

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037471**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.31

(21) Номер заявки
201891845

(22) Дата подачи заявки
2018.01.25

(51) Int. Cl. **C07K 14/005** (2006.01)
C07K 14/01 (2006.01)
C07K 14/015 (2006.01)
G01N 15/02 (2006.01)

(54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИЗМЕРЕНИЯ СОДЕРЖИМОГО ЧАСТИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ В ВОДОСОДЕРЖАЩЕМ СОСТОЯНИИ

(31) 62/465,981

(32) 2017.03.02

(33) US

(43) 2020.03.31

(86) PCT/US2018/015263

(87) WO 2018/160298 2018.09.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНТЕЛЛИДЖЕНТ ВАЙЕРЭС
ИМЭДЖИНГ ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Коломб-Делсак Матье, Хааг Ларс,
Нордстром Рикард, Райнер Мартин
(SE)**

(74) Представитель:
Нагорных И.М. (RU)

(56) SOMMER, JM et al.: Quantification of Adeno-Associated Virus Particles and Empty Capsids by Optical Density Measurement. Molecular Therapy, January 2003, Vol. 7, No. 1; pages 122-128; page 125, 1st column, 1st paragraph, page 126, 1st column, 1st paragraph, page 127, 1st column, 3rd paragraph; DOI:10.1016/S1525-0016(02)00019-9
US-A1-20130191037

(57) Способ предназначен для количественного измерения содержимого частиц с помощью получения изображения в водосодержащем состоянии, такого как крио-ТЭМ. Предоставляется образец (100) вирусоподобных частиц (VLP) или вирусных частиц. Предпочтительно, чтобы образец (100) быстро замораживался в криогенной жидкости при криогенной температуре. При криогенной температуре содержимое каждой частицы VLP в замороженном образце наблюдается в крио-ТЭМ. Количество содержимого частиц ВЛП определяется для оценки того, являются ли частицы VLP пустыми или нет.

B1

037471

037471

B1

Область техники

Изобретение относится к способу количественного измерения содержимого частиц с использованием способа получения изображения в водосодержащем состоянии, такого как крио-ТЭМ (CryoTEM, крио-трансмиссионная электронная микроскопия).

Уровень техники и краткое описание изобретения

В фармацевтической промышленности вирусоподобные частицы (VLP) и вирусы дикого типа (wt) или модифицированные вирусы, например, частицы аденоассоциированного вируса (AAV) широко используются в качестве носителя для доставки генов. В общем, VLP или AAV с дефектной репликацией не могут реплицироваться/воспроизводиться в отличие от реальных вирусных частиц и часто предпочтительны в качестве носителя для доставки генов. Оценка содержимого их генетического материала имеет первостепенное значение, поскольку оно напрямую связано с эффективностью лечения. Для оценки содержимого вирусоподобных частиц (VLP) и AAV частиц обычно используются различные способы. Одним из способов является полимеразная цепная реакция в реальном времени, также известная как количественная полимеразная цепная реакция (количественная ПЦР). Исторически, трансмиссионная электронная микроскопия с негативным окрашиванием (nsTEM) использовалась в качестве ортогонального прямого способа, используемого в качестве опорного для получения изображения содержимого VLP и AAV частиц. Одной из причин этого является то, что nsTEM является быстрым, простым и обеспечивает хорошее разрешение, так что частицы VLP и AAV действительно могут быть увидены. Другим является то, что nsTEM считается точным и хорошим способом определения содержимого частиц. Однако недавно было обнаружено, что nsTEM обладает присущими ему характеристиками, которые делают его ненадежным, а не надежным, и даже ошибочным, когда дело касается оценки содержимого VLP, частиц AAV и частиц вируса wt.

