

На правах рукописи

Храмцов Павел Викторович

**ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ С БЕЛКОВЫМ ПОКРЫТИЕМ В  
КАЧЕСТВЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ  
ИММУНОАНАЛИЗА**

3.2.7. Иммунология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Екатеринбург - 2024

Работа выполнена в лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН - филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН», г. Пермь

**Научный консультант:**

доктор биологических наук, профессор

**Раев Михаил Борисович**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Долгих**

**Олег Владимирович**

доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и переподготовки специалистов ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Колесникова**

**Наталья Владиславовна**

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

**Карамов Эдуард**

**Владимирович**

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт Экспериментальной Медицины», г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.063.01 на базе ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской/Академическая, 22/20 и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iip.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.063.01,  
кандидат биологических наук

**Ю.А. Журавлёва**

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** В настоящее время наноматериалы все активнее используются в иммунодиагностике в качестве компонентов тест-систем, прежде всего диагностических реагентов. Это обусловлено наличием у них целого ряда преимуществ и уникальных свойств, которые могут быть использованы как для создания новых, так и для усовершенствования существующих диагностикумов. Диссертационная работа посвящена применению наночастиц различной природы, покрытых белковыми молекулами, в качестве меток в иммуноанализах. Наночастицами мы будем называть частицы искусственного или естественного происхождения с размерами от 1 до 1000 нм (J. Jeevanandam et al., 2018).

Иммуноанализы являются одним из центральных методов фундаментальной и клинической иммунологии. Они используются для количественного обнаружения цитокинов, гормонов, иммуноглобулинов, инфекционных агентов. Наиболее популярной разновидностью иммуноанализов является планшетный иммуоферментный анализ (ИФА), основанный на измерении сигнала, который генерируют ферментные метки, конвертирующие бесцветный субстрат в окрашенный или люминесцирующий продукт. Помимо ферментов метками служат флуоресцентные молекулы или микросферы, цветные частицы, а также магнитные материалы. Некоторые из перечисленных меток, входящих в состав коммерческих тест-систем, представляют собой наноматериалы, как, например, золотые наночастицы, широко применяемые в иммунохроматографических тестах (Z. Farka et al., 2017).

Одной из наиболее популярных ферментных меток являются пероксидаза хрена. К её преимуществам относятся высокая каталитическая активность и стабильность при физиологических рН и температуре, низкая токсичность, наличие функциональных групп, подходящих для ковалентного присоединения распознающих молекул и синтеза ферментных конъюгатов (углеводы и аминокислотные остатки) (O. Spadiut et al., 2013). Тем не менее, пероксидаза хрена не лишена недостатков, которые ограничивают спектр ее применений:

- 1) Относительно высокая стоимость (от 150 до 1000 евро за 100 мг фермента).
- 2) Необходимость выделения фермента из растительного сырья, трудоемкость технологии выделения и низкий выход конечного продукта (D. Humer, O. Spadiut, 2019).
- 3) Гетерогенность: выделенный фермент представляет собой смесь изоформ и может иметь разную степень гликозилирования. Гетерогенность фермента мало предсказуема и зависит от условий выращивания хрена (F. W. Krainer, A. Glieder, 2015; O. Spadiut, C. Herwig, 2013).
- 4) Чувствительность фермента к воздействию физико-химических факторов ограничивает спектр условий их хранения и применений (K. Chattopadhyay, S. Mazumdar, 2000; X. Liu et al., 2019).

5) Деактивация в присутствии некоторых реагентов, например, широко используемого в биотехнологии консерванта азиды натрия (P.R. Ortiz de Montellano et al. 1988), а также тяжелых металлов, в частности меди, свинца, кадмия, никеля и др. (A. Nepovím et al., 2004; P.N. Nomngongo et al., 2011).

Несмотря на то, что с момента создания ИФА прошло более 50 лет, некоторые технологические проблемы до сих пор остаются неразрешенными (а возможно и неразрешимыми). В частности, это проблемы, связанные с вариабельностью компонентов иммуноферментных тест-систем, прежде всего, ферментных диагностикумов. Эта вариабельность в существенной степени обусловлена недостаточной воспроизводимостью свойств разных партий препаратов ферментов. Следствием этого являются невоспроизводимые результаты анализов, что может существенно усложнить корректную оценку состояния пациента.

Перечисленные проблемы определяют необходимость совершенствования иммуноферментных тест-систем. Пути этого совершенствования могут быть различны и состоят как в замене отдельных компонентов тест-систем, так и в разработке новых методов иммуноанализа. Одним из подходов к совершенствованию тест-систем является использование наноматериалов. В частности, их применение может уменьшить предел обнаружения иммуноанализов, упростить их процедуру, сократить их длительность, уменьшить объем исследуемого образца и так далее. Помимо этого, некоторые физико-химические свойства наноматериалов (магнитные, оптические, каталитические) дают возможность создавать принципиально новые форматы иммуноанализов, которые имеют существенные преимущества в сравнении с традиционными подходами (A. Sena-Torralba et al., 2022).

Одной из проблем, ограничивающих применение наноматериалов в качестве компонентов тест-систем, является их тенденция к агрегации, обусловленная высокой удельной площадью поверхности. Стабильные суспензии наночастиц, как правило, получают путем модификации их поверхности. В качестве модификаторов используют различные молекулы: поверхностно-активные вещества, низкомолекулярные лиганды (например, лимонная кислота), клеточные мембраны, неорганические капсулы (например, кремниевые или золотые), а также полимеры, в том числе биополимеры. Выбор типа покрытия наночастиц зависит от области их применения. В частности, для успешного использования в иммунодиагностике наноматериалы должны быть стабильны в физиологических условиях, выдерживать длительное хранение при 2-8 С, а также быть совместимыми с хромогенными и люминесцентными субстратами (T. Komsthöft et al., 2022).

Среди многочисленных полимеров естественного и искусственного происхождения, белковые молекулы обладают некоторыми особенностями, которые делают их перспективными для модификации поверхности наночастиц (M. Drozd, et al., 2022). К таким особенностям относятся:

1. Разнообразная химическая структура, наличие полярных и неполярных групп, которые обеспечивают успешное взаимодействие с поверхностями различной природы.

2. Многочисленные функциональные группы (амины, карбоксильные группы, тиоловые группы, гуанидиновые группы) и гидрофобные карманы, которые могут быть использованы для ковалентного и нековалентного присоединения распознающих или репортерных молекул.

3. Белковые молекулы, используемые для покрытия наночастиц (альбумины, желатин и его производные, фиброин, казеин и т.д.) являются коммерчески доступными и относительно безопасными для здоровья человека и окружающей среды.

Диссертационное исследование направлено на разработку и применение в иммуноанализе диагностических реагентов на основе магнитных железоуглеродных наночастиц, а также наночастиц, обладающих каталитической пероксидазоподобной активностью.

Магнитные наночастицы дают возможность применять абсолютно новые, потенциально высокочувствительные, методы регистрации сигнала, что позволяет рассчитывать на снижение предела детекции анализа и выявление биомаркеров, присутствующих в образцах в очень низких концентрациях, например, некоторых цитокинов в физиологических и культуральных средах. Наночастицы и наноматериалы, обладающие пероксидазоподобной активностью, являются заменителями пероксидазы хрена, лишенные тех её недостатков, которые были перечислены выше. Как правило, по своей каталитической активности наноматериалы уступают ферментам. Однако в последние годы были разработаны наноматериалы, превосходящие пероксидазу хрена по своей активности. Один из таких материалов, берлинская лазурь (координационное соединение железа с формулой  $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6] \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ), был использован нами в качестве альтернативы пероксидазе хрена в твердофазном иммуноанализе.

На основании вышеизложенного была сформулирована цель работы.

**Цель работы:** разработать концептуальные подходы (получение, управление свойствами, контроль качества) к созданию диагностических реагентов для иммуноанализов, на основе белковых наночастиц и наноматериалов с белковым покрытием.

**Задачи:**

1. Разработать твердофазный ЯМР-иммуноанализ, предназначенный для количественной оценки концентрации иммуноглобулинов в образцах сыворотки крови.

2. Создать новые подходы к получению и контролю качества иммунодиагностикомов на основе наноразмерных белковых частиц.

3. Разработать колориметрический иммуноанализ противостолбнячных антител с использованием альбуминовых наночастиц, содержащих гемин, низкомолекулярный миметик пероксидазы хрена.

4. Разработать диагностикум для иммуноферментного анализа, представляющий собой наночастицы берлинской лазури, покрытые желатиновой оболочкой, и использовать его в непрямом анализе противостолбнячных антител и сэндвич-анализе простатспецифического антигена.

**Методология и методы диссертационного исследования.** Методология работы включала в себя три основных стадии: оптимизацию и приготовление диагностических реагентов на основе наночастиц, подбор оптимальных условий иммуноанализа и оценку его аналитических характеристик.

Методы детекции сигнала в иммуноанализе включали в себя спектрофотометрию и метод ядерно-магнитного-резонанса (ЯМР-релаксометрия). Специфичность диагностикумов подтверждали путем использования различных контрольных образцов, включая контрольные диагностикумы, не содержащие распознающие молекулы, специфичные к молекулам-мишеням. В качестве калибровочных образцов использовали препараты очищенных рекомбинантных белков либо международные стандарты, одобренные ВОЗ. В работе использованы современные методы исследования структуры наноматериалов: метод динамического светорассеяния, электронная и атомно-силовая микроскопия, рентгенофазовый анализ, элементный анализ.

**Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.** Для обеспечения достоверности и воспроизводимости результатов большинство экспериментов выполнены в нескольких реальных или технических повторностях. Мы синтезировали несколько партий для большинства диагностикумов, проводили эксперименты по масштабированию их синтеза. Большая часть данных, включая необработанные данные с приборов, касающиеся свойств диагностикумов, результатов подгонки калибровочных кривых, результатов анализа образцов, находятся в открытом доступе. Все результаты, представленные в диссертации, опубликованы в ведущих международных научных журналах.

Результаты этой работы были апробированы на всероссийских и международных конференциях: XIV Конференция иммунологов Урала с международным участием (Челябинск, 2017), Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018), II Международная научная конференция «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018), International Conference on Biotechnology and Bioengineering (Будапешт, 2018), ACS Publications Symposium: Innovation in Materials Science and Technology (Сингапур, 2019), Международный форум «Биотехнологии: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, 2019), VI Всероссийская конференция с международным участием: Техническая химия. От теории к практике (Пермь, 2019), XI Всероссийский конгресс молодых ученых – биологов с международным участием: Симбиоз – Россия (Пермь, 2019), Объединённый иммунологический форум (Новосибирск, 2019), Международная научная конференция «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии»

(Екатеринбург, 2020), VII Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2020), XII Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз - Россия 2020» (Пермь, 2020), XXII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2021), XII Международная конференция молодых ученых «Менделеев 2021» (Санкт-Петербург, 2021), Первая школа по медицинской химии для молодых ученых (Новосибирск, 2021), XXIII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2022), IV школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (Казань, 2022), VI Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, 2022).

Автор диссертации планировал исследования и выполнил большую часть экспериментальной работы. Анализ и интерпретация данных полностью выполнены автором. В работе использован ЯМР-релаксометр и программное обеспечение, разработанные и изготовленные сотрудниками лаборатории прикладного магнетизма Института физики металлов им М.Н. Михеева УрО РАН (г. Екатеринбург), заведующий лабораторией – к.ф.-м.н. Михаил Александрович Уймин. Просвечивающая электронная микроскопия, измерение удельной площади поверхности наночастиц, элементный анализ наночастиц желатина, меченных комплексами европия, выполнены сотрудниками этой же лаборатории. Исследование диагностикумов методом сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионного анализа выполнен старшим научным сотрудником Института технической химии, к.т.н. Дмитрием Михайловичем Кисельковым. Элементный анализ наночастиц берлинской лазури выполнен заведующим лабораторией химического мониторинга объектов окружающей среды кафедры аналитической химии и экспертизы химического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета (ПГНИУ), к.х.н. Александром Сергеевичем Максимовым и сотрудником лаборатории биогеохимии техногенных ландшафтов Естественно-научного института ПГНИУ Алексеем Юрьевичем Пузиком. Лиганды для синтеза флуоресцентных комплексов европия любезно предоставлены с.н.с. кафедры органической химии химического факультета ПГНИУ, к.х.н. Екатериной Евгеньевной Храмцовой. Рекомбинантный белок G был любезно предоставлен в.н.с. лаборатории функциональной геномики и протеомики микроорганизмов Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург), д.б.н. Татьяной Витальевной Гупаловой. Эксперименты по синтезу наночастиц берлинской лазури с разным размером, характеристика магнитных наночастиц и желатиновых наночастиц выполнены сотрудниками лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН) (г. Пермь), заведующий

лабораторией, д.б.н. Михаил Борисович Раев. Атомно-силовая микроскопия магнитных наночастиц выполнена при помощи сотрудников лаборатории алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН, заведующий лабораторией - академик РАН Ирина Борисовна Ившина.

Исследования проводились при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Регистрационный номер НИОКТР 122010800029-1), Российского фонда фундаментальных исследований, в том числе совместно с Правительством Калининградской области и Правительством Пермского края (гранты 16-44-590427, 19-015-00408, 19-415-393005), Российского научного фонда (гранты 17-15-01116, 20-75-00029).

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Магнитные железоуглеродные наночастицы, покрытые альбумином, казеином или желатином, могут быть использованы в качестве меток в ЯМР-иммуноанализах, предназначенных для количественного обнаружения иммуноглобулинов человека, а также других млекопитающих.

2. Белковые наночастицы, представляющие собой сферические наноразмерные ковалентно-стабилизированные комплексы белковых молекул, являются универсальной платформой для создания диагностических реагентов для иммуноанализов.

3. Диагностические реагенты на основе альбуминовых наночастиц, содержащих гемин и проявляющих каталитические свойства, аналогичные свойствам пероксидазы хрена, могут быть использованы для количественного определения противостолбнячных антител.

4. Наночастицы берлинской лазури обладают высокой пероксидазоподобной активностью и являются эффективной альтернативой пероксидазе хрена при создании дианостикумов для иммуноферментных анализов.

