Mg^{2+} , 0 АТФ (кривая (c)); 20 мМ Mg^{2+} , 100 мкМ АТФ (кривая (d)).

На фиг. 8A-8E показано открытие наночастиц мезопористого SiO₂ со шпильковыми структурами и высвобождение родамина В, RhB, с применением биомаркера аналит-ДНК в качестве активатора для раскрытия шпилек и внедрения Echo III в качестве биокатализатора для регенерации ДНК-биомаркера (фиг. 8A). На фиг. 8B показаны спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению RhB при воздействии на MP-SiO₂-NP (10 мг) различных концентраций аналита, являющегося биомаркером, в присутствии Echo III (1 Ед./мкл) в течение фиксированного периода времени, составляющего 60 минут. (a) 0 нМ; (b) 50 нМ; (c) 100 нМ; (d) 500 нМ; (e) 1 мкМ; (f) 2,5 мкМ. На фиг. 8C представлены спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению RhB при воздействии на MP-SiO₂-NP (10 мг) различных концентраций Echo III в присутствии постоянной концентрации (2) (1 мкМ) в течение фиксированного периода времени, составляющего 60 минут. (a) 0 Ед./мкл; (b) 0,05 Ед./мкл; (c) 0,1 Ед./мкл; (d) 0,5 Ед./мкл; (e) 1 Ед./мкл; (f) 2 Ед./мкл. На фиг. 8D представлены изменения флуоресценции в зависимости от времени, наблюдаемые при

высвобождении RhB из MP-SiO₂-NP за счет: (a) высвобождения RhB-загруженной системой без обработки биомаркером (2) или Echo III; (b) обработки RhB-загруженной системы только ДНК-биомаркером (2) (1 мкМ) без добавления Echo III; (c) обработки RhB-загруженной системы только Echo III (1 Ед./мкл) и без добавления (2); (d) обработки RhB-загруженных MP-SiO₂-NP (2) (1 мкМ) и Echo III (1 Ед./мкл). На фиг. 8Е представлены спектры флуоресценции для высвобождения RhB после обработки RhB-загруженных MP-SiO₂-NP с закрытой шпилькой: (a) без ДНК-биомаркера; (b), (c) и (d) обработки ДНК-биомаркером с мутацией по одному, двум или трем основаниям (3), (4) и (5), соответственно, 1 мкМ каждого; (e) обработки (2) (1 мкМ). Во всех экспериментах Echo III (1 Ед./мкл) были включены в системы, и при этом спектры флуоресценции регистрировали по истечении фиксированного периода времени, составляющего 60 минут.

Фиг. 9А-9Е относится к открытию наночастиц мезопористого SiO₂ со шпильковыми структурами и высвобождению родамина В, RhB, с применением биомаркера аналит-ДНК в качестве активатора для раскрытия шпилек и внедрения надрезающего фермента Nb.BbvCI в качестве биокатализатора для регенерации ДНК-биомаркера (показано на фиг. 9А). На фиг. 9В показаны спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению RhB при воздействии на MP-SiO₂-NP (10 мг) различных концентраций аналита, являющегося биомаркером, в присутствии надрезающего фермента Nb.BbvCI (0,5 Ед./мкл) в течение фиксированного периода времени, составляющего 60 минут. (a) 0 нМ; (b) 50 нМ; (c) 100 нМ; (d) 500 нМ; (e) 1 мкМ; (f) 2,5 мкМ. На фиг. 9С показаны спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению RhB при воздействии на MP-SiO₂-NP (10 мг) различных концентраций надрезающего фермента Nb.BbvCI в присутствии постоянной концентрации (7) (1 мкМ) в течение фиксированного периода времени, составляющего 60 минут. (a) 0 Ед./мкл; (b) 0,05 Ед./мкл; (c) 0,1 Ед./мкл; (d) 0,5 Ед./мкл; (e) 1 Ед./мкл; (f) 2 Ед./мкл. На фиг. 9D показаны изменения флуоресценции в зависимости от времени, наблюдаемые при высвобождении RhB из MP-SiO₂-NP за счет: (a) высвобождения RhB-загруженной системой без обработки биомаркером (7) или надрезающим ферментом; (b) обработки RhB-загруженной системы только биомаркером-ДНК (7) (1 мкМ) без добавления надрезающего фермента; (c) обработки RhB-

загруженной системы только надрезающим ферментом (0,5 Ед./мкл) и без добавления (7); (d) обработки RhB-загруженных MP-SiO₂-NP (7) (1 мкМ) и надрезающим ферментом (0,5 Ед./мкл). На фиг. 9E показаны спектры флуоресценции для высвобождения RhB после обработки RhB-загруженных MP-SiO₂-NP с закрытой шпилькой: (a) без ДНК-биомаркера; (b), (c) и (d) обработки ДНК-биомаркером с мутацией по одному, двум или трем основаниям (8), (9) и (10), соответственно, 1 мкМ каждого; (e) обработки (7) (1 мкМ). Во всех экспериментах надрезающий фермент Nb.BbvCI (0,5 Ед./мкл) был включен в системы, и при этом спектры флуоресценции регистрировали по истечении фиксированного периода времени, составляющего 60 минут.

Фиг. 10A-10E относится к открытию MP-SiO₂-NP с затвором в виде шпильковой структуры и высвобождению RhB за счет раскрытия элементов затвора в виде шпильковой структуры посредством образования АТФ-аптамерного комплекса, при этом с регенерацией АТФ-биомаркера с применением Echo III (показано на фиг. 10A). На фиг. 10B показаны спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению RhB после обработки защищенных шпилькой MP-SiO₂-NP различными концентрациями АТФ в присутствии Echo III (1 Ед./мкл) в течение фиксированного периода времени, составляющего 90 минут. (a) 0 мкМ; (b) 100 мкМ; (c) 500 мкМ; (d) 1 мМ; (e) 2 мМ. На фиг. 10C показаны спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению RhB из RhB-загруженных MP-SiO₂-NP после обработки различными концентрациями Echo III и постоянной концентрацией АТФ (1 мМ) в течение фиксированного периода времени, составляющего 90 минут. (a) 0 Ед./мкл; (b) 0,1 Ед./мкл; (c) 0,5 Ед./мкл; (d) 1 Ед./мкл. На фиг. 10D показаны изменения флуоресценции в зависимости от времени после обработки RhB-загруженных MP-SiO₂-NP: (a) при отсутствии АТФ и при отсутствии Echo III; (b) в присутствии только АТФ (1 мМ) без Echo III; (c) в присутствии Echo III (1 Ед./мкл) без АТФ; (d) в присутствии АТФ (1 мМ) и Echo III (0,5 Ед./мкл). На фиг. 10E показаны исследования селективности, демонстрирующие специфическое открытие пор под действием АТФ. Спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению RhB из RhB-загруженных MP-SiO₂-NP: (a) при отсутствии АТФ; (b), (c) и (d) в присутствии УТФ, ГТФ, ЦТФ, 1 мМ каждого, соответственно; (e) в

присутствии АТФ (1 мМ). Все спектры флуоресценции регистрировали в присутствии Echo III (1 Ед./мкл) и по истечении фиксированного периода времени, составляющего 90 минут.

Фиг. 11А-11Е относится к открытию МР-SiO₂-NP с затвором в виде шпильковой структуры и высвобождению RhB за счет раскрытия элементов затвора в виде шпильковой структуры посредством образования АТФ-аптамерного комплекса, при этом с регенерацией АТФ-биомаркера с применением надрезающего фермента Nb.BbvCI (показан на фиг. 11А). На фиг. 11В показаны спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению RhB после обработки защищенных шпилькой, RhB-загруженных МР-SiO₂-NP различными концентрациями АТФ в присутствии надрезающего фермента Nb.BbvCI (0,5 Ед./мкл) в течение фиксированного периода времени, составляющего 90 минут. (а) 0 мкМ; (b) 100 мкМ; (c) 500 мкМ; (d) 1 мМ; (e) 2 мМ. На фиг. 11С показаны спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению RhB из RhB-загруженных МР-SiO₂-NP после обработки различными концентрациями надрезающего фермента Nb.BbvCI и постоянной концентрацией АТФ (1 мМ) в течение фиксированного периода времени, составляющего 90 минут. (а) 0 Ед./мкл; (b) 0,1 Ед./мкл; (c) 0,5 Ед./мкл; (d) 1 Ед./мкл. На фиг. 11D показаны изменения флуоресценции в зависимости от времени после обработки RhB-загруженных МР-SiO₂-NP: (а) при отсутствии АТФ и при отсутствии надрезающего фермента; (b) в присутствии только АТФ (1 мМ) без надрезающего фермента; (c) в присутствии надрезающего фермента (0,5 Ед./мкл) без АТФ; (d) в присутствии АТФ (1 мМ) и надрезающего фермента (0,5 Ед./мкл). На фиг. 11Е показаны исследования селективности, демонстрирующие специфическое раскрытие пор под действием АТФ. Спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению RhB из RhB-загруженных МР-SiO₂-NP: (а) при отсутствии АТФ; (b), (c) и (d) в присутствии ЦТФ, УТФ, ГТФ, 1 мМ каждого, соответственно; (e) в присутствии АТФ (1 мМ). Все спектры флуоресценции регистрировали в присутствии надрезающего фермента Nb.BbvCI (0,5 Ед./мкл) и по истечении фиксированного периода времени, составляющего 90 минут.

На фиг. 12А-12D показаны спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению СРТ при воздействии на МР-SiO₂-NP (10 мг) различных

концентраций аналита, являющегося биомаркером, в присутствии Echo III (1 Ед./мкл) в течение фиксированного периода времени, составляющего 60 минут. На фиг. 12А (а) 0 нМ; (b) 50 нМ; (c) 100 нМ; (d) 500 нМ; (e) 1 мкМ; (f) 2,5 мкМ. На фиг. 12В показаны изменения флуоресценции в зависимости от времени, наблюдаемые при высвобождении СРТ из МР-SiO₂-NP за счет: (а) СРТ-загруженной системы без биомаркера (7) или Echo III; (b) обработки СРТ-загруженной системы только биомаркером (7) (1 мкМ) без Echo III; (c) обработки СРТ-загруженной системы только Echo III (1 Ед./мкл) и без (7); (d) обработки СРТ-загруженных МР-SiO₂-NP (7) (1 мкМ) и Echo III (1 Ед./мкл). На фиг. 12С показаны спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению СРТ при воздействии на МР-SiO₂-NP (10 мг) различных концентраций аналита, являющегося биомаркером, в присутствии надрезающего фермента Nb.BbvCI (0,5 Ед./мкл) в течение фиксированного периода времени, составляющего 60 минут. (а) 0 нМ; (b) 50 нМ; (c) 100 нМ; (d) 500 нМ; (e) 1 мкМ; (f) 2,5 мкМ. На фиг. 12D показаны изменения флуоресценции в зависимости от времени, наблюдаемые при высвобождении СРТ из МР-SiO₂-NP за счет: (а) СРТ-загруженной системы без биомаркера (2) или надрезающего фермента; (b) обработки СРТ-загруженной системы только биомаркером (2) (1 мкМ) без надрезающего фермента; (c) обработки СРТ-загруженной системы только надрезающим ферментом (0,5 Ед./мкл) и без биомаркера (2); (d) обработки СРТ-загруженных МР-SiO₂-NP (2) (1 мкМ) и надрезающим ферментом (0,5 Ед./мкл).

На фиг. 13А-13D показаны спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению СРТ после обработки МР-SiO₂-NP различными концентрациями АТФ, в присутствии Echo III (1 Ед./мкл) в течение фиксированного периода времени, составляющего 90 минут. На фиг. 13А (а) 0 мкМ; (b) 100 мкМ; (c) 500 мкМ; (d) 1 мМ; (e) 2 мМ. На фиг. 13В показаны изменения флуоресценции в зависимости от времени после обработки СРТ-загруженных МР-SiO₂-NP: (а) при отсутствии АТФ и при отсутствии Echo III; (b) в присутствии АТФ (1 мМ) без Echo III; (c) в присутствии Echo III (1 Ед./мкл) без АТФ; (d) в присутствии АТФ (1 мМ) и Echo III (0,5 Ед./мкл). На фиг. 13С показаны спектры флуоресценции, соответствующие высвобождению СРТ после обработки МР-SiO₂-NP различными концентрациями АТФ в присутствии надрезающего фермента

Nb.BbvCI (0,5 Ед./мкл) в течение фиксированного периода времени, составляющего 90 минут. (a) 0 мкМ; (b) 100 мкМ; (c) 500 мкМ; (d) 1 мМ; (e) 2 мМ. На фиг. 13D показаны изменения флуоресценции в зависимости от времени после обработки СРТ-загруженных MP-SiO₂-NP: (a) при отсутствии АТФ и при отсутствии надрезающего фермента; (b) в присутствии только АТФ (1 мМ) без надрезающего фермента; (c) в присутствии надрезающего фермента (0,5 Ед./мкл) без АТФ; (d) в присутствии АТФ (1 мМ) и надрезающего фермента (0,5 Ед./мкл).

34 35

На фиг. 14А-14В показана цитотоксичность СРТ-MP-SiO₂ в отношении раковых клеток молочной железы (MDA-MB-231) по сравнению с нормальными клетками молочной железы (MCF-10a). Цитотоксичность СРТ-MP-SiO₂ в раковых клетках молочной железы (MDA-MB-231) по сравнению с нормальными клетками молочной железы (MCF-10a). На Фиг. 14А показаны микрофотографии эпифлуоресценции раковых клеток молочной железы линии MDA-MB-231 с захваченными FITC-мечеными и СРТ-загруженными MP-SiO₂-NP через различные периоды времени. (Эндоцитоз достигался за счет обработки клеточной культуры NP диоксида кремния при концентрации 150 мкг/мл, см. раздел экспериментов). Верхняя панель: зеленая флуоресценция FITC, ассоциированного с частицами, подвергавшимися эндоцитозу. Нижняя панель: синяя флуоресценция высвобождаемого СРТ в клетках. На фиг. 14В показаны результаты исследования жизнеспособности клеток в течение двух периодов времени (24 ч, 48 ч), соответствующие следующему: панель I – раковые клетки молочной железы линии MDA-MB-231; панель II - нормальные эпителиальные клетки молочной железы линии MCF-10a. (a) Клетки, не обработанные СРТ-загруженными MP-SiO₂-NP. (b) Клетки, обработанные СРТ-загруженными MP-SiO₂-NP. (c) Клетки, обработанные свободным СРТ, 20 мкг/мл. (d) Клетки, предварительно обработанные олигомицином, 25 мкг/мл, а затем СРТ-загруженными MP-SiO₂-NP.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В настоящем изобретении металл-зависимые каталитические нуклеиновые кислоты были введены в качестве функциональных инициаторов раскрытия поры

мезопористого SiO_2 и высвобождения заключенных в порах флуоресцентных субстратов. Путем смешивания двух видов гибридов мезопористого SiO_2 , которые функционализированы с применением Mg^{2+} - или Zn^{2+} -зависимых ДНКзимов, в качестве закупоривающих единиц, которые запирают в порах два различных флуорофора, демонстрируется селективное (или мультиплексное) высвобождение флуорофора соответствующими субстратами.

Кроме того, было показано, что комбинированные структуры ДНК, состоящие из Mg^{2+} - или Zn^{2+} -последовательностей, блокируют краситель (заключенные субстраты) в двух типах пор мезопористых материалов. Раскрытие пор соответствующими ДНКзимами происходит только после совместного образования комплексов аптамер-субстрат или мостиков между металлическим ионом и нуклеиновой кислотой, процессов, которые запускают образование активных структур ДНКзима. Поскольку поры раскрываются в присутствии специфических ионов (Mg^{2+} , Zn^{2+}) или после совместного включения аптамерного субстрата (АТФ) или добавленных одновременно ионов металла (Hg^{2+}) эти дополнительные компоненты рассматриваются в качестве входных сигналов для логических операций, инициированного раскрытия пор и высвобождения заключенных субстратов в качестве выходных сигналов этих логических операций.

Наночастицы мезопористого SiO_2 (350-400 нм в диаметре), получали в соответствии со способом, представленным в публикации [51]. Диаметр пор, по оценкам, составлял 3 нм, и площадь поверхности мезопористого композита соответствовала $632,8 \text{ м}^2/\text{г}$, а средний объем пор составлял $7,2 \times 10^{-2} \text{ см}^3/\text{г}$. NP были функционализированы с применением тиолированной последовательности, содержащей рибонуклеотидные основания (1), в соответствии с фиг. 1А. (1) соответствует последовательности субстрата Mg^{2+} -зависимого ДНКзима, (MP-SiO₂-А)-последовательности и субстрата Zn^{2+} -зависимого ДНКзима (MP-SiO₂-В). MP-SiO₂-А был введен во взаимодействие с метиленовым синим, MB⁺, (2), в качестве гостевого субстрата, тогда как MP-SiO₂-В обрабатывали раствором тионина, Th⁺, (3), чтобы загрузить мезопористые наночастицы, соответственно. Заполненный MB⁺ MP-SiO₂-А и заполненный Th⁺ MP-SiO₂-В затем обрабатывали соответствующими Mg^{2+} и Zn^{2+} -зависимыми последовательностями ДНКзимов (4)

и (5), соответственно. Гибридизация последовательностей ДНКзимов (4) и (5) с (1)-функционализированными частицами приводила к формированию дуплексных структур, которые удерживали красители MB⁺ или Th⁺ в порах MP-SiO₂-A или MP-SiO₂-B, соответственно. Получаемые в результате SiO₂-NP тщательно промывали чтобы удалить любые элементы MB⁺ или Th⁺, связанные с поверхностными доменами снаружи пор (см. фиг. 2S). Получаемые в результате NP сохраняли темный цвет диссоциирующих красителей, свидетельствуя о том, что красители заключены в поры MP-SiO₂ в конфигурациях “замков”.

На фиг. 1B показан принцип ион-опосредованного, селективного высвобождения красителей MB⁺ или Th⁺ из соответствующих контейнерных матриц MP-SiO₂. В присутствии либо Mg²⁺, либо Zn²⁺-ионов активный Mg²⁺-или Zn²⁺-зависимый ДНКзим был получен на (4)-MP-SiO₂-A или (5)-MP-SiO₂-B, соответственно. Это приводило к расщеплению субстратов (4) и/или (5), соответственно, с последующей диссоциацией дуплексных пробков ДНК и высвобождением MB⁺ или Th⁺, соответственно.