В nsTEM краситель наносится на образец до или после нанесения образца на сетку для повышения контрастности и защиты частиц. Одним из недостатков nsTEM является то, что краситель покрывает частицы и не обязательно проникает в них. Это предотвращает прямой нативный просмотр содержимого частиц. То есть, краситель делает анализ содержимого частиц в nsTEM косвенным способом. Другими словами, краситель проникает только в частицы и создает контраст, отображающий внутреннюю поверхность частиц, при наличии отверстия в их оболочках, например, при их разрушении. Краситель также может отрицательно повлиять на морфологию образца и из-за этапов блоттинга (удаления доступной жидкости с помощью фильтровальной бумаги) и низкого pH красителя было неожиданно обнаружено, что частицы часто в пространственном отношении локально находятся под действием препарата. Было неожиданно обнаружено, что толщина слоя красителя не может быть полностью контролирована в процессе приготовления, а в регионах с более тонким слоем красителя частицы не защищены должным образом. Оказывается на форму пустых частиц иногда влияет процедура окрашивания и блоттинга, даже если они не повреждены. Процедура подготовки может создать вмятину или вмячивание на оболочке в верхней части частицы, где может собираться краситель. Это более вероятно для пустых частиц, так как внутреннее содержание не помогает сохранить форму. Это заставляет частицу выглядеть пустой в микроскопе, в то время как в регионах с более толстыми красителем форма частиц остается нетронутой и нет видимой разницы между пустой и заполненной частицей. Это затрудняет анализ и делает его ненадежным. В nsTEM частицы обычно видны, классифицируются и считаются пустыми, если они появляются с яркой внешней границей и темной внутренней частью.

Объяснение заключается в том, что, попав на сетку, пустая частица разрушается и краситель заполняет полые частицы. Заполненные частицы - это те, которые появляются в виде ярких дисков со слегка более яркими частями в центре. Объяснение заключается в том, что, поскольку частицы заполнены, они не разрушаются во время подготовки и поэтому не имеют полых частей. Часто есть большая часть частиц, которые не могут быть однозначно классифицированы. Это так называемые неопределенные частицы.

Другая проблема заключается в том, что когда пустая частица не разрушается во время приготовления, она выглядит как заполненная, в то время как с другой стороны, когда заполненная частица разрушается из-за высоких механических нагрузок на локальном уровне, она может разрушаться и выглядеть как пустая. Важным моментом настоящего изобретения является осознание того, что способ использования nsTEM подвержен большому количеству ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Существует необходимость в улучшенном и более надежном способе количественной оценки содержимого частиц. Способ согласно настоящему изобретению является надежным способом оценки содержимого VLP, AAV и вирусов wt с хорошей надежностью, точностью, повторяемостью и специфичностью. В частности, этот способ предназначен для количественной характеристики содержимого частиц VLP, AAV и вируса wt путем получения их изображения в нативном водосодержащем состоянии, например, с помощью крио-трансмиссионной электронной микроскопии (крио-ТЭМ). Также было обнаружено, что анализ может быть надежно проведен с использованием ионных жидкостей для подготовки образца к ТЭМ или с использованием специальных держателей образцов для жидких образцов (иногда называемых жидкими ТЭМ или ТЭМ in situ). Способ приготовления ионной жидкости аналогичен способу крио-ТЭМ в том, что добавление ионной жидкости поддерживает частицы в водосодержащем состоянии, поэтому нет необходимости использовать краситель для повышения контрастности. Тем не ме-

нее, небольшое количество красителя или химикатов может быть добавлено для сохранения структуры частиц.

Способ согласно настоящему изобретению обеспечивает решение вышеуказанных задач. В частности, этот способ предназначен для количественного измерения содержимого частиц с помощью способа получения изображения в водосодержащем состоянии, такого как крио-ТЭМ. Предоставляется образец вируса или вирусоподобных частиц (VLP), таких как частицы AAV, или частицы вируса. Образец подготовлен для поддержания образца в водосодержащем состоянии. Это можно сделать несколькими способами. Для крио-ТЭМ в предпочтительном варианте исполнения образец быстро замораживается в криогенной жидкости при криогенной температуре. При криогенной температуре содержание частиц каждого VLP в замороженном образце наблюдается в устройстве получения изображений крио-ТЭМ. Для других способов получения изображения в водосодержащем состоянии получение изображения выполняется с помощью ТЕМ-изображения, но не при криогенных температурах, с помощью держателей жидких образцов или добавлением ионной жидкости в образец при приготовлении. Измерение содержимого частиц производится для определения того, пустые ли частицы VLP или нет.