**Научная новизна.** Впервые разработаны диагностические реагенты для ЯМР-иммуноанализа, представляющие собой магнитные наночастицы, покрытые желатином, казеином и альбумином. Впервые были всесторонне изучены их свойства, существенные для использования в качестве дианостикумов в гомогенных и гетерогенных ЯМР-иммуноанализах, в частности, магнитные свойства (релаксивность), стабильность при хранении, устойчивость к агрегации в сыворотке и плазме крови, эффективность конъюгирования с распознающими молекулами.

Впервые применены в колориметрическом иммуноанализе дианостикумы на основе высокоактивных наночастиц берлинской лазури, обладающих каталитической активностью, аналогичной таковой пероксидазы хрена. Показано, что желатиновое покрытие позволяет конъюгировать такие наночастицы с моноклональными антителами, стрептавидином, белком G, а также обеспечивает высокую стабильность дианостикумов при длительном хранении.

Впервые продемонстрирована возможность существенного увеличения аналитического сигнала в колориметрическом иммуноанализе с использованием наноматериалов за счет оптимизации состава субстратного буфера.

Разработаны новые технологические подходы к синтезу и контролю качества диагностикумов на основе альбуминовых и желатиновых наночастиц, которые в дальнейшем были использованы для количественного иммуноанализа противостолбнячных антител и онкомаркера - простатспецифического антигена.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** *Теоретическая значимость работы.* В ходе проведения диссертационного исследования решена научная проблема, важная для специальности «Иммунология», заключающаяся в получении стабильных диагностических реагентов для иммуноанализов на основе наноматериалов. Получены новые знания о свойствах наноматериалов с различными типами белковых покрытий. Эти новые знания позволяют управлять теми свойствами диагностических реагентов на основе наноматериалов, которые оказывают непосредственное влияние на аналитические и технологические параметры иммуноанализов: нижний предел детекции, форму калибровочной кривой, стабильность диагностикумов при хранении и транспортировке и т.д.

*Практическая значимость работы.* Разработаны диагностические реагенты для ЯМР-иммуноанализов, представляющие собой железоуглеродные наночастицы с белковыми покрытиями разного типа. Они обладают высокой устойчивостью к агрегации и стабильностью при хранении, что позволяет рассматривать их в качестве альтернативы диагностическим реагентам, используемым в коммерческих ЯМР-иммуноанализах. Разработаны технологические подходы к синтезу наноразмерных диагностических реагентов для иммуноферментного анализа, представляющие собой миметики пероксидазы хрена, инкапсулированные в альбуминовую и желатиновую оболочку. Такие реагенты обладают высокой каталитической активностью, сравнимой с таковой пероксидазы хрена, а диагностикумы на их основе являются более стабильной и экономичной альтернативой ферментным диагностикумам. Разработаны способы снижения предела детекции иммуноанализов, основанных на применении миметиков пероксидазы хрена, заключающиеся в оптимизации состава растворов хромогенных субстратов. Диагностические реагенты, разработанные в ходе диссертационного исследования, могут быть использованы для оценки напряженности поствакцинального иммунитета, измерения концентрации иммуноглобулинов в образцах сывороток крови и культуральных сред, в частности, полученных при культивировании клеток-продуцентов моноклональных антител.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета, курс «Стереоспецифические взаимодействия» для магистров 2 года обучения, обучающихся по программе 06.04.01 «Биология».

Разработанная тест-система определения иммуноглобулинов класса G применяется в повседневной практике лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии «ИЭГМ УрО РАН»

**Публикации.** По результатам диссертационной работы опубликовано 19 работ: статей в изданиях, включенных в Перечень ВАК для публикации результатов диссертационных исследований по специальности 3.2.7. Иммунология и/или индексируемых в МБД Scopus, WoS и RSCI -15, получено 4 патента РФ.

**Объём и структура диссертации.** Работа изложена на 303 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 407 источников. Работа проиллюстрирована 70 рисунками и 11 таблицами.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **Материалы и методы исследования.**

Образцы сывороток крови были взяты у добровольцев в возрасте от 21 до 58 лет. Все процедуры, выполняемые в исследованиях с участием людей, соответствовали Хельсинкской декларации 1964 года и ее более поздним поправкам. Исследование было одобрено Этическим комитетом Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (IRB00010009). От добровольцев было получено письменное информированное согласие.

*Комплекс методов, которые использовались для исследования физико-химических и иммунохимических свойств диагностических реагентов на основе наночастиц.* Размеры и морфологию наночастиц оценивали при помощи динамического светорассеяния (ДРС), сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), атомно-силовой микроскопии (АСМ), электрофореза в агарозном геле (полуколичественный метод). Дзета-потенциал наночастиц измеряли методом МЗ-PALS. Концентрацию наночастиц оценивали при помощи гравиметрического анализа и спектрофотометрии в видимом диапазоне. Структуру наночастиц изучали при помощи рентгенофазового анализа, флуоресцентного анализа (изменение спектров флуоресценции), термогравиметрического анализа, спектроскопии в ИК, УФ и видимой области, гель-электрофореза, энергодисперсионного анализа, масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, адсорбции азота (метод Брунауэра-Эммета-Теллера), а также набора стандартных биохимических методов. Для подтверждения успешности конъюгирования аффинных молекул (моноклональных антител, стрептавидина и т.д.) с наночастицами использовали аффинные молекулы, меченные флуоресцентными зондами, а также твердофазный иммуноанализ. Концентрацию противостолбнячных антител и

простатспецифического антигена в сыворотках крови измеряли при помощи иммуноферментного анализа.

ЯМР-анализ антител при помощи магнитных наночастиц проводили с использованием ЯМР-релаксометра, разработанного и собранного сотрудниками лаборатории прикладного магнетизма Института физики металлов им. М.Н. Михеева УрО РАН (заведующий лабораторией - к.ф.-м.н. Михаил Александрович Уймин). Для выявления противостолбнячных IgG нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 8 мкм разрезали на кусочки размером 6 × 80 мм и замачивали в фосфатном буфере (ФБ) в течение 5 мин при +37°C. Затем влажную мембрану инкубировали в 1,5 мл 20 мкг/мл раствора столбнячного анатоксина в ФБ в течение 30 мин, последовательно высушивали при +37°C в течение 30 мин и при комнатной температуре в течение 15 мин, блокировали в 1,5 мл 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) + 2 % казеина в ФБ с твином-20 (ФБТ) и трижды промывали 1,5 мл ФБТ в течение 5 мин. Затем мембраны, покрытые столбнячным анатоксином, разрезали на 16 частей (6 мм × 5 мм) (далее называемых “тест-полосками”), которые использовали в последующих процедурах. Тест-полоски инкубировали в 400 мкл образцов сыворотки, разведенных в 200 раз в ФБТ с 1 % БСА и 2 % казеином, в течение 60 мин, трижды промывали 600 мкл ФБТ и инкубировали в 400 мкл 0,05 мг/мл Fe@C-NH<sub>2</sub>/Белок/Белок G (нанокластеры, конъюгированные с белком G) в ФБТ с 2% казеином в течение 60 мин и промывали 12 раз. Для построения калибровочной кривой использовали стандарт ВОЗ противостолбнячных антител ТЕ-3, разведенный в блокирующем буфере. Все образцы и калибраторы были протестированы в трех повторностях. Измерение времени релаксации T<sub>2</sub> проводили путем помещения тест-полосок внутрь катушки релаксометра. Все этапы анализа проводили при температуре +37°C на орбитальном шейкере, за исключением измерения.

*Синтез диагностикумов на основе наночастиц БСА, нагруженных геминном (наночастицы БСА/Гемин).* Порошок гемина (48, 24, 12, 6 или 3 мг) добавляли к 6 мл водного раствора БСА в концентрации 40 мг/мл. От 100 до 200 мкл (в зависимости от количества гемина) 1 М NaOH добавляли небольшими порциями к смеси БСА и гемина до исчезновения видимых комков гемина. После добавления каждой порции щелочи смесь перемешивали в течение 10-20 с. pH полученного раствора составлял от 10 до 10,5. Затем pH раствора доводили до 11 с помощью pH-метра. Раствор выдерживали на ротационном смесителе (360°C, 10 об/мин) в течение 1 ч при температуре +37°C, а затем обрабатывали ультразвуком (20 с, 18 Вт, 3 мм зонд). Четыре миллилитра полученного раствора переносили в стеклянный флакон и нагревали до +35°C при постоянном перемешивании на магнитной мешалке (700 об/мин). Этанол (95 %) добавляли по каплям (1 мл/мин) к перемешиваемому раствору с помощью перистальтического насоса. После добавления 5 мл этанола насос останавливали и из реакционного объема брали пробу объемом 1 мл. Поглощение этого образца при 600 и 700 нм измеряли в кварцевой кювете (длина оптического пути 0,1 см), затем образец возвращали в реакционный сосуд.

Добавление этанола возобновляли. Через 1 мин пробу снова отбирали и измеряли. Эту процедуру повторяли до тех пор, пока не происходило увеличение поглощения. Наночастицы сшивали в течение 2 часов нагреванием при +70°C при перемешивании. После этого суспензию охлаждали до комнатной температуры, переносили в центрифужные пробирки объемом 2 мл и центрифугировали при 20000 г в течение 60 мин. Супернатанты удаляли, затем к осадку наночастиц добавляли воду. Наночастицы повторно диспергировали ультразвуком (20 с, 10 Вт, 3 мм зонд), затем промывали еще два раза, объединяли и хранили при +4°C. Полученные наночастицы будут далее именоваться NP5 (48 мг гемина + 160 мг БСА; массовое соотношение БСА к гемину составляет 5:1), NP10 (24 мг гемина, 10:1), NP20 (12 мг гемина, 20:1), NP40 (6 мг гемина, 40:1), NP80 (3 мг гемина, 80:1) и NPC (наночастицы, не содержащие гемина).

*Конъюгирование наночастиц БСА/гемина с белком G.* Глутаровый альдегид разбавляли до 2 % фосфатным буфером (pH 7), затем pH смеси доводили до 7 с помощью 1 М NaOH. Наночастицы БСА/Гемин разбавляли до 2 мг/мл фосфатным буфером (pH 7); затем 4 мл наночастиц БСА/Гемин медленно добавляли при перемешивании в 4 мл 2 %-го глутарового альдегида. Реакцию проводили в течение 60 мин при температуре +37°C на ротационном смесителе (10 об/мин, 360 градусов). Наночастицы обрабатывали ультразвуком (18 Вт, 100 % усиление, зонд 3 мм, 10 с). После этого измеряли поглощение при 700 нм. Затем наночастицы трижды промывали фосфатным буфером (pH 7) центрифугированием при 20000 г в течение 60 мин. Осадок повторно диспергировали после каждой промывки ультразвуком (10 Вт, 60 % усиление, 3 мм зонд, 10 с). Конечный объем наночастиц, активированных глутаровым альдегидом, составлял 4 мл. Концентрацию наночастиц определяли путем измерения поглощения при 700 нм. Суспензию наночастиц, активированных глутаровым альдегидом, разделяли на 4 порции по 1 мл каждая. К трем из четырех порций добавляли белок G (10 мг/мл) для достижения соотношения белка G к наночастицам 5, 20 и 80 мкг/мг. К четвертой порции добавляли БСА (192 мг/мл) (80 мкг БСА на 1 мг наночастиц). Полученные суспензии кратковременно перемешивали и инкубировали в течение 16 ч при температуре +37°C на ротационном смесителе (10 об/мин, 360°C). Блокирование свободных альдегидных групп осуществляли путем добавления 1 мл раствора БСА (192 мг/мл) с последующей 60-минутной инкубацией в тех же условиях. Наночастицы БСА/гемина, конъюгированные с белком G или БСА, отмывали от несвязанных белков, как описано выше, и повторно диспергировали в 1 мл деионизированной воды. Концентрацию наночастиц определяли путем измерения поглощения при 700 нм. В зависимости от исходного количества белка G или БСА полученные наночастицы обозначали как G5, G20, G80 или БСА, например, NPC-G5 или NP20-БСА.

*Иммуноанализ противостолбнячных IgG при помощи диагностикумов БСА/Гемин.* Столбнячный анатоксин разводили до 2 мкг/мл в 0,2 М карбонатном буфере, pH 9,6. Сто микролитров этого раствора добавляли в лунки 96-луночного

планшета. Планшеты инкубировали при температуре +37°C в течение 2 часов. Далее все этапы анализа проводили при температуре +37 °С на орбитальном шейкере (400 об/мин). Лунки трижды промывали ФБТ (300 мкл на лунку), затем добавляли 200 мкл блокирующего раствора (ФБТ +1% казеин+1% БСА, pH 7). Через 60 мин лунки промывали и добавляли 100 мкл tIgG четырехкратно разведенных в блокирующем буфере или в блокирующем буфере, содержащем 5% кроличьей сыворотки (100, 25, 6.25, 1.56, 0.39, 0.097, и 0 мМЕ/мл). Планшеты инкубировали в течение 60 мин, промывали и заполняли 100 мкл наночастиц, разведенных до 200 мкг/мл в блокирующем растворе. Планшет инкубировали в течение 60 мин и промывали. Лунки заполняли 100 мкл раствора субстрата (9 мл 0,1 М цитратно-имидазольного буфера, pH 4 или цитратно-фосфатного буфера, pH 4; 1 мл 1 мг/мл ТМБ в ДМСО; 10 мкл 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и инкубировали в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение при 450 нм измеряли с помощью планшетного спектрофотометра

*Синтез наночастиц берлинской лазури с пероксидазоподобной активностью (нанозимов).* Готовили 100 мл растворов 50 мМ FeCl<sub>3</sub> и 50 мМ K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. Оба раствора нагревали до +55°C. Растворы смешивали путем быстрого добавления K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] в FeCl<sub>3</sub> при перемешивании при 700 об/мин на магнитной мешалке. После смешивания температуру смеси поддерживали на уровне +55°C в течение 10 мин. Затем раствор остужали до комнатной температуры и добавляли изопропиловый спирт до конечной объемной концентрации 30 %. Проводили центрифугирование при 4000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а нанозимы повторно суспендировали в воде. Суспензию (приблизительно 40 мл) подвергали трехкратному диализу против 2 л воды и обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин на льду (диаметр зонда — 6 мм, усиление — 60 %, выходная мощность — 18-25 Вт).

