

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045221**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.03

(21) Номер заявки
202091501

(22) Дата подачи заявки
2018.12.19

(51) Int. Cl. **B01D 15/38** (2006.01)
B01J 20/286 (2006.01)
B01J 20/32 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)

(54) НЕПОДВИЖНАЯ ФАЗА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, СПОСОБ И НАБОР ДЛЯ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 102017000146281

(32) 2017.12.19

(33) IT

(43) 2020.09.21

(86) PCT/EP2018/085974

(87) WO 2019/122003 2019.06.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭДВАНСТ ЭКСТРАСЕЛЛУЛАР
ВЕСИКЛ ЭППЛИКЕЙШНЗ С.Р.Л.
(IT)**

(72) Изобретатель:
**Д'Агостино Вито Джузеппе,
Провенцани Алессандро, Куатроне
Алессандро, Цукал Кьяра,
Нотаранджело Микела, Модельска
Анджелика, Пеше Изабелла (IT)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A2-2008045526

FATIN MOHD NASIR ET AL.:
"IMMOBILISED METAL AFFINITY
CHROMATOGRAPHY (IMAC) BEADS FOR
LYSOZYME SEPARATION: SYNTHESIS AND
CHARACTERIZATION STUDY", MALAYSIAN
JOURNAL OF ANALYTICAL SCIENCES, vol.
20, no. 3, 15 June 2016 (2016-06-15), pages
578-584, XP055500136, MY, ISSN: 1394-2506, DOI:
10.17576/mjas-2016-2003-17, Section: Materials and
Methods, figure 3

JOSHUA A. BORNHORST ET AL.:
"Purification of proteins using polyhistidine affinity
tags", METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 326,
1 January 2000 (2000-01-01), pages 245-254,
XP055310519, US, ISSN: 0076-6879, DOI:
10.1016/50076-6879(00)26058-8, Section: Affinity
Matrices; page 2

CN-A-106622181
WO-A2-2004106361

(57) Изобретение направлено на неподвижную фазу для выделения внеклеточных везикул, секретлируемых эукариотическими или прокариотическими клетками в биологической жидкости, где указанная неподвижная фаза функционализована катионами, выбранными из группы, состоящей из никеля и алюминия, имеет дзета-потенциал от 30 до 80 мВ, состоит из магнитных или немагнитных частиц микрометрического или нанометрического размера, и выбрана из группы, состоящей из гранул, изготовленных из агарозы, кремния, альгинатных солевых матриц, полимеров для металл-аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (ИМАС), никелевого хелатного акцептора, анионных или углеродных стирольных полимеров. Изобретение также направлено на способ и набор для получения заявленной неподвижной фазы и на применение заявленной неподвижной фазы для выделения внеклеточных везикул, секретлируемых эукариотическими или прокариотическими клетками, в биологической жидкости.

045221
B1

045221
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области выделения внеклеточных везикул из среды для культивирования клеток или биологических жидкостей.

Предшествующий уровень техники

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой мембранные частицы, которые включают экзосомы (80-200 нм), микровезикулы (100-600 нм) и апоптотические тельца (800-5000 нм). Эта классификация в основном основана на размере везикул, хотя для их биогенеза были предложены разные механизмы. В онкологии ВВ обладают потенциалом для изучения модуляции микроокружения опухоли и иммунного надзора, для сбора информации и/или биомаркеров, высвобождаемых из опухоли, или для использования в качестве носителей терапевтических средств.

Биологические и биомедицинские исследования все больше фокусируются на роли ВВ в различных физиологических и патологических процессах. Таким образом, на сегодняшний день было предложено много способов выделения ВВ из биологического материала, хотя многие из них недостаточно эффективны или стандартизированы (Theyu C., et al., *Curr Protoc Cell Biol*, 2006; Gardiner C., et al. *Extracell Vesicles* 2016).

Методики выделения ВВ, описанные до настоящего времени, в значительной степени относятся к очистке экзосом, то есть наименьшим ВВ с размером от 50 до 200 нм. Описаны следующие широко цитируемые методики:

- дифференциальное ультрацентрифугирование (Livshits et al., *Sci Rep*. 2015);
- центрифугирование в градиенте плотности (Van Deun et al., *J Extracell Vesicles*, 2014; Iwai et al., *J Extracell Vesicles*, 2016);
- микрофильтрация (Merchant et al., *Proteomics Clin Appl*. 2010; Grant et al., *J Immunol Methods*, 2011; Hyun-Kyung Woo et al., *ACS Nano*. 2017);
- микроструйная техника (Davies et al., *Lab Chip*, 2012; He et al., *Lab Chip*, 2014; Kanwar et al., *Lab Chip*, 2014; Liga et al., *Lab Chip*, 2015);
- иммунопреципитация с использованием синтетических пептидов (Ghosh et al., *PLoS One*, 2014), гепарина (Balaj et al., *Sci Rep*. 2015), комбинации антител, которые распознают мембранные белки (кластеры дифференцировки или антигены или компоненты) (Pugholm et al., *Biomed Res Int*. 2015; Cao et al. al., *Mol Cell Proteomics*, 2008), или белок Tim4 (Nakai et al., *Sci Rep*. 2016);
- осаждение/выделение на основе полимеров или растворителей (Deregibus et al., *Int J Mol Med*. 2016; Taylor et al., *Methods Mol Biol*., 2011; Gallart-Palau et al., *Sci Rep*. 2015);
- ультразвук (Lee et al., *ACS Nano* 2015);
- коммерческие системы на основе колонок, включая ExoQuick™ (System Bioscience), реагент для выделения всех экзосом (Thermo Fisher), набор для выделения экзосом miRCURY™ (Exiqon), exoEasy (Qiagen), Exo-spin™ (Cell Guidance), набор ME™ (NEP).

Ультрацентрифугирование в настоящее время считается наиболее эффективной и широко применяемой процедурой (золотым стандартом) в качестве способа первичного выделения (Gardiner C et al., *J Extracell Vesicles*, 2016; Al-Nedawi K и Read *J Methods Mol Biol*. 2016), благодаря тому факту, что в альтернативных методиках центрифугирования в градиенте плотности и осаждения используются химические вещества, влияющие на выход, состав и целостность ВВ; иммуноаффинный захват приводит к дифференциальному выделению субпопуляций ВВ (следовательно, к низкой гетерогенности) и является дорогостоящим, поскольку включает антитела; эксклюзионная хроматография требует значительных объемов биологического образца, дающего очень низкий выход; системы на основе колонок и центрифуг сильно нарушают целостность ВВ.

Однако даже при ультрацентрифугировании существуют критические проблемы: они касаются трудоемкости, важности объема пробы, подлежащей обработке, и времени (6-12 ч), чистоты полученного образца, используемого инструмента, опыта оператора, высокого уровня загрязнителей (белковых агрегатов), совместного осаждения с ВВ, деградации биомолекул в зависимости от времени обработки (Lobb et al., *J Extracell Vesicles* 2015, Gardiner C. et al., *J Extracell Vesicles*, 2016).

Из предшествующего уровня техники известны Ni²⁺-функционализированные неподвижные фазы (такие как металл-аффинная хроматография (ИМАС)), акцепторные гранулы никелевого хелата (Dynabeads)), предназначенные для очистки или распознавания рекомбинантных белков с гистидиновой меткой. В этих функционализированных неподвижных фазах положительный суммарный заряд, возникающий в результате функционализации, даже не описывается производителем, который вместо этого указывает индекс стабильности при различных значениях pH (очень переменный), влияющий на эффективность связывания в растворе с белками в широком диапазоне размеров (от нескольких кДа до сотен кДа).

Целью настоящего изобретения является обеспечение подходящей функционализированной неподвижной фазы и соответствующего способа ее функционализации и использования в качестве нового инструмента для выделения внеклеточных везикул (ВВ); указанный способ должен быть более быстрым, менее трудоемким и более эффективным, чем ультрацентрифугирование, и обеспечивать дополнительные преимущества по сравнению с существующими способами.

Изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение направлено на неподвижную фазу для выделения внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых эукариотическими или прокариотическими клетками в биологической жидкости, где указанная неподвижная фаза, функционализована катионами, выбранными из группы, состоящей из никеля и алюминия, имеет дзета-потенциал от 30 до 80 мВ, состоит из магнитных или немагнитных частиц микрометрического или нанометрического размера, и выбрана из группы, состоящей из гранул, изготовленных из агарозы, кремния, альгинатных солевых матриц, полимеров для металл-аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (ИМАС), никелевого хелатного акцептора, анионных или углеродных стирольных полимеров.

Согласно изобретению, заявленная неподвижная фаза является агарозными гранулами с частицами, имеющими средний размер 25-40 мкм, если размер является микрометровым.

Настоящее изобретение также направлено на способ получения функционализованной неподвижной фазы, включающий суспендирование нефункционализованной неподвижной фазы в солевом буферном растворе с физиологическим значением рН, содержащем 15-100 мМ соли никеля или алюминия.

Согласно изобретению, солевой буферный раствор с физиологическим значением рН представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (ФБР) или любой другой буфер с физиологическим рН.

Согласно изобретению, суспензию инкубируют при комнатной температуре при круговом вращении при 300-600 об/мин.

Настоящее изобретение также направлено на применение заявленной неподвижной фазы для выделения внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых эукариотическими или прокариотическими клетками, в биологической жидкости.

Настоящее изобретение также направлено на способ выделения внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых эукариотическими или прокариотическими клетками в биологической жидкости, который включает

добавление по каплям на поверхность биологической жидкости суспензии гранул с неподвижной фазой по любому из пп.1, 2, причем указанная суспензия находится в солевом растворе, забуференном при физиологическом рН,

инкубирование гранул в биологической жидкости и последующее разделение

путем мягкого центрифугирования и декантации,

удаление ВВ с гранул путем инкубации по меньшей мере в равном объеме элюирующего раствора, который приготовлен перед использованием путем смешивания двух физиологических растворов с физиологическим рН, содержащих по меньшей мере два разных хелатирующих агента.

Согласно изобретению, хелатирующие агенты выбраны из группы, состоящей из ЭДТА и цитрата натрия.

Согласно изобретению, в конечном элюирующем растворе ЭДТА имеет концентрацию 3-6 мМ, а цитрат натрия имеет концентрацию 30-300 мкМ.

Согласно изобретению, инкубацию с элюирующим раствором поддерживают при круговом вращении при 20-37°C.

Согласно изобретению, биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из сред для культивирования клеток, физиологических буферных растворов, сред для бактериальных культур, крови человека и животных, экссудатов тканей человека и животных.

Настоящее изобретение также направлено на способ подвергания ВВ, выделенных заявленным способом, протоколам для экстракции белка и нуклеиновых кислот из ВВ, технологиям обнаружения антигена в сочетании со специфическими антителами, детекции и количественному определению ассоциированных и/или содержащихся в везикулах нуклеиновых кислот с помощью ОТ-ПЦР, детекции и количественному определению ассоциированных и/или содержащихся в везикулах нуклеиновых кислот с помощью капельной цифровой ПЦР.

Настоящее изобретение также направлено на набор для выделения внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых эукариотическими или прокариотическими клетками, в биологической жидкости, который включает

контейнер, содержащий неподвижную фазу по любому из пп.1, 2, или

контейнер, содержащий нефункционализованную неподвижную фазу, состоящую из магнитных и немагнитных частиц микрометрового или нанометрового размера, при этом неподвижная фаза выбрана из группы, состоящей из гранул, изготовленных из агарозы, кремния, альгинатных солевых матриц, полимеров для металл-аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (ИМАС), никелевого хелатного акцептора, анионных или углеродных стирольных полимеров, и

контейнер, содержащий соль никеля или алюминия.

Настоящее изобретение также направлено на набор для выделения внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых эукариотическими или прокариотическими клетками, в биологической жидкости, который включает:

контейнер, содержащий нефункционализованную неподвижную фазу, состоящую из магнитных и немагнитных частиц микрометрового или нанометрового размера; при этом неподвижная фаза выбрана

из группы, состоящей из гранул, изготовленных из агарозы, кремния, альгинатных солевых матриц, полимеров для аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (ИМАС), никелевого хелатного акцептора, анионных или углеродных стирольных полимеров; и контейнер, содержащий соль никеля или алюминия.

Согласно изобретению, заявленный набор дополнительно включает контейнер, содержащий солевой буферный раствор с физиологическим значением pH, по меньшей мере два контейнера, содержащих различные хелатирующие агенты. Подробное описание изобретения

Неподвижная фаза согласно изобретению предпочтительно функционализована никелем.

Неподвижная фаза предпочтительно выбрана из группы, состоящей из агарозных или кремниевых гранул, магнитных или немагнитных, альгинатных солевых матриц, полимеров для металл-аффинной хроматографии (ИМАС), акцепторных гранул хелата никеля, анионных (в виде стирола дивинилбензола) или углеродных (в виде графена) стирольных полимеров. Агарозные гранулы являются особо предпочтительными.