В альтернативном варианте воплощения способ также содержит этап автоматического или ручного обнаружения частиц на изображениях и отображения обнаруженных частиц на дисплее, а также автоматического или ручного удаления частиц, размер которых меньше нижнего предела и больше верхнего предела размера. Также возможно автоматическое удаление или добавление частиц на изображение без предварительного отображения. Также возможно отображение частиц и интерактивное удаление или добавление частиц на изображении.

В другом альтернативном варианте осуществления способ также содержит этап автоматической или ручной классификации частицы, которая имеет внутреннюю плотность и не имеет четкой границы между оболочкой частицы и ядром частицы в качестве заполненной частицы.

В еще одном альтернативном варианте способ содержит также этап автоматической или ручной классификации частицы, имеющей четкую внешнюю оболочку и незначительную внутреннюю плотность как пустую частицу.

В альтернативном варианте способ также содержит этап использования криотрансмиссионной электронной микроскопии для определения содержимого частиц VLP.

В другом альтернативном варианте осуществления способ также содержит этап определения содержимого частиц в частицах аденоассоциированного вируса (AAV).

В еще одном альтернативном варианте воплощения способ дополнительно содержит этап использования частиц AAV в качестве носителя для доставки генов.

В альтернативном варианте воплощения способ дополнительно содержит этап классификации частиц AAV, которые содержат одну или несколько копий гена, в качестве заполненной частицы.

В еще одном альтернативном варианте воплощения способ дополнительно содержит этап классификации AAV частиц, которые не содержат гена, в качестве пустой частицы.

В другом варианте воплощения способ дополнительно содержит добавление ионной жидкости в образец для поддержания VLP в водосодержащем состоянии.

В другом варианте воплощения способ дополнительно содержит получение изображения VLP частиц в их нативном, жидком и водосодержащем состоянии с помощью держателя жидких проб.

Краткое описание чертежей

Чертеж является схематичным изображением образца AAV, наблюдаемого с помощью крио-ТЭМ.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к способу получения изображений в водосодержащем состоянии, такому как крио-ТЭМ, для оценки и количественного измерения объема содержимого частиц VLP, AAV частиц и частиц вируса wt во внутреннем пространстве. Измерение содержимого частиц может представлять собой метрику (число), которая соответствует степени заполнения или пустоты частиц. Это может быть, например, измерение общей интенсивности внутренней частицы или интенсивности, нормированной с интенсивностью на оболочке частицы. Это также может быть мерой того, насколько большая часть области внутри частицы светлая или темная. Как упоминалось выше, важным аспектом настоящего изобретения является осознание и открытие того, что nsTEM не подходит для оценки/анализа заполненных/пустых частиц в связи с тем, что появление частиц при получении изображения на сетке зависит от нескольких параметров, таких как

- толщина красителя (которая варьируется в пределах сетки);
- степень, до которой высох образец (которая варьируется в пределах сетки); и
- целостность частиц (которые могут быть или не быть затронуты процессом окрашивания и подготовки из-за локальных изменений механического напряжения, которому подвергаются частицы).

Так как толщина красителя влияет на внешний вид частиц, это также влияет на результат. Толщина пятна варьируется в пределах сетки, и это не поддается надежному контролю. Например, когда краситель относительно тонкий, частицы более подвержены физическому воздействию в процессе приготовления и некоторые частицы могут продавливаться так, что он окажется в углублении, не проникая внутрь частицы. Когда краситель остается в углублении частицы, он выглядит очень похожим на пустые части-

цы, которые были заполнены им. Таким образом, анализ содержимого частиц во многом зависит от того, будут ли частицы в регионах с толстым или тонким красителем визуализированы и проанализированы. В результате неравномерного распределения красителя на частицах при использовании nsTEM, частицы часто оказываются с разным содержанием, хотя на самом деле не имеют его. Это понимание, которое не было реализовано в прошлом.