На Фиг. 2A, показана флуоресценция MB⁺, наблюдаемая в основном растворе по истечении фиксированного периода времени продолжительностью 60 минут после обработки (1)/(4)-функционализированным MP-SiO₂-A с различными концентрациями Mg²⁺. По мере повышения концентрации Mg²⁺, флуоресценция MB⁺, образующаяся в основном растворе, по мере его высвобождения из пор, усиливается. На фиг. 2B показана получаемая в результате калибровочная кривая, указывающая на то, что при концентрации Mg²⁺, составляющей приблизительно 10 мМ, высвобождение MB⁺ из пор достигает значения насыщения. При помощи изображенной на фиг. 2C кривой (a) показываются находящиеся в зависимости от времени изменения флуоресценции после обработки (1)/(4)-функционализированного MP-SiO₂-A ионами Mg²⁺ (10 мМ). Флуоресценция в основном растворе повышается со временем и достигает значения насыщения приблизительно через 60 минут. Для сравнения при помощи показанной на фиг. 2C кривой (b) демонстрируют находящиеся в зависимости от времени изменения флуоресценции в растворе после обработки (1)/(4)-модифицированного MP-SiO₂-A в отсутствие Mg²⁺. Изменения флуоресценции были существенно ниже, и они могут объясняться десорбцией остаточного MB⁺ с

поверхностного домена на внешней стороне пор, или медленным вытеканием $MВ^+$ из не полностью заблокированной поры. На основании интенсивности флуоресценции, полученной в системе (1)/(4)-MP-SiO₂-A через 60 минут после высвобождения $MВ^+$ и с применением соответствующей калибровочной кривой, по нашим оценкам, приблизительно 2,7 мкмоль/г SiO₂ NP $MВ^+$ высвобождалось путем ДНКзим-опосредованного расщепления закупоривающих единиц. На фиг. 2D показаны находящиеся в зависимости от времени изменения флуоресценции после обработки (1)/(4)-модифицированных MP-SiO₂-A NP ионами различных металлов. Очевидно, что селективность была продемонстрирована, и что только в присутствии Mg^{2+} можно наблюдать повышение флуоресценции в основном растворе, в результате высвобождения $MВ^+$ из пор. Эти результаты показывают, что Mg^{2+} -зависимый ДНКзим отщепляет запирающие дуплексные элементы ДНК, что обеспечивает возможность высвобождения $MВ^+$ из пор. Особенно интересным является продемонстрированная селективность, указывающая на то, что композит (1)/(4)-MP-SiO₂-A является нечувствительным к Zn^{2+} . Это обеспечивает возможность выборочной активации (1)/(5)-MP-SiO₂-B за счет ионов Zn^{2+} и высвобождения тионина из этого композита.

Сходные результаты были продемонстрированы с применением (1)/(5)-функционализированного заключенного тионина, Th^+ , (3). На фиг. 3А показаны интенсивности флуоресценции Th^+ в основном растворе после обработки (1)/(5)-функционализированных MP-SiO₂-B NP различными концентрациями Zn^{2+} -ионов, в течение фиксированного периода времени, составляющего 40 минут. По мере повышения концентрации ионов Zn^{2+} усиливается флуоресценция в основном растворе, в соответствии с усилением высвобождения Th^+ из пор. Получаемая в результате калибровочная кривая показана на фиг. 3В, указывая на то, что уровни флуоресценции приближаются до значений насыщения при концентрации Zn^{2+} приблизительно 5 мМ. При помощи показанной на фиг. 3С кривой (а) демонстрируют находящиеся в зависимости от времени изменения флуоресценции после обработки (1)/(5)-MP-SiO₂-B в присутствии Zn^{2+} , 5 мМ, в то время как при помощи приведенной на фиг. 4С кривой (b) показываются находящиеся в зависимости от времени изменения флуоресценции в отсутствие ионов Zn^{2+} . Очевидно, находящиеся в зависимости от времени изменения

флуоресценции примерно в 4,2 раза выше при активации высвобождения Th^+ Zn^{2+} -зависимым ДНКзимом по истечении периода времени продолжительностью 40 минут. Исходя из полученных значений интенсивности флуоресценции и с применением соответствующей калибровочной кривой, мы рассчитываем, что около 3,9 мкмоль/г SiO_2 NP Th^+ высвобождалось из пор. Находящиеся в зависимости от времени изменения флуоресценции в отсутствие Zn^{2+} -ионов объясняются утечкой Th^+ из пор из-за неполного блокирования пор (1)/(5)-дуплексами и/или остаточными количествами Th^+ , которые десорбируются из отличного от поры домена на наночастицах. Усиленное высвобождение Th^+ из пор продолжается только в присутствии ионов Zn^{2+} , а все другие дополнительные ионы (кроме ионов Pb^{2+}) не влияют на высвобождение Th^+ из пор, фиг. 3D. Интерференция Pb^{2+} по отношению к селективному раскрытию пор может быть устранена путем добавления 2,6-пиридин-дикарбоновой кислоты (PDCA), которая действует в качестве селективного лиганда для связывания ионов Pb^{2+} .

В присутствии PDCA Pb^{2+} -индуцированное раскрытие пор устраняется, в то время как инициированное Zn^{2+} -ионами раскрытие пор не меняется. Таким образом, можно сделать вывод, что Zn^{2+} -зависимый ДНКзим активирует только высвобождение Th^+ из (1)/(5)-MP-SiO₂-B контейнера. Обработка смеси, состоящей из заполненных MB^+ (1)/(4)-MP-SiO₂-A NP и заполненных Th^+ (1)/(5)-MP-SiO₂-B NP ионами Mg^{2+} и Zn^{2+} приводила к высвобождению MB^+ и Th^+ из двух видов контейнеров наночастиц. Соответственно, ионы Mg^{2+} и Zn^{2+} считаются входными сигналами для активации работы логического элемента "И", фиг. 4. Получение двойственной флуоресценции MB^+ и Th^+ рассматривается как "истинный" выходной сигнал, "1". Таким образом, в отсутствие какого-либо входного сигнала (0,0) наблюдается только очень низкая флуоресценция, выходной сигнал "0", фиг. 4A. В присутствии ионов Mg^{2+} или Zn^{2+} , входных сигналов (1,0) или (0,1), генерируется только один интенсивный выходной сигнал флуоресценции MB^+ или Th^+ (выход "0"), фигура 4 (B) и (C). В присутствии ионов Mg^{2+} и Zn^{2+} наблюдались интенсивные полосы флуоресценции двух красителей MB^+ и Th^+ , порождая выходной сигнал "1", фиг. 4D, логический элемент "И".

Активность металл-зависимых ДНКзимов контролируется консервативными последовательностями оснований в петлях “шпильках”, которые связывают ионы соответствующих металлов, и консервативными последовательностями для связывания субстратов ДНКзима. Было показано, что встраивание чужеродных оснований в специфичные по отношению к последовательностям петли ДНКзимов приводит к нарушению сродства для связывания петель по отношению к ионам металла, предположительно, из-за гибкости добавленных цепей оснований, что приводит к снижению активности ДНКзима. Таким образом, ожидается, что встраивание гибких чужеродных олигонуклеотидных последовательностей в последовательности в виде петель, обладающие специфичностью к Mg^{2+} или Zn^{2+} , нарушают активность ДНКзима. Программирование этих дополнительных чужеродных последовательностей на связывание вспомогательных субстратов/ионов металла (например, за счет формирования петель или дуплексов), однако, может придавать жесткость последовательности ДНКзимов в виде петли, таким образом, восстанавливая их биокаталитическую активность. То есть, программирование последовательностей аптамеров или межцепочечных последовательностей связывания металлов в петлях ДНКзима, предусматривает возможность аллостерической активации ДНКзимов посредством формирования комплексов аптамер-субстрат или стабилизированных ионами металла дуплексов. Эта концепция была реализована на практике, чтобы повлиять на высвобождение MV^{+} из загруженного MV^{+} $MP-SiO_2$ посредством содействующего АТФ-аптамерного комплекса, или посредством активации Mg^{2+} -зависимого ДНКзима с участием тимин- Hg^{2+} -тимина. На фиг. 5А схематично изображена наноструктура нуклеиновой кислоты, которая приводит к управляемой АТФ сборке Mg^{2+} -зависимого ДНКзима с последующим высвобождением MV^{+} из пор. Нуклеиновая кислота (6) включает последовательность оснований, характерную для Mg^{2+} -зависимого ДНКзима, и встроенную последовательность, состоящую из последовательности АТФ-связывающего аптамера. Ожидается, что при гибридизации (6) и (1)-функционализованного $MS-SiO_2$ образуется гибкая структура петли, демонстрирующая низкое сродство к связыванию Mg^{2+} , что, таким образом, ведет к формированию неэффективного катализатора для расщепления (1) и

высвобождения заключенного в порах MB⁺. В присутствии АТФ ожидается, что домен аптамера будет сворачиваться с формированием шпилькового комплекса аптамер-АТФ, что приводит к повышению жесткости последовательности ДНКзима и к пространственной близости оснований, связанных с последовательностью ДНКзима. При таких условиях, мы ожидаем, что будет продолжаться эффективное связывание Mg²⁺ с петлей ДНКзима. Это активирует расщепление ДНКзима (1) и в то же время приведет к высвобождению MB⁺ из пор.

Соответствующим образом, MB⁺ заключался в поры (1)-модифицированных MP-SiO₂ NP посредством гибридизации (6) с (1), с применением (1)/(6) наноструктур в качестве заглушек для поры. Изображенная на фиг. 5B кривая (a) показывает спектры флуоресценции MB⁺ в основном растворе после перемешивания запертых (1)/(6)-MB⁺ MP-SiO₂ NP в течение 90 минут, в водном растворе. Наблюдается полоса низкой флуоресценции MB⁺, которая относится на счет утечки MB⁺ из пор и частичной десорбции следов MB⁺, связанных с отличными от пор доменами. При помощи изображенной на фиг. 5B кривой (b) показывают интенсивность флуоресценции, генерируемой системой в присутствии добавленного АТФ. Не наблюдается никакого эффекта АТФ на получаемую в результате флуоресценцию, указывая на то, что АТФ сама по себе не оказывает никакого влияния на раскрытие пор. В присутствии Mg²⁺, но без добавления АТФ, генерируемая системой флуоресценция повышается на 40%, фиг. 5B, кривая (c). Это значение флуоресценции следует сравнить со значением флуоресценции, генерируемой при аналогичных условиях (1)/(4)-MP-SiO₂ в присутствии Mg²⁺ (3-кратное усиление флуоресценции). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что мутировавшая цепь (6), которая содержит встроенную последовательность аптамеров, проявляет низкую каталитическую активность, по-видимому в связи с гибкостью цепи (5), которая не связывается эффективно с ионами Mg²⁺. В свою очередь, добавление АТФ в систему, и в присутствии ионов Mg²⁺, приводит к эффективному высвобождению MB²⁺ из пор и высокой флуоресценции, фиг. 5B, кривая (d). Эти результаты ясно указывают, что образование АТФ-аптамерного комплекса приводит к сборке жесткой петли для связывания Mg²⁺, что приводит к получению эффективного

катализатора для расщепления (1) и открытия поры. На фигуре 5 (С) показаны находящиеся в зависимости от времени изменения флуоресценции в различных системах. Из насыщенного значения флуоресценции, генерированной АТФ-аптамер-(1)/(6)-МВ+-загруженной МР-SiO₂ системой, и с применением соответствующей калибровочной кривой, по нашим оценкам, по истечении периода времени продолжительностью 90 минут, приблизительно 1,9 мкмоль/г SiO₂ NP МВ+ высвобождались из пор. Очень сходные результаты наблюдались после введения последовательности АТФ-связывающих аптамеров в участок петли Zn²⁺-зависимого ДНКзима, (см. фиг. S3). Мы считаем, что в то время как мутировавшая последовательность Zn²⁺-ДНКзима является неэффективной в высвобождении тионина из пор MS-SiO₂, аллостерическое образование АТФ-аптамерного комплекса приводит к сборке активной петли Zn²⁺-ДНКзима, что ведет к эффективному открытию пор и высвобождению тионина.

Вышеизложенное демонстрирует аллостерическую активацию Mg²⁺-зависимого ДНКзима и Zn²⁺-зависимого ДНКзима посредством образования аптамер-субстратных комплексов, что приводит к инициированному раскрытию пор МР-SiO₂ и эффективному высвобождению МВ+ или Th+ из пор. Сходный аллостерический контроль активности ДНКзима достигался с применением ионов металла (например, Hg²⁺) в качестве промоторов. В качестве примера на фиг. 6А показана нуклеиновая кислота (7), которая включает два домена Mg²⁺-зависимого ДНКзима. Чужеродная последовательность встраивается в консервативную последовательность ДНКзима, и она содержит основания 6-тимина, способные в присутствии Hg²⁺-ионов формировать структуру шпильки с мостиками Т-Hg²⁺-Т. Таким образом, гибридизация (7) с (1)-функционализированным МР-SiO₂ приводит к закрытию МВ+ в порах матрицы. Предполагается, что увеличенная структура петли (7) и ее гибкость приведут к формированию плохой нано-среды для связывания Mg²⁺, и, таким образом, будет образован ДНКзим, неэффективный для "открытия" поры. В присутствии Hg²⁺-ионов встроенная последовательность формирует шпильковую структуру с мостиками Т-Hg²⁺-Т, и эта структура контактирует и делает более жесткой структуру петли ДНКзима. В результате, добавленные ионы Hg²⁺ аллостерически активируют структуру Mg²⁺-ДНКзима, обеспечивая, таким образом, возможность

каталитического расщепления (1), раскрытия поры и высвобождения загруженного в поры MB⁺. На фиг. 6B показаны спектры флуоресценции основного раствора при взаимодействии (1)/(7)-запертого MB⁺-MP-SiO₂ в отсутствие ионов Mg²⁺ и ионов Hg²⁺, кривая (a), или только в присутствии ионов Hg²⁺, кривая (b). Была обнаружена только остаточная флуоресценция низкой интенсивности, которая была идентичной в отсутствие или присутствие ионов Hg²⁺. Эти результаты показывают, что ионы Hg²⁺, которые взаимодействуют с (7), не способствуют высвобождению MB⁺ из пор. Обработка (1)/(7)-MB⁺-заполненного MS-SiO₂ ионами Mg²⁺ в отсутствие Hg²⁺, приводит к очень низкому увеличению флуоресценции основного раствора, фиг. 6 (B), кривая (c), указывая на то, что поры еще закрыты, что в результате приводит к плохому высвобождению MB⁺. В присутствии добавленных одновременно Hg²⁺-ионов и в присутствии Mg²⁺-ионов, генерируется высокая флуоресценция в основном растворе, что указывает на эффективное высвобождение MB⁺ из пор (кривая d). Находящиеся в зависимости от времени изменения флуоресценции после высвобождения MB⁺ из различных систем показаны на фиг. 6C. Таким образом, добавленные одновременно Hg²⁺-ионы выступают в качестве аллостерического активатора для Mg²⁺-зависимого ДНКзима, который катализирует расщепление (1) и высвобождение (2) из системы. На основании уровня насыщения флуоресценции, генерируемой Hg²⁺/Mg²⁺-(1)/(7) MB⁺-загруженными MP-SiO₂, фиг. 6C, кривая (d), и с применением соответствующей калибровочной кривой, мы рассчитали, что приблизительно 2,3 мкмоль/г SiO₂ NP (2) высвобождались из пор по истечении периода времени продолжительностью приблизительно 60 минут.

Также была рассмотрена модельная система Mg²⁺-индуцированного высвобождения противоракового лекарственного средства доксорубина. На фиг. 7A показано, что добавление Mg²⁺-ионов к порам (1)/(4)-закупоренного SiO₂ с заключенным в них доксорубином приводит к раскрытию пор и высвобождению лекарственного средства. Особенно интересным является совместное с АТФ синергетическое Mg²⁺-опосредованное раскрытие пор и высвобождение доксорубина. Быстрый метаболизм, который наблюдается в раковых клетках, приводит к образованию избыточных количеств АТФ, и, таким

образом, получаемая в результате АТФ может действовать в качестве активного элемента для направленного высвобождения доксорубина на раковых клетках. На фиг. 7В показано, что доксорубин, заключенный в порах за счет их закупоривания дуплексной структурой (1)/(6) не высвобождается под действием только АТФ, неэффективно высвобождается под действием только Mg^{2+} -ионов, тогда как эффективно высвобождается при добавлении и АТФ, и Mg^{2+} -ионов. То есть, связывание АТФ с последовательностью аптамера (6) приводит к повышению жесткости последовательности петли Mg^{2+} -зависимого ДНКзима, что приводит к эффективному расщеплению (1) и открытию пор.

Настоящее изобретение дополнительно относится к наночастицам мезопористого SiO_2 с ДНК в качестве затвора, MP- SiO_2 -NP, загруженным родамином В, RhВ, которые выступают в качестве "умных" материалов, проявляющих взаимосвязанные функциональные возможности "определения" и "высвобождения". Открытие элементов в виде ДНК, закупоривающих поры, достигается путем биокаталитического расщепления ДНК, и процесс открытия усиливается за счет регенерации аналита-инициатора. RhВ-загруженные MP- SiO_2 -NP закупорены шпильковыми структурами нуклеиновой кислоты, которые запирают RhВ в порах. Раскрытие шпильковых структур при помощи аналита-инициатора, являющегося нуклеиновой кислотой, или за счет образования аптамер-субстратного (АТФ) комплекса, что приводит к образованию дуплексных структур, которые расщепляются под действием экзонуклеазы III, Eho III, или надрезающего фермента, Nb.BbvCI. Это приводит к регенерации целевых аналитов, автономному открытию пор и высвобождению RhВ. Системы проявляют селективность, и при этом мутации по одному, двум или трем основаниям в ДНК-мишени или замена АТФ на другой нуклеозидтрифосфат блокируют открытие пор. По аналогии с биокаталитическим высвобождением модельных субстратов с флуорофором, противораковое лекарственное средство камптотecin, СРТ, заключалось в порах, запираемых шпильковыми структурами (1) или (11). Лекарственное средство высвобождалось из пор в присутствии нуклеиновой кислоты (2) или АТФ и Eho-III в качестве биокатализатора. Аналогичным образом, СРТ, запертый в порах шпильками (6) или (12), высвобождался из пор в присутствии АТФ и Nb.BbvCI, являющегося

нарезающим ферментом, соответственно. Были рассмотрены эффекты СРТ-загруженных MP-SiO₂-NP, закупоренных АТФ-зависимым запирающим элементом (6), на жизнеспособность раковых клеток молочной железы линии MDA-231 и нормальных клеток молочной железы линии MCF-10a. Было обнаружено, что через 48 часов наблюдалась гибель 65% раковых клеток MDA-231, тогда как для нормальных клеток этот показатель составлял только 25% клеток. Более высокий показатель гибели раковых клеток хорошо коррелирует с повышением метаболического синтеза АТФ в раковых клетках.