*Получение альбуминовых наночастиц, загруженных нанозимами берлинской лазури (БЛ@БСА).* В стеклянные флаконы добавляли 4 мл водного раствора, содержащего 30 мг/мл БСА и определенное количество нанозимов берлинской лазури. Конечные концентрации нанозимов составляли 0,375, 0,75, 1,5, 3 и 6 мг/мл. Растворы выдерживали при перемешивании (1000 об/мин) на всех стадиях синтеза. Этанол (95 %; 16 мл) добавляли по каплям (4 мл/мин) с помощью перистальтического насоса. Добавление этанола осуществляли при комнатной температуре. Затем температуру смеси повышали до +70°C (температуру контролировали с помощью термодатчика). После двухчасового нагревания перемешивание прекращали, и суспензию наночастиц охлаждали до комнатной температуры. Наночастицы переносили в центрифужные пробирки объемом 2 мл и трижды промывали деионизированной водой путем центрифугирования при 20000 g в течение 20-30 мин (продолжительность зависела от скорости осаждения наночастиц). Осадок диспергировали ультразвуком после каждого осаждения (зонд 3 мм; продолжительность — 15 с; мощность — приблизительно 8-9 Вт). Полученные наночастицы объединяли (7-8 мл), обрабатывали ультразвуком на льду в течение 10

мин (зонд 3 мм; мощность — приблизительно 8-9 Вт) и хранили при температуре +4°C.

*Синтез конъюгатов БЛ@БСА с моноклональными антителами, БСА и стрептавидином.* Наночастицы БЛ@БСА разводили в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН от 7 до 5 мг/мл. Полученную суспензию по каплям добавляли к равному объему 1% раствора глутарового альдегида в фосфатном буфере (рН 7, доведен с помощью 1 М NaOH) при интенсивном перемешивании. Смесь инкубировали в течение 30 мин при +37 °С на ротационном смесителе (10 об/мин), затем наночастицы промывали два раза водой и один раз фосфатным буфером при помощи центрифугирования при 20000 г. До и после промывки измеряли поглощение при 450 нм ( $A_{450}$ ) наночастиц, обработанных глутаровым альдегидом, для определения их концентрации. К промытым наночастицам добавляли МКА, стрептавидин или БСА. Полученные суспензии кратковременно перемешивали, а затем инкубировали в течение 60 мин при температуре +37°C на ротационном смесителе (10 об/мин). Непрореагировавшие альдегидные группы инактивировали добавлением 1 М глицин-NaOH буфера (рН 7) до конечной концентрации 0,1 М с последующей 60-минутной инкубацией при +37°C. Наночастицы промывали водой три раза, как описано выше. Концентрацию наночастиц определяли путем измерения  $A_{450}$ .

Наночастицы с конъюгированными МКА, стрептавидином или БСА будут далее именоваться БСА НЧ/МКА, БЛ@БСА1/МКА, БСА НЧ/Стр, БЛ@БСА1/БСА и т.д. «БЛ@БСА/МКА», «БЛ@БСА/Стр» и «БЛ@БСА/БСА» будут использоваться в качестве общих терминов для любого типа БЛ@БСА, конъюгированных с МКА, стрептавидином или БСА, соответственно.

*Иммуноанализ простатспецифического антигена (ПСА).* 96-луночные планшеты заполняли 100 мкл 10 мкг/мл моноклональных антител против ПСА (клон 3А6), разведенных 0,1 М карбонатным буфером, рН 9,5. Планшеты выдерживали при +37°C в течение 2 ч, затем трижды промывали 300 мкл ФБТ (10 мМ фосфатный буфер, рН 7, содержащий 0,1 % Твина-20). В лунки добавляли блокирующий буфер (200 мкл; ФБТ с 1 % казеина и 1 % БСА). После этого планшеты инкубировали на шейкере (300 об/мин) при температуре +37°C в течение 1 ч и промывали три раза. Добавляли ПСА (100 мкл), разведенный в блокирующем буфере, планшеты инкубировали на шейкере (300 об/мин) при +37°C в течение 3 ч. После промывки добавляли БЛ@БСА/МКА или БЛ@БСА/БСА (100 мкл), разведенные в блокирующем буфере. Планшеты инкубировали на шейкере (300 об/мин) при +37°C в течение 1 ч, затем их промывали и добавляли 100 мкл раствора субстрата (9 мМ фосфат-цитратного буфера, рН 4 + 1 мл 1 мг/мл ТМБ в ДМСО + 100 мкл 30 %  $H_2O_2$ ). После 30-минутной инкубации на шейкере (300 об/мин) при +37°C добавляли 100 мкл 2 М  $H_2SO_4$  и немедленно измеряли  $A_{450}$ .

*Синтез наночастиц берлинской лазури восстановительным способом (наночастицы «искусственная пероксидаза»).* В деионизированную воду добавляли 0,1 М растворы  $FeCl_3$  и  $K_3[Fe(CN)_6]$  до 3,125 мМ. Затем добавляли лимонную кислоту до 2 мМ. Осаждение наночастиц берлинской лазури инициировали

добавлением  $\text{H}_2\text{O}_2$  (до 22 мМ). Конечный объем реакционной смеси составлял 250 мл. Через 60 мин суспензию переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали при 16000 g до полного осаждения; надосадочную жидкость осторожно удаляли, а гранулы наночастиц повторно диспергировали в  $\text{H}_2\text{O}$  путем встряхивания на вортексе. Наночастицы промывали 3 раза. После этого их повторно диспергировали в 25 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , обрабатывали ультразвуком (зонд 6 мм, усиление 60%) и центрифугировали. Полученные суспензии хранили при температуре  $+4^\circ\text{C}$ . Полученные таким образом наночастицы именовали в дальнейшем «R2C».

*Получение конъюгатов наночастиц берлинской лазури с моноклональными антителами против ПСА, белком G и бычьим сывороточным альбумином.* Наночастицы берлинской лазури (R2C) добавляли к водному раствору желатина А (180 мл) до конечной концентрации 2,41 мг/мл. Массовое соотношение наночастиц и желатина составляло 1:8. Полученный объем суспензии составлял приблизительно 12 мл. Образец встряхивали на вортексе, кратковременно обрабатывали ультразвуком (диаметр зонда - 3 мм; усиление – 60 %; продолжительность – 10 с) и инкубировали при  $+37^\circ\text{C}$  в течение 60 мин на ротационном смесителе (10 об/мин). Наночастицы берлинской лазури, покрытые желатином А (БЛ/Жел А), смешивали с равным объемом 25 % глутарового альдегида (рН 7), инкубировали при  $+37^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Поглощение при 700 нм наночастиц, активированных глутаровым альдегидом (далее именуемых БЛ/Жел А-СОН), измеряли и использовали для оценки концентрации наночастиц на следующих стадиях синтеза. БЛ/Жел А-СОН центрифугировали при 20000 g до полного осаждения. Затем осадок повторно диспергировали в деионизированной воде путем кратковременного воздействия ультразвуком (диаметр зонда - 3 мм; усиление – 60 %; продолжительность - 10 с) и центрифугировали при 20000 g в течение 15 мин. В общей сложности наночастицы промывали три раза. После последней промывки наночастицы повторно диспергировали в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7). Затем суспензию БЛ/Жел А-СОН разделили на 3 части. Каждую часть добавляли при перемешивании к раствору одного из трех белков: моноклональных антител против ПСА (МКА; клон 1А6), белка G или БСА. Указанные белки предварительно разводили в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7). Массовое соотношение БЛ/Жел А-СОН к белку составляло 1 мг к 100 мкг. После этого полученные смеси перемешивали на вортексе и выдерживали на ротационном смесителе (10 об/мин) в течение ночи при  $+4^\circ\text{C}$ . Глицин добавляли до 0,1 М для инактивации непрореагировавших карбонильных групп, и смесь инкубировали при  $+37^\circ\text{C}$  еще два часа. Наночастицы промывали водой, как описано выше. После окончательной промывки наночастицы повторно диспергировали в  $\text{H}_2\text{O}$  при помощи ультразвука (диаметр зонда - 3 мм; усиление – 60 С, продолжительность - 30 с). Конъюгаты хранили при температуре  $+4^\circ\text{C}$ . Конъюгаты БЛ/Жел А с МКА, белком G и БСА в тексте обозначены как БЛ/Жел А /МКА, БЛ/Жел А /белок G и БЛ/Жел А /БСА соответственно.

*Иммуноанализы ПСА и IgG против столбнячного анатоксина.* В лунки 96-луночного полистирольного планшета добавляли 100 мкл мышинных анти-ПСА IgG

в концентрации 0,05 мг/мл (клон 3А6) в 0,2 М карбонатном буфере, рН 9,6. Планшеты выдерживали при температуре +4°C в течение ночи. Планшеты трижды промывали 300 мкл натрий-фосфатного буфера с 0,1 % Твин-20, рН 7 (ФБТ), а затем добавляли 250 мкл блокирующего буфера (ФБТ + 2 % казеина + 1 % БСА, рН 7). После 60 мин блокирования планшеты промывали три раза. Добавляли четырехкратные разведения ПСА в блокирующем буфере от 1000 до 0,24 нг/мл (100 мкл на лунку), затем планшеты инкубировали в течение 60 мин и трижды промывали. Добавляли суспензию БЛ/Жел А/МКА (100 мкл, 0,025 мг/мл) в блокирующем буфере и инкубировали в течение 60 мин. После промывки добавляли 100 мкл субстратного буфера (1 мл 1 мг/мл ТМБ в ДМСО + 9 мл цитратно-фосфатного буфера + 100 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Через 30 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М серной кислоты. Поглощение при 450 нм измеряли с помощью планшетного спектрофотометра. Все этапы анализа, за исключением промывки и измерения, проводили в термошейкере при температуре +37°C (скорость перемешивания - 300 об/мин).

В лунки 96-луночного полистирольного планшета добавляли 100 мкл 0,05 мг/мл столбнячного анатоксина в 0,2 М карбонатном буфере (рН 9,6). Планшеты выдерживали при температуре +4°C в течение ночи. Планшеты трижды промывали 300 мкл натрий-фосфатного буфера с 0,1% Твин-20, рН 7 (ФБТ), а затем добавляли 250 мкл блокирующего буфера (ФБТ + 2 % казеина + 1 % БСА, рН 7). После 60 мин блокирования планшеты промывали три раза. Добавляли четырехкратные разведения противостолбнячных антител в блокирующем буфере от 100 мМЕ/мл до 0,024 мМЕ/мл (100 мкл на лунку), затем планшеты инкубировали в течение 60 мин и трижды промывали. Добавляли суспензию БЛ/Жел А/Белок G (100 мкл, 0,025 мг/мл) в блокирующем буфере и инкубировали в течение 60 мин. После промывки добавляли 100 мкл субстратного буфера (1 мл 1 мг/мл ТМБ в ДМСО + 9 мл цитратно-фосфатного буфера + 100 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Через 30 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М серной кислоты. Поглощение при 450 нм измеряли с помощью планшетного спектрофотометра. Все этапы анализа, за исключением промывки и измерения, проводили в термошейкере при температуре +37°C (скорость перемешивания - 300 об/мин).

Калибровочная кривая была подогнана к четырехпараметровой логистической модели (использовалась схема взвешивания 1/Y<sup>2</sup>). Общее уравнение логистической функции имеет вид:

$$y = \frac{A2 + (A1 - A2)}{(1 + (x/x0)^p)} \quad [1]$$

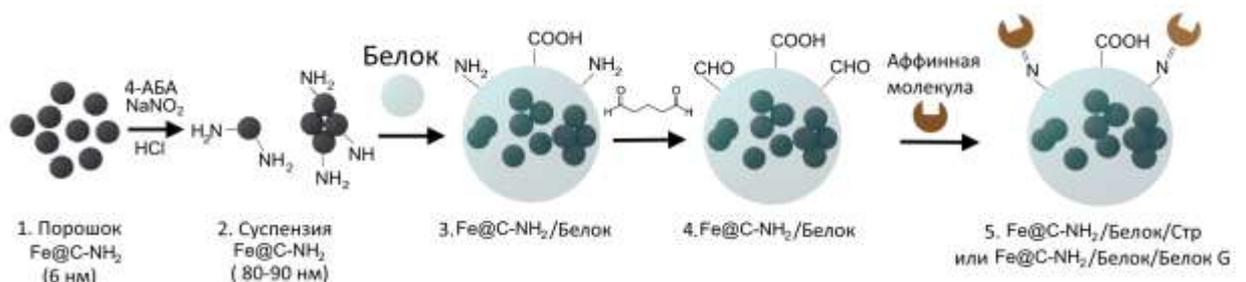
### **Результаты собственных исследований и их обсуждение.**

Одно из основных условий, а зачастую, самое трудоемкое и многозадачное в своей реализации, – это качественные характеристики применяемых в конструируемых тест-системах диагностических реагентов (конъюгатов). К таковым относятся: природа, состав, свойства и т.д. материала наночастиц, способ

стабилизации их в водных (физиологических) средах, гарантирующий неизменную устойчивость к агрегации, неспецифическая адсорбция белков (белковая корона), определяющая интенсивность фонового сигнала и т.д. В связи с этим, в данной работе большое внимание было уделено детальной характеристике физико-химических свойств разрабатываемых диагностических реагентов. Всестороннее понимание свойств диагностикумов необходимо как для оптимизации условий проведения иммуноанализа (выбор буферов для разведения, подбор оптимальной температуры и длительности инкубаций), так и для разработки способов хранения диагностических реагентов (условия и время, при которых они сохраняют свои свойства), определяющие, в конечном счете, условия транспортировки и хранения тест-наборов.

Конъюгаты магнитных наночастиц были синтезированы следующим способом: наночастицы Fe@C со средним размером приблизительно 6 нм аминировали, полученные наночастицы (Fe@C-NH<sub>2</sub>) добавляли к водным растворам белка. Получаемые таким образом наноразмерные материалы являлись по своей морфологии не просто наночастицами, а нанокластерами, т.е. скоплениями мелких магнитных железоуглеродных наночастиц, заключенных в единую белковую оболочку. Далее для лучшего понимания описываемых процессов, мы будем называть «наночастицами» частицы Fe@C, а «нанокластерами» - их скопления, внутри белковой капсулы. Именно нанокластеры и использовались в дальнейшем в качестве магнитных меток в ЯМР-иммуноанализе.