Под микрометрическим размером подразумевается от 0,5 до 1000 мкм; под нанометрическим размером подразумевается от 1 до 500 нм.

Способ по настоящему изобретению далее описан на основе варианта осуществления с агарозными гранулами известного номинального размера (предпочтительно 25-40 мкм), функционализированными ионами никеля, т.е. положительно заряженными, что позволяет связывать в физиологическом растворе отрицательно заряженные наночастицы и микрочастицы. Количество ионов никеля, воздействующих на концентрацию используемых гранул, придает им электрохимические свойства, приводящие к положительному суммарному заряду от 30 до 80 мВ, стабильному в течение по меньшей мере шести месяцев, если гранулы хранятся при 4°C, в физиологическом фосфатно-солевом буферном растворе (ФБР). Любые консерванты, такие как азид натрия или 20% этанол, могут быть добавлены в раствор для хранения после интенсивного промывания в ФБР перед использованием неподвижной фазы.

Солевой раствор при физиологическом значении pH предпочтительно представляет собой ФБР, но может быть заменен любым другим буферным раствором (основа Trizma™, HEPES и т.д.), не интерферирующим с двухвалентными катионами, например, никелем (в переходном или стабилизированном состоянии в выявляемых формах) и забуференным при физиологическом значении pH 7,4. Буферный солевой раствор, содержащий ионы Ni^{2+} , предпочтительно дополнительно стерилизуют с помощью фильтров 0,2 мкм.

Агарозные гранулы согласно изобретению предпочтительно получают из нефункционализированных гранул путем инкубации в 15-30 мМ растворе соли никеля (предпочтительно сульфата никеля или хлорида никеля, оксида никеля, или в случае функционализации с алюминием, сульфата алюминия, хлорида алюминия, оксидов алюминия и/или силикатов алюминия) в ФБР при pH 7,4, стерилизованном с помощью фильтров 0,2 мкм.

Предпочтительно смесь гранул в растворе соли никеля инкубируют при комнатной температуре (20-25°C) и при осторожном круговом вращении в течение минимум 1-3 мин.

После инкубации гранулы отделяют от раствора центрифугированием.

Надосадочную жидкость удаляют, и гранулы промывают буферным солевым раствором, предпочтительно стерилизованным. Предпочтительно промывание можно повторять 2-3 раза для удаления следов ионов никеля и остаточных противоионов путем суспендирования, центрифугирования и удаления надосадочной жидкости.

После промывания гранулы предпочтительно суспендируют в объеме солевого буферного раствора, предпочтительно равном объему гранул, при физиологическом значении pH, предпочтительно стерилизованного с помощью фильтров 0,2 мкм, и их (в дальнейшем именуемые С-гранулами) можно хранить при 4°C.

Если неподвижная фаза (коммерческая) функционализована катионами Ni^{2+} или Al^{3+} , перед функционализацией, как описано выше, необходимо подвергнуть ее очистке путем одного или нескольких промываний водным раствором с добавлением 200-300 мМ NaCl или KCl, 100-300 мМ ЭДТА или ЭГТА, 300-500 мМ имидазола или раствора, содержащего катионные хелатирующие агенты с широким диапазоном pH (обычно от 5 до 8), и одного или нескольких промываний бидистиллированной водой (18,2 МОм cm^{-1}).

Способ в соответствии с настоящим изобретением включает использование С-гранул, которые можно добавлять по каплям на поверхность биологической жидкости, предпочтительно отделенной от клеточного детрита центрифугированием при 2800 g, собирать в пробирки любого размера и инкубировать при комнатной температуре в течение минимум 30 мин. С-гранулы добавляют в объемном соотношении 10-30 мкл на каждый мл образца, и их избыток определяют эмпирически на основе количества частиц, обнаруженных в биологической жидкости.

Биологической жидкостью может быть

среда для культивирования клеток, содержащая не более 1,5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) для использования в качестве таковой для процедуры NBI. Если процентное содержание ЭТС выше, предпочтительно разбавлять ФБР при pH 7,4;

бактериальные питательные среды (среда LB или среды, содержащие пептоны, сахара и/или дрожжевые экстракты);

физиологический буферный раствор;

образец жидкости от биопсии (цельная кровь или сыворотка или плазма, моча, спинномозговая жидкость, молоко, слюна, тканевые экссудаты) человеческого или животного происхождения. Даже в этом случае вязкость среды может быть снижена путем разбавления подходящим объемом ФБР.

После инкубации с биологическим образцом С-гранулы + ВВ отделяют декантацией. Слабое центрифугирование на максимальной скорости 300 g позволяет ускорить этап и в то же время сохранить целостность ВВ и неподвижной фазы во время процедуры NBI.

Отделение ВВ от С-гранул осуществляют путем добавления раствора (далее определенного как элюирующий раствор), свежеприготовленного в ФБР при pH 7,4 перед использованием, полученного смешиванием двух растворов А и В, содержащих по меньшей мере 2 разных хелатирующих агента.

Указанный раствор А предпочтительно содержит 3-6 mM ЭДТА при pH 8,0; более предпочтительно раствор А представляет собой ФБР с добавлением 3-6 mM ЭДТА при pH 8,0.

Указанный раствор В предпочтительно содержит 30-300 мкМ цитрата натрия; более предпочтительно раствор В представляет собой ФБР с добавлением 30-300 мкМ цитрата натрия и 50-100 mM NaCl. Как для раствора А, так и для В, другими хелатирующими агентами, которые можно использовать, являются имидазол, ДТРА (диэтиленetriаминпентауксусная кислота), NTA (нитрилотрехуксусная кислота), амидоксим, молекулы, предназначенные для этой цели, или пептиды, которые могут устанавливать ковалентное и/или конкурентное связывание с Ni^{2+} и, следовательно, стимулировать стадию высвобождения ВВ из неподвижной фазы более или менее эффективно.

После смешивания растворов А и В добавляют подходящее количество KH_2PO_4 (8 мкл KH_2PO_4 , где концентрация ЭДТА составляет 3,2 mM, концентрация NaCl составляет 60 mM, а концентрация цитрата натрия составляет 45 мкМ) или любого другого солевого буферного раствора с физиологическим значением pH 7,4, и в то же время не влияющего на ионы никеля и/или морфологические и биохимические свойства ВВ.

С-гранулы + ВВ предпочтительно инкубируют по меньшей мере с тем же объемом элюирующего раствора, причем указанную инкубацию предпочтительно проводят при круговом вращении в течение минимум 10-20 мин при 20-37°C, предпочтительно 28°C.

Чтобы отделить С-гранулы от элюирующего раствора + ВВ, предпочтительно проводят центрифугирование с угловым ротором при минимум 300 g в течение примерно 1 мин. Надосадочную жидкость, содержащую цельные и полидисперсные ВВ (обычно распределенные между 50 и 2000 нм), переносят в пробирки с низкой степенью связывания образца.

Вышеприведенное описание со ссылкой на агарозные гранулы является пригодным, с очевидными корректировками, для любой другой неподвижной фазы согласно настоящему изобретению.

Вышеупомянутая процедура, описанная на всех ее этапах, может поддерживаться дополнительными модификациями или инструментальными связями, подходящими для содержания неподвижной фазы любой природы в соответствии с биохимическими условиями, указанными выше, в условиях стабильности или подвижности (колонки, матрицы, фильтры, и т.д.), и позволяющими упростить или оптимизировать процедуру.

Описанный выше способ совместим с последующими приложениями, такими как выделение РНК из ВВ, осаждение ВВ и/или сортировка на основе антител, амплификация нуклеиновых кислот, содержащихся или адсорбированных в ВВ, с помощью ПЦР (полимеразной цепной реакции) и её технических вариантов, трансфекция ВВ в эукариотических клетках, инженерия ВВ с нуклеиновыми кислотами, использование ВВ в качестве носителей нуклеиновых кислот, пептидов или фармакологических агентов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к набору, включающему контейнер, содержащий неподвижную фазу, как описано выше, или, альтернативно, контейнер, содержащий нефункционализированную неподвижную фазу, состоящую из магнитных и немагнитных частиц микрометрического или нанометрического размера; и

контейнер, содержащий соль Ni^{2+} или Al^{3+} . Предпочтительно набор дополнительно включает:

контейнер, содержащий солевой буферный раствор с физиологическим значением pH;

по меньшей мере два контейнера, каждый из которых содержит различный хелатирующий агент.

Предпочтительно набор дополнительно включает:

по меньшей мере один контейнер, содержащий регулируемую pH солевой буферного раствора с физиологическим pH смесь хелатирующих агентов.

Предпочтительно набор может дополнительно включать

микроцентрифужные пробирки с низкой связывающей способностью в отношении образца.

Набор, описанный выше, где предпочтительно:

неподвижная фаза состоит из агарозных гранул размером 25-40 мкм;

соль никеля представляет собой $NiSO_4$, или соль алюминия представляет собой Al_2O_3 или алюмосиликаты;

солевой буферный раствор с физиологическим значением pH, представляет собой ФБР;

хелатирующий агент представляет собой ЭДТА, когда катионом является Ni^{2+} , или соли магния, такие как MgCl_2 или MgSO_4 , когда катионом является Al^{3+} ;

другим хелатирующим агентом является цитрат натрия, когда катионом является Ni^{2+} , или соли кальция, такие как CaCl_2 или $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, когда катионом является Al^{3+} ;

регулирующий pH солевой раствор является раствором KH_2PO_4 или K_2HPO_4 . Настоящее изобретение будет лучше понято в свете следующих вариантов осуществления.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - схема, указывающая удобный для пользователя подход и этапы выделения ВВ с помощью NBI согласно настоящему изобретению, начиная с биологического материала различного происхождения.

Фиг. 2 - анализ с помощью проточной цитометрии, показывающий сравнение количества частиц ($>0,5$ мкм), выделенных ультрацентрифугированием или NBI. А) Прибор FACS Canto (BD) был откалиброван с помощью полистирольных гранул диаметром 1 и 10 мкм (F13838, Life Technologies). В) Количество частиц, захваченных с использованием процедуры NBI с использованием нефункционализованных гранул (отрицательный контроль). С) Количество частиц $>0,5$ мкм (P2), полученных после ультрацентрифугирования (56,6%) или NBI (58,8%) с использованием агарозных гранул, функционализованных 19 мМ сульфатом никеля. Графики представляют два независимых эксперимента.

Фиг. 3А) - очистка белков с помощью гистидиновой метки. Окрашивание кумасси после 15% ДСН полиакриламидного геля рекомбинантных белков показывает: М - предварительно окрашенный набор маркерных белков; 1 - белок T7p07, 105 кДа (с нанесением на гель 2 мкг); 2 - белок HuR, 36 кДа (с нанесением на гель 300 нг); 3 - белок YTHDF1, 23 кДа (с нанесением на гель 2 мкг). В) Конкурентный анализ, выполненный в бессывороточной среде для культивирования клеток, обогащенной 500 мкг/мл экстракта общего белка DH5aaa E.coli и с суммарным количеством рекомбинантных белков 150 мкг/мл, показанных в (А) (T7p07, HuR, YTHDF1). Два параллельных геля были проявлены после окрашивания SYPRO Ruby или вестерн-блоттинга с использованием антитела против гистидиновой метки. FT (проточное элюирование) представляет собой среду после воздействия гранул NBI, и графики получены в результате анализа с применением qNANO (iZON Science) с использованием указанных нанопор. Раствор 1X позволяет максимально селективно элюировать ВВ в обогащенной белком системе. С) Повышенная концентрация хелатирующих агентов и солей в элюирующем буфере изменяет целостность ВВ в 1,5 раза. Графики, полученные с помощью анализа qNANO, представляют два независимых эксперимента, а уменьшение количества и размера указывает на эффект разрушения ВВ.

Фиг. 4А) - результаты трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) ВВ, полученных посредством NBI после фиксации 2,5% параформальдегидом в элюирующем буфере. В) Вестерн-блоттинг анализ извлеченных лизатов ВВ из 18×10^6 (NBI1) или 9×10^6 (NBI2) или 1% общего лизата клеток U87 (TCL).

Фиг. 5 - смесь липосом размером $4,2 \times 10^9$ с диаметром $181 \pm 23,8$ нм, полученная ультрацентрифугированием (УЦ) или NBI. Тот же эксперимент был воспроизведен после окрашивания липосом фосфатидилэтаноламин-родамином (PE-Rho, 5 нг/мл).

Фиг. 6 - микровезикулы, выделенные из клеток U87, культивированные в 3 мл бессывороточной среды и проанализированные сразу после (t0) или через 24 дня (t24, хранение при 4°C) с помощью УЦ или NBI. Затем проводили повторные измерения gNANO в течение 52 дней после очистки, и рассчитывали период полураспада популяции микровезикул с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.5 по сравнению со временем t0.