Между тем, использование крио-ТЭМ не может негативно повлиять на внешний вид частиц из-за неравномерного распределения красителя (поскольку он не используется), поэтому частицы выглядят одинаково во всех областях обзора, что делает крио-ТЭМ очень эффективной для анализа содержимого согласно настоящему изобретению. Другими словами, хотя использование крио-ТЭМ сложнее для анализа содержимого, чем nsTEM, было неожиданно обнаружено, что преимущества более точных результатов перевешивают недостатки использования более громоздкой технологии крио-ТЭМ. В крио-ТЭМ, согласно способу настоящего изобретения, небольшая порция образца помещается на гидрофилизированную медную сетку, покрытую тонкой углеродной пленкой. Избыток образца затем удаляется с помощью фильтровальной бумаги. Затем сетка быстро, до высухания образца, погружается в криогенную жидкость, где образец мгновенно замораживается. Быстрое замораживание позволяет образцу/пробе внедриться в аморфный лед вблизи его нативной (т.е. неокрашенной) водосодержащей формы, так что частицы имеют правильный внешний вид в образце, поскольку они не подвержены воздействию какого-либо красителя. Затем образец хранится при криогенных температурах в течение всего процесса, пока вставляется и наблюдается в просвечивающем электронном микроскопе. Одним из преимуществ способа настоящего изобретения является то, что он позволяет осуществлять прямое получение изображения неизмененных частиц с возможностью видеть их внутренние особенности. Это позволяет более точно определить, является ли частица пустой или нет. В крио-ТЭМ пустые частицы появляются в виде дисков с незначительной внутренней плотностью. Одно из объяснений является то, что внутренние части частиц можно увидеть с помощью крио-ТЭМ, а пустые частицы имеют низкую внутреннюю плотность. Заполненные частицы появляются в виде темных однородных дисков. Опять же, внутренние части частиц можно увидеть с помощью крио-ТЭМ, а заполненные частицы, которые содержат генетический материал внутри, имеют однородную внутреннюю плотность.

Пример

Ниже приведен подробный пример того, как крио-ТЭМ используется для реализации способа согласно настоящему изобретению.

Подготовка сетки

Подходящие сетки, такие как медные (Cu) сетки 400 меш, сначала гидрофилизировали. Это было сделано путем воздействия на сетки тлеющим разрядом. В частности, медные решетки, покрытые углеродной пленкой, были помещены в устройство для создания тлеющего разряда. Вакуум подавался до тех пор, пока давление в камере не достигло 0,5 мбар. Ток подавался, например, около 20 мА в течение примерно 1 мин. Затем давление было увеличено до давления окружающей среды. Решетки были сняты, а зарядное устройство выключено.

Замораживание сетки

Был включен погружной морозильник. Камера для образцов была уравновешена до желаемой температуры и влажности. Промокательная бумага в камере для образцов была заменена. Подготовлена этановая ванна в холодильной станции. На пинцет была загружена сетка, только что обработанная тлеющим разрядом. Начался процесс замораживания. Около 3 мкл образца помещалось на сетку. Примерно через 10 с ожидания сетка была промокнута фильтровальной бумагой и заморожена. Сетка была перенесена в бокс для замороженных сеток и хранится в жидком азоте. Этан и жидкий азот были безопасно разморожены, погружная морозильная камера была выключена.

Перемещение сетки

Бокс для замороженных сеток был перемещен из места хранения в криостанцию, предварительно охлажденную жидким азотом, в которую предварительно был вставлен криодержатель с предварительным насосом. Сеть была перенесена в слот на криодержателе. Криодержатель был вставлен в крио-ТЭМ и был заполнен контейнер с жидким азотом.