При получении нанокластеров происходили два процесса: зависящая от pH агрегация Fe@C-NH<sub>2</sub> (формирование нанокластеров) и стабилизация нанокластеров молекулами белка (Fe@C-NH<sub>2</sub>/Белок). Сформированный поверхностный белковый слой сшивали глутаровым альдегидом, а затем с нанокластерами конъюгировали распознающие молекулы: стрептавидин (Fe@C-NH<sub>2</sub>/Белок/Стр) или белок G (Fe@C-NH<sub>2</sub>/Белок/G) посредством реакции первичных аминов с карбонильными группами (рисунки 1). Следует отметить, что сшивание предотвращает разрушение нанокластеров, вследствие чего их размер зависит только от условий, в которых происходило смешивание аминированных наночастиц с белком.



**Рисунок 1 – Схема функционализации наночастиц**

*Примечание:* 4-АБА – 4-аминобензиламин.

В ходе диссертационного исследования удалось синтезировать диагностикумы, представляющие собой магнитные нанокластеры, т.е. наночастицы, распределенные внутри белковой капсулы. Было обнаружено, что разные белки

позволяют наделять наночастицы различными свойствами. Так, желатиновое покрытие позволяет наночастицам сохранять коллоидную стабильность в широком диапазоне рН и ионной силы. Это является весьма ценным свойством, поскольку существенно расширяет границы их практического применения, в частности, позволяет использовать все многообразие способов химической модификации наночастиц. Альбуминовое и казеиновое покрытие позволяет наночастицам сохранять стабильность в сыворотке и плазме крови, т.е. делает их пригодными для гомогенных иммуноанализов. Поперечно-сшитые альбуминовые и казеиновые оболочки менее чувствительны к протеолизу, что увеличивает стабильность частиц к микробной контаминации. Кроме того, эти белковые покрытия позволяют достичь более высокой чувствительности в ЯМР-иммуноанализах, по всей видимости, за счет большего количества ковалентно пришитых распознающих молекул.

На основе оптимизированных магнитных диагностиумов был разработан метод количественной детекции противостолбнячных антител в сыворотке крови человека. В качестве метода регистрации сигнала использовали ЯМР-релаксометрию. Концентрация антител коррелирует с защитой от столбняка и отражает эффективность вакцинации. По данным Всемирной организации здравоохранения, защитный порог концентрации противостолбнячных антител составляет 0,1 МЕ/мл.

Перед нами стояла задача по созданию принципиально нового подхода: твердофазного ЯМР-иммуноанализа, который до настоящего времени не был описан в литературе. Известные из литературы тест-системы, в том числе и коммерческие, были исключительно гомогенными. Проведение анализа на твердой фазе имеет преимущества, связанные с возможностью удаления не связавшихся молекул в ходе промывок, что снижает уровень фонового сигнала и увеличивает нижний предел детекции анализа. Кроме того, твердофазные тесты не чувствительны к хук-эффекту, который является недостатком гомогенных методов. В то же время, нам пришлось столкнуться с рядом технологических трудностей, которые были обусловлены самой физической сущностью ядерно-магнитного резонанса. Перед тем, как мы рассмотрим эти трудности, а также найденные нами пути по их преодолению, мы уделим некоторое внимание детализации самого принципа твердофазного ЯМР-иммуноанализа.

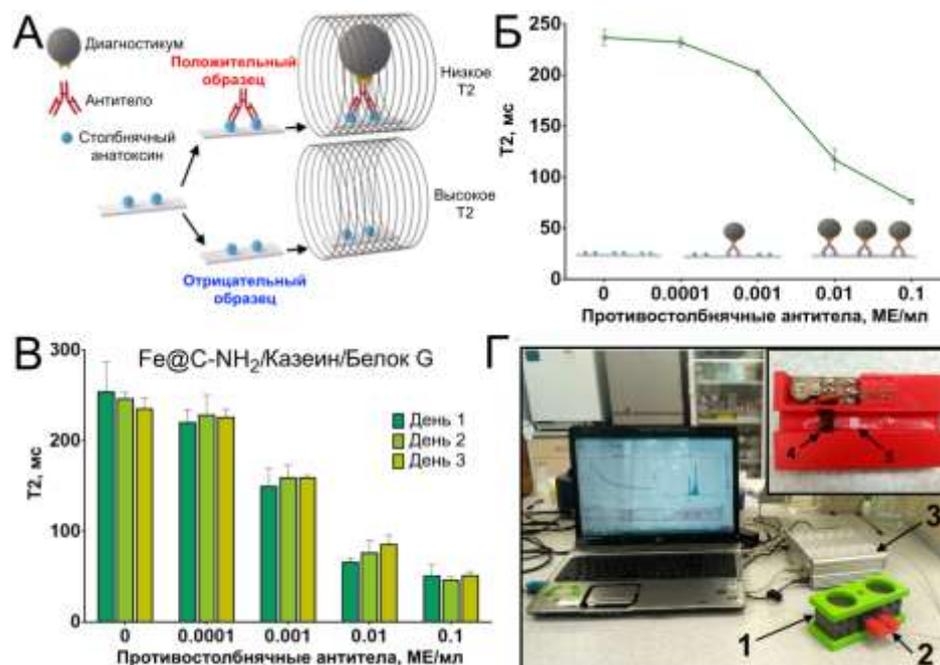
В качестве твердой фазы нами были выбраны нитроцеллюлозные тест-полоски с диаметром пор 8 мкм. Столь большой диаметр пор был призван обеспечить проникновение наночастиц в толщу мембраны. Это являлось необходимым условием для реализации ЯМР-анализа, поскольку измеряемым сигналом является время релаксации T<sub>2</sub> протонов буферного раствора, пропитывающего мембрану. Таким образом, в ходе ЯМР-анализа промывочный буфер используется не только для удаления не связавшихся молекул и частиц, но играет роль среды, генерирующей магнитный сигнал. Для эффективного использования магнитных наночастиц и более близкого их контакта с буферным раствором, пропитывающим мембрану, требовалось обеспечить условия для

проникновения частиц в её толщу. Увеличение размера пор мембраны (обычно для иммуноанализа используются мембраны с размером пор в районе сотен нанометров) способствовало этому проникновению. Мы протестировали первую итерацию иммуноанализа на модели «биотин-стрептавидин», осуществляя прямой анализ Би-БСА на тест-полосках при помощи магнитных стрептавидиновых диагностикумов, и получили воспроизводимые зависимости сигнала ( $T_2$ ) от концентрации Би-БСА. Однако при переходе к реальной иммуноаналитической системе, а именно непрямому анализу антител против столбнячного анатоксина, сигнал был едва детектируемым. Аналогичный разочаровывающий результат был получен и для сэндвич-модификации твердофазного анализа (мы проводили анализ простатспецифического антигена при помощи пары моноклональных антител, одно из которых было конъюгировано с магнитными метками). При этом проблема, очевидно, была не в отсутствии связывания конъюгата с антителами или антител с антигеном, поскольку образование иммунных комплексов на нитроцеллюлозе было видно невооруженным взглядом (благодаря темно-коричневому цвету магнитных нанокластеров). После изучения литературы и поиска возможных решений проблемы мы выяснили, что при анализе на нитроцеллюлозе формирование иммунных комплексов происходит, главным образом, на ее поверхности, а не в толще, несмотря на ее пористую структуру. При достаточной величине иммунного комплекса (антиген-антитело-конъюгат магнитной частицы с белком G) магнитные наночастицы оказываются удалены от поверхности мембраны, а, значит, и от протонов, находящихся внутри нее. Это приводит к тому, что магнитные частицы оказываются неспособными воздействовать на их время релаксации  $T_2$  и сигнал отсутствует. В случае прямого анализа Би-БСА размер белковых комплексов меньше по размеру и наночастицы располагаются ближе к поверхности мембраны, что и позволяло нам без каких-либо проблем детектировать изменения  $T_2$  в модельных анализах.

Таким образом, нашей задачей было подобрать такие условия, которые бы способствовали проникновению иммунных комплексов в толщу мембраны. Для этого, необходимо было «заставить» противостолбнячный анатоксин проникнуть внутрь тест-полоски. Мы протестировали два подхода к решению этой задачи. Первый состоял в добавлении в буфер для нанесения антигена на тест-полоску детергентов. Второй заключался в вымачивании тест-полоски в растворе антигена. На практике, оба метода дали существенное улучшение: мы смогли надежно детектировать изменение  $T_2$  при увеличении концентрации антител, однако второй способ (вымачивание) обеспечивал более низкие пределы детекции, поэтому мы остановились именно на нем. Несмотря на его кажущуюся затратность (вместо нанесения на полоску нескольких микролитров раствора антигена мы вымачивали ее в 1,5 мл раствора антигена), на деле расход антигена почти не изменился. Мы увеличили объем раствора антигена, но пропорционально снизили его концентрацию, т.е. количество расходуемого антигена оставалось неизменным.

Именно такой оптимизированный вариант подготовки иммуносорбента был использован нами при проведении иммуноанализа противостолбнячных антител.

Нитроцеллюлозные тест-полоски обрабатывали последовательно столбнячным анатоксином и образцами, содержащими различные концентрации антител против столбнячного анатоксина. Антитела детектировали с помощью магнитных нанокластеров, конъюгированных с белком G. Магнитные нанокластеры уменьшают релаксацию протонов внутри пор мембраны, из которой изготовлена тест-полоска. Таким образом, время релаксации протонов T2 пропорционально концентрации антител (рисунк 2).



**Рисунок 2 – Применение покрытых белком магнитных нанокластеров в ЯМР-иммуноанализе IgG против столбнячного анатоксина**

*Примечание:* А – принцип анализа; Б – калибровочная кривая, полученная с использованием Fe@C-NH<sub>2</sub>/Казеин/Белок G; В – воспроизводимость ЯМР-иммуноанализа; Г – ЯМР-релаксометр и держатель образца (вставка): 1 – магнит, 2 – держатель образца, 3 – ЯМР-релаксометр, 4 – радиочастотная катушка, 5 – тест-полоска в пластиковой обертке.

Магнитные нанокластеры позволяли детектировать антитела независимо от типа белкового покрытия. При этом Fe@C-NH<sub>2</sub>/BCA/Белок G и Fe@C-NH<sub>2</sub>/Казеин/Белок G обеспечивали лучшую аналитическую чувствительность. В то же время нанокластеры, покрытые желатином, обеспечивали более высокий уровень сигнала в отрицательном контроле и более крутой наклон калибровочной кривой. Для всех конъюгатов была получена хорошая межсерийная воспроизводимость анализа. Для демонстрации принципиальной применимости анализа мы протестировали 10 образцов сыворотки крови, полученных от лиц, вакцинированных АКДС. В анализе использовали конъюгат Fe@C-NH<sub>2</sub>/Казеин/Белок G. Нижний предел обнаружения составил 0,52 мМЕ/мл (среднее негативного контроля + 3 стандартных отклонения), что чуть выше, чем у ИФА с

двойным антигеном или мультиплексного иммуноанализа на основе люминесцентных микросфер. Тем не менее, аналитическая чувствительность анализа была намного ниже защитного порога и позволяла количественно определять противостолбнячные IgG у незащищенных лиц. Была продемонстрирована высокая корреляция ( $r^2 = 0,97$ ) с результатами ИФА.

Таким образом, нам удалось разработать тест-системы с достаточно низким пределом детекции, хорошей специфичностью и воспроизводимостью. Возможными способами улучшения их аналитических характеристик являются использование наночастиц с более высокой релаксивностью  $r_2$ , новых режимов измерения сигнала, увеличения мультиплексности и т.д.

Идея второй части исследования состояла в том, чтобы сконструировать принципиально новую в части используемых детектирующих реагентов линейку колориметрических иммуноаналитических систем, предназначенных для определения иммуноглобулинов в различных биологических средах, в том числе с акцентом на серологические исследования, связанные с оценкой иммунного ответа в ситуации перенесенного инфекционного заболевания или оценки уровня поствакцинального иммунитета, определяющим подходом к которым (детектирующим реагентам) является разработка метода синтеза альбуминовых наночастиц, нагруженных гемином и представляющих из себя метку, имитирующую пероксидазу. Непростая, но весьма привлекательная задача определила наше стремление как можно более детально отнестись и к этой части исследования, результаты которого подробно изложены далее.

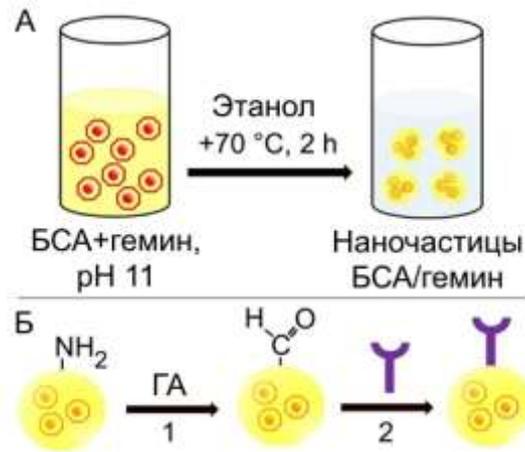
Гемин, являющийся основным элементом каталитического центра пероксидазы хрена, обладает значительной пероксидазоподобной активностью. Несмотря на то, что пероксидаза хрена имеет гораздо более высокую молярно-взвешенную каталитическую активность, нормированная по массе каталитическая активность гемина превышает таковую пероксидазы хрена. Гемин уже успешно использовался в качестве заменителя пероксидазы в середине 80-х годов. Ikarigama с соавт. (1982) разработали хемилюминесцентные иммуноанализы с использованием белков, меченных гемином, с пределом обнаружения всего 1 нг/мл. Мы предположили, что снижение предела детекции иммуноанализов может быть достигнуто путем мечения аффинных соединений наночастицами, содержащими многочисленные молекулы гемина. Наночастицы альбумина потенциально могут обеспечить доставку множества молекул гемина в расчете на одну молекулу анализируемого вещества, чтобы превзойти анализ на основе пероксидазы. Идея использования комплексов альбумин/гемин для применения в качестве метки в тест-системах является привлекательной, поскольку альбумин потенциально может повысить каталитическую активность и улучшить растворимость гемина при нейтральном pH и обеспечить функциональные группы для последующего конъюгирования с аффинными соединениями. В свою очередь, ковалентное присоединение гемина является более сложным и трудоемким процессом. Мы предположили, что десольватация нековалентных комплексов альбумин/гемин

может быть эффективным и относительно простым способом получения нанозимов, имитирующих каталитические свойства пероксидазы хрена.