Фиг. 7 - воспроизводимость метода NBI была проверена с использованием бессывороточной среды с клетками U87, посеянными с различной плотностью в 6-луночные планшеты, как указано (NBI 1, 2 и 3). Условия с 10% ультрацентрифугатной сывороткой (dFBS) показали существенное совпадение с результатами, полученными с образцами NBI1. Графики представляют 3 независимых эксперимента, и общий коэффициент вариации (КВ) составил 6,1%, демонстрируя превосходную воспроизводимость метода.

Фиг. 8 - выделенные ВВ как функция плотности клеток в 6-луночных планшетах (1 мл) показывают различную динамику высвобождения в культуральной среде. А) ВВ очищали с помощью NBI через 24 ч, и клетки подвергали воздействию 10 нг/мл Hoechst33342, окрашивающей ДНК, указывающей количество посеянных клеток. Изображения были получены с помощью системы анализа "высокого содержания", программного обеспечения Harmony v4.1 и инструмента Operetta (Perkin Elmer). В) Среда, описанная в (А), была обработана NBI, и количество экзосом и микровезикул, обозначенное здесь в Log_2 , было измерено с помощью qNANO (iZON Science). Стандартное отклонение относится к 3 независимым экспериментам.

Фиг. 9 - количество и размер ВВ, выделенных NBI, были проанализированы для нескольких линий опухолевых клеток, как указано. Только клетки SH-SY5Y показали существенное снижение высвобождения обеих популяций ВВ (** значение $P = 0,006$, $F = 70,13$ и *** $<0,0001$, $F = 30,84$, с использованием ANOVA и апостериорного критерия Бонферрони). Стандартное отклонение относится к 3 независимым экспериментам.

Фиг. 10 - универсальность NBI была также подтверждена при выделении везикул, высвобождаемых грамотрицательными бактериями. Клетки E. coli DH5aaa выращивали в полной среде LB до $\text{ОП}_{600} = 0,7$.

Бактерии осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 15 мин, и надосадочную жидкость использовали для обработки NBI. Частицы анализировали с помощью qNANO с использованием нанопор NP150 и NP200, и наибольшая обнаруженная популяция имела диаметр 92 ± 29 нм. График представляет два независимых эксперимента.

Фиг. 11 - подсчет корпускулярных элементов крови, взятых у 47 здоровых доноров со средним возрастом 45 лет в Детской больнице Мейера во Флоренции, проводили гематологическим анализатором Sysmex XE-5000 (Sysmex America, Манделейн, Иллинойс) в соответствии с инструкциями производителя.

Фиг. 12 - сравнение количества микрочастиц (≥ 500 нм), выделенных NBI из той же донорской плазмы и сыворотки. Данные проточного цитометра были получены в течение 2 мин, и показан относительный процент той же популяции частиц.

Фиг. 13 - А) NBI применяли к 0,5 мл плазмы, и посредством анализа ИПРЗ (импульсного перестраиваемого резистивного зондирования) определяли количество и размер указанных везикул. Количество экзосом коррелировало с эритроцитами (RBC), коэффициент Пирсона = 0,99. В) Те же анализы, проведенные в А, были применены для подсчета микровезикул, и корреляция с тромбоцитами (PLT) составила 0,98.

Фиг. 14 - CD41a и CD235a биотинилированные антитела, направленные против известных тромбоцитарных и глобулярных маркеров, соответственно, использовали для изучения "линий ВВ". Каждый образец везикул в растворе, очищенном NBI, был разделен на две эквивалентные части, которые соответственно инкубировали с антителом или биотином (отрицательный контроль). После осаждения конъюгированными со стрептавидином магнитными гранулами оставшиеся везикулы в растворе были охарактеризованы посредством qNANO. Количество показанных частиц нормализовано к относительному отрицательному контролю. * Значение $P < 0,05$; ** значение $P < 0,01$; *** Значение $P < 0,001$.

Фиг. 15 - два микролитра из 20 синтезированных кДНК, начиная с 0,1-4 нг РНК, экстрагированной из NBI-очищенных везикул из плазмы 47 доноров. Цифровую капельную ПЦР (цкПЦР) использовали с химикатом EvaGreen и следующими праймерами: 5'-CAACGAATTTGGCTACAGCA (SEQ ID №1) и 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG (SEQ ID №2). Абсолютное количество копий мРНК ГАФДГ (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) было получено после анализа с помощью программного обеспечения QuantaSoft Analysis (BIORAD).

Фиг. 16-17 - абсолютное количество копий мРНК ГАФДГ, представленное на фиг. 15, положительно коррелирует с количеством тромбоцитов ($r=0,62$).

Фиг. 18 - буферные растворы, используемые в методе NBI, совместимы с цифровой капельной ПЦР (цкПЦР), непосредственно используемой для целых ВВ, очищенных из клеток меланомы SK-MEL-28, для количественного анализа специфической РНК, содержащей мутацию V600E.

Фиг. 19А) - первоначальное связывание между противоположными зарядами между никелем (положительным) и ВВ (отрицательным) делает возможным комбинацию NBI и технологии AlphaScreen, где никель-акцепторные гранулы используются в сочетании с биотинилированными антителами и стрептавидиновыми гранулами-донорами для захвата и обнаружения специфических антигенов на поверхности ВВ. В) Пример распознавания и количественного определения специфических антигенов (CD235a, CD41a, CD45), присутствующих на ВВ, циркулирующих в плазме человека. Антиген CD146 является маркером для клеток эпителиального происхождения, который действует как экспериментальный отрицательный контроль.

Фиг. 20 - буферные растворы, используемые для NBI, также совместимы с обычными методами обнаружения белков в денатурирующих условиях, такими как вестерн-блоттинг.

Экспериментальный раздел

Пример 1. Получение функционализированных ионами никеля гранул.

Процедуру функционализации гранул осуществляют следующим образом:

коммерческие гранулы высокоэффективной сефарозы NiNTA (код продукта GE Healthcare 71-5027-67 или 17-5268-01) были взяты в качестве исходных гранул; измеренные значения суммарного заряда были получены в диапазоне от 3 до 25 мВ при 22-25°C в ФБР, по результатам анализа с помощью прибора Malvern Zetasizer;

исходные гранулы подвергают очистке путем одного или нескольких промываний водным раствором с добавлением 200-300 мМ NaCl или KCl, 100-300 мМ ЭДТА или ЭГТА, 300-500 мМ имидазола или раствора, содержащего катионные хелатирующие агенты с широким диапазоном pH (обычно от 5 до 8), и одного или нескольких промываний бидистиллированной водой ($18,2 \text{ МОм}\cdot\text{см}^{-1}$);

суспензию 40 мг/мл исходных гранул (высокоэффективной сефарозы NiNTA, GE Healthcare, 17-5268-01, известный номинальный размер 34 мкм), предварительно подвергнутую десорбционной обработке, аликвотированную в пробирках на 50 мл, повторно суспендируют в двойном объеме (по отношению к объему гранул) концентрированного раствора сульфата никеля 19 мМ в ФБР при pH 7,4, стерилизованного шприцевыми фильтрами 0,2 мкм;

смесь гранул в растворе сульфата никеля инкубируют при комнатной температуре и с осторожным вращением в течение 2 мин;

пробирку вместимостью 50 мл центрифугируют в угловом роторе при 200 g в течение 1 мин, и гранулы собирают на дне пробирки;

надосадочную жидкость осторожно отделяют аспирацией и выбрасывают, а к гранулам добавляют тройной объем (по отношению к объему гранул) ФБР при pH 7,4, стерилизованный шприцевыми фильтрами 0,2 мкм;

гранулы снова центрифугируют, как описано, надосадочную жидкость отделяют аспирацией и выбрасывают;

этап добавления и удаления ФБР к гранулам последовательно повторяют еще два раза для удаления остаточных сульфатных или никелевых ионов;

гранулы повторно суспендируют в том же объеме (относительно объема гранул) ФБР при pH 7,4, стерилизуют с помощью шприцевых фильтров 0,2 мкм, и эти гранулы (далее называемые С-гранулами) хранят при 4°C.

Количество ионов никеля, воздействующих на гранулы, придает им электрохимические свойства, что приводит к положительному суммарному заряду от 40 до 60 мВ, стабильному в течение по меньшей мере шести месяцев при комнатной температуре, в физиологическом растворе с фосфатным буферным солевым раствором (ФБР).

Пример 2. Способ выделения ВВ из биологического образца.

С-гранулы могут быть добавлены по каплям к поверхности биологической жидкости (очищенной от клеточного детрита путем центрифугирования 2800 g), собраны в пробирки любого размера и инкубированы при комнатной температуре в течение 30 мин в объемном соотношении 20 мкл/мл.

Биологическая жидкость может представлять собой среду для культивирования клеток, в основном содержащую 1,5% эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) - ФБР при pH 7,4, разбавление допускается, если процент ЭТС выше; жидкий образец от биопсии (цельную кровь, или плазму, моча, спинномозговую жидкость, молоко, слюну).

Выделение ВВ из биологического образца осуществляют следующим образом:

С-гранулы инкубируют с биологическим образцом при осторожном круговом вращении (300-600 об/мин) в течение 30 мин при комнатной температуре, в конце которой пробирку стабилизируют в вертикальном положении, чтобы обеспечить гравитационное осаждение или слабое центрифугирование (100-400 g) С-гранул (7-15 мин) на дне пробирки;

надосадочную жидкость полностью отделяют аспирацией и выбрасывают. Очистке ВВ, то есть их удалению из гранул, способствует раствор (определенный с настоящего момента как элюирующий раствор), приготовленный за несколько минут до использования в ФБР при pH 7,4, который получают смешиванием двух растворов А и В, содержащих хелатирующие агенты.

ВВ-элюирующий раствор А: ФБР с добавлением до конечной концентрации 3,2 mM ЭДТА, pH 8,0.

ВВ-элюирующий раствор В: полный ФБР с 60 mM NaCl, 45 мкМ цитрата натрия.

После смешивания ВВ-элюирующих растворов А и В (получения элюирующего раствора 1X), 8 мкл/мл KH_2PO_4 добавляют к элюирующему раствору непосредственно перед элюированием ВВ.

Элюирующий раствор обеспечивает ионный обмен между элементами в растворе и способствует быстрому отделению ВВ от гранул агарозы, сохраняя при этом целостность, размер и морфологию ВВ.

Очистку ВВ осуществляют следующим образом:

объем элюирующего раствора, равный объему раствора С-гранул, по каплям осторожно добавляют в С-гранулы;

пробирку, содержащую смесь С-гранул + элюирующего раствора, инкубируют с при круговом вращении (500 об/мин) в течение 15 мин, предпочтительно при 28°C;

пробирку центрифугируют в угловом роторе при 1800 об/мин в течение 1 мин.

Надосадочную жидкость, содержащую цельные и полидисперсные ВВ (обычно распределяемые между 50 и 800 нм), переносят в пробирки с низким уровнем связывания образца.

Пример 3. Сравнение количества частиц (> 0,5 мкм), выделенных с помощью УЦ или NBI.

NBI применяли для выделения везикул, высвобождаемых из клеток глиомы U87, и число частиц диаметром >0,5 мкм (по оценкам с помощью проточной цитометрии) сравнимо с числом, полученным с использованием дифференциального УЦ, в отличие от нескольких случаев захвата нефункционализированными гранулами (фиг. 2А).

Пример 4. Анализ популяций частиц и улучшение стадии элюции.

Чтобы проанализировать популяции частиц и улучшить стадию элюирования, которая позволяла обогащать ВВ в растворе, с прибором qNANO систематически использовали импульсное перестраиваемое резистивное зондирование (ИПРЗ).

Чтобы оценить селективность элюирования, были проведены конкурентные тесты в обогащенной белком системе, включающей рекомбинантные белки с 6X гистидином, меткой, которая, как известно, обеспечивает наиболее сильное взаимодействие с Ni^{2+} . Бессывороточную среду клеток U87, дополненную необработанными экстрактами клеток E.coli DH5aa (500 мкг/мл) и различными очищенными белками (50 мкг/мл каждый, T7p07, 105 кДа, NuR, 36 кДа; YTH, 23 кДа, фиг. 3А), подвергали NBI после градиентного элюирования буфером, сохраняя в качестве эталона элюирующий раствор 1X (3,2 mM ЭД-

ТА, 45 мкМ цитрата натрия и 60 мМ NaCl). Белки с наибольшей молекулярной массой (MW), обогащенные T7p07 с минимальными количествами HuR и YTHDF1, постепенно элюировали, начиная с 1,5X элюирующего раствора (4,8 мМ ЭДТА, 90 мМ NaCl и 67,5 мкМ натрия цитрата), как показано путем ДСН-ПАГЭ, окрашивания Ruby SYPRO и вестерн-блоттинга с использованием анти-His-антител (фиг. 3В). Напротив, большинство ВВ было элюировано Элюирующим раствором 1X, демонстрируя, что уменьшенного количества химических агентов достаточно для смещения взаимодействий ВВ/Ni-гранулы без контаминации раствора никелем, что требует >100 мМ ЭДТА. В частности, морфология ВВ изменялась в соответствии с различными элюирующими буферами, которые влияли на их размер и дисперсию, начиная с 1,5X раствора (фиг. 3С).