Кроме того, настоящее изобретение предусматривает блокирование прохождения через поры MP-SiO₂-NP при помощи функциональных нуклеиновых кислот, которые описаны в данном документе, и открытие пор за счет сочетанного эффекта распознавания/биокаталитического действия. Распознавание аналита (биомаркера) приводит к преобразованию закупоривающего элемента в новый функциональный элемент, который подвергается биокаталитическому разрезанию. Процесс разрезания приводит к фрагментированию части закупоривающей единицы и высвобождению аналита для дополнительной автономной каталитической деградации закупоривающего элемента, таким образом, с открытием пор и обеспечением высвобождения заключенного в порах материала. Таким образом, здесь представлена сборка "умных" модельных материалов, которые определяют биомаркеры, инициирующие автономное биокаталитическое открытие пор и высвобождение субстратов (аналогов лекарственных средств) из контейнеров пор. Биокаталитическая регенерация биомаркеров обеспечивает механизм усиления, при котором низкое количество биомаркеров позволяет достичь высвобождения большого количества захваченного субстрата (лекарственного средства).

Аминопропилсилоксан-MP-SiO₂-NP (300~400 нм в диаметре) получали в соответствии со способом, описанным в Chen, C.; Pu, F.; Huang, Z.; Liu, Z.; Ren, J.; Qu, X. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, 1638-1644. Мезопористые материалы характеризовались площадью поверхности, соответствующей 733 м²/г, средним диаметром пор 2-3 нм и средним объемом пор 0,19 см³/г.

На Фиг. 8 (А) показан один сочетанный процесс определения/биокаталитического открытия, в котором используются

функционализированные нуклеиновой кислотой MP-SiO₂-NP и экзонуклеаза III, Eho III, 36-38, в качестве биокатализатора регенерации биомаркера. Для биокаталитической активности Eho III требуется присутствие дуплексной структуры, и при этом она гидролитически расщепляет 3'-конец дуплексной структуры ДНК. Соответственно, 5'-конец нуклеиновой кислоты (1) был ковалентно связан с функционализированными при помощи амина MP-SiO₂-NP с применением сульфо-EMCS в качестве ковалентного сшивающего средства. Нуклеиновая кислота (1) содержит специальную последовательность оснований, которая при комнатной температуре образует шпильковую структуру, содержащую одноцепочечную петлю для распознавания биомаркера, являющегося нуклеиновой кислотой. Шпильковая структура демонстрирует, однако, низкую температуру плавления (67,3°C), и, таким образом, существует при более высоких температурах в одноцепочечной конфигурации по типу случайная спираль, а при комнатной температуре (25°C) укладывается в энергетически стабилизированную шпильковую структуру. Таким образом, поры MP-SiO₂ загружали родамином В, RhB, являющимся флуоресцентным красителем, при температуре 90°C, при которой нуклеиновая кислота (1) находится в конфигурации по типу случайная спираль. После этого системе давали охладиться до 25°C, при которой (1) укладывалась в шпильковую структуру. MP-SiO₂-NP, загруженные RhB, окрашены красителем, но флуоресцентный краситель не может быть извлечен, это означает, что краситель действительно удерживается в порах. После отмывания MP-SiO₂-NP для удаления остатков флуоресцентного красителя, связанного с внешним участком, расположенным за пределами пор. Проводится обработка (1)-закупоренных MP-SiO₂-NP нуклеиновой кислотой, являющейся аналитом (биомаркером) (2), что приводит к раскрытию шпильки с образованием дуплексной структуры. 3'-конец дуплексной структуры гидролитически "расщепляется" под действием Eho III, что приводит к укорочению (1) и высвобождению цепи аналита (биомаркера) (2). Последняя цепь раскрывает дополнительную структуру шпильки и приводит к последующему расщеплению получаемой в результате дуплексной структуры за счет гидролитического расщепления 3'-конца. То есть, аналит (биомаркер) определяется шпильковой структурой и это инициирует автономную регенерацию

аналита под действием Echo III и открытие пор с высвобождением RhB. Обратите внимание, что Echo III не воздействует на цепь анализатора (биомаркера), (2), так как предусматривается привязка одноцепочечной нуклеиновой кислоты по 3'-концу. На фиг. 8 (b) показаны значения интенсивности флуоресценции высвобождаемого RhB по истечении фиксированного периода времени, составляющего 60 минут, и в присутствии 1 Ед./мкл Echo III с применением различных концентраций анализатора-биомаркера для инициирования раскрытия пор. По мере повышения концентрации анализатора-биомаркера, увеличивается содержание высвобождаемого красителя в пределах периода времени, составляющего 60 минут, в соответствии с увеличением уровня первичного раскрытия шпилек за счет (2), что иницирует регенерацию целевого биомаркера и Echo III-стимулируемое раскрытие пор. Аналогичным образом, на фиг. 8 (C) показаны значения интенсивности флуоресценции высвобождаемого RhB в присутствии (1)-закупоренных MP-SiO₂-NP и фиксированной концентрации анализатора-биомаркера (2), 1 мкМ, после обработки различными концентрациями Echo III в течение фиксированного периода времени, составляющего 60 минут. Очевидно, что по мере повышения концентрации Echo III, увеличивается количество высвобождаемого RhB, в соответствии с повышением уровня раскрытия запертых шпилькой MP-SiO₂-NP под действием автономной регенерации целевых единиц биомаркера за счет Echo III. На фиг. 8 (D) показан уровень 7 высвобождения RhB из нескольких контрольных систем, которые содержат MP-SiO₂-NP с заключенным в них RhB. Заключенный RhB вымывается из закупоренных шпилькой пор даже в отсутствие целевого анализатора-биомаркера, кривая (a). Очень сходное вымывание RhB наблюдается в присутствии только целевого вещества или Echo III, кривые (b) и (c), соответственно. Быстрое высвобождение RhB протекает только в присутствии анализатора-мишени (1 мкМ) и Echo III (1 Ед./мкл), кривая (d). По истечении 60 минут уровень высвобождаемого RhB достигает значения насыщения. С применением соответствующей калибровочной кривой было рассчитано, что высвобождаемое количество RhB составляет приблизительно 8,5 мкмоль/г MP-SiO₂-NP. Процесс высвобождения RhB из MP-SiO₂-NP также очень чувствителен к первичному определению биомаркера-аналита. На фиг. 8 (E) показано, что при мутациях по одному, двум или трем основаниям в целевом биомаркере, цепях (3), (4) и (5),

соответственно, не наблюдается раскрытие закупоривающих шпильковых элементов и не активируется автономное расщепление закупоривающих элементов под действием Eho III. Высвобождение RhB с применением (3), (4) или (5) в качестве аналитов-биомаркеров и в присутствии Eho III происходит неэффективно и очень сходно с фоновым вымыванием RhB из каналов, фиг. 8 (D), кривые (a), (b) и (c).

Дополнительное стимулированное биокатализатором раскрытие пор MP-SiO₂, закупоренных шпильковой нуклеиновой кислотой, и высвобождение заключенного субстрата показано на фиг. 9 (A). MP-SiO₂-NP функционализируют с помощью нуклеиновой кислоты (6) путем ковалентного связывания 5'-конца нуклеиновой кислоты с MP-SiO₂-NP, функционализованными с помощью аминогрупп, с применением сульфо-EMCS в качестве сшивателя. При 90°C (6) существует в виде одонитевой цепи, в то время как при 25°C цепь стабилизируется в шпильковую структуру. Таким образом, поры MP-SiO₂-NP загружают с помощью RhB при 90°C и охлаждение системы приводит к запиранью RhB в порах шпильковой структурой. Взаимодействие закупоренных шпилькой пор с аналитом-биомаркером (7) приводит к образованию дуплексной структуры (6)/(7), которая все еще служит структурной заглушкой пор. При этом дуплексная структура (6)/(7) специально разработана таким образом, что она включает запрограммированную последовательность дуплекса для специфического надрезания одного основания в дуплексе (отмечено точкой). Надрезание цепи (6) приводит к разделению неустойчивой дуплексной структуры, что приводит к образованию ненужной нити (7) и регенерации аналита-биомаркера для вторичного раскрытия шпильки и надрезания полученной в результате дуплексной заглушки. Обратите внимание, что шпилька, образованная при сворачивании (6), не включает соответствующий дуплексный домен для осуществления надрезания, и этот домен формируется только после гибридизации аналита-биомаркера с одонитевой петлей шпильки для обнаружения. Таким образом, гибридизация аналита-биомаркера с закупоривающим шпильковым элементом запускает надрезание затворяющих пору элементов и регенерацию аналита-биомаркера для автономного высвобождения закупоривающих элементов и последующего высвобождения заключенного субстрата (RhB). Скорость

высвобождения RhB контролируется концентрацией аналита-биомаркера (7), который открывает запирающие закупоривающие шпильковые элементы. На фиг. 9(B) показаны интенсивности флуоресценции высвобожденного RhB при обработке (6)-закупоренных MP-SiO₂-NP различными концентрациями аналита-биомаркера в течение фиксированного периода времени, составляющего 60 минут, и при постоянном количестве надрезающего фермента Nb. BbvCI, составляющем 0,5 Ед./мкл. По мере повышения концентрации аналита-биомаркера усиливается флуоресценция высвобожденного RhB, что согласуется с более высокой степенью раскрытия шпильковых запирающих элементов, что усиливает раскрытие пор за счет автономного процесса надрезания/регенерации аналита. Аналогичным образом, при фиксированной концентрации аналита-биомаркера высвобождение RhB из пор контролируется концентрацией надрезающего фермента Nb.BbvCI. На фиг. 9 (C) показаны интенсивности флуоресценции высвобожденного RhB при обработке (6)-закупоренных RhB-загруженных MP-SiO₂-NP аналитом-биомаркером с постоянной концентрацией, 1 мкМ, в течение фиксированного периода времени, составляющего 60 минут, в присутствии различных количеств надрезающего фермента. По мере повышения содержания фермента увеличивается количество высвобожденного RhB, что согласуется с усилением раскрытия пор благодаря автономному биокаталитическому расщеплению закупоривающих элементов и регенерации 9 аналита-биомаркера. В присутствии 0,5 Ед./мкл надрезающего фермента интенсивность флуоресценции системы достигает значения насыщения, что означает, что в этих условиях большая часть RhB удаляется из мезопористой матрицы. Контрольные эксперименты, фиг. 9 (D), показывают, что когда (6)-закупоренные поры не взаимодействуют с надрезающим ферментом или аналитом-биомаркером, наблюдается утечка RhB, кривая (a), и аналит-биомаркер или надрезающий фермент по отдельности мало влияют на высвобождение RhB, кривые (b) и (c), соответственно. На фиг. 9 (D), кривая (d), показаны спектры флуоресценции раствора в зависимости от времени при обработке запертой шпилькой (6) MP-SiO₂-NP, которые содержат заключенный RhB, аналитом-биомаркером (7), 1 мкМ, в присутствии надрезающего фермента, 0,5 Ед./мкл. Эффективное высвобождение RhB из пор продолжается только когда

заблокированные (6)-шпилькой поры реагируют с аналитом-биомаркером и надрезающим ферментом. Изменяющееся со временем высвобождение RhB наблюдается на кривой (d), которое, как правило, достигает значения насыщения приблизительно через 60 минут. На основании значения насыщения спектра флуоресценции и с применением соответствующей калибровочной кривой было подсчитано, что количество высвобождаемого RhB составляет приблизительно 12,4 мкмоль/г MP-SiO₂-NP. Дополнительное подтверждение того, что гибридизация (7) с модифицированными шпилькой-(6) MP-SiO₂-NP приводит к надрезанию дуплексной структуры с помощью Nb.BbvCI и открытию пор благодаря высвобождению фрагментированных закупоривающих элементов, было получено в экспериментах с гель-электрофорезом, которые отслеживали фрагментированный продукт. Также, раскрытие (6)-модифицированных пор за счет сопряженного раскрытия шпилек с помощью аналита-биомаркера и автономного надрезания закупоривающих элементов с помощью точного распознавания сайтов надрезания (CCTCAGC/GGAGT▲CG) демонстрирует впечатляющую селективность, фиг. 9(E). Несовпадения одного, двух или трех оснований в аналите-биомаркере, последовательности (8), (9) и (10), соответственно, не открывают шпильковую структуру и автономное биокаталитическое удаление закупоривающих элементов с помощью надрезающего фермента не выполняется. Таким образом, в присутствии мутантных форм высвобождение RhB из поры очень напоминает собственную утечку красителя из (6)-функционализированных пор, фиг. 9(D), кривые (a), (b) и (c), соответственно.

В описанных выше системах раскрытие пор, функционализированных нуклеиновой кислотой, запускалось нитями нуклеиновой кислоты аналита-биомаркера, при этом биокаталитические реакции, стимулированные Eho III или надрезающими ферментами, обеспечивали средства для удаления закупоривающих элементов с регенерацией биомаркерных элементов. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения раскрытие пор и высвобождение заключенного субстрата (RhB) достигается за счет аптамер-субстратных комплексов и сопряженной автономной биокаталитической деградацией аптамер-субстратного комплекса, с регенерацией субстрата-

биомаркера. Одна конфигурация контролируемого высвобождения RhB из пор MP-SiO₂-NP под действием сопряженного АТФ-аптамерного комплекса и биокаталитического процесса, осуществляемого Eho III, показана на фиг. 10(A). Нуклеиновая кислота (**11**), замещающая MP-SiO₂-NP, существует при 90°C в виде случайной спиральной структуры, позволяя, таким образом, загрузку пор с помощью RhB. Поры с заключенным RhB закупориваются шпильковыми структурами, которые стабилизируются при 25°C. Шпильковые структуры (**11**) разработаны таким образом, чтобы включать последовательность аптамера (зеленый), которая конъюгирована с однонитевой последовательностью (розовый), которая обеспечивает то, что фермент Eho III не оказывает гидролитического действия на шпильковые структуры. В присутствии АТФ шпилька (**11**) открывается, и 3'-конец раскрытой шпильки разработан для формирования дуплексной структуры с 5'-доменом (**11**). То есть, образуемый АТФ-аптамерный комплекс совместно стабилизируется этим дуплексным доменом. Полученный в результате дуплекс обеспечивает, при этом, активный сайт для гидролитического расщепления под действием Eho III 3'-конца дуплекса. Этот биокаталитический процесс дестабилизирует АТФ-аптамерный комплекс, который высвобождает АТФ для вторичного раскрытия шпильковой структуры, что приводит к образованию комплекса аптамер-АТФ. Таким образом, раскрытие шпильки с помощью АТФ запускает сопряженную стимулированную Eho III регенерацию АТФ для автономного биокаталитического "расщепления" закупоривающих элементов и высвобождения заключенного RhB. На фиг. 10 (с) показаны спектры флуоресценции RhB, высвобожденного из пор, при обработке MP-SiO₂-NP АТФ с различными концентрациями, в течение фиксированного периода времени, составляющего 90 минут, и с применением постоянной концентрации Eho III, соответствующей 1 Ед./мкл. Аналогичным образом, на фиг. 10 (С) показаны спектры флуоресценции RhB, высвобожденного из MP-SiO₂-NP, при обработке NP Eho III с различными концентрациями и с применением постоянной концентрации АТФ (1 мМ) в течение фиксированного периода времени, составляющего 90 минут. Высвобождение RhB из пористого материала усиливается путем повышения или концентрации АТФ, или концентрации Eho III, что согласуется с тем фактом, что эти два компонента контролируют раскрытие

закупоривающих элементов пор. На фиг. 10 (D) показана серия контрольных экспериментов, которые были проведены с целью разъяснения функции АТФ и Echo III в контролируемом высвобождении RhB из пор. В отсутствие АТФ или Echo III наблюдается утечка RhB из пор, кривая (a). В присутствии или АТФ, или Echo III наблюдается аналогичный уровень утечки RhB, кривые (b) и (c), соответственно. Усиленное высвобождение RhB отмечается только в присутствии АТФ, 1мМ, и Echo III, 1 Ед./мкл, кривая (d), что согласуется с предполагаемым механизмом, при котором раскрытие (11)-функционализированных пор, с образованием соответствующего аптамер-субстратного комплекса, сопряжено с автономным расщеплением закупоривающих элементов и регенерацией АТФ-аналита-биомаркера. С применением калибровочной кривой было рассчитано, что количество высвобожденного RhB составляет приблизительно 9,3 мкмоль/г МР-SiO₂-NP. Наконец, контролируемое раскрытие (11)-функционализированных МР-SiO₂-NP является селективным в отношении АТФ и других нуклеотидов (УТФ, ГТФ, ЦТФ), которые не вызывают раскрытия пор, фиг. 10 (E).