Десольватация является простым методом получения белковых наночастиц. Она основана на добавлении органического растворителя, который способен смешиваться с водой (этанол, метанол, ацетон) к водному раствору белка. При определенной концентрации органического растворителя растворимость белка снижается, и он выпадает в осадок в виде белковых наночастиц. Распад наночастиц на отдельные молекулы белка обычно предотвращают ковалентной сшивкой, чаще с помощью глутарового альдегида. Различные метки, такие как флуоресцентные красители, наночастицы и ферменты, могут быть инкапсулированы в наночастицы альбумина в ходе синтеза, что обусловлено способностью альбумина образовывать комплексы с небольшими органическими молекулами. В молекуле альбумина имеется несколько сайтов связывания гемина, поэтому возможна простая загрузка гемина путем прямого смешивания его с белком. Различные функциональные группы на поверхности наночастиц предоставляют многочисленные пути ковалентного присоединения распознающих молекул, таких как моноклональные антитела. Хорошая коллоидная стабильность и относительно простой синтез являются дополнительными привлекательными свойствами белковых наночастиц. Важно отметить, что недавно метод десольватации уже был применен для получения наночастиц альбумина, нагруженных гемин. Эти нанозимы использовались для количественной детекции перекиси водорода, что подтверждает возможность использования десольватации для получения нанозимов на основе гемина. Однако о применении таких наночастиц в иммуноанализе не сообщалось.

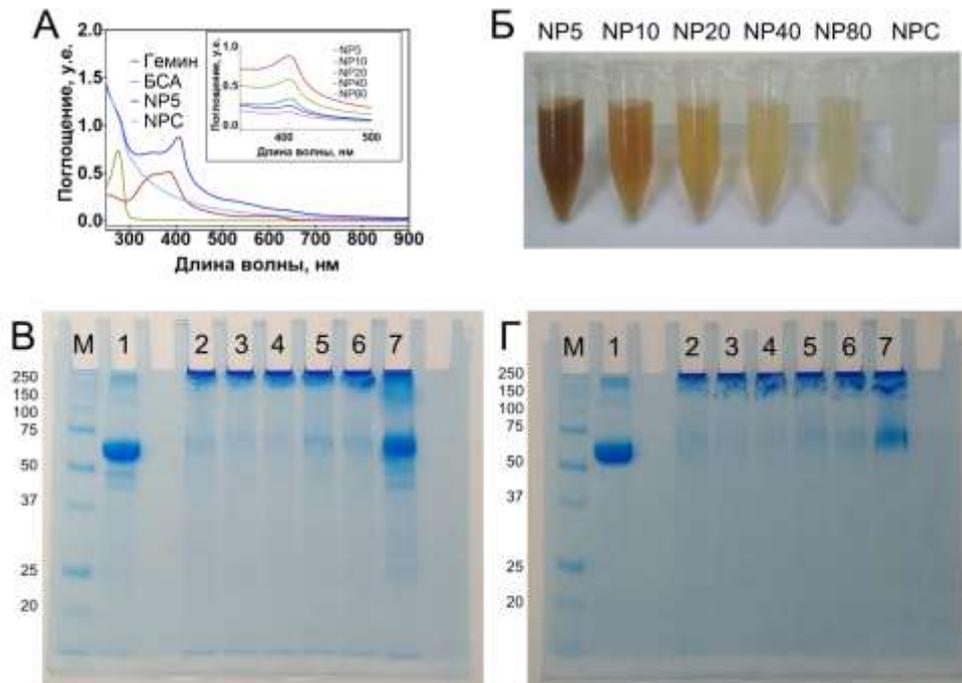
Наночастицы БСА/гемин были синтезированы методом десольватации, который основан на капельном добавлении этанола к раствору, содержащему БСА и гемин (*рисунок 3*). Образовавшиеся наночастицы стабилизировали нагреванием при  $+70^{\circ}\text{C}$ , поскольку сшивание глутаровым альдегидом приводило к агрегации наночастиц.

Была изучена зависимость эффективности загрузки гемина от исходного соотношения массы БСА к массе гемина. Массовое соотношение варьировали от 5:1 до 80:1 (полученные наночастицы обозначены соответственно, как NP5, NP10, NP20, NP40 и NP80), кроме того, контрольные наночастицы (обозначенные как NPC) синтезировали в отсутствие гемина. Свойства наночастиц БСА/гемин обобщены на *рисунке 4*.



**Рисунок 3 – Принцип получения дианоцикумов на основе БСА и гемина**

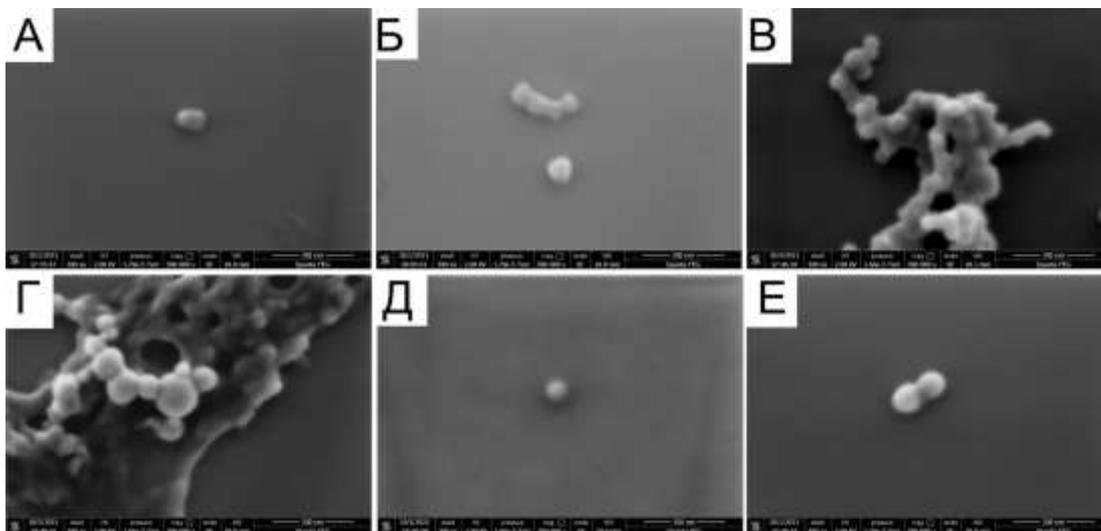
*Примечание:* А - схема приготовления наночастиц БСА/гемин; Б - схема конъюгации наночастиц БСА/гемин с белком G. 1 - добавление глутарового альдегида (ГА); 2 - добавление белка G (фиолетовая фигура).



**Рисунок 4 – Свойства наночастиц БСА/гемин:** А - спектры поглощения БСА (1 мг/мл), гемина (10 мкг/мл) и наночастиц NPC и NP5 (250 мкг/мл), Вставка - спектры поглощения наночастиц БСА/гемин (250 мкг/мл); Б - суспензии наночастиц БСА/гемин; электрофорез в ПААГ наночастиц БСА/гемин (1 мг/мл) без (В) или с (Г) нагреванием при +95°С: М - белковые маркеры, 1 - БСА, 2 - NP5, 3 - NP10, 4 - NP20, 5 - NP40, 6 - NP80, 7 - NPC.

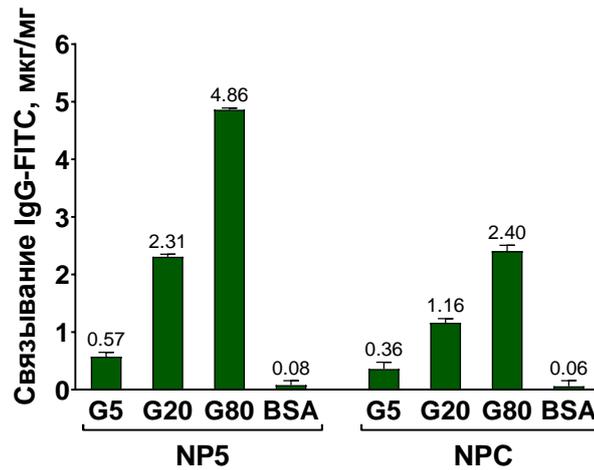
Размер наночастиц (гидродинамический диаметр, Dh), измеренный с помощью ДРС, находился в диапазоне от 96 до 153 нм. Индекс полидисперсности всех наночастиц был равен или ниже 0,1, что означает, что они имеют относительно узкое распределение по размерам. Из-за высокого pH исходного раствора БСА и, следовательно, значительного электростатического отталкивания белковых

молекул, выход синтеза наночастиц был низким (менее 40 %) по сравнению с обычными условиями синтеза. Наночастицы имели сферическую форму (рисунок 5) в соответствии с данными СЭМ.



**Рисунок 5 – СЭМ-изображения наночастиц БСА/гемин: NP5 (А), NP10 (Б), NP20 (В), NP40 (Г), NP80 (Д), NPC (Е). Масштабная линейка 300 нм**

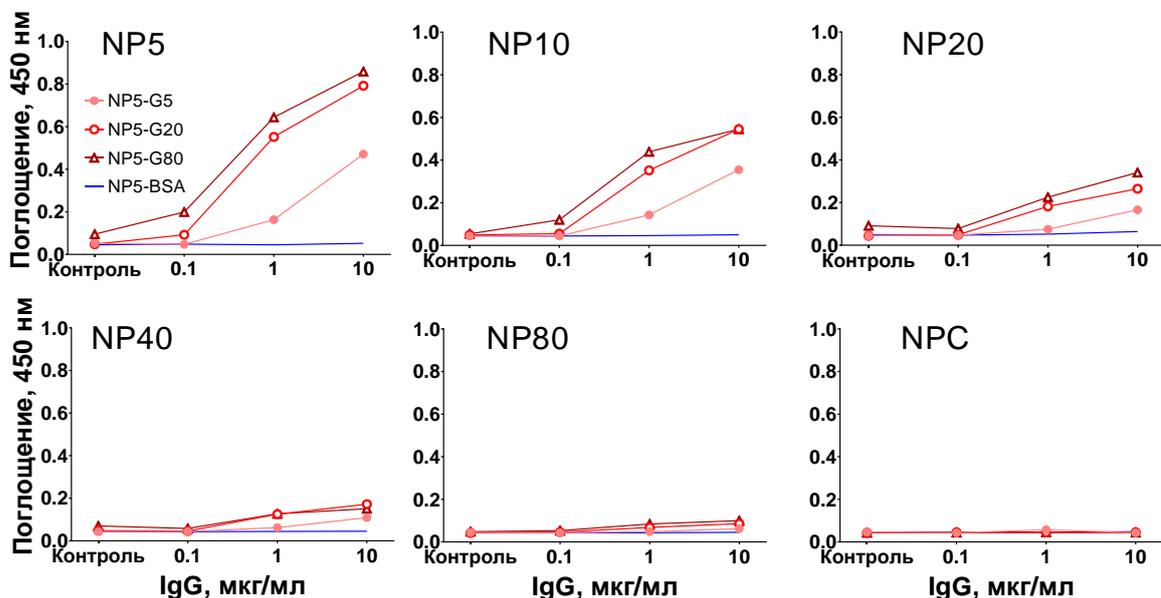
Наночастицы наделяли способностью связывать IgG путем конъюгирования с белком G. Белок G способен распознавать Fc и в меньшей степени Fab фрагменты IgG млекопитающих, включая человеческие IgG. Использование белка G позволяет получать универсальные диагностические реагенты для серологических анализов, которые могут быть использованы для оценки гуморального иммунного ответа у вакцинированных или инфицированных лиц, а также у иммунизированных лабораторных животных. Здесь мы использовали рекомбинантный вариант (G4223) белка G, экспрессируемый в *E. coli*, имеющий молекулярную массу 30 кДа. G4223 имеет три сайта связывания IgG, но лишен сайтов связывания альбумина. Методика конъюгирования включала обработку наночастиц БСА/Гемин 10-кратным избытком (десять карбонильных групп на одну молекулу лизина) глутарового альдегида, который образует основания Шиффа при взаимодействии с первичными аминами, расположенными на поверхности наночастиц. Будучи диальдегидом, глутаровый альдегид обеспечивает множество свободных карбонильных групп, к которым могут быть прикреплены молекулы белка G. Исходное соотношение белка G к наночастицам составляло 5, 20 и 80 мкг/мг, кроме того, были получены контрольные наночастицы, конъюгированные с БСА. Способность наночастиц связывать IgG подтверждали при помощи IgG с флуоресцентной меткой. Мы протестировали наночастицы, нагруженные (NP5) и ненагруженные (NPC) гемин. Связывающая способность наночастиц положительно коррелировала с исходным соотношением белка G к наночастицам (рисунок 6).



**Рисунок 6 – IgG-связывающая способность NP5 и NPC, конъюгированных с белком G**

*Примечание:* n=3, среднее ± стандартное отклонение

Способность наночастиц БСА/Гемин, конъюгированных с белком G, связывать IgG проверяли методом ИФА-подобного анализа. Человеческие IgG или БСА адсорбировали на поверхности лунок 96-луночных планшетов, затем последовательно добавляли конъюгаты и раствор субстрата. Развитие окраски наблюдалось для всех геминсодержащих наночастиц, несущих белок G, но не для NPC или наночастиц, конъюгированных с БСА (*рисунок 7*). В целом, интенсивность окраски была пропорциональна степени загрузки гемина и соотношению белка G к наночастицам.

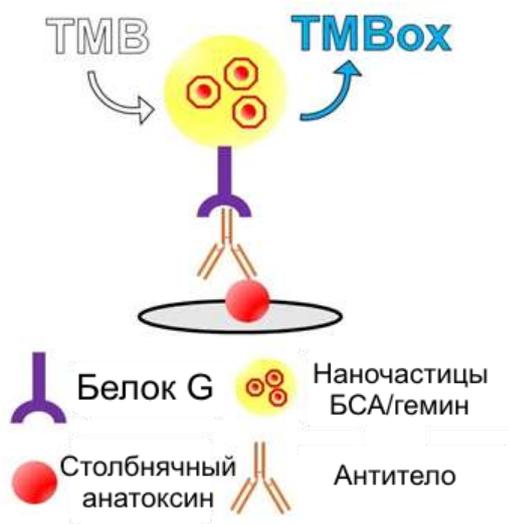


**Рисунок 7 – Прямое определение IgG человека с помощью различных конъюгатов наночастиц БСА/гемин, конъюгированных с белком G**

*Примечание:* Субстратный буфер: 29 частей 0,1 М ацетатного буфера, pH 5; 1 часть 0,1 М фосфатно-цитратного буфера, pH 5. n=1.