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) (увеличение 20500x и 87000x, фиг. 4А) подтвердила низкий уровень белка в образцах NBI и указала, что раствор 1X сохранял морфологию ВВ и широкую дисперсию, демонстрируя диаметр 541 ± 120 нм и индекс дисперсии $0,61 \pm 0,05$ по оценке динамического рассеяния света ($n = 3$). Эти данные были объединены с данными вестерн-блоттинга для позитивности мембранно-ассоциированных или эндосомальных белков в лизатах ВВ, полученных из небольшого количества 9×10^6 клеток U87 (фиг. 4В), что подтверждает эффективность NBI в извлечении гетерогенных ВВ.

Пример 5. Влияние механических сил и равновесия солей во время процедуры NBI.

Чтобы проанализировать влияние механических сил и равновесия солей во время процедуры NBI, получали липосомы, подобные экзосомам, с четырьмя различными средними размерами (149, 177, 196, 202 нм), и их смесь добавляли в 10 мл среды DMEM перед обработкой с NBI (фиг. 5). И NBI, и УЦ позволили полностью извлечь (98,6%) частицы. Напротив, мы наблюдали, что липосомы, предварительно окрашенные фосфатидилэтаноламин-родамином и подвергнутые ультрацентрифугированию (PE-Rho UC), имели коалесцентное поведение (смещение >40 нм) в отличие от частиц NBI PE-Rho, вероятно, из-за большего повреждения мембраны или кривизны, вызванной УЦ. Эти данные указывают, что NBI лучше сохраняет морфологию ВВ и может использоваться в сочетании с красителями, конъюгированными с фосфолипидами, с незначительными интерференциями.

Пример 6. Повышенная стабильность ВВ, выделенных с NBI по сравнению с УЦ.

Поскольку биологические материалы подвергаются различным условиям хранения, мы проанализировали оборот микровезикул, хранящихся при 4°C после очистки NBI или УЦ (фиг. 6). В 24-дневных образцах УЦ после выделения (t24) первоначально проанализированная популяция 600 нм была заменена популяцией ~ 300 нм. Удивительно, но в образцах NBI 86% исходной популяции ВВ все еще можно было обнаружить с использованием той же нанопоры (фиг. 6, в центре), а систематический анализ микровезикул показал период полураспада >50 дней для ВВ от NBI, в отличие от 7,35 дня для ВВ от УЦ (фиг. 6, справа). Таким образом, NBI сохраняет исходную морфологию ВВ и их дисперсию, что приводит к лучшей стабильности в растворе.

Пример 7. Надежность метода NBI в клеточных системах.

Чтобы оценить надежность NBI в клеточных системах, ВВ очищали независимо из сред от клеток U87, высеванных с различной плотностью, в трех экземплярах на 6-луночных планшетах (фиг. 7). Извлеченные частицы были пропорциональны количеству посеянных клеток с глобальным коэффициентом вариации (КВ) 6,14% ($n = 9$ для NBI 1, 2 и 3) как для экзосом (197 ± 26 нм), так и для микровезикул (595 ± 37 нм); не наблюдалось статистически значимой вариации ($P=0,459$) между ВВ из бессывороточной культуральной среды (NBI1) и не содержащей везикул сыворотки из ультрацентрифугата (dFBS). Интересно, что быстрая процедура NBI, применимая к небольшому объему, позволяла следить за высвобождением везикул, используя меньшее количество клеток, такое как 10^3 клеток/см² (фиг. 8). Отмечено линейное высвобождение экзосом как функция плотности клеток, в то время как когерентное высвобождение с различной динамикой для микровезикул, возможно, связано с различными биогенетическими механизмами, стабильностью и/или клеточно-опосредованным оборотом, связанным с размером частиц.

Затем выделенные ВВ сравнивали при получении по методу NBI из опухолевых клеточных линий MCF-7, PC3, MDA-MB-231 и SH-SY5Y. Во всех случаях наблюдалось эквивалентное распределение везикул соответствующего размера, за исключением клеток SH-SY5Y, которые вызывали более слабое высвобождение обеих популяций везикул (фиг. 9). Общая универсальность NBI была также продемонстрирована при очистке грамотрицательных бактерий (клеток E. coli DH5aa), продуцирующих везикулы, при выявлении популяцию диаметром 92 ± 29 нм (фиг. 10).

Пример 8. Показатели NBI на жидких биоптатах.

Поскольку ВВ высвобождаются из многих типов клеток крови и могут быть изучены в качестве биомаркеров, была оценена эффективность NBI для жидких биоптатов у здоровых доноров с известным количеством корпускулярных элементов (фиг. 11). Обнаружено обогащение ВВ в плазме по сравнению с сывороткой (фиг. 12), и NBI в плазме (0,5 мл) систематически выполняли у 47 субъектов со средним возрастом 45 ± 10 лет. Как показано на фиг. 13А, $30,56 \pm 25,78 \times 10^9$ экзосом/мл было выделено со средним размером $249,5 \pm 36,71$ нм и $5,49 \pm 3,09 \times 10^8$ микровезикул/мл со средним размером $564,4 \pm 57,3$ нм, что привело к соотношению экзосом/микровезикул. около 55:1. Количество восстановленных экзосом корре-

лирует с количеством эритроцитов (RBC) (критерий Пирсона r : 0,998 $P < 0,0001$), тромбоцитов (PLT, критерий Пирсона r : 0,958) и лейкоцитов (WBC, критерий Пирсона r : 0,970), в то время как значение критерия Пирсона падает до 0,74 или 0,72% для эозинофилов или базофилов, соответственно. С другой стороны (фиг. 13В), количество микровезикул лучше коррелирует с количеством тромбоцитов (критерий Пирсона r : 0,989, значение $P < 0,0001$), эритроцитов (критерий Пирсона r : 0,976) и лейкоцитов (критерий Пирсона r : 0,912), и показало низкую корреляцию с процентом эозинофилов (критерий Пирсона r : 0,58) или базофилов (критерий Пирсона r : 0,35).

Иммунное истощение очищенных везикул с использованием эритроцитарного маркера CD235a или тромбоцитарного маркера CD41a уменьшало присутствие экзосом или микровезикул в растворе (фиг. 14), указывая на возможность оценки физиологического содержания ВВ в плазме человека. Важно отметить, что сродство к специфическим мембранным белкам можно использовать для упорядочения различных "линий ВВ" на основе исходных типов клеток.

Наконец, РНК, выделенная из 47 донорских ВВ и преобразованная в кДНК, была использована для расчета абсолютного количества мРНК ГАФДГ/ $\sim 3 \times 10^9$ ВВ для анализа методом цифровой капельной ПНР (фиг. 15 и 16). Количество копий мРНК коррелирует с числом тромбоцитов (критерий Пирсона r : 0,623), позволяя предположить, что значительное количество мРНК ГАФДГ содержится в микровезикулах, продуцируемых тромбоцитами (фиг. 17), плазматические клетки уже были признаны ведущими продуцентами ГАФДГ. Анализ ВВ-содержащей/связанной РНК также проводили с помощью цифровой капельной ПНР, используя реагент EvaGreen (BIO-RAD), без предварительной экстракции нуклеиновых кислот, но с использованием очищенных NBI ВВ, непосредственно инкапсулированных в каплях масла для реакции (фиг. 18), демонстрируя, что метод NBI совместим с последующими химическими реакциями, используемыми технологиями для высокочувствительного анализа нуклеиновых кислот.

Представленный в настоящей заявке способ NBI также совместим с другими технологиями, используемыми для сверхчувствительного обнаружения антигенов (белков), которые могут присутствовать на поверхности ВВ. Согласно принципу взаимодействия между положительными (металлы, такие как никель или алюминий) и отрицательными (например, ВВ) чистыми зарядами, NBI может быть комбинирована с технологией AlphaScreen (Perkin Elmer) с использованием никель-хелатных акцепторных гранул и биотинилированных антител, распознаваемых донорскими гранулами (фиг. 19А). Таким образом, ВВ, циркулирующие в плазме человека, могут быть непосредственно обнаружены с использованием антител, показанных на фиг. 19В, которая представляет собой прямое применение NBI, связанной с технологией AlphaScreen.

Метод NBI позволяет дополнительно проверить наличие белка, ассоциированного с ВВ, методом вестерн-блоттинга, экспериментальный результат которого показан на фиг. 20 с использованием антител, которые распознают белки, повсеместно экспрессируемые в ВВ.

В заключение, NBI является инструментом следующего поколения для выделения внеклеточных везикул.

Материалы и методы.

Клеточные культуры.

Клетки глиомы человека U87-MG (ATCC® HTB-14™), клеточные линии нейробластомы SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) и аденокарциномы предстательной железы PC-3 (ATCC® CRL-1435™) были получены из банка ATCC (Американской коллекции типовых культур). Линии клеток аденокарциномы молочной железы MCF7 (ICLC; HTL95021) и MDA-MB-231 (ICLC; HTL99004) были предоставлены биологическим банком IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino - IST Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro. Эти клетки выращивали в адгезивной культуре, и за исключением клеток PC-3, которые содержали в культуре в среде RPMI 1640, все остальные линии выращивали в среде DMEM, добавляя 10 об.% ЭТС, 100 Ед./мл пенициллина. + 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США), и инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Для получения среды, содержащей внеклеточные везикулы, клетки первоначально культивировали в полной среде до достижения слияния 75% (обычно через 48 ч); затем, после аккуратного промывания дважды ФБР, клетки инкубировали в среде, не содержащей ЭТС, в течение 24 ч. Клетки высевали в разные форматы пластин и колб в соответствии с проводимыми экспериментами, но плотность сохраняли постоянной на уровне $3,2 \pm 0,2 \times 10^4$ /см², если иное не указано в условных обозначениях на е.

Перед началом процедуры NBI собранную культуральную среду центрифугировали при 2800 g в течение 10 мин и осторожно переносили в новые пробирки. Для экспериментов, описанных на фиг. 7, условие dFBS относится к NBI, выполненной на культуральной среде, содержащей ультрацентрифугированную при 100000 g ЭТС, добавленную до концентрации 10%. Эту культуральную среду затем разбавляли 1:10 ФБР, чтобы уменьшить вязкость раствора.

Для экспериментов по плотности клеток на фиг. 9 клеточные линии U-87-MG, MDA-MB-231, SH-SY5Y, MCF7 и PC-3 высевали в трех экземплярах в 6-луночные планшеты со следующими номерами лунок: $3,4 \times 10^5$; $1,7 \times 10^5$; $8,5 \times 10^4$; $4,2 \times 10^4$; $2,1 \times 10^4$ и $1,0 \times 10^4$. После 48 ч инкубации в полной среде клетки дважды промывали ФБР и инкубировали в течение 24 ч в среде, не содержащей ЭТС, перед тем, как про-

должить работу с протоколом NBI. В этом случае, после взятия ВВ-содержащей среды, прилипшие клетки фиксировали 4% параформальдегидом, маркировали Hoechst 33342 и промывали ФБР перед получением изображений через систему количественной визуализации Operetta (Perkin Elmer). Изображения получали при 10-кратном увеличении, и 50 полей на лунку анализировали с помощью программного обеспечения Harmony. Затем ВВ анализировали с помощью импульсного перестраиваемого резистивного зондирования с использованием qNano (IZON Science).

Выделение ВВ путем дифференциального ультрацентрифугирования ВВ, продуцируемые клетками U87-MG, культивируемыми во флаконах T150 (CLS430823-50EA), выделяли дифференциальным ультрацентрифугированием в соответствии с протоколом, описанным в Di (Vizio et al., Am J Pathol, 2012; 15: 1573-84) с незначительными модификациями. Вкратце, после 24-часовой инкубации в среде, не содержащей ЭТС, надосадочную жидкость собирали в пробирки Falcon и центрифугировали при 2800 g при 4°C для удаления клеточного детрита. Затем надосадочную жидкость переносили в пробирки для ультрацентрифугирования (центрифужные пробирки Polyallomer Quick-Seal 25×89 мм, Beckman Coulter) и центрифугировали в течение 30 мин при 4°C при 10000 g в приборе Optima XE-90 (Beckman Coulter) с ротором SW 32 Ti. Этот этап обеспечивал преимущественное осаждение микровезикул, которые осторожно ресуспендировали в отфильтрованном ФБР. Затем в соответствии с протоколом, описанным в Thery C. et al. (Curr Protoc Cell Biol. 2006; Chapter 3: Unit 3.22), собранную надосадочную жидкость фильтровали через одноразовый фильтр 0,22 мкм (Sarstedt, Нюмбрехт, Германия) для удаления микровезикулярных загрязнений или агрегатов, и центрифугировали при 100000 g в течение 70 мин при 4°C, чтобы преимущественно осадить экзосомы. Осадки ресуспендировали в отфильтрованном ФБР. ВВ, полученные в результате дифференциального ультрацентрифугирования, объединяли и хранили при -80°C или при 4°C перед анализом ИПРЗ.