Получение изображения сетки

На этапе получения изображения сетки важно было убедиться, что микроскоп правильно выровнен в соответствии с протоколом, описанным производителем, и пустое изображение с камеры было плоским. (Следует понимать, что этап получения изображения сетки может выполняться автоматически, если изображения получены автоматически, без необходимости присутствия оператора на микроскопе для получения изображений. Сетка экранируется до тех пор, пока не будет найдена подходящая область). Затем было установлено увеличение с полем зрения около 600 -1000 нм. Фокус 0 был найден перед установкой микроскопа на небольшую расфокусировку около 6 мкм. Этот этап расфокусировки можно было бы выполнить вручную или автоматически в микроскопах, оснащенных функциями автофокусировки и расфокусировки. Получали изображение и смещались в близлежащую область. Шаг получения изображения повторялся до тех пор, пока не было получено необходимое количество изображений.

Последующая обработка и анализ изображений

Изображения были сохранены и импортированы с помощью подходящего программного обеспечения, такого как Vironova Analyzer Software (VAS). Изображения для сохранения в микроскопе были выданы и сохранены в подходящем формате, например в 16-разрядном формате tiff, или же автоматически сохранены после автоматического получения изображения. Создана соответствующая проекту папка в VAS и заполнена вся необходимая информация в различных пунктах. Импорт изображений осуществлялся в пункте "Микроскопия" путём щелчка правой кнопкой мыши по пункту, выбора "Открыть изображение(я)" и выбора соответствующих файлов перед щелчком по "Открыть".

Обнаружение и классификация частиц

В пункте "Микроскопия", в поле "Тип частицы", было введено "VLP(сгуо)". Изображения, на которых частицы должны были быть обнаружены, были отобраны до щелчка правой кнопкой мыши на одном из них. Было выбрано "Запуск обнаружения...". Были введены следующие параметры:

Алгоритм детектирования		Сегментация эллипса
Параметр	Рекомендуемое номинальное значение	Приемлемый диапазон
Четкое содержимое обнаруженных частиц	Да	Да
Темные мембраны	Да	Да
Разделить большие компоненты	Да	Да
Допустимый зазор между краями	0.2	0.2
Ширина края (нм)	5	4 – 6
Максимальный диаметр (нм)	24	22 – 30
Минимальный диаметр (нм)	18	16 – 22
Отношение малой оси	0.2	0.2
Выходная форма	Круговая	Круговая
Уточнение после обработки	Да	Да
Предпочитать круговые эллипсы	Да	Да
Способ предварительной обработки	Выделение краев	Выделение краев

Обнаруженные частицы отображались в панели управления графиками с помощью графика рассеяния, на оси x - "Размер", на оси y - "Сигнал-шум". Обнаруженные частицы с сигналом к шуму <math><0.1</math> были сначала отобраны перед удалением.

Обнаруженные частицы размером <math><17</math> нм и >28 нм были отобраны перед удалением. Изображения были визуально оценены на экране и ложно и неправильно обнаруженные частицы AAV были удалены. Правильно обнаруженные частицы были приняты с помощью поверочного инструмента. Частицы AAV, которые не были обнаружены при автоматическом обнаружении, были выбраны вручную.

В более широком смысле, были выполнены следующие этапы анализа:

- 1) частицы, представляющие интерес в изображениях, были обнаружены либо вручную, либо с помощью подходящего алгоритма обнаружения (например, соответствие шаблонов, круговое обнаружение объектов, способы обнаружения по регионам или границам и т.д.);
- 2) ложные обнаружения, основанные на измерениях размера, формы и соотношения сигнал/шум для каждой частицы, были удалены (автоматически или вручную или в комбинации) и
- 3) при необходимости добавлялись частицы, которые не были обнаружены, если использовался алгоритм автоматического обнаружения.

Классификация частиц

В пункте класса частиц панели инструментов графика было выбрано "Содержимое". Все обнаруженные частицы отображались с помощью инструмента RDP PCA (RDP, Remote Desktop Protocol - протокол удалённого рабочего стола; PCA, Principal Component Analysis - метод главных компонент) на панели инструментов управления графиком. Участок был повернут для того, чтобы получить четкое разделение между двумя кластерами. Частицы одного кластера были отобраны и отнесены к соответствующему классу. Класс был определен с помощью следующих параметров:

- частицы AAV, имеющие внутреннюю плотность и не имеющие четкой границы между оболочкой и ядром, классифицировались как заполненные частицы; и
- частицы AAV, имеющие ярко выраженную внешнюю оболочку и незначительную внутреннюю плотность, классифицировались как пустые частицы.