На следующем этапе исследований нами был разработан непрямой иммуноанализ tIgG. Он включал следующие стадии: адсорбция столбчатого

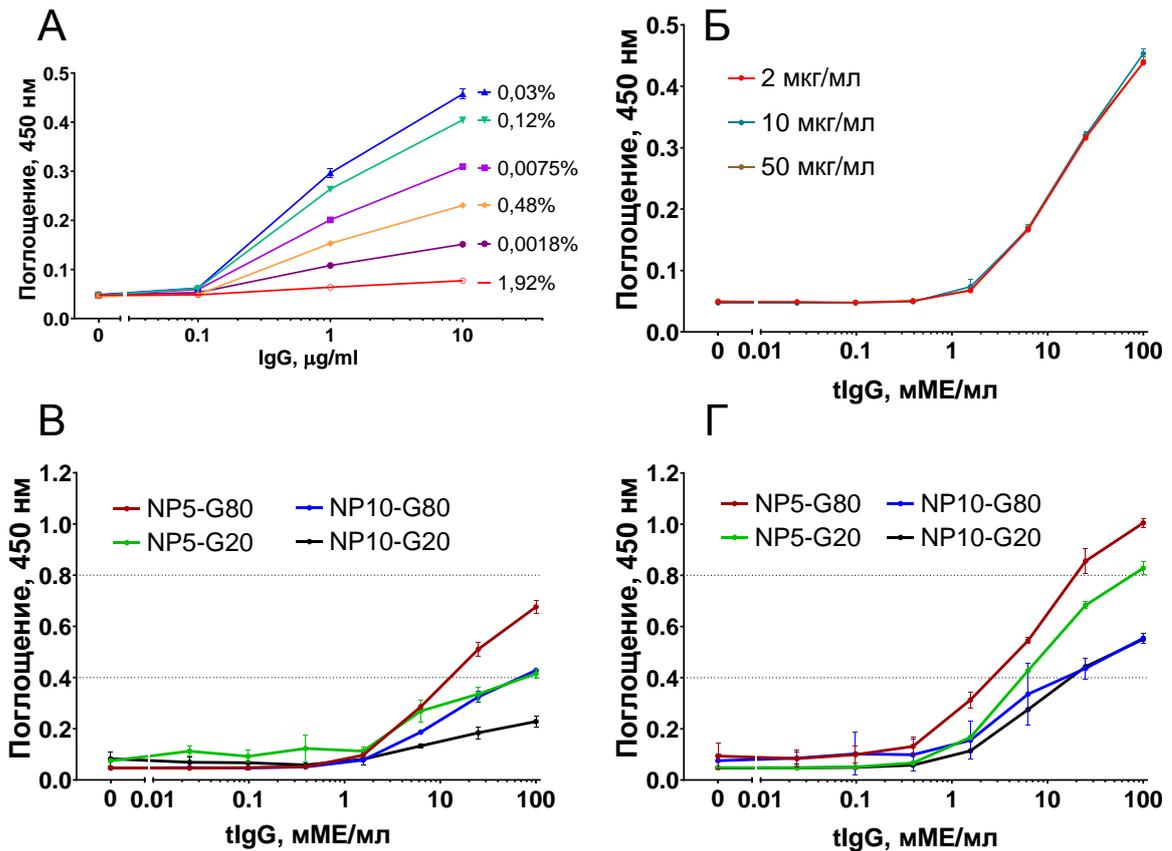
анатоксина на полистирольные планшеты, блокирование свободных участков поверхности лунки, добавление tIgG, добавление наночастиц БСА/гемин, конъюгированных с белком G, и генерация сигнала с помощью раствора субстрата (рисунки 8).



**Рисунок 8 – Принцип непрямого иммуноанализа антител против столбнячного анатоксина**

*Примечание:* TMBox представляет собой окисленную форму TMB синего цвета.

Оптимизацию иммуноанализа проводили в несколько этапов. Прежде всего, мы оптимизировали концентрацию столбнячного анатоксина. Обычно раствор для нанесения покрытия содержит 1-10 мкг/мл антигена. Лунки были покрыты 2, 10 и 50 мкг/мл столбнячного анатоксина, и были получены почти идентичные кривые доза-реакция (рисунки 9). Поэтому в дальнейших экспериментах использовали 2 мкг/мл раствора столбнячного анатоксина. Затем был выбран оптимальный тип конъюгата БСА/гемин и подобрана его концентрация. Большая концентрация наночастиц обеспечивает более высокую вероятность взаимодействия между наночастицами и анализируемым веществом (в данном случае tIgG), тем самым увеличивая генерируемый сигнал на одну молекулу анализируемого вещества. Возможным нежелательным последствием высокой концентрации конъюгата является повышенный фоновый сигнал, вызванный неспецифическим взаимодействием между наночастицами и иммуносорбентом. Тот же компромисс справедлив и для количества распознающих молекул, приходящихся на одну наночастицу. Чем больше молекул присоединено к одной наночастице, тем выше вероятность как специфических, так и неспецифических взаимодействий. Были протестированы четыре конъюгата, которые обеспечивали наибольшие значения поглощения в экспериментах с прямым обнаружением IgG: NP5-G20, NP5-G80, NP10-G20 и NP10-G80. Концентрации наночастиц составляли 0,1 и 0,2 мг/мл. Конъюгаты NP5-G80 и NP5-G20 в концентрации 0,2 мг/мл обеспечивали лучшие значения поглощения (рисунки 9).

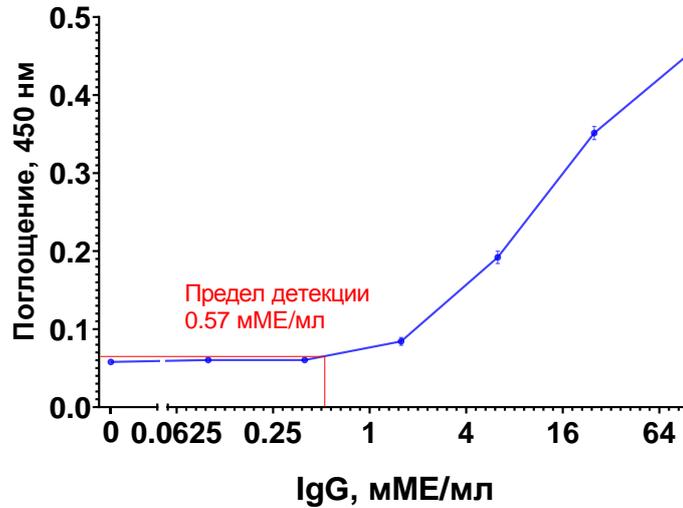


**Рисунок 9 – Оптимизация параметров иммуноанализа**

*Примечание:* концентрация перекиси водорода (А); концентрация столбнячного анатоксина (Б); концентрация нанозимов - 0,1 мг/мл (В) и 0,2 мг/мл (Г). Субстратный буфер: 0,1 М цитрат-имидазольный буфер, рН 4.  $n=3$ , среднее  $\pm$  стандартное отклонение.

Практическая применимость наноконъюгатов БСА/Гемин для измерения концентрации аналитов в реальных образцах была подтверждена обнаружением tIgG в сыворотке крови. Из-за высокой серопревалентности антител против столбняка получение человеческой сыворотки, не содержащей антител против столбнячного анатоксина, является довольно сложной задачей, поэтому использовалась пулированная кроличья сыворотка, в которую добавляли tIgG. Отсутствие tIgG в сыворотке крови кролика было подтверждено методом ИФА. Одной из основных целей анализа на антитела является выявление защищенных и незащищенных лиц. Для tIgG концентрация 100 мМЕ/мл является защитным порогом. Для обеспечения лучшей разрешающей способности анализа разведение сыворотки (1/20) было скорректировано таким образом, чтобы защитная концентрация находилась в крутой области калибровочной кривой (рисунок 10). Предел обнаружения tIgG составил 0,57 мМЕ/мл (среднее значение контроля  $+3 \times$  стандартных отклонения контроля). Несмотря на то, что он значительно выше, чем у ИФА или мультиплексных иммуноанализов на основе микросфер, аналитическая чувствительность которых достигает 0,01-0,05 мМЕ/мл, он тем не менее достаточен для количественного определения антител у вакцинированных лиц. Продолжительность иммуноанализа составляет около 3 ч (от добавления образца до

измерения оптической плотности), что сопоставимо с коммерческим ИФА и современными мультиплексными иммуноанализами.



**Рисунок 10 – Кривая доза-реакция анализа tIgG в 5% кроличьей сыворотке**

*Примечание:* Конъюгат: NP5-G20; субстратный буфер: 0,1 М фосфат-цитратный буфер, pH 4. n=3, среднее ± стандартное отклонение.

На примере наночастиц БСА/гемин мы продемонстрировали принципиальную возможность использования в иммуноанализе меток на основе белковых наночастиц, содержащих репортерные молекулы. Дальнейшая работа была направлена на усовершенствование разработанной системы и окончательный уход от использования как пероксидазы хрена, так и ее дорогостоящих компонентов (гемина) в пользу неорганических миметиков пероксидазы. Известно, что наночастицы переходных и драгоценных металлов обладают выдающейся пероксидазоподобной каталитической активностью. Эта часть диссертационного исследования посвящена разработке иммуноанализа, в котором в качестве метки используются альбуминовые наночастицы, содержащие в своем составе нанозимы берлинской лазури.

Нанозимы – это наноматериалы, проявляющие каталитическую активность, похожую на каталитическую активность ферментов. Нанозимы представляют собой катализаторы на основе искусственных наноматериалов, способные имитировать функции ферментов (G. F. Goya et al., 2021; Y. Huang et al., 2019). Физико-химическая стабильность, низкая стоимость и регулируемые свойства делают их многообещающей альтернативой пероксидазе хрена (ПХ), щелочной фосфатазе,  $\beta$ -галактозидазе, которые используются в качестве меток в колориметрических иммуноанализах. Колориметрические иммуноанализы включают иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографию (ИХА), иммунофильтрацию, дот-иммуноанализ и другие менее распространенные модификации. В таких анализах роль ферментов и их искусственных аналогов состоит в превращении бесцветного субстрата в окрашенный продукт. В настоящее время колориметрические иммуноанализы являются одним из ключевых

аналитических инструментов в медицине, контроле качества пищевых продуктов и биотехнологии. Несмотря на недостаточную технологическую зрелость нанозимов, они являются перспективной альтернативой ферментам в области биосенсорики (Y. Gao et al., 2020; J. J. Gooding, 2019). Наиболее привлекательными свойствами нанозимов по сравнению с ферментами являются лучшая физико-химическая стабильность, возможность многократного использования и практически неограниченный диапазон способов регулирования каталитических свойств. В настоящее время нанозимы рассматриваются в качестве альтернативы ферменту в различных областях биомедицины, включая терапию и диагностику. Разработка иммуноанализов является перспективной областью применения нанозимов. В современных иммуноанализах ферменты, такие как пероксидаза хрена, генерируют цветовой сигнал путем преобразования бесцветного субстрата в окрашенный продукт. Этот принцип лежит в основе иммуноферментного анализа (ИФА), одного из самых популярных видов клинических иммуноанализов. Нанозимы, проявляющие пероксидазоподобную активность, такие как наночастицы берлинской лазури, считаются более стабильными и дешевыми заменителями пероксидазы в ИФА.

Берлинская лазурь - это синий пигмент с химической формулой, варьирующей от  $AFe^{III}[Fe^{II}(CN)_6] \cdot xH_2O$  (где A - K, Na или NH<sub>4</sub>) до  $Fe^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_3 \cdot xH_2O$ . Наночастицы берлинской лазури проявляют пероксидазоподобную активность и ранее уже использовались в качестве каталитических меток в иммуноанализах, подобных ИФА, и в иммунохроматографических тестах. Применение нанозимов в качестве диагностических реагентов требует их функционализации молекулами (например, моноклональными антителами), которые обеспечивают биоспецифическое распознавание анализируемого вещества. Кроме того, нанозимы должны обладать хорошей коллоидной стабильностью в физиологических условиях (нейтральный pH, относительно высокая концентрация солей) и стабильностью при длительном хранении. На сегодняшний день разработано множество подходов к функционализации нанозимов берлинской лазури, которые наделяют их перечисленными свойствами. К таким подходам относятся покрытие низкомолекулярными стабилизаторами, искусственными полимерами, белками и так далее. Для присоединения к наночастицам распознающих молекул могут быть использованы как ковалентные, так и нековалентные взаимодействия.

Нами был разработан простой метод функционализации нанозимов берлинской лазури, основанный на десольватации альбумина. Метод десольватации основан на добавлении плохого растворителя (например, спирта) к раствору альбумина. Снижение растворимости белка инициирует образование монодисперсных и стабильных альбуминовых наночастиц. В фармацевтике этот метод широко применяется для инкапсулирования лекарственных средств и полимеров в белковые наночастицы. Целый ряд исследовательских групп успешно применял десольватацию для покрытия белковой оболочкой нанозимов, таких как наночастицы золота, железа и церия. В то же время, для функционализации

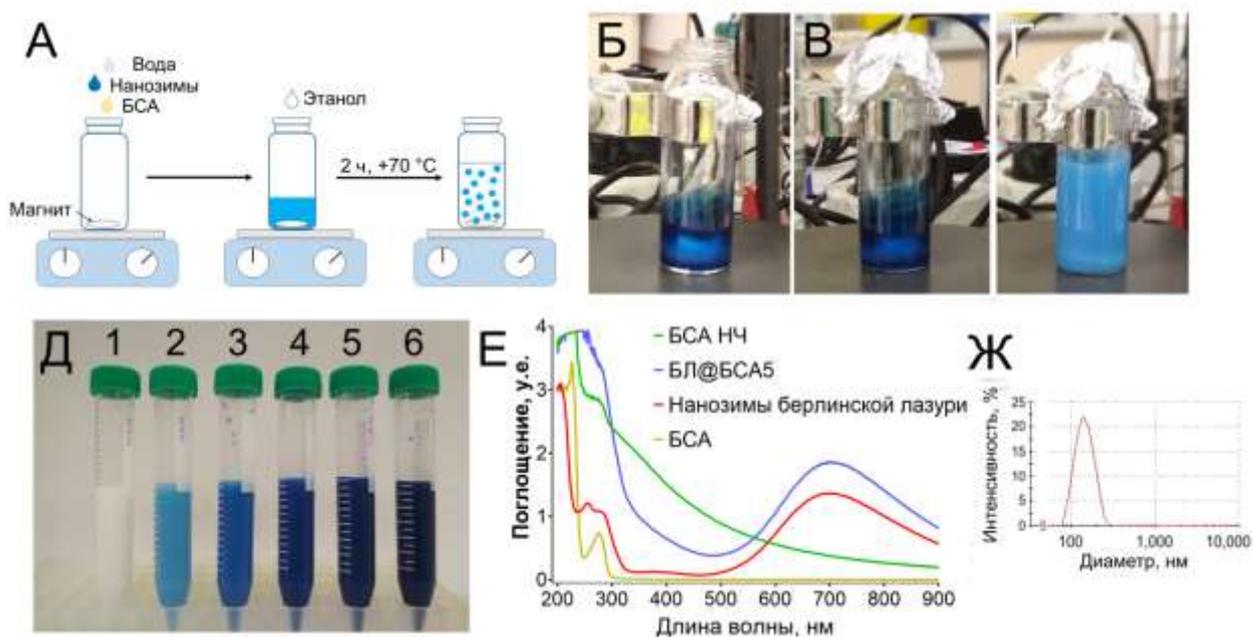
наночастиц берлинской лазури этот метод ранее не использовался. Берлинская лазурь склонна к гидролизу при щелочном рН, который обычно используется для десольватации альбумина, поэтому перед нами стояла задача подбора подходящих условий синтеза.