Реагенты NBI (предпочтительно используемые):

ФБР (ThermoFisher, 10010023) профильтрованный через одноразовую фильтрующую мембрану 0,2 мкм (использовали по всему протоколу NBI),

NiSO₄ [0,1 M] (Sigma, 656895),

NaCl [5 M] (Sigma, 450006),

Цитрат натрия [0,2 M] (Sigma, C8532),

ЭДТА [0,5 M] (ThermoFisher, UltraPure pH 8,0, 15575020),

КН₂РО₄ [1M] (Sigma, P9791),

Буфер для очистки: ФБР + 0,5 M NaCl, 50 mM ЭДТА, pH 8,0,

ВВ-элюирующий раствор А: доводят до нужного до объема ФБР с конечной концентрацией 3,2 mM ЭДТА, pH 8,0.

ВВ-элюирующий раствор В: доводят до нужного до объема ФБР с 60 mM NaCl, 45 мкМ цитрата натрия.

После смешивания ВВ-элюирующих растворов А и В (элюирующий раствор 1X) 8 мкл/мл КН₂РО₄ добавляли к элюирующему раствору 1X перед продолжением элюирования ВВ.

Анализ микровезикул проточной цитометрией.

Везикулы от дифференциального ультрацентрифугирования или от NBI разбавляли в 0,22 мкм фильтрованном ФБР. Фоновый сигнал настраивали на основе отфильтрованного ФБР, и порог рассеяния света корректировали для сбора данных с частотой событий ≤5 событий в 1 с.

Детекцию светорассеяния устанавливали в логарифмическом масштабе; напряжения, назначенные для прямого рассеяния и бокового рассеяния, составляли 300 и 310 В, соответственно, и пороговое значение было установлено равным 200 для обоих сигналов. Сбор данных производили при низкой скорости потока, и образцы тщательно разбавляли, чтобы избежать эффекта группировки и совпадения событий. Стандартные полистирольные гранулы 1 и 10 мкм (Invitrogen) использовали для установки затворов для микровезикул. Когда для анализа каждой пробы были подсчитаны возможные 10000 событий, на основе данных о времени регистрировали данные не менее 1 мин. Анализ образцов осуществляли с помощью проточного цитометра FACS Canto (BD Biosciences), и данные анализировали с использованием программного обеспечения BD Diva (BD Biosciences).

ИПРЗ (импульсное перестраиваемое резистивное зондирование).

Размер и концентрацию ВВ характеризовали посредством ИПРЗ с использованием инструмента qNano (IZON Science). В среднем 500 частиц были подсчитаны для каждого образца, помимо экспериментов с 6-луночными планшетами (фиг. 9, 3С и 8) или в случае образцов, в которых скорость частиц была ниже 100 частиц/мин, где анализировали по меньшей мере 2 мин записи. Нанопоры NP200 (A40948, A43545, A43667, A43667), NP400 (A43592, A44117, A44116), NP800 (A40542, A36164, A40548, A44118) и N1000 (A40572) использовали с продольным колебанием между I 45,5 и I 477 мм. Напряжение устанавливали в диапазоне 0,12-0,68 В для поддержания постоянной силы тока в диапазоне 95-130 нА, с фоновым шумом ниже 7-12 пА и линейной скоростью счета частиц. Калибровочные частицы CPC100B (номер серии: B8748N), CPC200B (номер серии: B6481M), CPC500E (номер серии: 659543B), CPC800E (номер серии: 634561B) и CPC1000F (номер серии: 669582B) со средним диаметром 114 нм, 210 нм, 500

нм, 710 нм и 940 нм, соответственно, были получены от iZON Science. Все данные, относящиеся к анализу с помощью qNANO, были записаны и проанализированы с помощью программного обеспечения Izon Control Suite v.3.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ).

Везикулы визуализировали с использованием трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ). Вкратце, аликвоту по 5 мкл для каждого образца ВВ, фиксированную в элюирующем буфере с 2,5% формальдегидом, помещали на сетку с ячейками 300 меш² из меди и никеля, покрытую тонкой углеродной пленкой. Затем сетки негативно маркировали 1% уранилацетатным буфером при pH 4,5 и наблюдали с использованием ТЭМ микроскопа FEI Tecnai G2 Spirit 100 кВ, оборудованного камерой Olympus Morada (используемые увеличения: 20500x и 87000x).

Затем проводили вестерн-блоттинг анализ с использованием анти-CD63 антител (Abcam, ab193349), анти-Флотилин-1 антител (BD Biosciences, 610821) и анти-Alix антител (Cell Signaling Technology, #2171).

Конкурентный анализ.

Стадию элюции ВВ тестировали конкурентным анализом, где 30 мкг/мл экстракта белка из DH5a E.coli и 15 мкг/мл очищенных рекомбинантных белков, маркированных гистидином (T7 РНК pol, 110 кДа; HuR, 36 кДа; YTH, 23 кДа) добавляли к 10 мл среды, содержащей ВВ, полученные из клеток U87-MG. Вкратце, клетки DH5aaa хранили в культуре в среде LB до достижения ОП₆₀₀ 0,5 и собирали центрифугированием при 6000 g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 3 мл среды DMEM + 1 мкг/мл лизоцима и обрабатывали ультразвуком при 4°C в термостатируемой бане в течение 7 циклов (40 амплитуда ультразвука, 7 секунд вкл., 10 секунд выкл.). Лизат осветляли центрифугированием при 13000 g в течение 20 мин и затем фильтровали через одноразовую фильтрующую мембрану 0,2 мкм перед добавлением в ВВ-содержащую среду. Рекомбинантный белок, меченная гистидином T7 РНК-полимераза, был любезно предоставлен лабораторией Dr. S. Mansy (CIBIO, Университет Тренто); рекомбинантные белки HuR (D'Agostino et al., PLoS One, 2013 Aug 12; 8 (8): e72426) и YTH (Xu et al., J Biol Chem. 2015 Oct 9; 290: 24902-13) были получены и очищены, как описано в ссылках.

NBI проводили после инкубационного периода и с уже описанными реагентами, за исключением растворов градиентной элюции, указанных на фиг. 3В. Количество белка в образцах определяли, используя анализ с бицинониновой кислотой (БХК) и метод Брэдфорда, следуя соответствующим инструкциям протокола. Равные объемы элюата наносили на 12% ДСН-ПАГЭ и подвергали окрашиванию Sygro Ruby или вестерн-блоттингу с использованием разведения 1:1000 первичного антигистидинового антитела (ab1187).

Количество и размер извлеченных частиц анализировали с помощью ИПРЗ с учетом гетерогенности образца с использованием нанопор NP800, NP400 и NP200.

Выделение ВВ из грамотрицательных бактерий.

Клетки E.coli DH5aaa культивировали в полной среде LB до достижения ОП₆₀₀ 0,7. Клетки осаждали при 4000 g в течение 15 мин, и собирали надосадочную жидкость для обработки в соответствии с протоколом NBI. Частицы подсчитывали с помощью прибора qNANO с использованием нанопор NP150 и NP200.

Приготовление липосом.

Липосомная липидная композиция, имеющая липидный состав, аналогичный составу эукариотических везикул, представляет собой: 20% моль фосфатидилхолина, 10% моль фосфатидилэтаноламина, 15% моль олеофосфатидилсерина, 15% моль сфингомиелина, 40% холестерина (Llorente et al. Bioch. Acta 2013; 1831: 1302-9; Naraszi et al., J. Extracell. Vesicles 2016; 5: 32570). Липидные пленки получали путем удаления органического растворителя (например, хлороформа) из липидного раствора с помощью роторного испарителя и вакуумной сушки в течение по меньшей мере 1 ч. Липиды в конечной концентрации 1 мг/мл ресуспендировали в DPBS и энергично перемешивали с помощью Vortex для образования многослойных липосом, которые затем подвергали 6 циклам замораживания-размораживания. Конечную морфологию липосом получали путем экструдирования суспензии мультислойных липосом с использованием двухшприцевого экструдера (LiposoFast Basic Unit, Avestin Inc.). Тридцать одну стадию выполняли через 2 сложенных поликарбонатных фильтра (Millipore), имеющих поры разного размера, для получения везикул разного размера (MacDonald et al. Biochim Biophys. Acta 1991; 1061: 297-303), впоследствии подтвержденного фотонной корреляционной спектроскопией с инструментом Zeta Sizer (Nano-ZS, Malvern Instruments).

Образцы крови.

Образцы цельной крови от здоровых доноров были собраны в Детской университетской больнице Мейера. Образцы плазмы собирали в коммерческие пробирки, обработанные ЭДТА, и затем отправляли из биологического банка больницы в исследовательские лаборатории в соответствии с холодовой цепью. Информированное согласие было получено от доноров перед анализом проб.

Плазму получали путем удаления клеток после центрифугирования в течение 10 мин при 2000 g с использованием центрифуги с охлаждением (4°C) (Eppendorf 5702 R, Милан, Италия). Образцы сыворотки крови были получены путем коагуляции крови, при этом не проводили перемешивания при комнат-

ной температуре в течение 30 мин. Коагулят удаляли центрифугированием при 2000 g с использованием центрифуги с охлаждением (4°C) (Eppendorf 5702 R, Милан, Италия). Полный анализ крови анализировали с помощью проточного цитометра Sysmex ХЕ-5000 (Sysmex America, Манделейн, Иллинойс). Процедуру анализа проводили в соответствии с инструкциями протокола.

Иммунодеплецию везикул, очищенных NBI, проводили с использованием анти-CD235a (Miltenyl Biotec, 130-100-271) и анти-CD41a (Miltenyl Biotec, 130-105-608) биотинилированных антител, соответственно, и гранул стрептавидина (ThermoFisher, 11205D). Везикулы анализировали с помощью qNano после осаждения гранул и нормализовали по количеству частиц в соответствующих контрольных образцах с количественным эквивалентом биотина (Sigma, B4501).

Экстракция РНК.

Общую РНК экстрагировали с использованием реагента QIAzol (QIAGEN), следуя прилагаемым инструкциям, с некоторыми модификациями. Вкратце, 100 мкл QIAzol непосредственно добавляли к гранулам перед стадией элюирования ВВ, затем перемешивали с помощью Vortex и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 20 мкл хлороформа. После энергичного перемешивания в течение 15 секунд образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 3 мин. Фазы разделяли центрифугированием при 12000 g в течение 15 мин при 4°C, и водную фазу удаляли. После добавления 1 мкл гликогена (20 мг/мл) и 100 мкл изопропанола РНК осаждали в течение ночи при -80°C. После центрифугирования при 12000 g в течение 10 мин осадок РНК промывали 75% этанолом, центрифугировали, как описано выше, и ресуспендировали в 10 мкл воды, не содержащей РНКазы. Количественную оценку РНК проводили с использованием Bioanalyzer RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies), следуя инструкциям протокола.

Реакция обратной транскрипции и цифровая капельная ПЦР.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR kit, Universal CDNA Synthesis Kit II (Exiqon), следуя инструкциям протокола со следующей реакционной композицией: 2,3 мкл 5X реакционного буфера; 1,15 мкл ферментной смеси; 0,5 мкл добавки синтетической РНК и 7,5 мкл матричной общей РНК. Для количественного определения мРНК ГАФДГ с использованием реагента EvaGreen применяли систему ПЦР QX200™ Droplet Digital™ (BioRad) и следующие праймеры: 5X-CAACGAATTTGGCTACAGCA-3' (SEQ ID № 1) и 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3' (SEQ ID № 2).

Анализ AlphaScreen.

Реакции проводили в 384-Optiplate (Perkin Elmer) в конечном объеме 20 мкл. Анализ был оптимизирован в ФБР с использованием 15 мкг/мл никель-хелатных акцепторных гранул и 10 мкг/мл стрептавидин-донорных гранул с серийными разведениями антител для определения точки присоединения. Присутствие поверхностных маркеров анализировали в зависимости от дозы с серийным разведением ВВ, ранее охарактеризованных в ИПРЗ. ВВ были очищены с помощью NBI из образцов плазмы здоровых доноров или не содержащих сыворотки образцов опухолевых клеток. Сигнал флуоресценции окончательно выявляли прибором Enspire (Perkin Elmer) после 90 мин инкубации в темноте при комнатной температуре.

Статистический анализ.