Сопряженное каталитическое раскрытие пор с участием нуклеиновой кислоты/надрезающего фермента, способ с применением аптамер-субстратного комплекса/надрезающего фермента применяли для управления автономным раскрытием пор для контролируемого высвобождения RhB, фиг. 11 (A). МР-SiO₂-NP модифицировали с помощью (12) и загружали RhB при температуре 90°C. При охлаждении системы до 25°C одонитевая молекула стабилизирует шпильковые структуры, которые закупоривают RhB в порах. Стеблевой участок шпильки не содержит последовательность-специфический домен, который будет надрезаться в сайтах распознавания надрезающего фермента Nb.BbvCI (CCTCAGC/GGAGT▲CG). Образование АТФ-аптамерного комплекса перестраивает шпильковую структуру в новую структуру, которая содержит домен для надрезания. Фрагментация стеблевого участка АТФ-аптамерного комплекса приводит к высвобождению большого фрагмента последовательности аптамера, что приводит к высвобождению АТФ из фрагментированной последовательности. Рециклированный комплекс АТФ-биомаркер открывает все дополнительные шпильковые закупоривающие элементы, таким образом, запуская автономное раскрытие пор и высвобождение RhB, за счет циклического

сопряженного раскрытия шпильковых элементов с помощью АТФ, образования АТФ-аптамерного комплекса, последующей фрагментацией (GGAGT▲CG) последовательности аптамера, стимулированной надрезающим ферментом, и рециклирования комплекса АТФ-биомаркер. На фиг. 11(B) показаны спектры флуоресценции высвобожденного RhB при обработке (12)-закупоренных RhB-загруженных MP-SiO₂-NP и постоянной концентрации надрезающего фермента, 0,5 Ед./мкл, в присутствии АТФ с различной концентрацией в течение фиксированного периода времени, составляющего 90 минут. По мере повышения концентрации АТФ повышается интенсивность флуоресценции высвобожденного RhB. Эти результаты согласуются с тем фактом, что при более высокой концентрации АТФ автономное раскрытие пор под действием АТФ является повышенным и сопряженное образование АТФ-аптамерного комплекса и его фрагментация с помощью надрезающего фермента усиливаются. На фиг. 11(C) показаны интенсивности флуоресценции высвобожденного RhB при обработке RhB-загруженных MP-SiO₂-NP АТФ с фиксированной концентрацией, 1 мМ, и надрезающим ферментом Nb.BbvCI с различными концентрациями в течение фиксированного периода времени, составляющего 90 минут. По мере повышения концентрации надрезающего фермента увеличивается высвобождение RhB, что согласуется с усиленным раскрытием пор. На фиг. 11(D) показаны изменения флуоресценции 13 в зависимости от времени при высвобождении RhB под действием сопряженного раскрытия пор за счет АТФ/надрезающего фермента по сравнению с контрольными системами. Поскольку (12)-модифицированные MP-SiO₂-NP проявляют собственную утечку RhB, кривая (a), присутствие только АТФ или надрезающего фермента незначительно влияет на процесс утечки, кривые (b) и (c), соответственно. Только комбинирование АТФ, 1 мМ, и надрезающего фермента Nb.BbvCI, 0,5 Ед./мкл, в качестве условия существенного усиления высвобождения RhB, кривая (d), согласуется с предполагаемым механизмом. С применением калибровочной кривой было рассчитано, что количество высвобожденного RhB составляет приблизительно 14,1 мкмоль/г MP-SiO₂-NP. На фиг. 11(E) показано селективное запускаемое АТФ высвобождение RhB из (12)-функционализированных MP-SiO₂-NP с применением соответствующего АТФ-аптамерного комплекса и надрезающего фермента в

качестве биокатализатора. Высвобождение RhB в присутствии нуклеотидов ЦТФ, УТФ и ГТФ очень напоминает собственную утечку RhB из MP-SiO₂-NP, которая наблюдается в отсутствие АТФ/надрезающего фермента, фиг. 11D, кривые (a), (b) и (c) относительно (d).

Этот вариант осуществления был дополнительно расширен за счет демонстрации того, что запускаемое нуклеиновой кислотой или запускаемое АТФ высвобождение противоракового лекарственного средства камптотецина, СРТ, может быть стимулировано экзонуклеазой III или надрезающим ферментом, Nb.BbvCI, опосредующими открытие пор. Кроме того, описано эффективное внутриклеточное высвобождение СРТ в клетках рака молочной железы и было проведено сравнение эффективности открытия пор и высвобождения СРТ в клетках рака молочной железы и нормальных клетках молочной железы и эффект в отношении гибели клеток для этих клеток. На фиг. 12(A) показана интенсивность флуоресценции высвобожденного СРТ после обработки MP-SiO₂-NP с запертым с помощью (1) СРТ различными концентрациями целевой ДНК, (2), в присутствии Eho III в течение фиксированного периода времени, составляющего 60 минут. По мере повышения концентрации целевой ДНК флуоресценция усиливается, указывая на высвобождение большего количества СРТ из пор. На фиг. 12(B) показано изменение флуоресценции в зависимости от времени при высвобождении СРТ из (1)- запертых MP-SiO₂-NP. Соответствующие контрольные эксперименты показаны на фиг. 12(B), кривые (a) – (c). Очевидно, что эффективное высвобождение СРТ наблюдается только при открытии пор с помощью (2) и деградации запирающих участков под действием Eho III, кривая (d). Сходные результаты наблюдаются при высвобождении СРТ из (6)-запертых MP-SiO₂-NP с применением целевой ДНК (7) и надрезающего фермента Nb.BbvCI, в качестве механизма раскрытия, фиг. 12(C) и (D). Аналогичным образом, были изучены стимулированное АТФ раскрытие и высвобождение СРТ из пор в присутствии Eho III или надрезающего фермента. На фиг. 13(A) показаны спектры флуоресценции, наблюдаемые при обработке (11)-закупоренных MP-SiO₂-NP, которые включают заключенный в порах СРТ, различными концентрациями АТФ и Eho III в течение фиксированного периода времени, составляющего 90 минут. По мере повышения концентрации АТФ

повышается количество высвобожденного СРТ, что согласуется с усиленным высвобождением СРТ из пор. С применением соответствующей калибровочной кривой было рассчитано, что по истечении периода времени, составляющего 90 минут, высвобождается приблизительно 10,8 мкмоль/г МР-SiO₂-NP СРТ. На фиг. 13(B) показано изменение флуоресценции в зависимости от времени при высвобождении СРТ из (11)-закупоренных МР-SiO₂-NP. Аналогичным образом, на фиг. 13(C) и (D) показано высвобождение СРТ из (12)-запертых пор в МР-SiO₂-NP с применением АТФ в качестве модификатора системы "контейнер-ключи" посредством образования соответствующих АТФ-аптамерных закупоривающих элементов и раскрытия пор путем деградации АТФ-аптамерных комплексов под действием надрезающего фермента. По мере повышения концентрации АТФ усиливается высвобождение СРТ, что согласуется с увеличением содержания комплексов аптамер-АТФ и их расщеплением под действием надрезающего фермента, Nb.BbvCI. Скорость высвобождения СРТ из пор в соответствующих контрольных экспериментах, фиг. 13(D), кривые (a) – (c), и в присутствии надрезающего фермента, фиг. 13(D), кривая (d), указывает на то, что СРТ, заключенный в (12)-запертых порах, эффективно высвобождается только в присутствии биомаркера и надрезающего фермента. На основании соответствующей калибровочной кривой было рассчитано, что приблизительно 13,4 мкмоль/г МР-SiO₂-NP высвобождалось из пор по истечении периода времени, составляющего приблизительно 90 минут.

Концепция открытия пор МР-SiO₂-NP и высвобождения из них СРТ путем трансформации системы "контейнер-ключи" с помощью ДНК или АТФ-биомаркеров в новые функциональные элементы, которые открывают с помощью биокаталитических процессов (Eco III или Nb.BbvCI), была сформулирована в качестве общего подхода для контроля доставки лекарственного средства и регулирования гибели клеток. В частности, более высокий метаболизм в раковых клетках приводит к высокому содержанию АТФ и, таким образом, он может представлять собой химический пусковой механизм для селективного раскрытия пор в раковых клетках. Тогда было сделано предположение, что усиленное высвобождение химиотерапевтического лекарственного средства, СРТ, в раковых

клетках приводит к более высокому показателю гибели раковых клеток по сравнению с нормальными клетками.

Было исследовано возможное запускаемое АТФ высвобождение СРТ из (11)-запертых MP-SiO₂-NP и эффект данного высвобожденного СРТ в отношении гибели соответствующих клеток. На первом этапе была исследована возможная цитотоксичность MP-SiO₂-NP в отношении клеток. Внешняя поверхность ДНК-запертых NP была функционализована с помощью флуоресцеинизотиоцианата (FTIC), и клетки MDA-MB-231 (клетки рака молочной железы), MCF-10A (нормальные клетки молочной железы) подвергали воздействию флуоресцеин-меченных NP. Наблюдали быстрый эндоцитоз в клетки, тогда как цитотоксический эффект не обнаруживали. На следующем этапе мы воспользовались тем, что в раковых клетках присутствует EndoG1, и он проявляет активность экзонуклеазы типа Eho III. MP-SiO₂-NP загружали СРТ и лекарственное средство запирали в порах с помощью АТФ-чувствительной шпильки (11). Клетки рака молочной железы MDA-MB-231 и нормальные клетки молочной железы MCF-10A подвергали воздействию СРТ-загруженных MP-SiO₂-NP. На фиг. 14 показана особенности флуоресценции клеток MDA-MB-231, и жизнеспособность двух типов клеток после 48 часов обработки с помощью MP-SiO₂-NP. На фиг. 14 (A) показаны особенности флуоресценции клеток MDA-MB-231, обработанных СРТ-загруженными NP, в зависимости от времени. Уже через 24 часа клетки проявляют зеленую флуоресценцию, соответствующую флуоресцеиновым меткам, связанным с NP, и эта флуоресценция преобладает даже через 48 часов. Это означает, что наночастицы включились в клетки. Синяя флуоресценция, соответствующая незапертому СРТ, не наблюдается через 24 часа, демонстрирует слабую флуоресценцию через 30 часов и эта флуоресценция усиливается по истечении периода времени, составляющего 48 часов, что указывает на то, что после этого интервала времени СРТ высвобождался в клетки. На панелях I и II фиг. 14 (B) обобщен эффект СРТ-загруженных NP в отношении жизнеспособности клеток (панель I - клетки рака молочной железы MDA-MB-231, панель II - нормальные клетки молочной железы MCF-10A). Представлены соответствующие системы контроля. Исходя из результатов можно понять, что приблизительно 65% раковых клеток

подвергаются гибели клеток через 48 часов по сравнению с контролем, не обработанным СРТ (компонент (а) по сравнению с (b)), в то время как только 25% нераковых клеток подвергались гибели клеток в течение этого периода (48 часов). В дополнительном контрольном эксперименте две культуры клеток подвергали действию олигомицина после обработки с помощью СРТ-загруженных МР-SiO₂-NP. Олигомицин действует как супрессор проходящего под действием АТФазы синтеза АТФ43, и, следовательно, АТФ-стимулированное высвобождение СРТ в раковых клетках должно подавляться в присутствии олигомицина. Действительно, на панели I фиг. 14 (B) (сравните компоненты (b) и (d)) показано, что в присутствии олигомицина наблюдали гибель только 50% клеток по сравнению с 65% в отсутствие супрессора синтеза АТФ. Эти результаты согласуются с тем, что высокий метаболический синтез АТФ в раковых клетках приводит к повышению раскрытия МР-SiO₂-NP и к эффективному высвобождению СРТ, который приводит к гибели клеток.

Пример I - SiO₂-наночастицы для ДНКзим-индуцированного мультиплексированного высвобождения субстратов

Материалы

Тетраэтилортосиликат (TEOS), (3-аминопропил)триэтоксисилан (APTES) и 2,6-пиридиндикарбоновую кислоту (PDCA) приобретали у Aldrich. Сложный N-(ε-малеимидокапроилокси)-сульфосукцинимидный эфир (сульфо-EMCS) приобретали у Pierce Biotechnologies. Гексадецилтриметиламмония бромид (СТАВ), метиленовый синий (MB⁺), тионин (Th⁺), доксорубицина гидрохлорид, натриевую соль 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновой кислоты (HEPES), магния (II) хлорид, цинка (II) ацетата дигидрат, свинца (II) ацетата тригидрат, кальция (II) ацетата гидрат, стронция (II) хлорида гексагидрат, бария (II) карбонат, меди (II) хлорид, кобальта (II) ацетата тетрагидрат, марганца (II) карбонат, никеля (II) ацетата тетрагидрат, железа (II) сульфата гептагидрат и ртути (II) ацетат приобретали у Sigma. В экспериментах применяли сверхчистую воду из системы NANOpure Diamond (Barnstead Int., Дубук, Айова). Все олигонуклеотидные последовательности ДНК приобретали у Integrated DNA Technologies Inc. (Коралвилль, Айова). После разбавления тиол-меченной РНК-

последовательности (1) с помощью раствора буфера HEPES (20 mM, pH 7,0) раствор восстанавливали с применением 0,1 M дитиотреитола (DTT) и хранили при температуре -20 °C, затем очищали в колонках Illustra™ MicroSpin™ G-25 (GE Healthcare) перед использованием.

Применяли следующие нуклеиновые кислоты:

(1) 5'-SH(CH₂)₆CAACAACATrAGGACATAGAAGAAGAAG-3' (SEQ № 1)

(4) 5'-CTTCTTCTTCTATGTCAGCGATCCGGAACGGCACCCATGTTGTTGTTG-3' (SEQ № 2)

(5) 5'-CTTCTTCTTCTATGTCTCCGAGCCGGTCGAAATGTTGTTG-3' (SEQ № 3)

(6) 5'-CTTCTTCTTCTATGTCAGCGATCCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGCACCCATGTTGTTGTTG-3' (SEQ № 4)

(7) 5'-CTTCTTCTTCTATGTCAGCGATCTTTTCGGAACGTTTAGCACCCATGTTGTTGTTG-3' (SEQ № 5)

(8) 5'-CTTCTTCTTCTATGTCTCATGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGTCGA AATGTTGTTG-3' (SEQ № 6)

Оборудование

Измерения флуоресценции выполняли с применением устройства Cary Eclipse (Varian Inc.). Длины волн возбуждения красителей MB⁺, Th⁺ и доксорубина составляли 663 нм, 600 нм и 494 нм, соответственно. Спектры поглощения в УФ- и видимой областях регистрировали с применением спектрофотометра Shimadzu UV-2401. SEM-изображения получали с применением сканирующего электронного микроскопа Magellan 400L.

Синтез наночастиц мезопористого диоксида кремния

NP мезопористого SiO₂, функционализированные с помощью аминогрупп, получали в соответствии с Chen, C.; Pu, F.; Huang, Z.; Ren, J.; Qu, X. Nucleic Acid Res. 2011, 39, 1638. Полученные в результате NP осаждали, промывали дистиллированной водой и метанолом и высушивали на воздухе. Чтобы удалить N-цетилтриметиламмония бромид (СТАВ) SiO₂-NP нагревали с обратным холодильником в течение 16 ч. в растворе, состоящем из HCl (37%, 1 мл) и метанола (80 мл), а затем интенсивно промывали дистиллированной водой и метанолом. Полученные в результате не содержащие СТАВ NP мезопористого SiO₂, функционализированные аминогруппами, хранили в вакууме для удаления оставшегося растворителя из пор.

Загрузка красителей

Монодисперсные SiO₂-NP получали следующим образом: 10 мг NP диоксида кремния погружали в 950 мкл буфера HEPES (20 mM, pH 7,0) и обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин. Осуществляли реакцию раствора с 50 мкл сульфо-EMCS (10 мг/мл) и полученную в результате смесь перемешивали в течение 30 мин. Чтобы удалить избыток EMCS NP мезопористого SiO₂ осаждали с применением центрифугирования при 10000 об./мин. в течение 3 минут и снова растворяли в 950 мкл буфера HEPES (20 mM, pH 7,0). Осуществляли реакцию очищенных SiO₂-NP с 50 мкл тиолированного олигонуклеотида ((1), 1 mM) и полученный в результате раствор перемешивали в течение 2 часов. После модификации избыток ДНК удаляли осаждением NP диоксида кремния, как описано выше. Количественное определение остаточной РНК производили с помощью спектроскопии в УФ и видимой области, и ее содержание составляло 38 нмоль, что соответствовало 1,2 мкмоль/г SiO₂-NP. Затем очищенные частицы растворяли в 900 мкл буфера HEPES (20 mM, pH 7,0), содержащего 500 mM NaCl, к которому добавляли 100 мкл красителя (1 mM MB⁺, Th⁺ или доксорубицина), и полученный в результате раствор встряхивали в течение ночи. После загрузки красителя раствор инкубировали с 50 мкл комплементарной ДНК (1 mM ДНК (4), (5), (6), (7) или (8), соответственно) и полученную в результате смесь встряхивали в течение 2 ч. Закупоренные ДНК NP мезопористого SiO₂, полученные с помощью этой процедуры, промывали восемь раз с применением буфера HEPES (20 mM, pH 7,0), содержащего 500 mM NaCl, до достижения слабого фона, чтобы удалить любой физически адсорбированный краситель с поверхности SiO₂-частиц. Этапы промывки контролировали по спектру поглощения красителя в ходе процесса. Загружаемое количество MB⁺ или Th⁺ в SiO₂-NP, модифицированные Mg²⁺- или Zn²⁺-зависимым ДНКзимом, согласно приблизительным расчетам составляло 6,3 мкмоль/г или 7,5 мкмоль/г SiO₂-NP, соответственно.

Высвобождение красителей

Для контроля процесса высвобождения красителя из NP мезопористого SiO₂ в присутствии ионов Mg²⁺ или Zn²⁺, частицы суспендировали в 1 мл буфера HEPES (20 mM, pH 7,0), содержащего 500 mM NaCl, и разделяли на пять аликвот, объемом по 190 мкл. К этим образцам добавляли различные ионы при переменной концентрации и встряхивали в течение 1 часа или 40 минут в случае ионов Mg²⁺ или Zn²⁺, соответственно. Спектры флуоресценции образцов регистрировали после осаждения. Для проверки процесса высвобождения красителя из АТФ- или Hg²⁺-стимулируемых ДНКзим-зависимых SiO₂-NP разделенные на пять образцов по 190 мкл NP мезопористого SiO₂, растворяли в 1 мл буфера HEPES (20 mM, pH 7,0), содержащего 500 mM NaCl и 20 mM Mg²⁺ или 10 mM Zn²⁺. Осуществляли реакцию SiO₂-NP с 10 мкл АТФ (2 mM) или ионами Hg²⁺ (20 мкМ). Полученные в результате растворы встряхивали в течение 90 минут или 1 часа в случае добавления АТФ или ионов Hg²⁺, соответственно. Затем производили измерения спектров флуоресценции образцов после осаждения SiO₂-NP.