С практической точки зрения, процесс функционализации наночастиц должен быть простым, воспроизводимым и включать в себя как можно меньше этапов. Преимуществами метода десольватации являются использование относительно дешевых и широко доступных реагентов, возможность регулировать исход синтеза путем настройки многочисленных параметров (концентрация белка, рН, ионная сила, скорость перемешивания, скорость добавления органического растворителя, тип органического растворителя, температура и т.д.), множество вариантов сшивки белковых молекул, простая очистка и потенциальная масштабируемость. Мы ожидали, что полученные наночастицы будут содержать множество нанозимов, покрытых оболочкой из сшитых между собой молекул альбумина, обеспечивающих коллоидную стабильность при физиологическом рН, и функциональные группы для присоединения распознающих молекул. Размер наночастиц, синтезированных методом десольватации, можно регулировать, изменяя условия синтеза.

На этом этапе работы мы синтезировали альбуминовые наночастицы, нагруженные различным количеством нанозимов берлинской лазури. Наночастицы функционализировали моноклональными антителами против опухолевого маркера простатспецифического антигена (ПСА). Были охарактеризованы свойства полученных диагностикумов, после чего их использовали в качестве меток в ИФА-подобном колориметрическом количественном сэндвич-иммуноанализе ПСА.

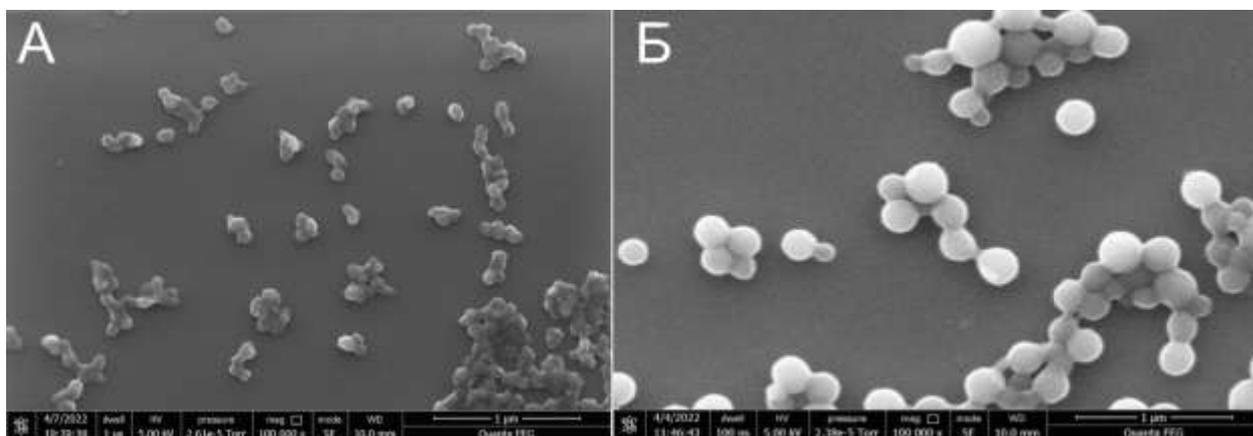
Нанозимы берлинской лазури были синтезированы традиционным методом, основанным на быстром смешивании растворов  $\text{FeCl}_3$  и  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Мы использовали относительно концентрированные растворы солей железа и не добавляли стабилизатор, такит как лимонная кислота. Было получено почти 2 г нанозимов берлинской лазури со средним гидродинамическим диаметром 44 нм и индексом полидисперсности 0,167. Нанозимы образовывали стабильные водные суспензии и сохраняли свой размер в течение нескольких месяцев.

Следующий этап включал синтез наночастиц БСА, нагруженных различными количествами нанозимов берлинской лазури (*рисунок 11*). К раствору, содержащему БСА и нанозимы, добавляли этанол, что приводило к образованию БЛ@БСА. Полученные наночастицы стабилизировали нагреванием. Начальное массовое соотношение БСА и нанозимов составляло от 5:1 (БЛ@БСА5) до 80:1 (БЛ@БСА1). Контрольные наночастицы БСА (БСА НЧ) синтезировали в тех же условиях без добавления нанозимов. В процессе синтеза наночастиц в реакционном сосуде образовывались агрегаты. После промывки, сопровождаемой ультразвуковой обработкой, эти агрегаты были разрушены. Полученные наночастицы БЛ@БСА имели индекс полидисперсности ниже 0,2, что указывает на их узкое распределение по размерам (репрезентативный график распределения по размерам представлены на *рисунке 11*).



**Рисунок 11 – А – Схема синтеза наночастиц; Б–Г – разные стадии синтеза БЛ@БСА1: смесь БСА и нанозимов до (Б) и после добавления 1 (В) или 4 (Г) мл этанола; Д – суспензии наночастиц: 1 – БСА НЧ, 2 – БЛ@БСА1, 3 – БЛ@БСА2, 4 – БЛ@БСА3, 5 – БЛ@БСА4, 6 – БЛ@БСА5. Е – спектры поглощения БСА НЧ, БЛ@БСА5, нанозимов и БСА. Ж – Взвешенное по интенсивности распределение по размерам БЛ@БСА5**

Анализ с помощью электронной микроскопии показал, что наночастицы имеют сферическую форму (*рисунок 12*).



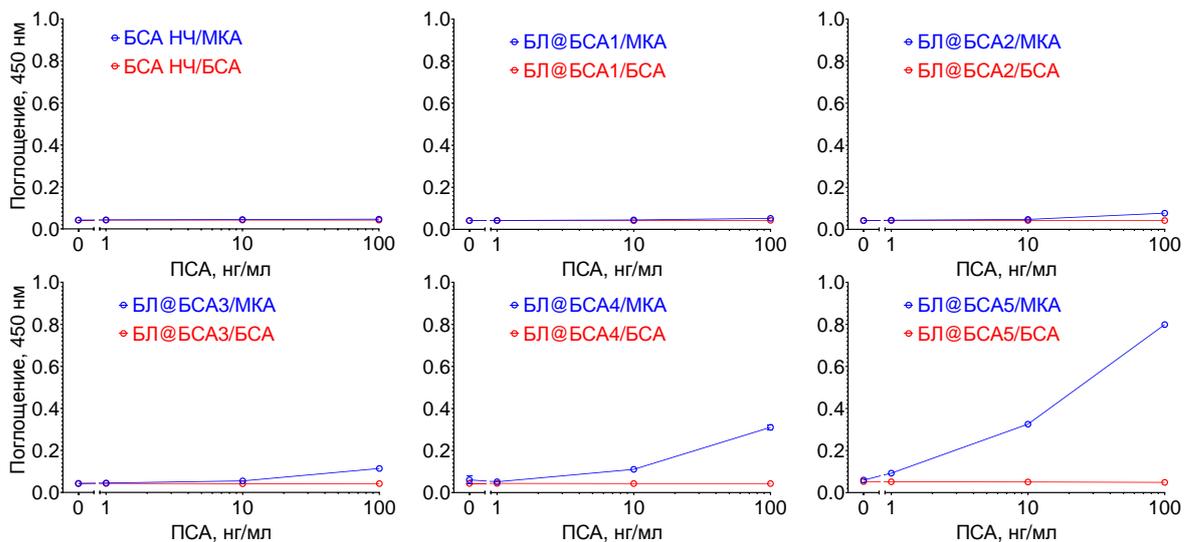
**Рисунок 12 – СЭМ-изображения наночастиц БЛ@БСА5 (А) и БСА НЧ (Б)**  
*Примечание:* Линейка - 1 мкм.

Успешную загрузку нанозимов можно оценить визуально: все наночастицы, полученные в присутствии нанозимов берлинской лазури, имели синий цвет, интенсивность которого прямо пропорциональна исходной концентрации берлинской лазури (*рисунок 11*). Более того, их спектры поглощения показали широкий пик при 700 нм, что характерно для берлинской лазури (*рисунок 11*). Эти результаты подтверждаются элементным анализом образцов БСА НЧ и БЛ@БСА5. Эффективность инкапсулирования достигала 96 % при самой высокой начальной

концентрации берлинской лазури, то есть почти все нанозимы были захвачены альбуминовыми наночастицами.

Загруженные нанозимом альбуминовые наночастицы функционализировали стрептавидином или моноклональными антителами (МКА) против простатспецифического антигена (ПСА) с использованием глутарового альдегида. Глутаровый альдегид содержит две альдегидные группы, которые сшивают первичные амины, входящие в состав БСА и распознающих молекул. Наночастицы сначала обрабатывали избытком глутарового альдегида, затем МКА или стрептавидин инкубировали с активированным глутаровым альдегидом БЛ@БСА, что приводило к образованию БЛ@БСА/МКА или БЛ@БСА/Стр. В качестве контроля использовали БЛ@БСА, конъюгированные с БСА (БЛ@БСА/БСА). Уменьшение дзета-потенциала наночастиц после сшивания глутаровым альдегидом подтверждало его реакцию с первичными аминами БСА.

Нами были синтезированы конъюгаты БЛ@БСА с БСА (отрицательный контроль) и с МКА против ПСА для сравнения их эффективности в иммуноанализе. Эффективность конъюгатов оценивали при помощи сэндвич-иммуноанализа ПСА. Самая высокая чувствительность обнаружения ПСА и наиболее интенсивный сигнал были получены с использованием наночастиц с наибольшим содержанием нанозима, БЛ/БСА5/МКА (рисунки 13). Отсутствие сигнала в лунках, в которые был добавлен контрольный конъюгат (БЛ@БСА5/БСА), подтвердило, что сигнал был обусловлен взаимодействием между антителами, присоединенными к наночастицам, и антигеном. Окислению субстрата способствовала пероксидазоподобная активность нанозимов, поскольку наночастицы без нанозимов (БСА НЧ/МКА) не генерировали никакого сигнала.

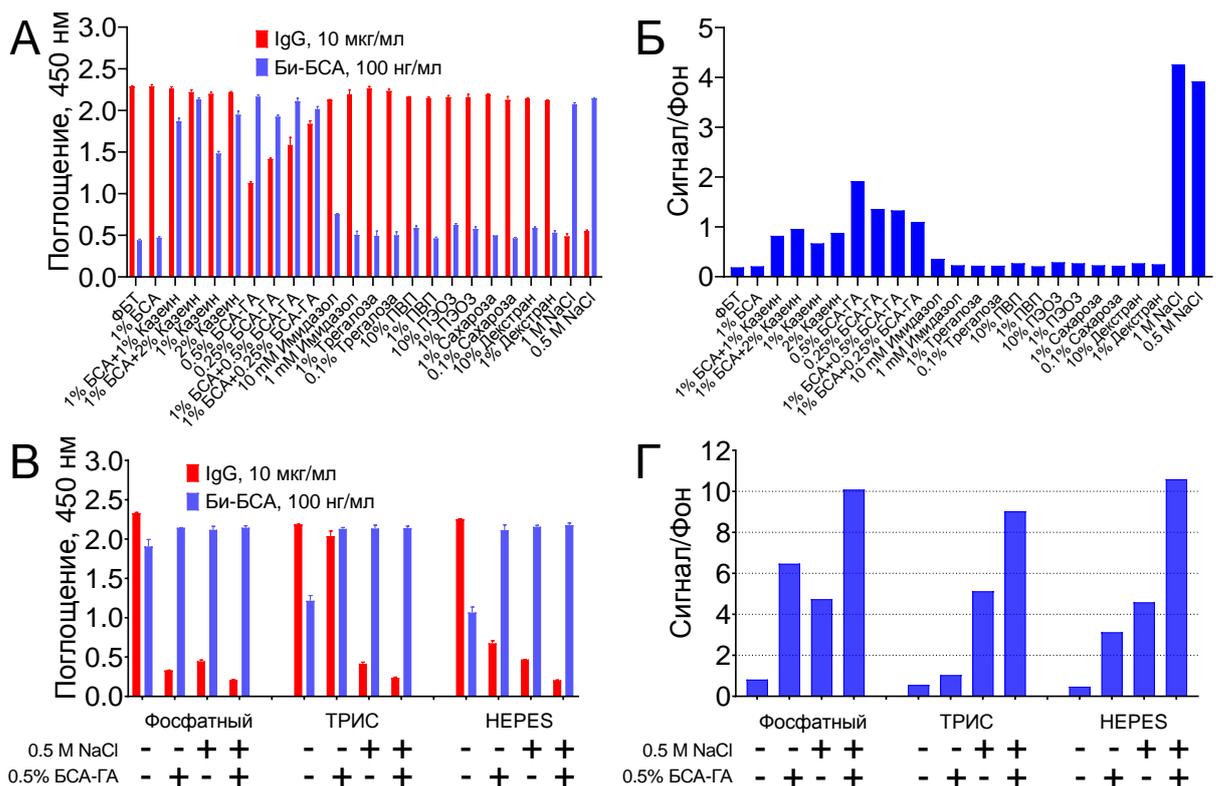


**Рисунок 13 – Калибровочные кривые в анализе ПСА, полученные для различных наночастиц БЛ@БСА, конъюгированных с БСА или МКА против ПСА**

*Примечание:* Концентрация наночастиц – 0,1 мг/мл. Представлены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение для 3 технических повторностей. Столбики погрешностей очень малы и скрыты точками данных.