Данные и количество независимых экспериментов указаны в соответствующих подписях к ам. Ано-ва, t-критерий и коэффициент Пирсона r были рассчитаны с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v5.1, и результаты считались статистически значимыми, когда значение P было $<0,05$ (*), $<0,01$ (**), $<0,001$ (***)).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Неподвижная фаза для выделения внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых эукариотическими или прокариотическими клетками в биологической жидкости, где указанная неподвижная фаза функционализована катионами, выбранными из группы, состоящей из никеля и алюминия, имеет дзета-потенциал от 30 до 80 мВ, состоит из магнитных или немагнитных частиц микрометрического или нанометрического размера и выбрана из группы, состоящей из гранул, изготовленных из агарозы, кремния, альгинатных солевых матриц, полимеров для металл-аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (ИМАС), никелевого хелатного акцептора, анионных или углеродных стирольных полимеров.

2. Неподвижная фаза по п.1, являющаяся агарозными гранулами с частицами, имеющими средний размер 25–40 мкм, если размер является микрометровым.

3. Способ получения функционализированной неподвижной фазы по любому из пп.1, 2, включающий суспендирование нефункционализированной неподвижной фазы в солевом буферном растворе с физиологическим значением рН, содержащем 15–100 мМ соли никеля или алюминия.

4. Способ по п.3, где солевой буферный раствор с физиологическим значением рН представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (ФБР) или любой другой буфер с физиологическим рН.

5. Способ по любому из пп.3, 4, где суспензию инкубируют при комнатной температуре при круговом вращении при 300–600 об/мин.

6. Применение неподвижной фазы по любому из пп.1, 2 для выделения внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых эукариотическими или прокариотическими клетками, в биологической жидкости.

7. Способ выделения внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых эукариотическими или прокариотическими клетками в биологической жидкости, включающий добавление по каплям на поверхность биологической жидкости суспензии гранул с неподвижной фазой по любому из пп.1, 2, причем указанная суспензия находится в солевом растворе, забуференном при физиологическом рН,

инкубирование гранул в биологической жидкости и последующее разделение путем мягкого центрифугирования и декантации,

удаление ВВ с гранул путем инкубации, по меньшей мере, в равном объеме элюирующего раствора, который приготовлен перед использованием путем смешивания двух физиологических растворов с физиологическим рН, содержащих по меньшей мере два разных хелатирующих агента.

8. Способ по п.7, где хелатирующие агенты выбраны из группы, состоящей из ЭДТА и цитрата натрия.

9. Способ по п.7, где в конечном элюирующем растворе ЭДТА имеет концентрацию 3-6 мМ, а цитрат натрия имеет концентрацию 30-300 мкМ.

10. Способ по любому из пп.7-9, где инкубацию с элюирующим раствором поддерживают при круговом вращении при 20-37°C.

11. Способ по любому из пп.7-10, где биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из сред для культивирования клеток, физиологических буферных растворов, сред для бактериальных культур, крови человека и животных, экссудатов тканей человека и животных.

12. Способ, включающий подвергание ВВ, выделенных способом по любому из пп.7-11, протоколам для экстракции белка и нуклеиновых кислот из ВВ, технологиям обнаружения антигена в сочетании со специфическими антителами, детекции и количественному определению ассоциированных и/или содержащихся в везикулах нуклеиновых кислот с помощью ОТ-ПЦР, детекции и количественному определению ассоциированных и/или содержащихся в везикулах нуклеиновых кислот с помощью капельной цифровой ПЦР.

13. Набор для выделения внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых эукариотическими или прокариотическими клетками, в биологической жидкости, включающий

контейнер, содержащий неподвижную фазу по любому из пп.1, 2, или

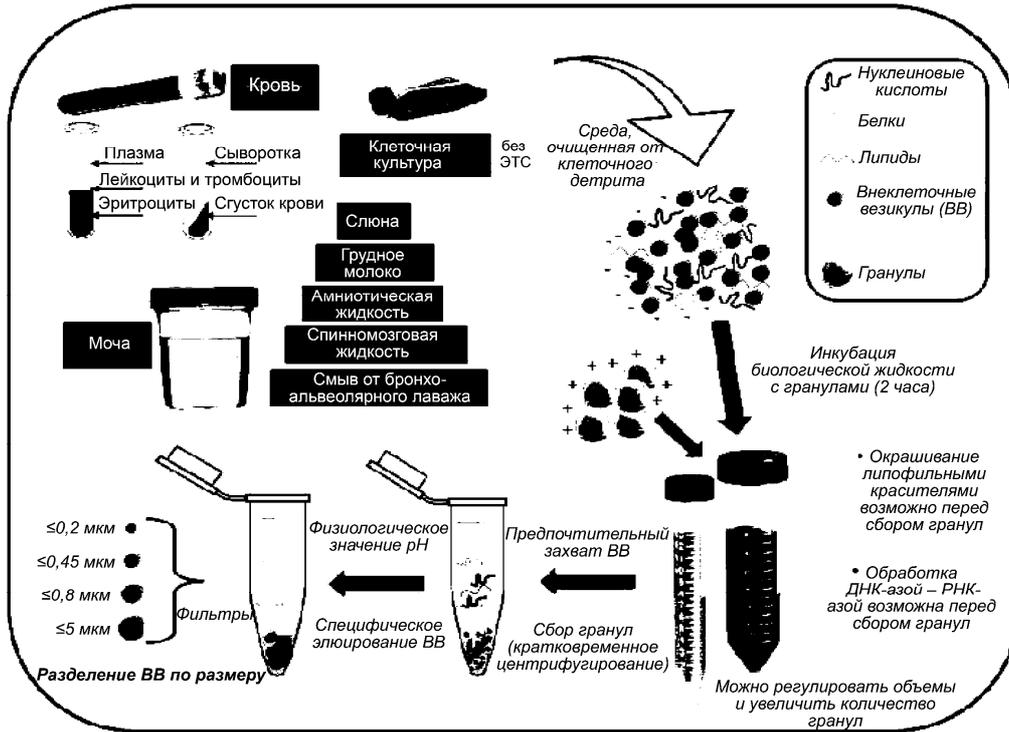
контейнер, содержащий нефункционализованную неподвижную фазу, состоящую из магнитных и немагнитных частиц микрометрового или нанометрового размера, при этом неподвижная фаза выбрана из группы, состоящей из гранул, изготовленных из агарозы, кремния, альгинатных солевых матриц, полимеров для металл-аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (ИМАС), никелевого хелатного акцептора, анионных или углеродных стирольных полимеров, и контейнер, содержащий соль никеля или алюминия.

14. Набор для выделения внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых эукариотическими или прокариотическими клетками, в биологической жидкости, включающий

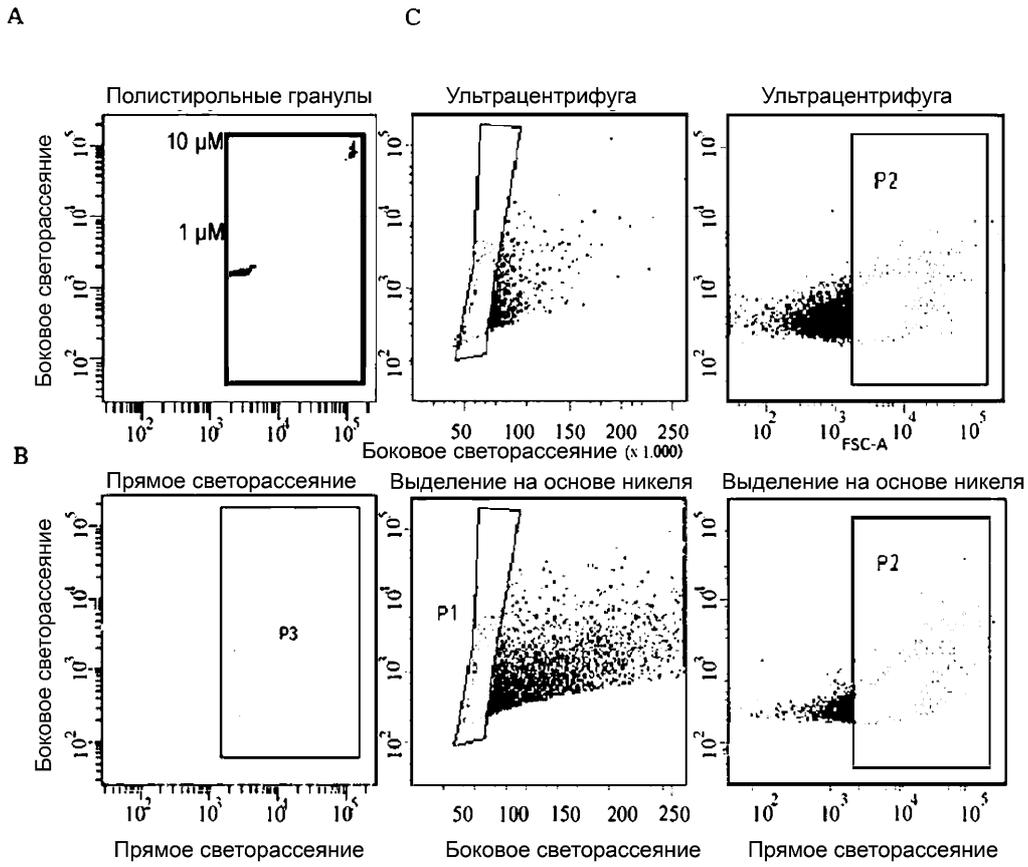
контейнер, содержащий нефункционализованную неподвижную фазу, состоящую из магнитных и немагнитных частиц микрометрового или нанометрового размера; при этом неподвижная фаза выбрана из группы, состоящей из гранул, изготовленных из агарозы, кремния, альгинатных солевых матриц, полимеров для аффинной хроматографии с иммобилизованными ионами металлов (ИМАС), никелевого хелатного акцептора, анионных или углеродных стирольных полимеров; и контейнер, содержащий соль никеля или алюминия.

15. Набор по п.13 или 14, дополнительно включающий

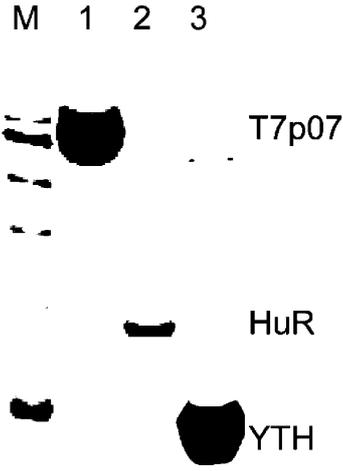
контейнер, содержащий солевой буферный раствор с физиологическим значением рН, по меньшей мере два контейнера, содержащих различные хелатирующие агенты.