Пример II - Усиленное биокаталитическое высвобождение субстратов из закупоренного нуклеиновыми кислотами мезопористого SiO₂ с применением ДНК или молекулярных биомаркеров в качестве запускающих стимулов

Материалы

Тетраэтилоксисиликат (TEOS), (3-аминопропил)триэтоксисилан (APTES) и родамин В (RhB) приобретали у Aldrich. Сложный N-(ε-малеимидакапроилокси)-сульфосукцинимидный эфир (сульфо-EMCS) приобретали у Pierce Biotechnologies. Гексадецилтриметиламмония бромид (СТАВ) и натриевую соль 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновой кислоты (HEPES) приобретали у Sigma. Экзонуклеазу III (Exo III), NEBuffer 1, надрезающий фермент Nb.BbvCI и NEBuffer 2 приобретали у New England Biolabs. Камптотецин (CPT), олигомицин, аденозин 5'-трифосфат (АТФ), уридин 5'-трифосфат (УТФ), цитидин 5'-трифосфат (ЦТФ) и гуанозин 5'-трифосфат (ГТФ) приобретали у Sigma-Aldrich. Все остальные применяемые химические вещества были аналитического класса чистоты и их применяли в таком виде, в котором их получали, без какой-либо

дополнительной очистки. В экспериментах применяли сверхчистую воду из системы NANOpure Diamond (Barnstead Int., Дубук, Айова). Все олигонуклеотидные последовательности ДНК приобретали у Integrated DNA Technologies Inc. (Коралвилль, Айова). Олигонуклеотиды применяли в таком виде, в котором они поставлялись, и разбавляли в водном растворе.

Сайт распознавания надрезающего фермента Nb.BbvCI является следующим.



Последовательности олигомеров являются следующими:

(1) 5'-SH(CH₂)₆ CAA GGG CAG AAG TCT TCA CTG CCC TTG CAC АСТ-3' Т.п.=67,3°C (SEQ № 7)

(2) 5'-AGT GTG CAA GGG CAG TGA AGA CTT GAT TGT-3' (SEQ № 8)

(3) 5'-AGT GTG CAA GAG CAG TGA AGA CTT GAT TGT-3' (SEQ № 9)

(4) 5'-AGT GTG CTA GAG CAG TGA AGA CTT GAT TGT-3' (SEQ № 10)

(5) 5'-AGT GTG CTA GAG CAG TTA AGA CTT GAT TGT-3' (SEQ № 11)

(6) 5'-SH(CH₂)₆AACGAAGCTGAGGATGTGTTCGTT-3' Т.п.=58,9°C (SEQ № 12)

(7) 5'-ATCCTCAGCTTCG-3' (SEQ № 13)

(8) 5'-ATCCTGAGCTTCG-3' (SEQ № 14)

(9) 5'-ATCATGAGCTTCG-3' (SEQ № 15)

(10) 5'-ATCATGAGCGTCG-3' (SEQ № 16)

(11) 5'-SH(CH₂)₆CCTCCGCTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGTA-3' Т.п.=69,8°C (SEQ № 17)

(12) 5'-

SH(CH₂)₆CCTCCGCAATACTCCGCTGAGGCCTGGGGGAGTATTGCG GAGGAAGGCCTCAGC-3' Т.п.=74,9°C (SEQ № 18)

Оборудование

Измерения флуоресценции выполняли с применением устройства Cary Eclipse (Varian Inc.). Родамин В (RhB) возбуждался при длине волны, составляющей 554 нм. Спектры поглощения в УФ- и видимой областях регистрировались с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-2401. ТЕМ-изображения регистрировали на G2 Tecnai F20 (FEI Co.) с применением ускоряющего напряжения 200 кВ. Площади поверхности определяли с применением измерительного устройства Nova 1200e BET (Quantachrome Instruments, США) по адсорбции/десорбции азота при температуре жидкого азота.

Синтез наночастиц мезопористого диоксида кремния (MP-SiO₂-NP)

MP-SiO₂-NP, функционализированные аминогруппами, получали в соответствии с ранее опубликованной процедурой.³⁰ Собранные SiO₂-NP промывали большими объемами дистиллированной воды и этанола с применением центрифугирования при 8000 об./мин. в течение 3 мин. Для удаления N-цетилтриметиламмония бромида (СТАВ) SiO₂-NP нагревали с обратным холодильником в течение 16 ч в растворе, состоящем из HCl (37%, 1,00 мл) и этанола (80,00 мл). Полученные NP тщательно промывали дистиллированной водой и этанолом. Наконец, чтобы удалить оставшийся растворитель из пор, полученные в результате не содержащие СТАВ NP MP-SiO₂, функционализированного аминогруппами, помещали в вакуум при 75°C на 12 ч.

Загрузка красителя и закупоривание пор

Для получения раствора монодисперсных MP-SiO₂-NP 10 мг NP диоксида кремния помещали в 950 мкл буфера HEPES (20 mM, pH 7,0) и обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин. Осуществляли реакцию раствора с 50 мкл сульфо-EMCS (10 мг/мл) и смесь перемешивали в течение 30 мин. Чтобы удалить избыток EMCS, MP-SiO₂-NP собирали с применением центрифугирования при 8000 об./мин. в течение 3 мин., и снова растворяли в 950 мкл буфера HEPES (20 mM, pH 7,0). Осуществляли реакцию очищенных SiO₂-NP со свежевосстановленными и очищенными тиолированными олигонуклеотидами (**1**), (**6**), (**11**), (**12**) (80 мкM, 1 mM), и полученный в результате раствор перемешивали в течение 2 ч., избыток ДНК удаляли из раствора NP осаждением. Количественное

определение остаточной избыточной ДНК производили с применением спектроскопии в УФ- и видимой области спектра в системе ДНК/Ехо III или ДНК/надрезающий фермент, и ее содержание составляло 61 нмоль или 58 нмоль, что соответствовало количеству иммобилизованной ДНК 1,9 мкмоль/г или 2,2 мкмоль/г SiO₂ NP, соответственно.

Водяную баню (90°C) применяли для загрузки красителя в поры, чтобы открыть шпильковую структуру связанной ДНК. Очищенные MP-SiO₂-NP растворяли в 900 мкл буфера HEPES (20 mM, pH 7,0, содержащего 50 mM NaCl), добавляли в раствор 100 мкл RhB или CPT (10 mM) и нагревали реакционную смесь до 90°C или 75°C, соответственно, с применением водяной бани в течение 2 ч. при непрерывном перемешивании. Затем образец отдельно погружали в водяную баню при 75°C, 50°C и 25°C на 20 мин. при непрерывном перемешивании в ходе процесса гибридизации. Наконец, MP-SiO₂-NP промывали по меньшей мере семь раз с применением дистиллированной воды до достижения слабого фона, чтобы удалить любой физически адсорбированный краситель с поверхности SiO₂-частиц. Загружаемое количество RhB в системах ДНК/Ехо III или ДНК/надрезающий фермент согласно приблизительным расчетам составляло 37,8 мкмоль/г или 31,3 мкмоль/г SiO₂-NP, соответственно. Загружаемое количество CPT в системах ДНК/Ехо III или ДНК/надрезающий фермент согласно расчетам составляло 34,5 мкмоль/г или 28,6 мкмоль/г SiO₂-NP, соответственно.

Высвобождение красителя

Для контроля высвобождения красителя в двух различных системах, ДНК/Ехо III или ДНК/надрезающий фермент, вышеупомянутые MP-SiO₂-NP суспендировали в 850 мкл дистиллированной воды и делили на пять образцов, каждый из которых содержал 160 мкл раствора. Затем в полученный в результате раствор добавляли 20 мкл буфера 1 и 10 мкл Ехо III с различной концентрацией или 20 мкл буфера 2 и 10 мкл надрезающего фермента с различной концентрацией, соответственно, после чего осторожно встряхивали. Наконец, в смесь добавляли 10 мкл ДНК с различной концентрацией и встряхивали в течение 1 ч., а затем спектры флуоресценции образцов измеряли после осаждения.

Чтобы проверить высвобождение красителя в системе стимулируемого АТФ Echo III или надрезающего фермента, промытые MP-SiO₂-NP растворяли в 850 мкл дистиллированной воды и разделяли на пять образцов, объемом 160 мкл каждый. SiO₂-NP инкубировали с 20 мкл буфера 1 и 10 мкл Echo III с различной концентрацией, или 20 мкл буфера 2 и 10 мкл надрезающего фермента с различной концентрацией, соответственно. Затем в полученные растворы добавляли по 10 мкл АТФ с различной концентрацией, полученные растворы встряхивали в течение 90 мин., а затем спектры излучаемой флуоресценции образцов измеряли после осаждения.

Эффект СРТ в отношении гибели клеток MDA-MB-231 (клетки рака молочной железы) и MCF-10a (нормальные клетки молочной железы)

Клетки MDA-MB-231 (клетки рака молочной железы) и MCF-10a (нормальные клетки молочной железы) высевали с плотностью 27000 клеток на лунку в 24-луночные планшеты для тканевых культур. После культивирования в течение ночи клетки предварительно инкубировали с олигомицином (25 мкг/мл) в течение 1 ч., а затем дважды загружали MP-SiO₂ (150 мкг/мл) (каждая загрузка продолжалась 3 ч.). Между загрузками клетки промывали свежей питательной средой, затем производили повторную загрузку. Клетки дополнительно инкубировали в течение ночи. Для определения жизнеспособности клеток 10 мкл раствора аламарового синего добавляли в каждую лунку планшета и инкубировали клетки в CO₂-инкубаторе в течение дополнительного 1 ч. Флуоресценцию аламарового синего проверяли планшет-ридером (TECAN). Клетки культивировали в чашках со стеклянным дном, предназначенных для микроскопии, и анализировали с применением эпифлуоресцентного микроскопа, усиленного конфокальным (эквивалентного качества) устройством OptiGrid (микроскоп Nikon TE 2000, оснащенный термостатированным столиком и CCD-видеокамерой Hamamatsu Orca-Era), работающего на операционной системе Volocity 4 (Improvision, Ковентри, Великобритания), который применяли как для сбора данных, так и для анализа изображений. Поглощение NP и высвобождение СРТ из частиц измеряли под микроскопом с применением FITC-меченных (возбуждение: 519 нм) и СРТ-загруженных (возбуждение: 423 нм) NP.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пористый субстрат, содержащий по меньшей мере одно активное средство, заключенное внутри указанных пор указанного субстрата;

где указанные поры закупорены по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты с конформацией “замка”, если внутри указанных пор заключено указанное по меньшей мере одно активное средство;

указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты способна к образованию подверженной расщеплению конформации после связывания по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом; с обеспечением, тем самым, расщепления указанной закупоривающей последовательности нуклеиновой кислоты, и осуществлением высвобождения указанного упакованного по меньшей мере одного активного средства.

2. Пористый субстрат по п. 1, где указанные поры закупорены по меньшей мере двумя независимыми последовательностями нуклеиновых кислот.

3. Пористый субстрат по п. 1 или п. 2, где указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты является либо одно-, либо двуцепочечной.

4. Пористый субстрат по любому из предшествующих пунктов, где указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты включает последовательность ДНКзима.

5. Пористый субстрат по п. 4, где указанная последовательность ДНКзима удлинена за счет чужеродного нуклеотидного домена со свободной конформацией и активной конформацией после связывания по меньшей мере с одним вторым анализируемым веществом; где указанная активная конформация указанной последовательности ДНКзима способна к формированию подверженной расщеплению конформации после связывания с указанным по меньшей мере одним первым анализируемым веществом, с обеспечением, тем самым, расщепления указанной закупоривающей последовательности нуклеиновой кислоты и осуществлением высвобождения указанного упакованного по меньшей мере одного активного средства.

6. Пористый субстрат по п. 1, где указанная закупоривающая по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность в виде петли “шпильки”.
7. Пористый субстрат по п. 2, где указанные по меньшей мере две независимые последовательности нуклеиновых кислот представляют собой по меньшей мере две независимые последовательности в виде петли “шпильки”.
8. Пористый субстрат по п. 6, где указанная закупоривающая по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты в виде петли “шпильки” формирует подверженную расщеплению конформацию после объединяющего связывания по меньшей мере с одной цепью анализируемой нуклеиновой кислоты.
9. Пористый субстрат по п. 8, где указанная по меньшей мере одна цепь анализируемой нуклеиновой кислоты представляет собой биомаркер для по меньшей мере одного заболевания или состояния.
10. Пористый субстрат по п. 6, где указанная последовательность в виде петли “шпильки” содержит нуклеотидный домен, который делает возможным образование указанной подверженной расщеплению конформации после связывания по меньшей мере с одним анализируемым веществом.
11. Пористый субстрат по п. 6, где указанная последовательность в виде петли “шпильки” дополнительно содержит нуклеотидный домен со свободной конформацией и активной конформацией после связывания по меньшей мере с одним вторым анализируемым веществом.
12. Пористый субстрат по любому из предшествующих пунктов, где указанная закупоривающая последовательность содержит нуклеотид, специфический по отношению к надрезающему ферменту.
13. Пористый субстрат по любому из предшествующих пунктов, где указанное расщепление осуществляется под действием биокатализатора.
14. Пористый субстрат по п. 13, где указанный биокатализатор представляет собой экзонуклеазу или эндонуклеазу.
15. Пористый субстрат по п. 13, где указанный биокатализатор представляет собой надрезающий фермент.

16. Пористый субстрат по любому из предшествующих пунктов, где указанный субстрат представляет собой наночастицы из оксида полуметалла.

17. Пористый субстрат по любому из предшествующих пунктов, где указанный субстрат представляет собой наночастицы мезопористого кремния.

18. Способ введения активного средства, высвобождение которого зависит от состояния, пациенту, нуждающемуся в этом, при этом указанный способ включает введение указанному пациенту пористого субстрата, содержащего по меньшей мере одно активное средство, упакованное внутри указанных пор указанного субстрата; где указанные поры закупорены по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью с конформацией “замка”, когда внутри указанных пор заключено указанное по меньшей мере одно активное средство; указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты способна к формированию подверженной расщеплению конформации после связывания по меньшей мере с одним первым биомаркером, ассоциированным с указанным состоянием; с обеспечением, тем самым, расщепления указанной закупоривающей последовательности нуклеиновой кислоты и осуществлением высвобождения указанного упакованного по меньшей мере одного активного средства.

19. Способ диагностики состояния или заболевания пациента, включающий введение указанному пациенту пористого субстрата, содержащего по меньшей мере одно средство, упакованное внутри указанных пор указанного субстрата; где указанные поры закупорены по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты с конформацией “замка”, где указанное по меньшей мере одно средство заключено внутри указанных пор; указанная закупоривающая последовательность нуклеиновой кислоты способна к формированию подверженной расщеплению конформации после связывания по меньшей мере с одним первым биомаркером указанного состояния или заболевания; с обеспечением, тем самым, расщепления указанной закупоривающей последовательности нуклеиновой кислоты и осуществлением высвобождения указанного упакованного по меньшей мере одного средства в жидкость организма указанного пациента и обнаружением указанного по меньшей мере одного средства в указанных жидкостях организма указанного пациента.

20. Способ получения пористого субстрата по п. 1, при этом указанный способ включает стадии: (а) связывания пористого субстрата по меньшей мере с одной первой последовательностью одноцепочечной нуклеиновой кислоты с образованием, таким образом, функционализированного субстрата; (b) приведения указанного функционализированного пористого субстрата в контакт по меньшей мере с одним активным средством с упаковкой, таким образом, указанного средства в поры указанного субстрата; (с) приведения указанного упакованного функционализированного в контакт с комплементарной второй последовательностью одноцепочечной нуклеиновой кислоты с закупориванием, таким образом, указанных пор указанного пористого субстрата указанной закупоривающей последовательностью и заключением указанного по меньшей мере одного активного средства в указанные поры; где указанная закупоривающая последовательность способна к формированию подверженной расщеплению конформации после связывания по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом.

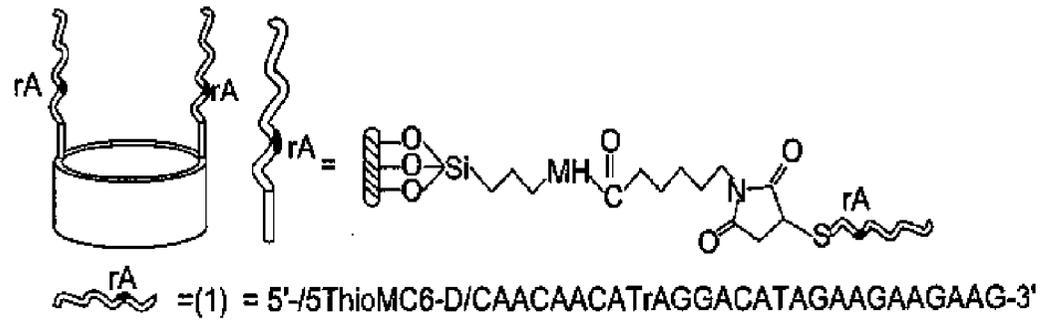
21. Способ по п. 20, где указанная вторая комплементарная последовательность одноцепочечной нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидный домен со свободной конформацией и активной конформацией после связывания по меньшей мере с одним вторым анализируемым веществом; где активная конформация указанной второй цепи делает возможным формирование указанной закупоривающей последовательностью подверженной расщеплению конформации после связывания по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом.