Частицы из другого кластера были затем отобраны и присвоены соответствующему классу. Все изображения были визуально проанализированы для оценки классификации. Класс "Неопределенно"

присваивался всем частицам, в которых было обнаружено несоответствие между оценкой аналитика и полуавтоматической классификацией.

В более широком смысле, были выполнены следующие шаги:

1) содержимое частиц измерялось путем анализа общей интенсивности и распределения интенсивности внутри частиц и

2) частицы были классифицированы на основе этих измерений. Это можно было бы сделать несколькими способами, например путем ручного установления порогового значения каждого измеряемого параметра (например, если темнее, чем определенная интенсивность T_f , классифицировать как заполненную, если ярче, чем другая интенсивность T_e , то классифицировать как пустую, и если между T_f и T_e , то классифицировать как неопределенную). Это также можно было бы сделать путем маркировки групп частиц на графиках рассеяния характеристик или с помощью способов автоматической/полуавтоматической кластеризации и классификации. В полностью автоматизированном режиме можно различать заполненные и пустые частицы, глядя на профиль внутренней плотности частиц.

На чертеже приведена схематическая иллюстрация типичного изображения частиц VLP образца AAV 100, наблюдаемого крио-ТЭМ. Образец содержит заполненные частицы 102, которые выглядят как простые темные диски. Таким образом, частицы 102 заполняются, например, фармацевтическим веществом или геном. Пустые частицы 104 появляются в виде темных кругов с ярко выраженной внутренней интенсивностью, соответствующей низкой внутренней плотности, поскольку они не содержат или не несут гена. Частицы 106, для которых классификация неоднозначна, как представляется, имеют характеристики между заполненными и пустыми частицами. Таким образом, анализ определяет как количество/число частиц, содержащих фармацевтическое вещество (ген), так и насколько каждая частица заполнена фармацевтическим веществом или геном. Некоторые частицы могут быть только частично заполнены фармацевтическим веществом, в то время как для генов частицы либо содержат один или несколько экземпляров гена, либо являются пустыми. Шкала 108 на чертеже представляет собой 100 нм.

Хотя настоящее изобретение было описано в соответствии с предпочтительными композициями и вариантами осуществления, следует понимать, что некоторые замены и изменения в нем могут быть сделаны без отклонения от духа и объема следующих пунктов формулы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения наличия содержимого внутри вирусоподобных частиц (VLP) или вирусных частиц с помощью получения изображения, содержащий подготовку образца для поддержания образца (100) в нативном неокрашенном водосодержащем состоянии;

получение изображения образца (100) в нативном неокрашенном водосодержащем состоянии в устройстве получения изображения;

наблюдение содержимого внутри каждой частицы VLP или вирусной частицы в образце в устройстве получения изображения;

при этом частицы, имеющие внутреннюю плотность и не имеющие четкой границы между оболочкой и ядром, являются заполненными частицами; и

частицы, имеющие ярко выраженную внешнюю оболочку и незначительную внутреннюю плотность, являются пустыми частицами.

2. Способ по п.1, в котором способ дополнительно содержит этап автоматического или ручного обнаружения частиц на изображениях и удаления частиц, размер которых меньше нижнего предела размера и больше верхнего предела размера.

3. Способ по п.2, в котором способ дополнительно содержит отображение VLP или вирусных частиц и интерактивное удаление или добавление VLP или вирусных частиц на изображение.

4. Способ по п.1, в котором способ дополнительно содержит этап использования криотрансмиссионной электронной микроскопии для определения содержимого частиц VLP.

5. Способ по п.1, в котором частицы являются частицами аденоассоциированного вируса (AAV).

6. Способ по п.1, в котором способ дополнительно содержит добавление ионной жидкости в образец для поддержания частиц VLP в водосодержащем состоянии.

7. Способ по п.1, в котором получение изображения образца в водосодержащем жидком состоянии осуществляют с помощью держателя жидкого образца.