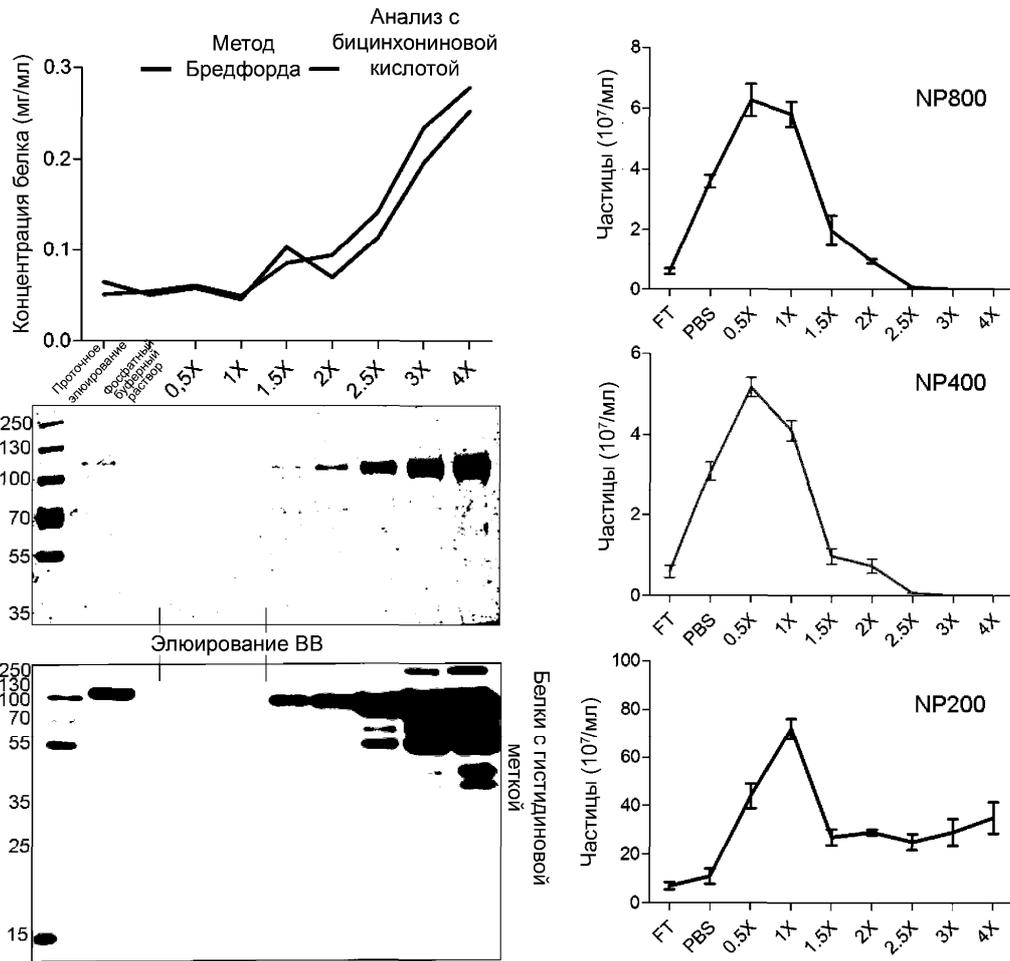
Фиг. 1



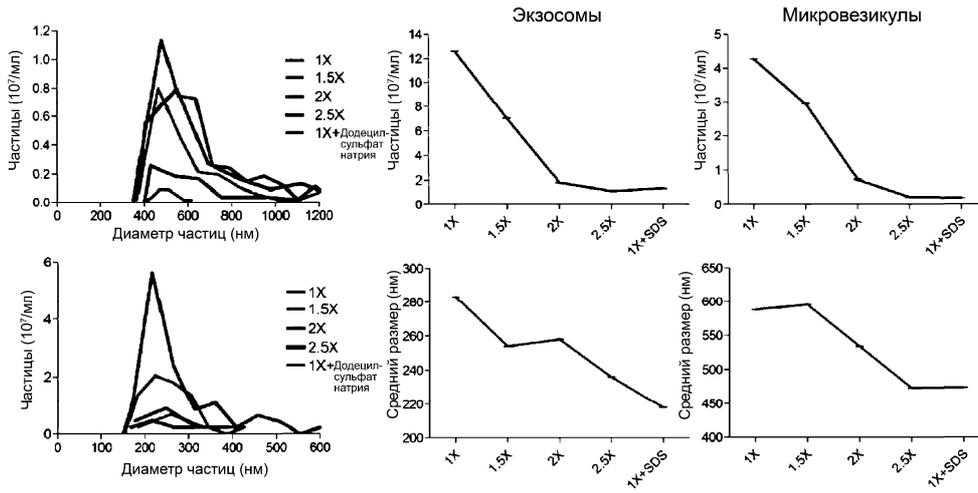
Фиг. 2



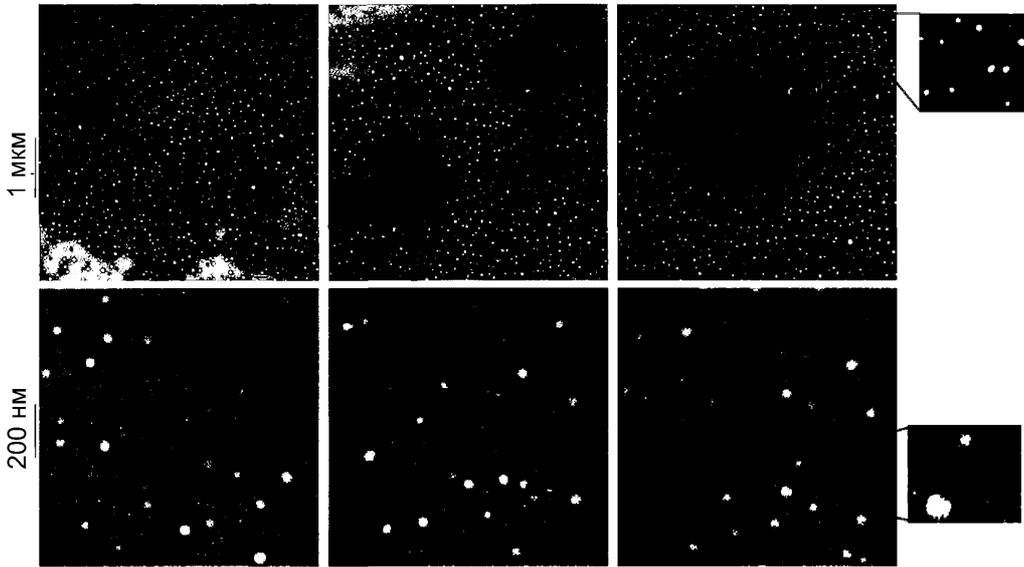
Фиг. 3А



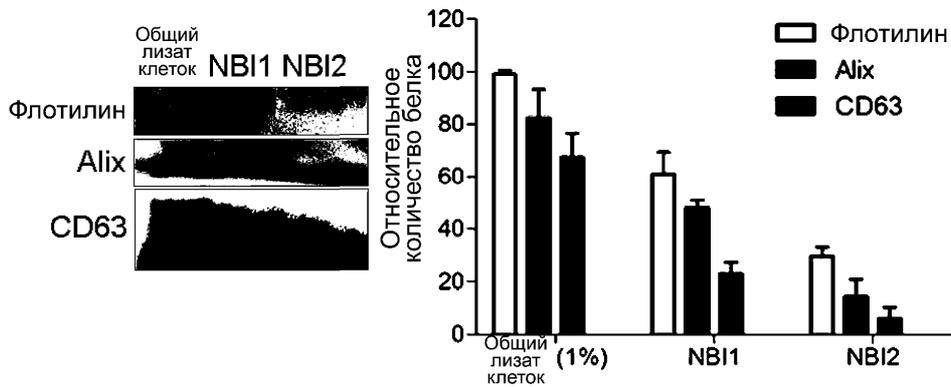
Фиг. 3В



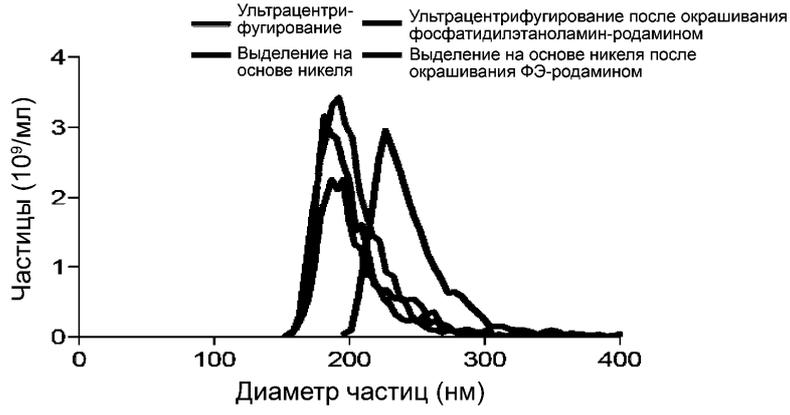
Фиг. 3С



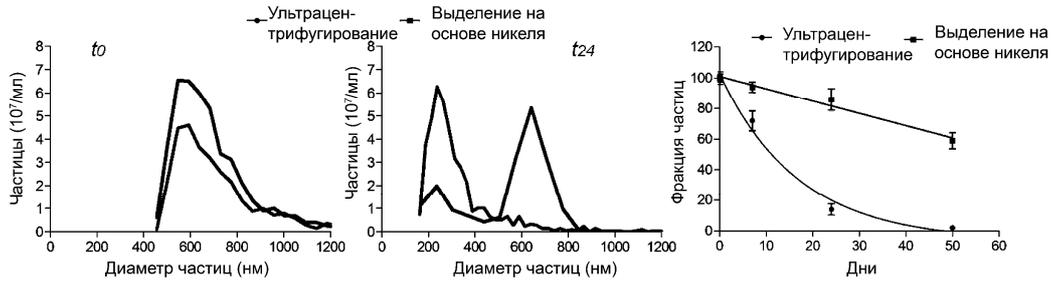
Фиг. 4А



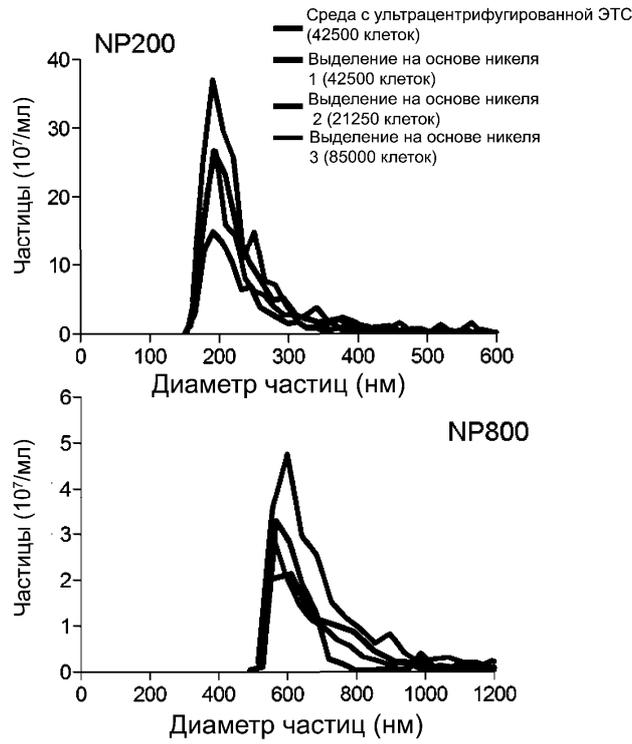
Фиг. 4В



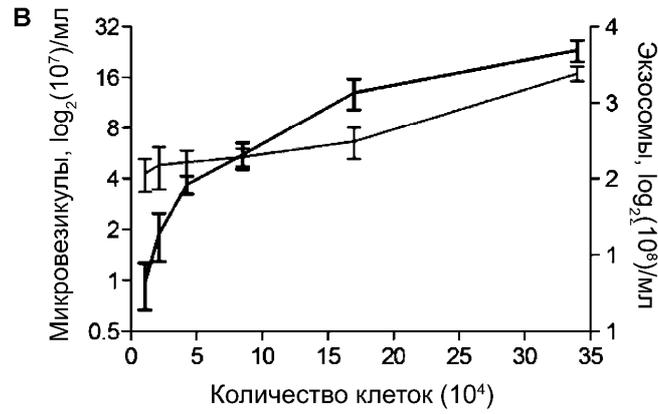
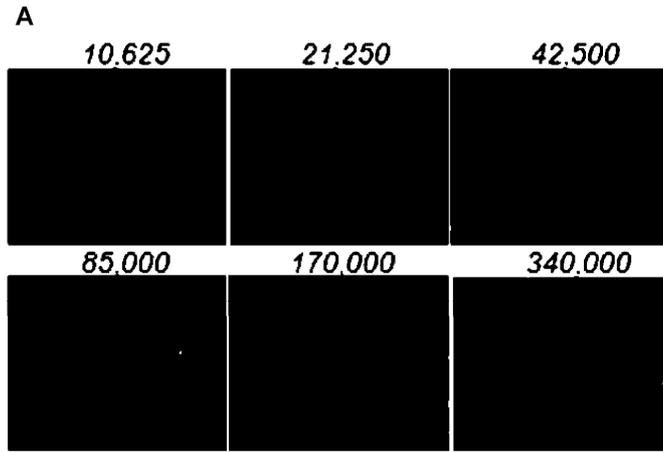
Фиг. 5