22. Способ получения пористого субстрата по п. 6, при этом указанный способ включает стадии: (а) связывания пористого субстрата по меньшей мере с одной последовательностью одноцепочечной нуклеиновой кислоты в виде шпильки с образованием, таким образом, функционализированного субстрата; (b) приведения указанного функционализированного пористого субстрата в контакт по меньшей мере с одним активным средством под действием температуры, где указанная последовательность в виде шпильки имеет случайную конформацию; с упаковкой, таким образом, указанного средства в поры указанного субстрата; (с) понижения температуры указанного функционализированного субстрата с

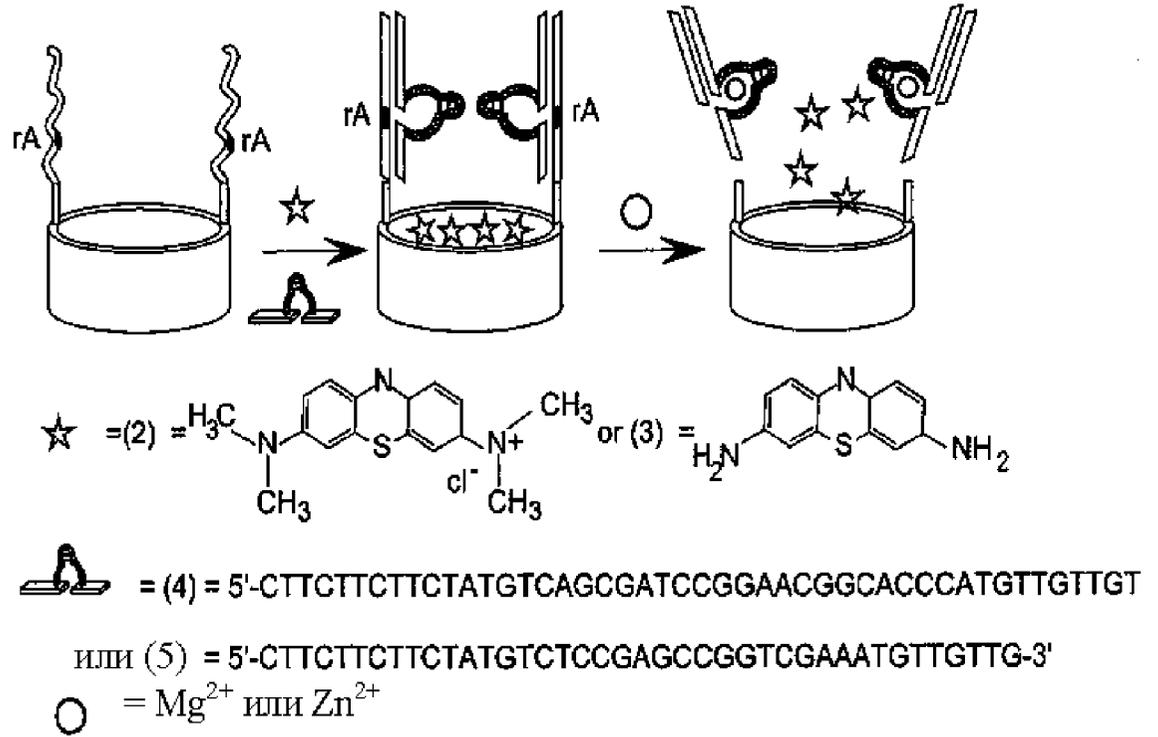
упакованным средством с образованием, таким образом, указанной конформации шпильки, и закупориванием указанных пор указанного пористого субстрата, и заключением указанного по меньшей мере одного активного средства в указанных порах; где указанная закупоривающая последовательность способна к формированию подверженной расщеплению конформации после связывания по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом.

23. Способ по п. 22, где указанная по меньшей мере одна последовательность в виде шпильки содержит нуклеотидный домен со свободной конформацией и активной конформацией после связывания по меньшей мере с одним вторым анализируемым веществом; где активная конформация делает возможным формирование указанной закупоривающей последовательностью подверженной расщеплению конформации после связывания по меньшей мере с одним первым анализируемым веществом.

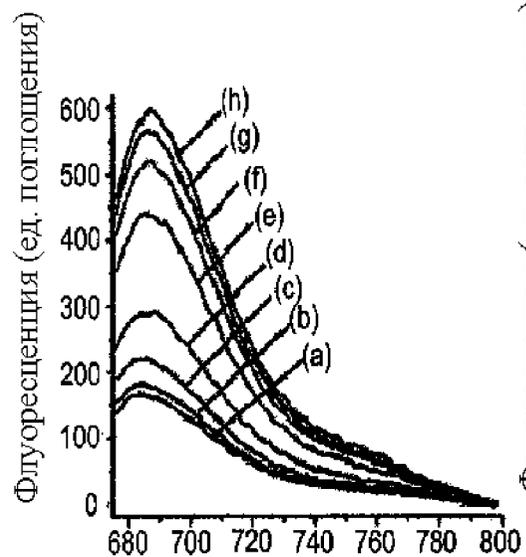
24. Способ по любому из пп. 20–23, где указанная закупоривающая последовательность содержит нуклеотид, специфический по отношению к надрезающему ферменту.



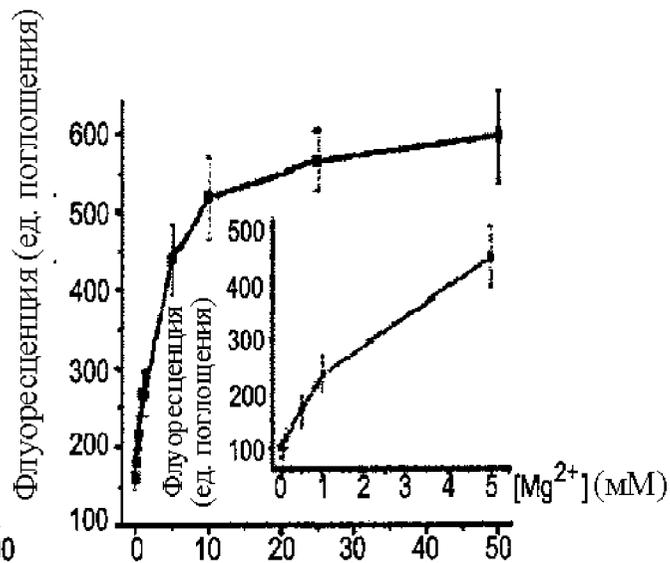
Фиг. 1А



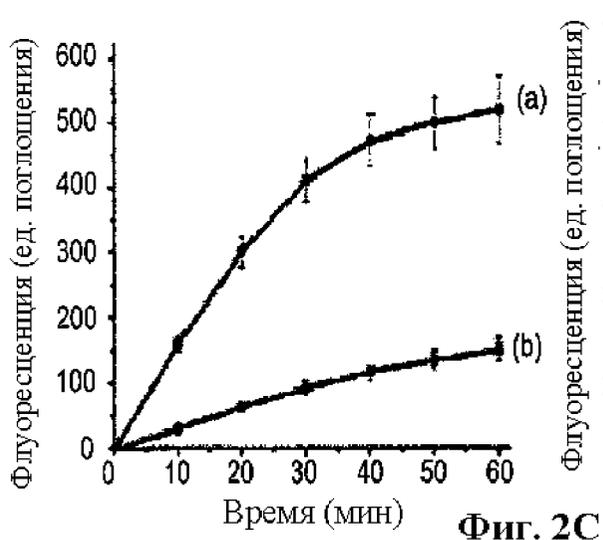
Фиг. 1В



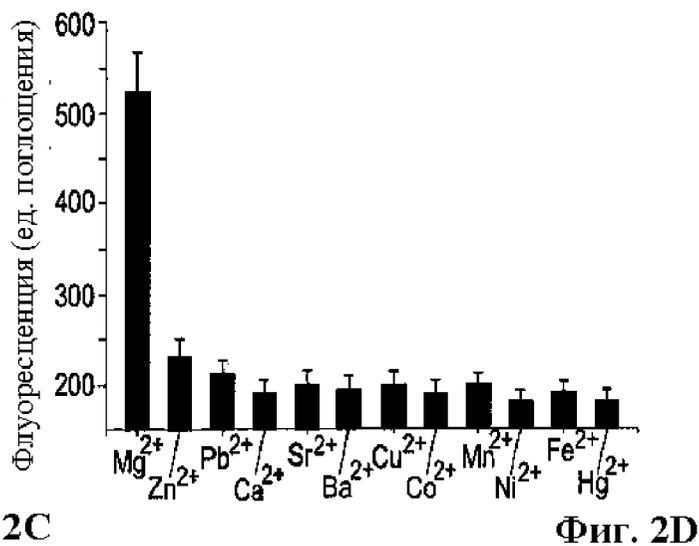
Длина волны (нм) **Фиг. 2А**



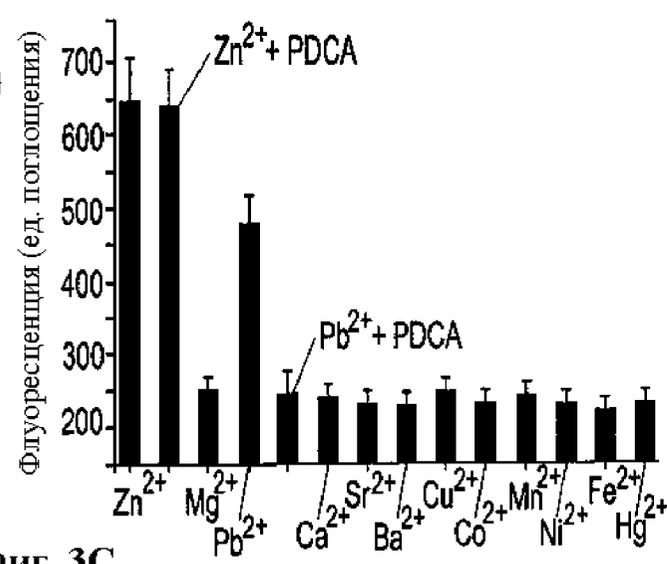
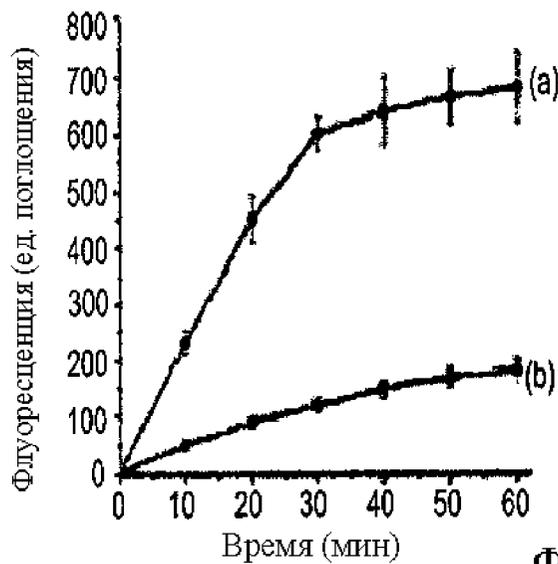
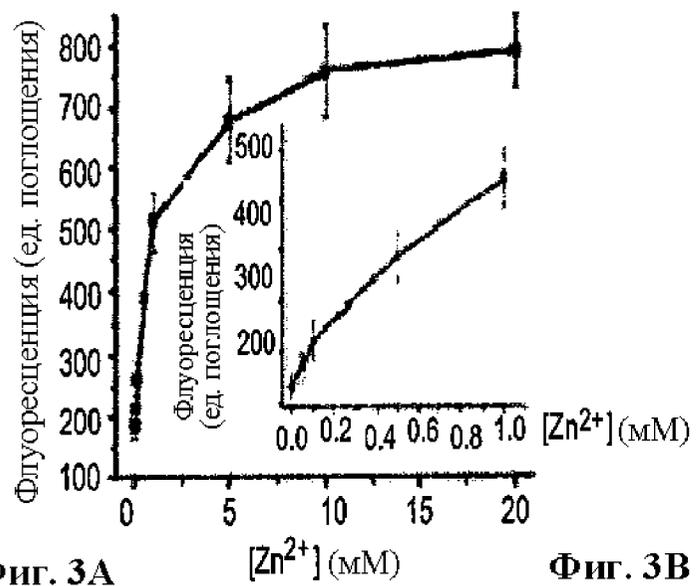
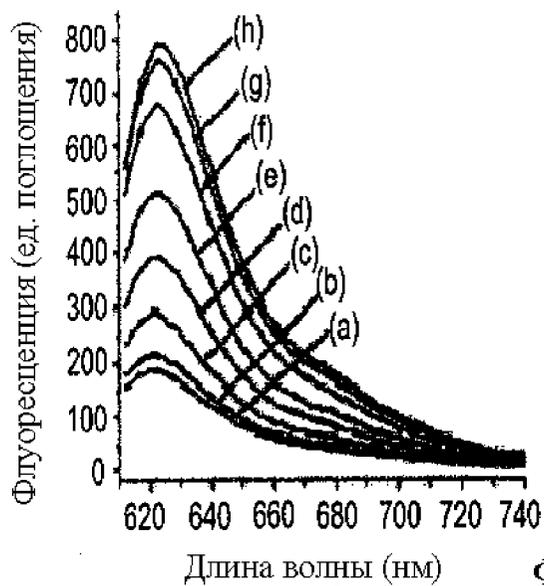
$[Mg^{2+}]$ (mM) **Фиг. 2В**



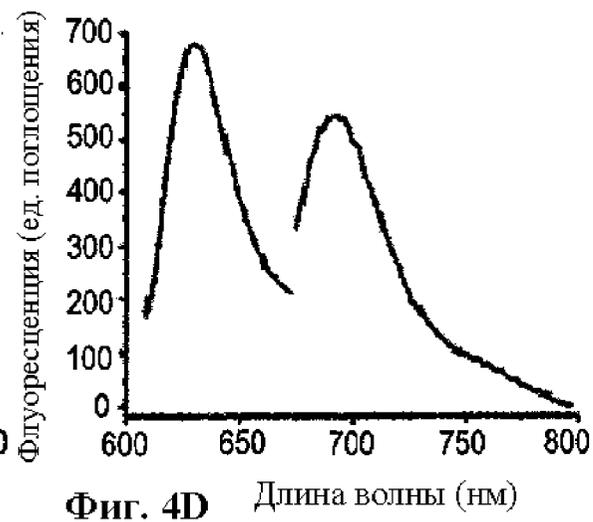
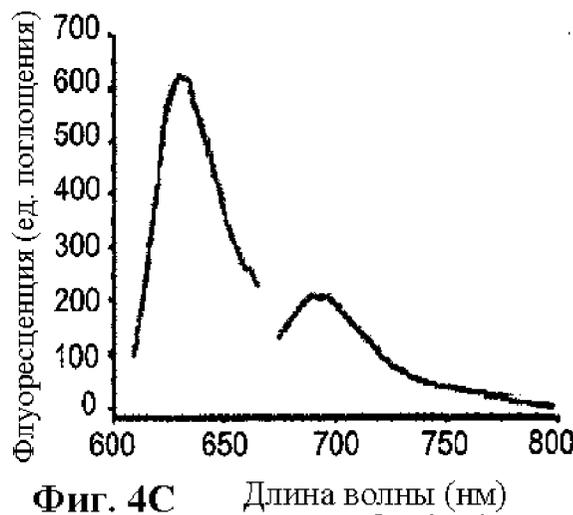
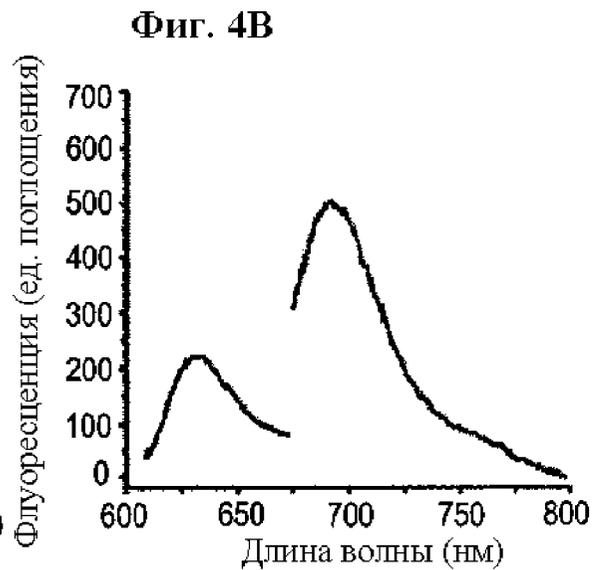
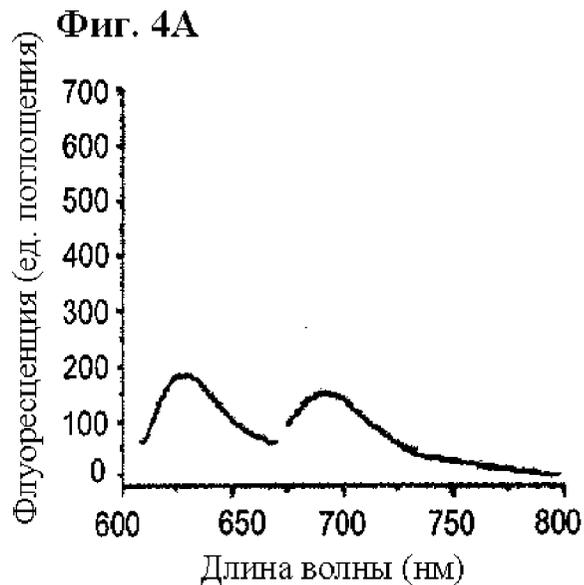
Время (мин) **Фиг. 2С**

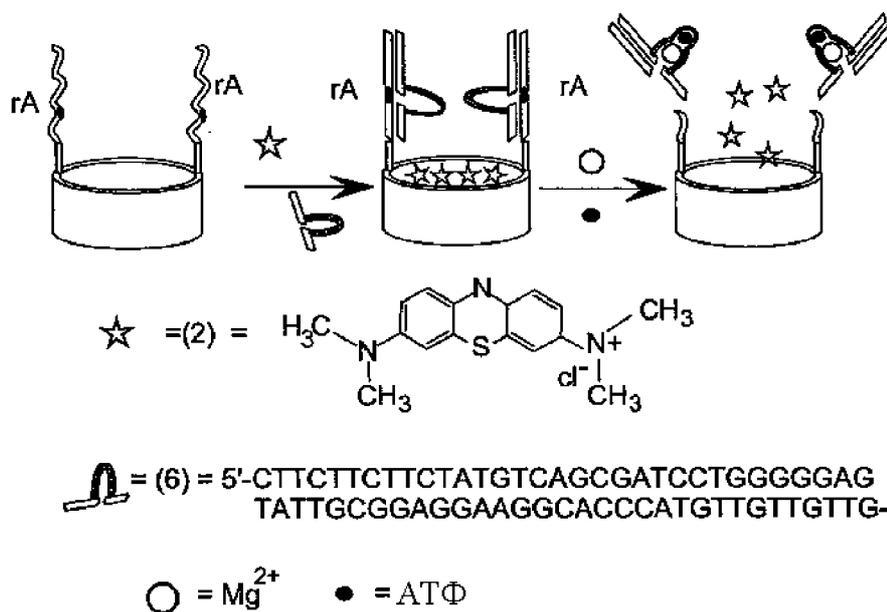


Фиг. 2D

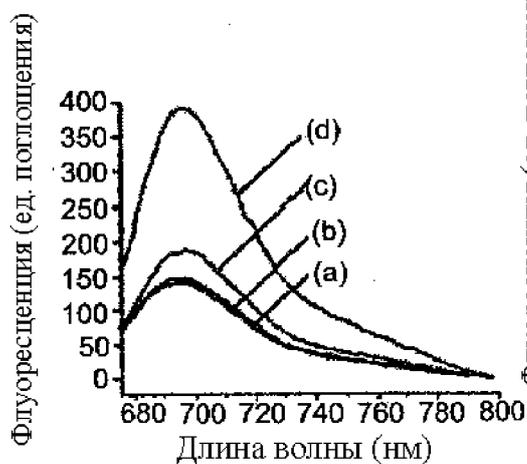


Фиг. 3D

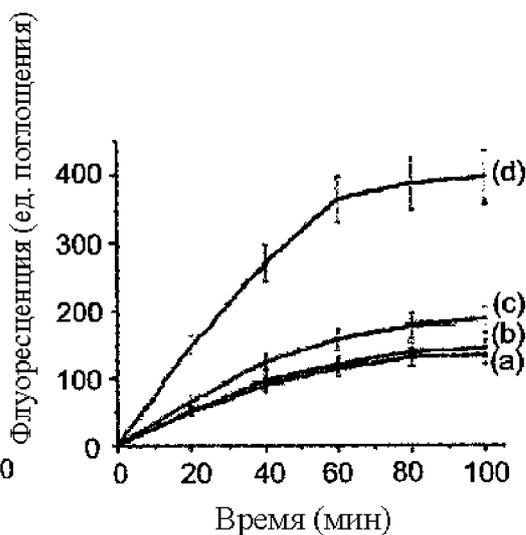




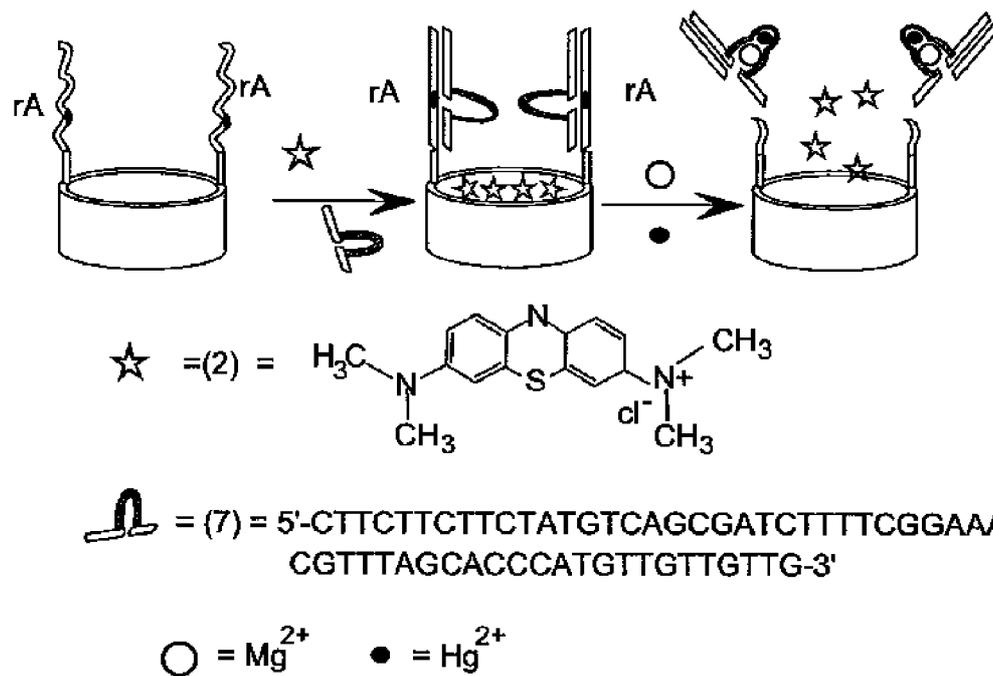
Фиг. 5А



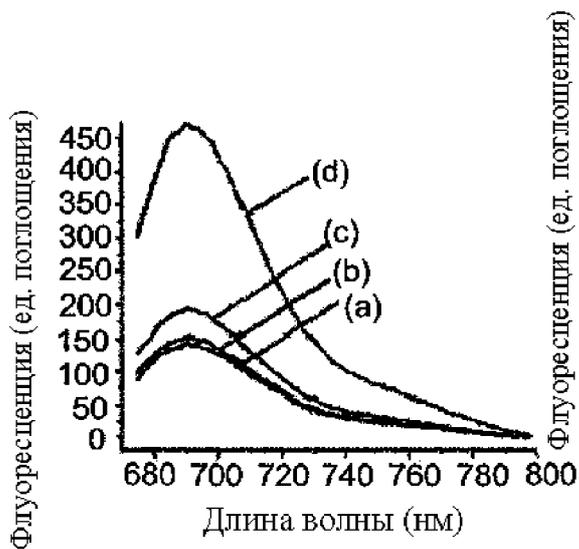
Фиг. 5В



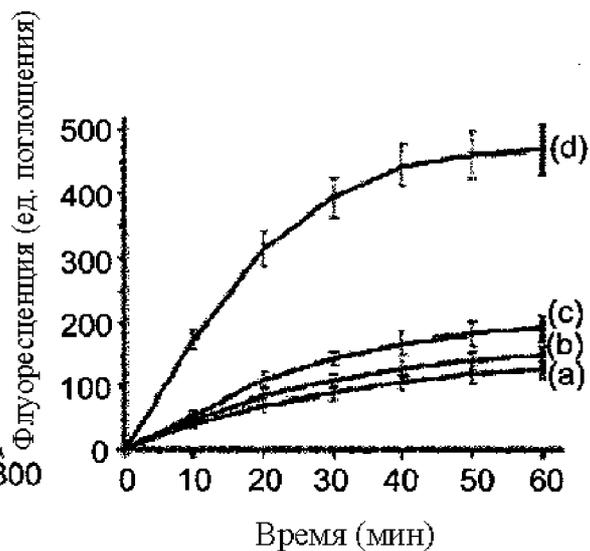
Фиг. 5С



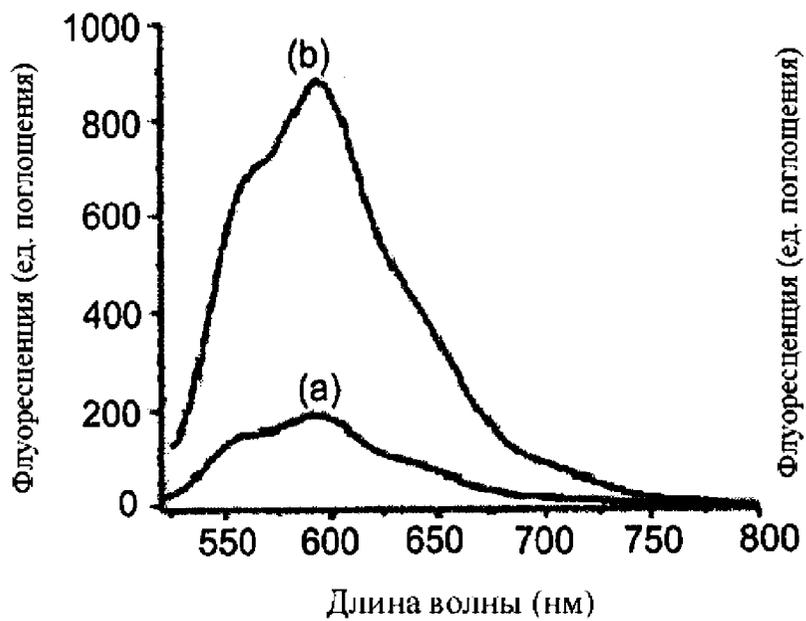
Фиг. 6А



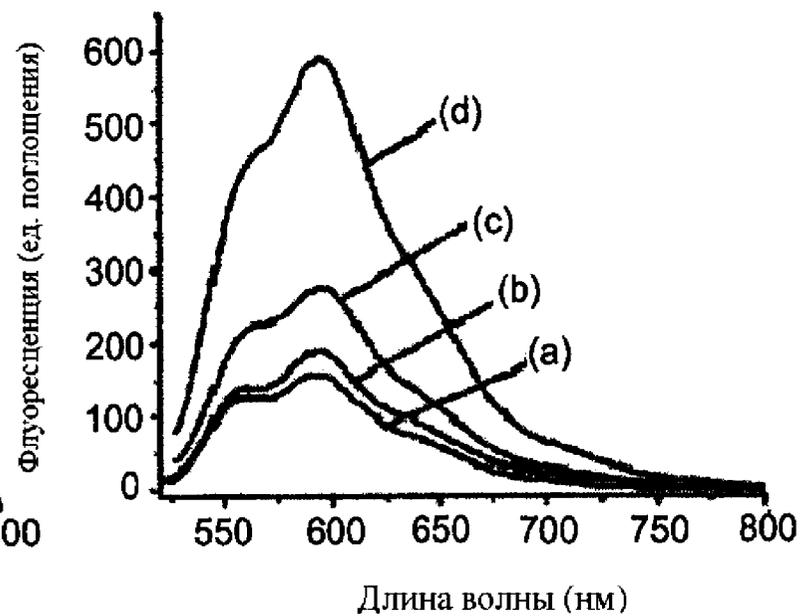
Фиг. 6В



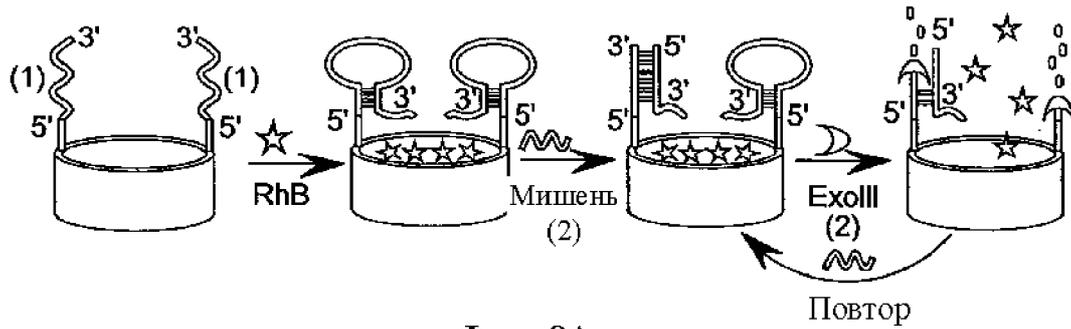
Фиг. 6С



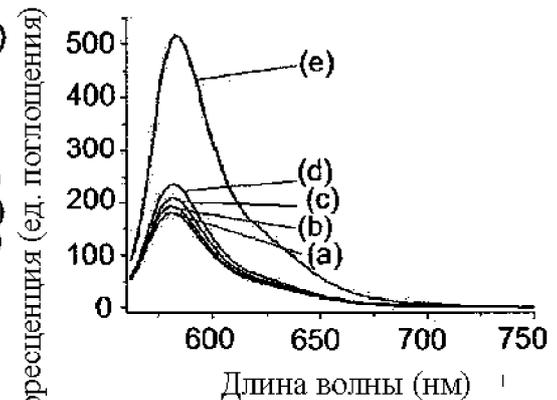
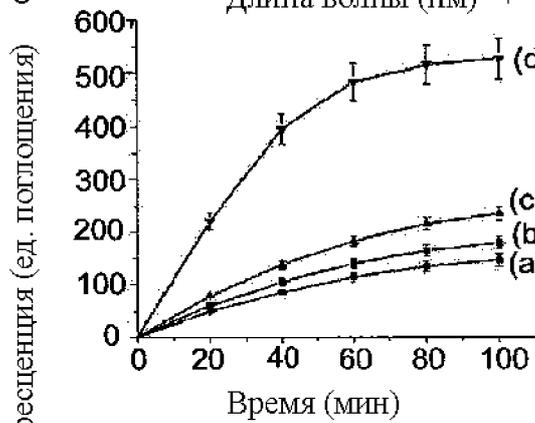
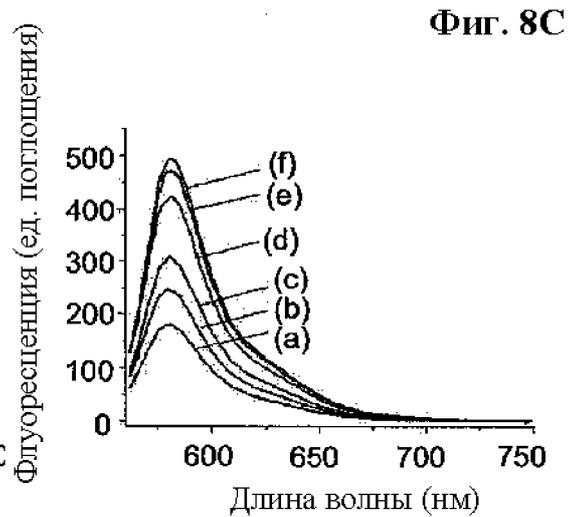
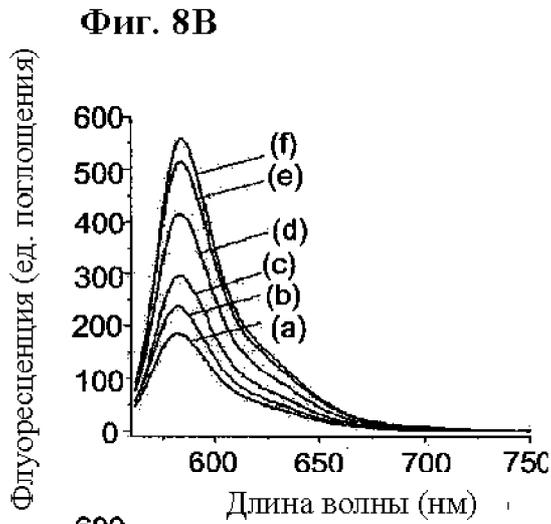
Фиг. 7А



Фиг. 7В

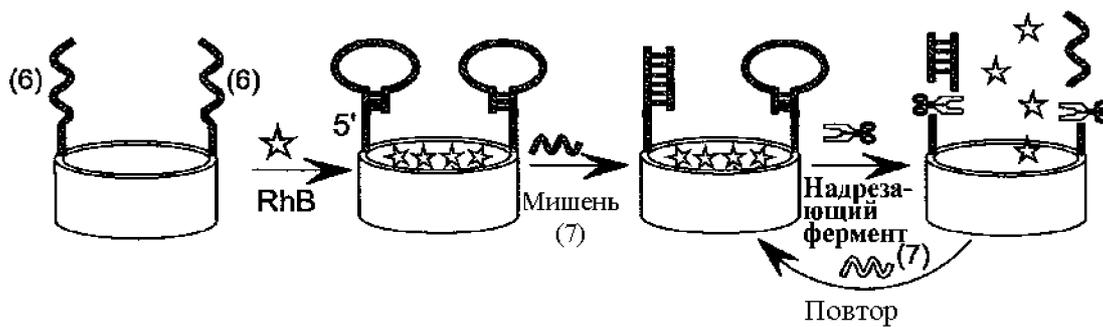


Фиг. 8А



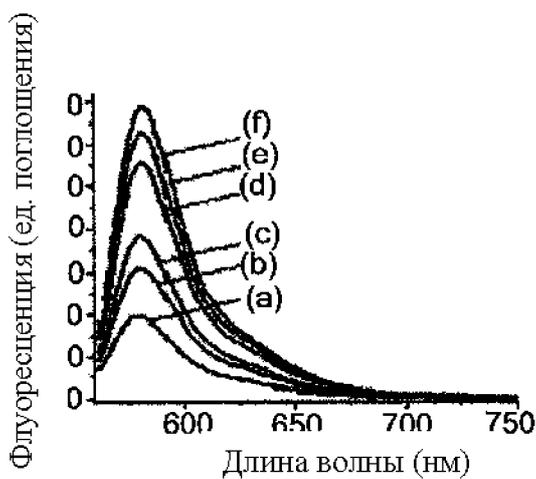
Фиг. 8D

Фиг. 8Е

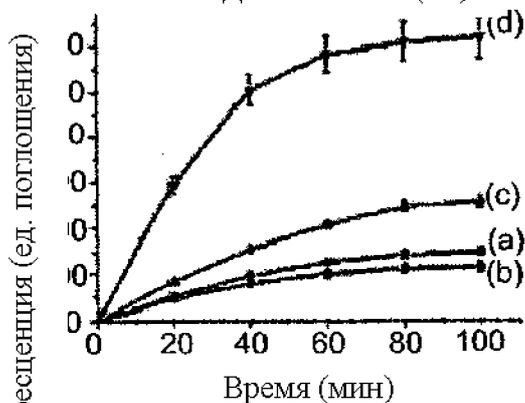
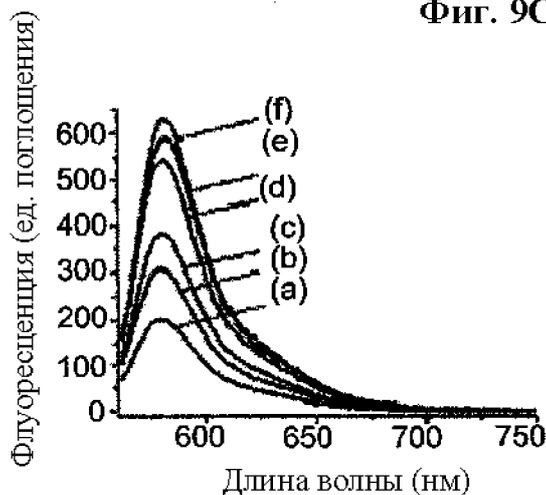