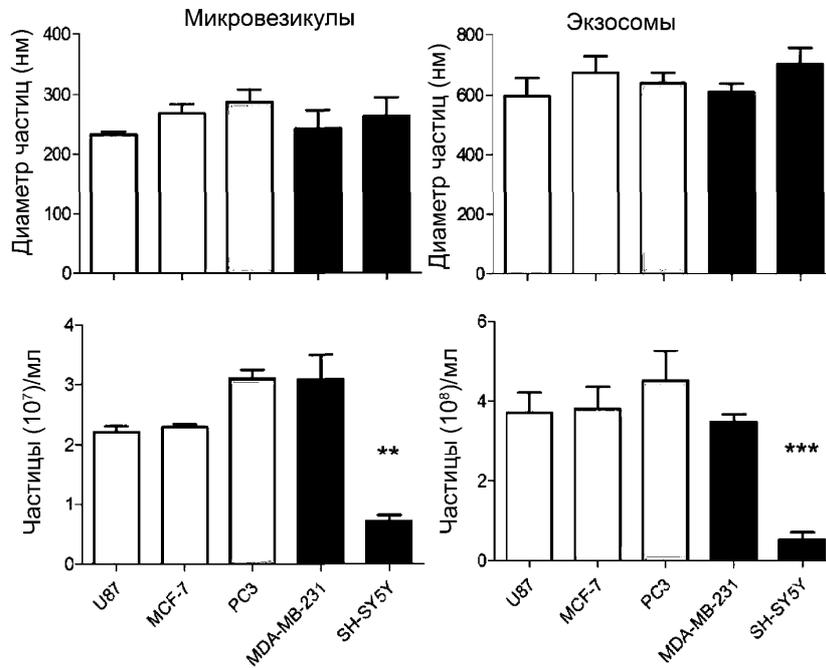
Фиг. 6



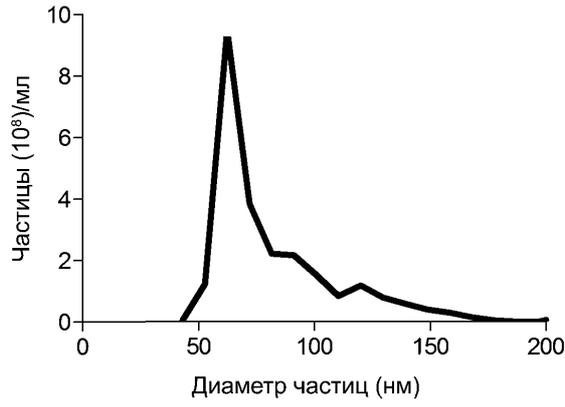
Фиг. 7



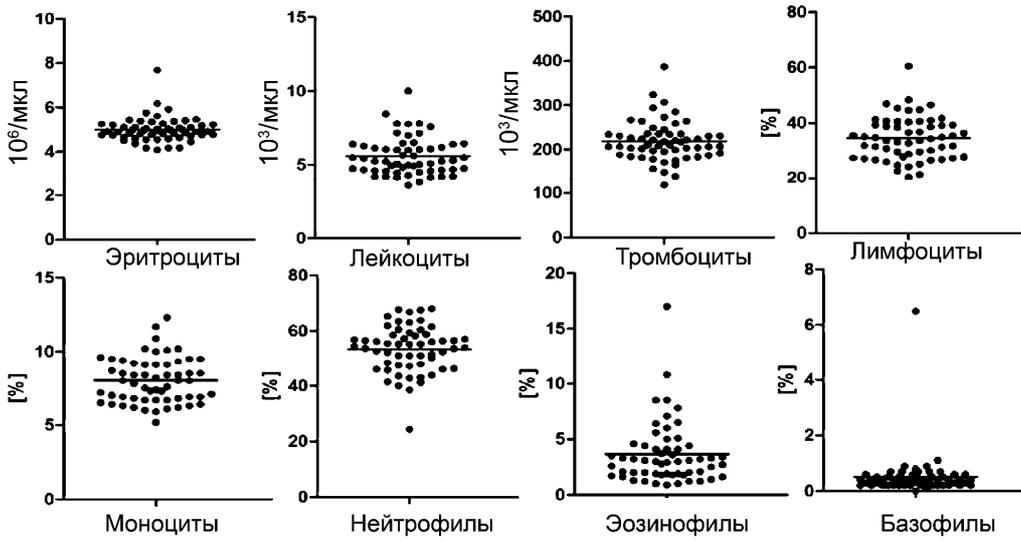
Фиг. 8



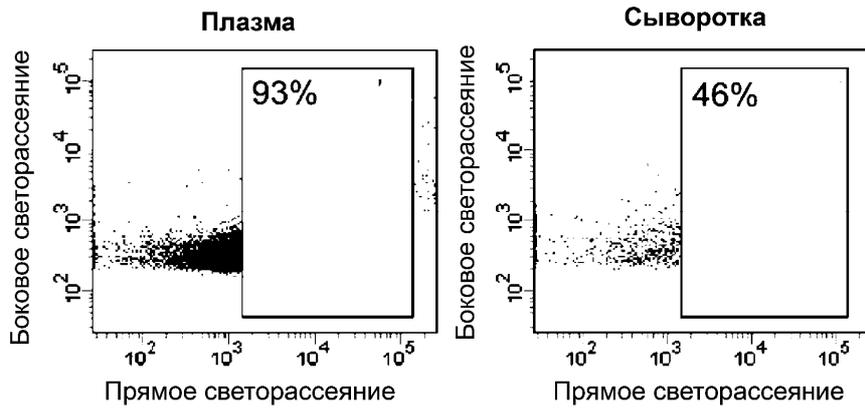
Фиг. 9



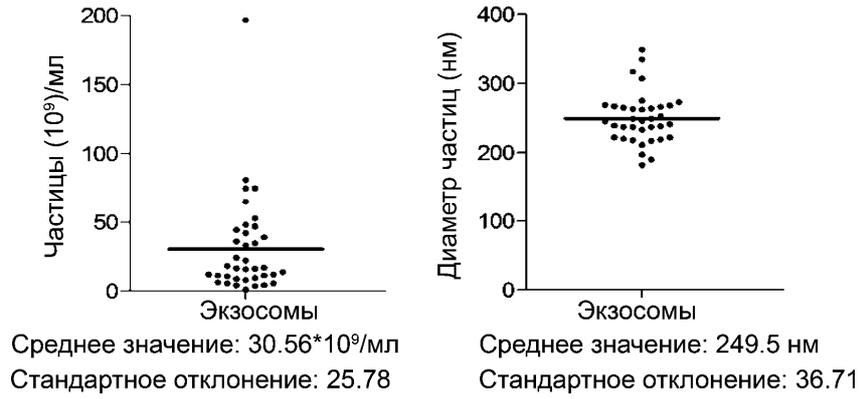
Фиг. 10



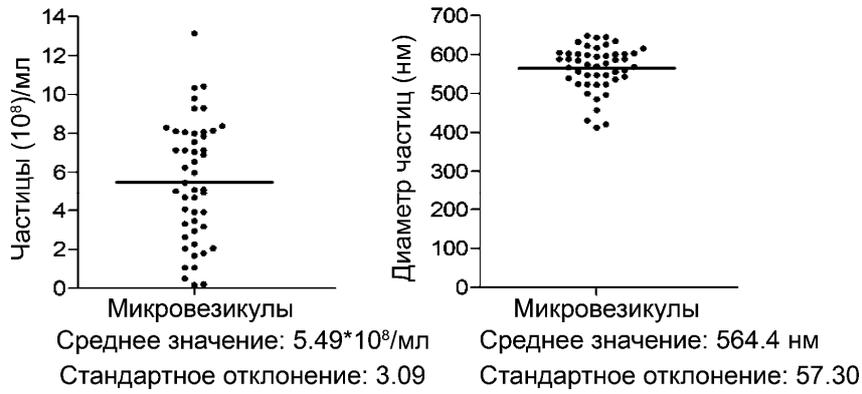
Фиг. 11



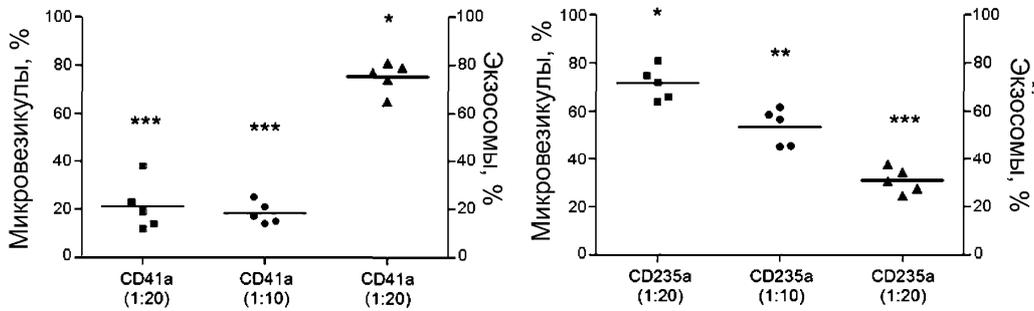
Фиг. 12



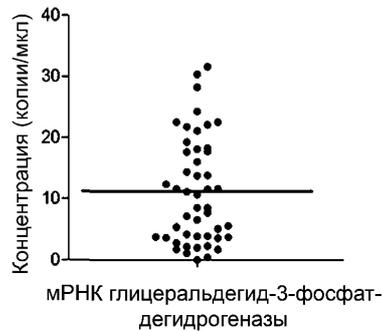
Фиг. 13А



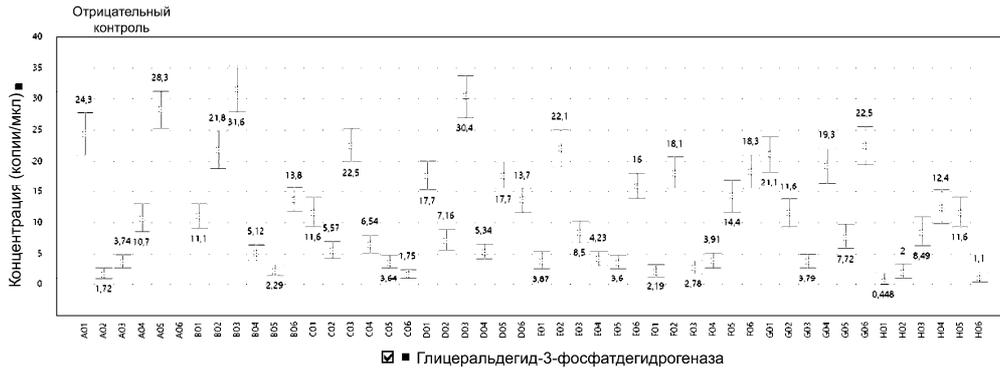
Фиг. 13В



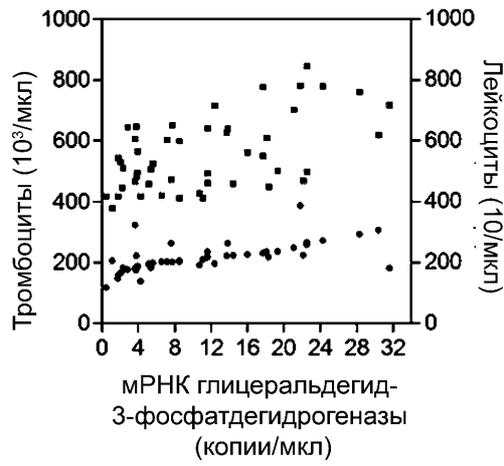
Фиг. 14



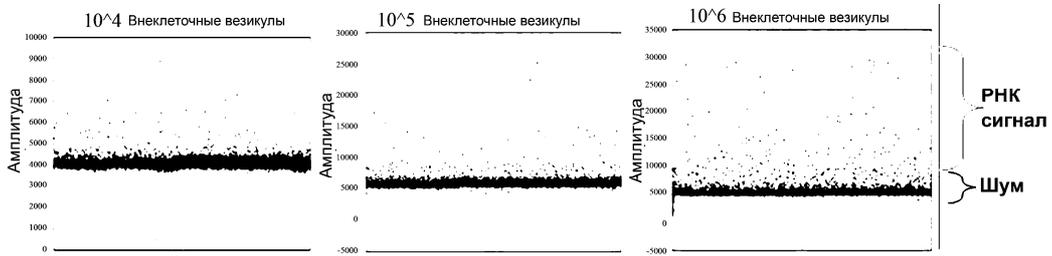
Фиг. 15



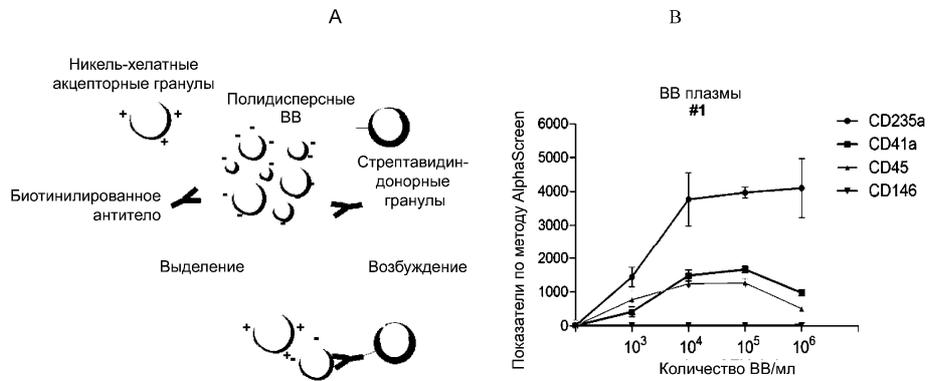
Фиг. 16



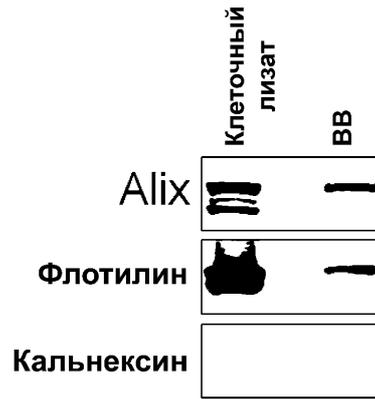
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20