Фиг. 9А

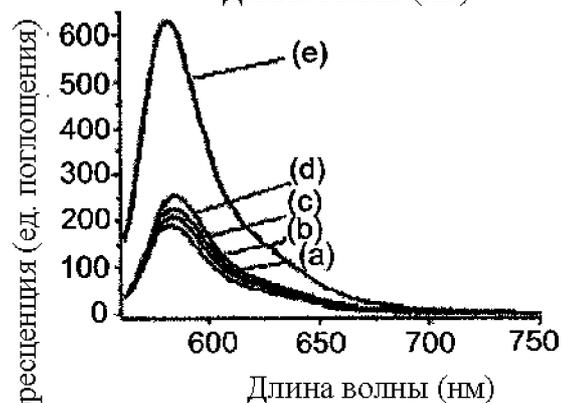
Фиг. 9В



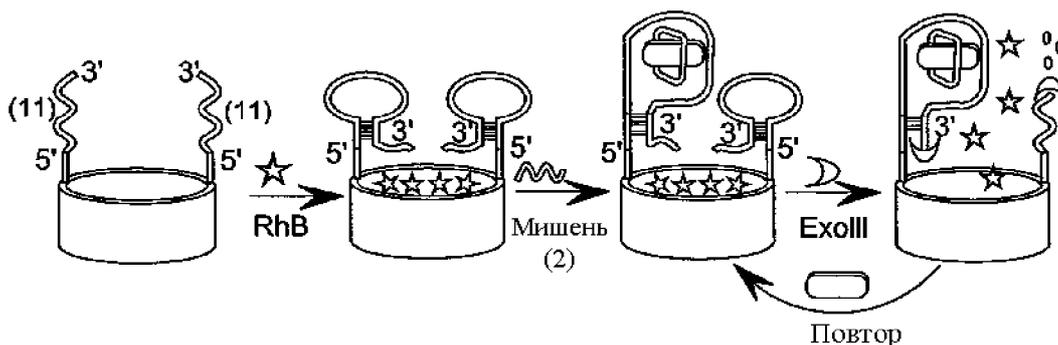
Фиг. 9С



Фиг. 9D



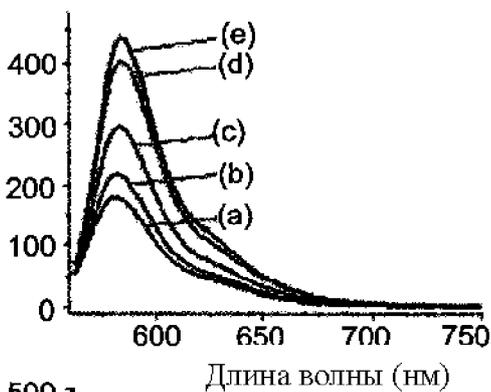
Фиг. 9Е



Фиг. 10А

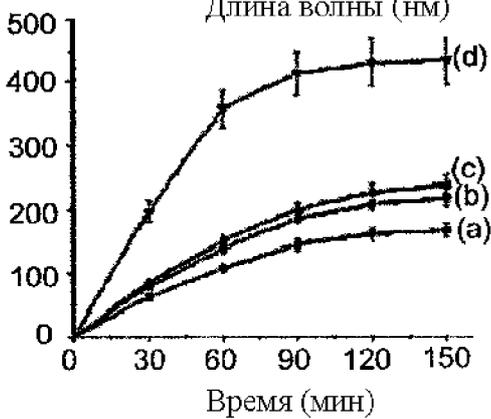
Флуоресценция (ед. поглощения)

Фиг. 10В



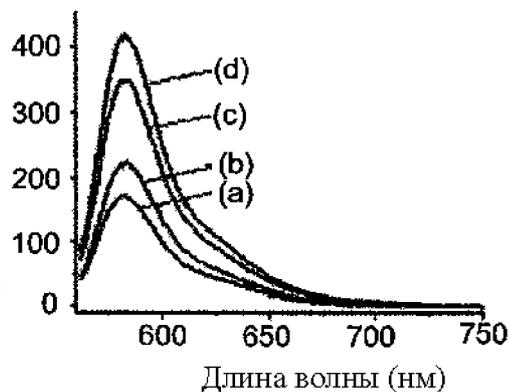
Флуоресценция (ед. поглощения)

Фиг. 10D



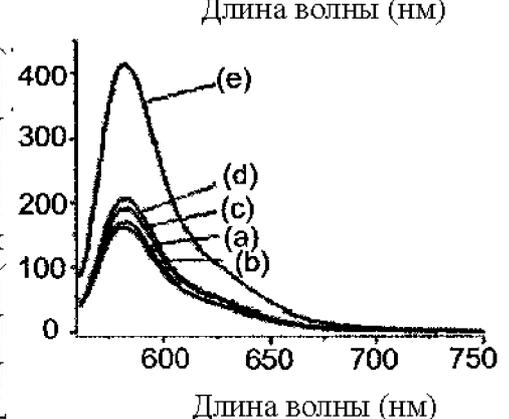
Флуоресценция (ед. поглощения)

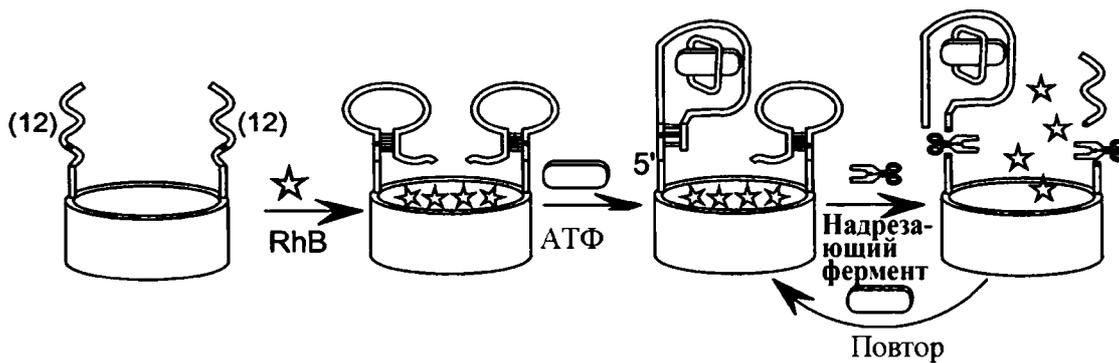
Фиг. 10С



Флуоресценция (ед. поглощения)

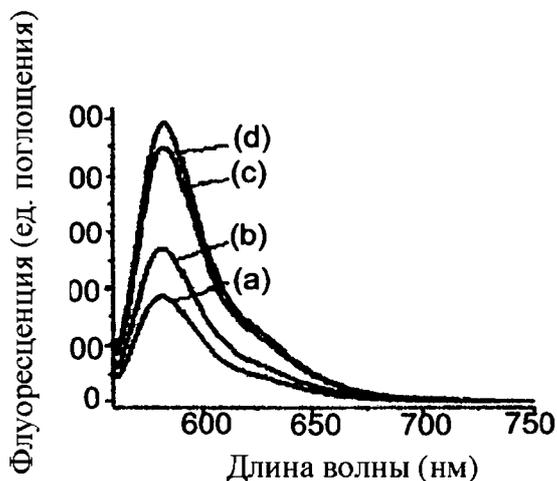
Фиг. 10Е



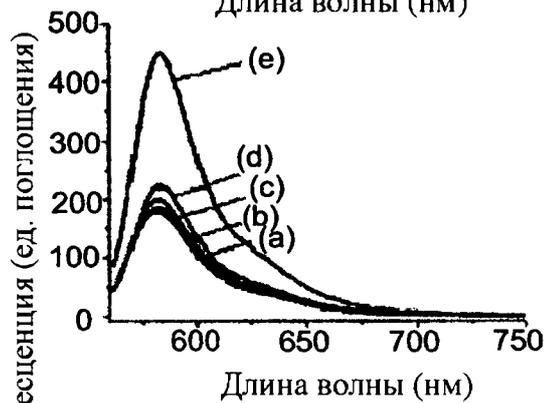
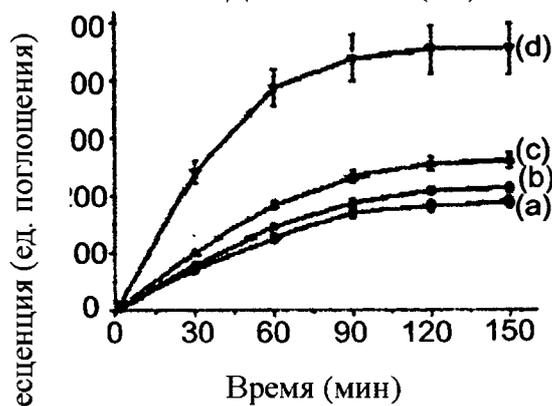
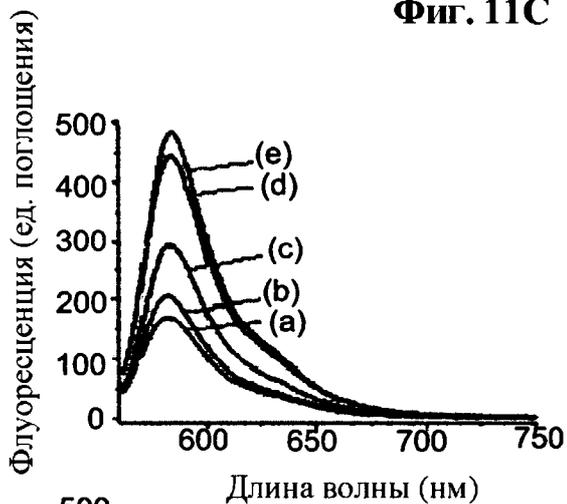


Фиг. 11А

Фиг. 11В

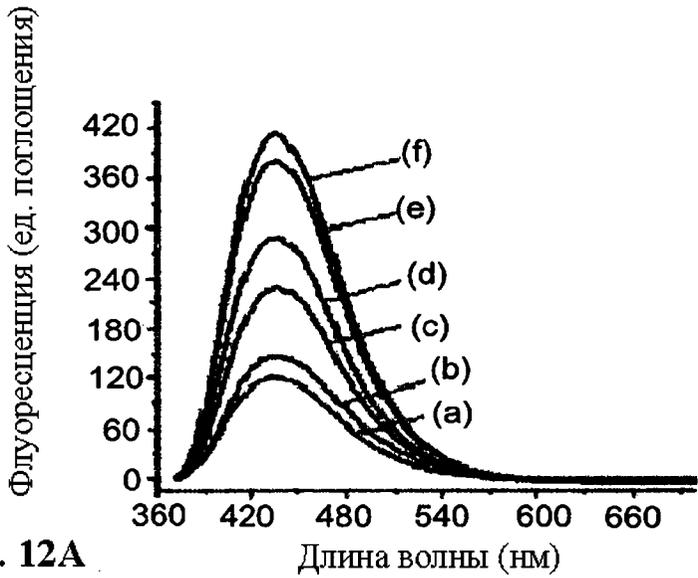


Фиг. 11С

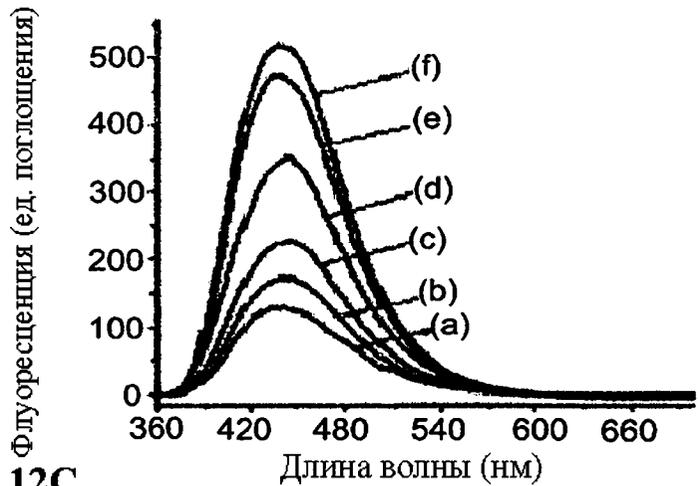


Фиг. 11D

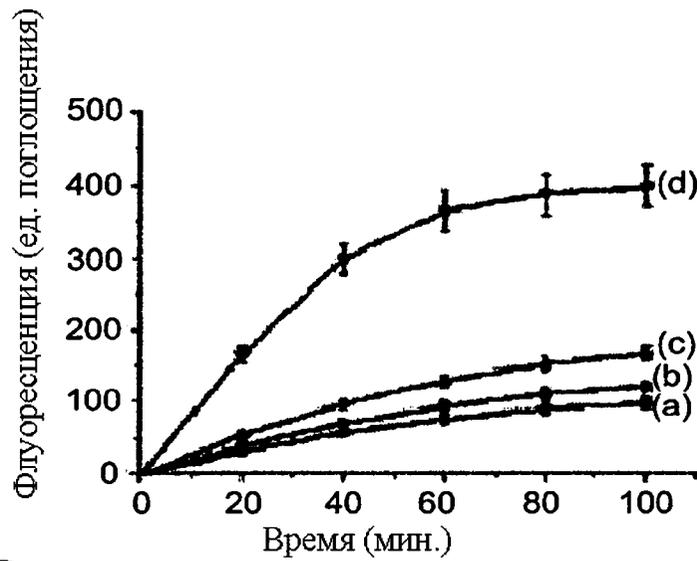
Фиг. 11Е



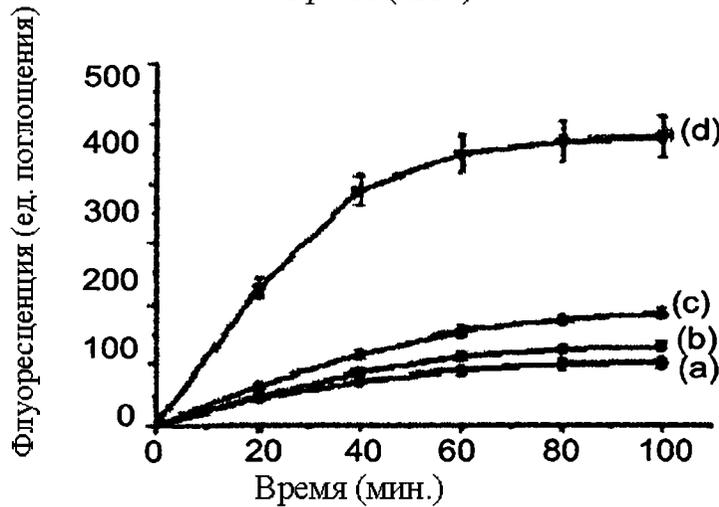
Фиг. 12А



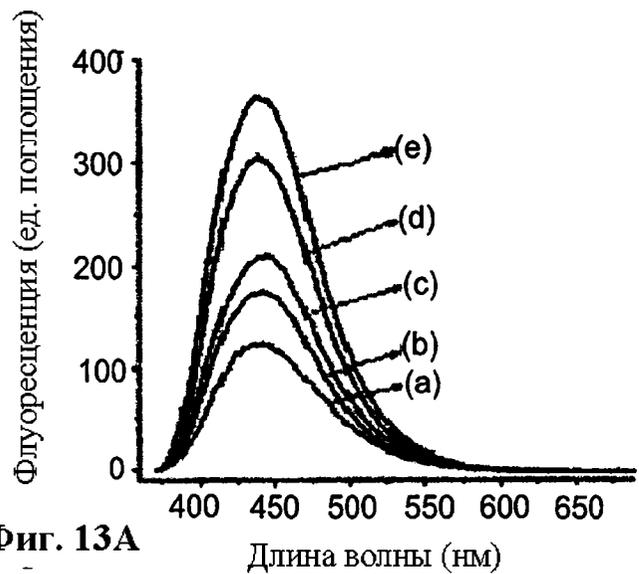
Фиг. 12С



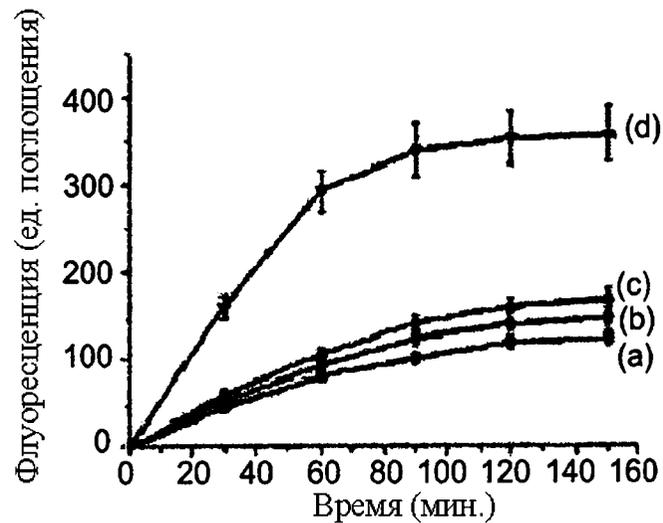
Фиг. 12В



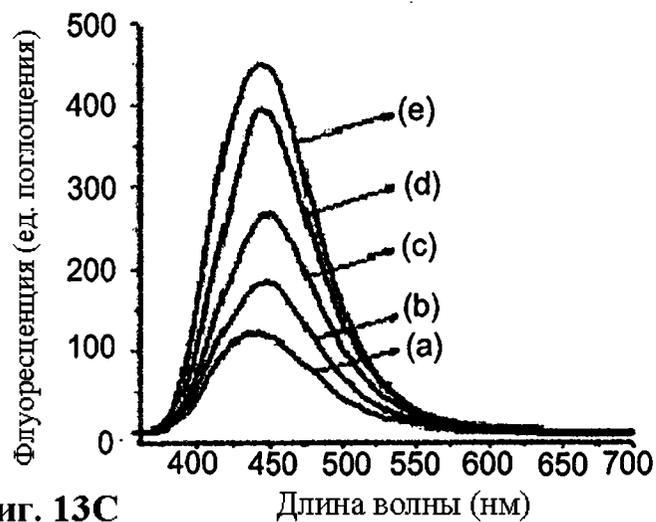
Фиг. 12D



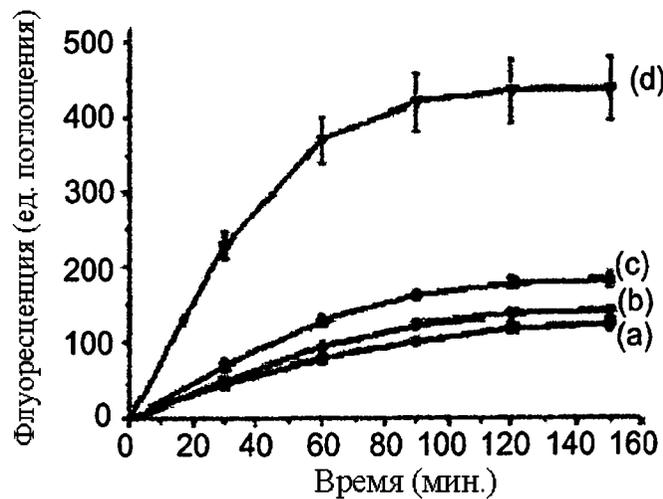
Фиг. 13А



Фиг. 13В



Фиг. 13С



Фиг. 13D