Оптимизация состава субстрата привела к значительному увеличению интенсивности цветового сигнала, генерируемого БЛ@БСА. Тем не менее, это улучшение также имело нежелательные последствия: фоновый сигнал в анализе ПСА резко увеличился. Мы предположили, что БЛ@БСА может неспецифически взаимодействовать как с человеческим, так и с мышинным иммуноглобулином G (IgG). Как правило, такие проблемы могут быть решены путем применения блокирующего раствора, который содержит вещества (обычно белки, полимеры или сыворотки животных), способные подавлять неспецифические взаимодействия. В предыдущих экспериментах мы использовали блокирующий раствор, содержащий казеин и альбумин; однако они стали неэффективными после применения оптимизированного субстрата.

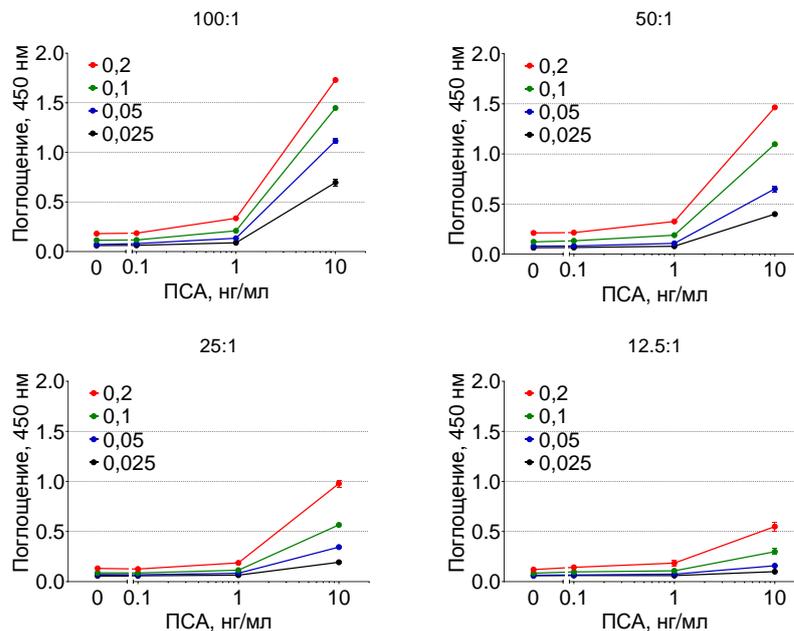
Было проведено дополнительное исследование для разработки соответствующего блокирующего раствора (рисунки 14). Желаемый эффект был достигнут путем увеличения ионной силы до 0,5–1 М при помощи NaCl и добавления 0,5–1 % обработанного глутаровым альдегидом альбумина, напоминающего структуру поверхности БЛ@БСА/МКА.



**Рисунок 14 – Оптимизация блокирующего реагента для иммуноанализа при помощи конъюгата БЛ@БСА5/Стр. Неспецифическое взаимодействие с IgG и специфическое взаимодействие с Би-БСА, адсорбированными на подложку**

*Примечание:* А, Б – скрининг блокирующих реагентов. В, Г – оптимизация наиболее эффективных блокирующих добавок. ФБТ – фосфатный буфер с твином-20, БСА-ГА – БСА, обработанный глутаральдегидом, ПВП – поливинилпирролидон, ПЭОЗ - поли (2-этил-2-оксазолин). n = 3, среднее значение ± стандартное отклонение.

Конечной целью нашего исследования было применение наночастиц альбумина, содержащих нанозимы, в качестве меток в колориметрическом анализе ПСА. Во всех предыдущих экспериментах мы использовали фиксированную концентрацию БЛ@БСА/МКА (0,1 мг/мл); соотношение МКА: наночастицы также было одинаковым: 50 мкг на 1 мг. Нами были протестированы различные концентрации наночастиц и соотношения антител к наночастицам. В целом, более высокая концентрация наночастиц и антител не обеспечивала значительного улучшения чувствительности анализа. Основываясь на анализе калибровочных кривых (рисунок 15), мы выбрали оптимальные условия анализа: концентрация БЛ@БСА/МКА-0.1 мг/мл; соотношение МКА к БЛ@БСА — 100 мкг на 1 мг.



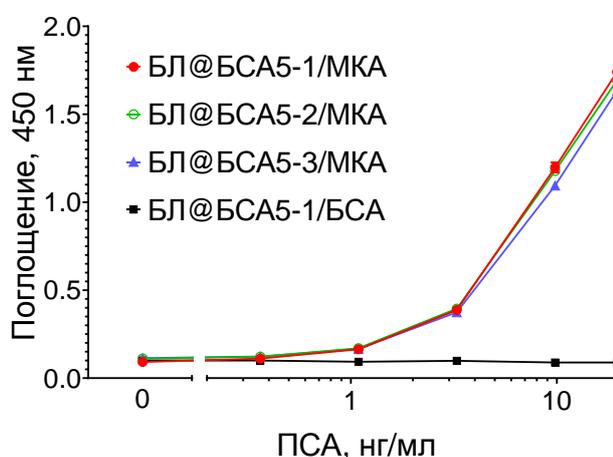
**Рисунок 15 – Оптимизация иммуноанализа простатспецифического антигена (ПСА)**

*Примечание:* соотношения МКА к БЛ@БСА5 (соотношение указано над графиками в мкг/мг) и концентрации конъюгатов БЛ@БСА5/МКА.  $n = 3$ , среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

Наночастицы БЛ@БСА5-1, БЛ@БСА5-2 и БЛ@БСА5-3 конъюгировали с МКА и использовали в качестве диагностических реагентов в иммуноанализе ПСА. Наночастицы, конъюгированные с БСА (БЛ@БСА 5-1/БСА), использовали в качестве отрицательного контроля. Для всех испытанных конъюгатов были получены почти идентичные калибровочные кривые (рисунок 16). Нижние пределы обнаружения ПСА составляли 0,064, 0,390 и 0,659 нг/мл. Таким образом, пределы детекции отличались на порядок. Чрезвычайно низкий предел детекции (0,064 нг/мл), полученный для БЛ@БСА5-1/МКА, можно объяснить очень низкой вариабельностью нулевого калибратора. Принимая во внимание очень пологий наклон калибровочной кривой при концентрациях ПСА ниже 1 нг/мл, мы пришли к выводу, что 0,390 и 0,659 нг/мл являются более реалистичными оценками нижнего предела детекции. Таким образом, аналитическая чувствительность разработанного

анализа позволяет определять ПСА в клинически значимом диапазоне концентраций (концентрация 4 нг/мл указывает на повышенный риск рака предстательной железы), что свидетельствует об эффективности разработанных диагностических реагентов.

Эффективность применения нанозимов берлинской лазури как заменителей пероксидазы хрена и успешное применение их для количественного анализа ПСА мотивировало нас продолжить исследования в этом направлении. Мы решили разработать диагностические реагенты на основе недавно описанной формы берлинской лазури, обладающей более высокой каталитической активностью. Для функционализации наночастиц нами была выбрана не альбуминовая, а желатиновая оболочка, обладающая большей проницаемостью по отношению к молекулам хромогенных субстратов, а также обеспечивающая лучшую стабильность при слабокислых рН, при которых берлинская лазурь хранится лучше всего.



**Рисунок 16 – Калибровочная кривая для анализов ПСА, сделанных при помощи трех партий наночастиц БЛ@БСА5, конъюгированных с БСА или антителами против ПСА**

*Примечание:*  $n = 3$ , среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Столбики погрешностей очень малы и скрыты точками данных.

В 2018 году научной группой доктора Аркадия Карякина (М.А. Комкова, Е.Е. Карякина, А.А. Карякин, 2018) был разработан способ получения наночастиц берлинской лазури с повышенной пероксидазоподобной активностью, обозначенных как «искусственная пероксидаза». Ключевой особенностью «искусственной пероксидазы» является процедура синтеза, основанная на восстановлении смеси  $\text{FeCl}_3/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  перекисью водорода (другие восстановители тоже эффективны), тогда как обычно нанозимы берлинской лазури получают реакцией между  $\text{FeCl}_3$  и  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  или сольвотермическим методом из  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . «Искусственная пероксидаза» обладает почти в десять раз более высокой каталитической активностью в пересчете на  $K_{\text{cat}}$  по сравнению с нанозимами берлинской лазури, полученными традиционным способом. Более того, авторы продемонстрировали, что увеличение диаметра наночастиц сопровождалось увеличением каталитической активности, что было объяснено диффузией субстрата

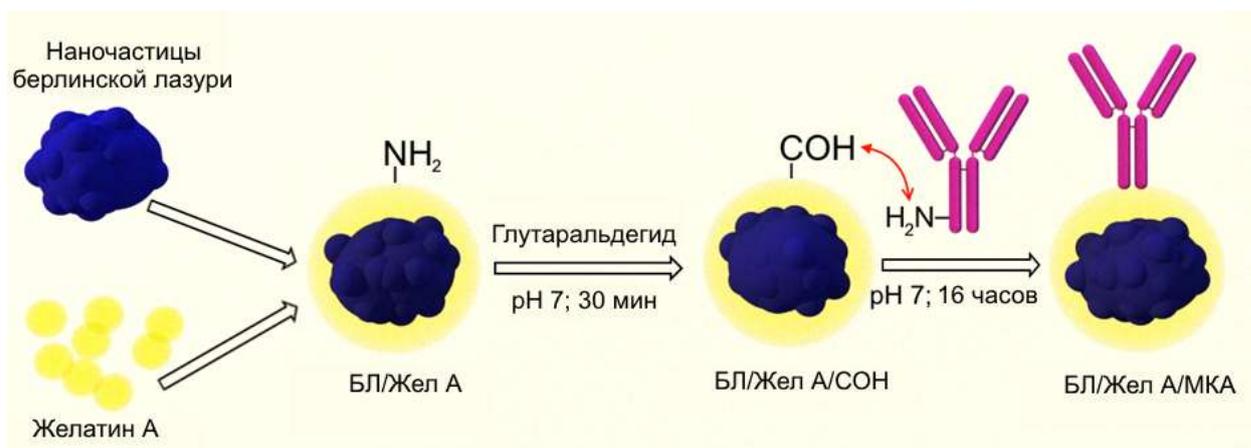
внутри наночастицы. Наночастицы «искусственная пероксидаза» ранее применяли при разработке ряда высокочувствительных тест-систем. В связи с этим, идея синтезировать большие (200-300 нм) наночастицы, функционализировать их аффинными соединениями и использовать их в качестве меток в колориметрическом иммуноанализе была весьма привлекательной. Однако в ходе предварительных экспериментов нам не удалось воспроизвести метод контроля размеров, описанный в оригинальной статье, основанный на изменении соотношения между концентрациями солей железа и перекиси водорода (соответствующий эксперимент и возможное объяснение приведены ниже). В связи с этим, мы решили разработать более надежный метод получения нанозимов «искусственная пероксидаза» желаемого размера.

Наночастицы берлинской лазури могут быть синтезированы различными путями (подробно они рассмотрены в обзорах). Наиболее популярным из них является смешивание  $\text{FeCl}_3$  и  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , обычно в присутствии лимонной кислоты, которая образует комплексы с ионами железа и обеспечивает более однородные наночастицы за счет уменьшения скорости кристаллизации. Другие методы включают гидротермальное разложение единственного прекурсора (например,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) или восстановление  $\text{FeCl}_3/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  с помощью  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Последний подход позволяет получать нанозимы «искусственная пероксидаза». Синтез, основанный на применении восстановителя используется нечасто, поэтому существует не так много исследований, посвященных регулированию размеров наночастиц, полученных этим методом. В частности, Liu с соавт. синтезировали небольшие (около 50 нм) наночастицы путем постепенного добавления  $\text{FeCl}_3$  к  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (оба раствора содержали  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Обработка ультразвуком позволяет дополнительно уменьшить размер наночастиц до 5 нм. Shiba с соавт. регулировали диаметр наночастиц путем изменения концентрации восстановителя (аскорбиновой кислоты) и добавления предварительно сформированных наночастиц в реакционную смесь, однако размер полученных наночастиц не превышал 150 нм. Использование полимеров в качестве покрывающих агентов является еще одним вариантом регулирования размера наночастиц берлинской лазури.

Поскольку нам не удалось воспроизвести описанный в литературе метод синтеза наночастиц берлинской лазури, мы были вынуждены сначала уделить некоторое внимание задачам, имеющим большее отношение к вопросам коллоидной химии, а именно разработать надежный и воспроизводимый способ получения каталитических меток для иммуноанализа. Лишь после решения этой задачи и верификации того факта, что их каталитические свойства действительно более высоки, чем у обычной берлинской лазури, мы смогли переключиться на разработку диагностических реагентов на их основе, исследование их свойств и разработку иммуноанализов ПСА и противостолбнячных антител.

Нами был разработан способ регулирования размеров наночастиц «искусственная пероксидаза», основанный на добавлении к смеси  $\text{FeCl}_3/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  различных количеств лимонной и щавелевой кислот. Их способность образовывать

комплексы с ионами железа замедляет скорость реакции осаждения берлинской лазури и позволяет увеличить размер наночастиц до 300 нм. Описанный подход является воспроизводимым и масштабируемым, что было подтверждено нами путем синтеза нескольких партий наночастиц в условиях десятикратно увеличенного объема реакционной смеси. Синтезированные таким образом наночастицы конъюгировали с белком G, моноклональными антителами против простатспецифического антигена и БСА при помощи ковалентного присоединения. Для этого наночастицы покрывали желатином А, затем желатиновый слой сшивали глутаровым альдегидом. Первичные амины белка G реагировали со свободными альдегидными группами (рисунки 17). Желатиновая оболочка была выбрана по нескольким причинам. Во-первых, желатин обеспечивает хорошую коллоидную стабильность в широком диапазоне значений рН, включая его низкие значения, что важно, поскольку гидролиз берлинской лазури происходит при нейтральном и щелочном рН. Во-вторых, желатин является общедоступным нетоксичным полимером, содержащим множество функциональных групп. Желатин А имеет изоэлектрическую точку в районе 7-9, т.е. положительно заряжен при нейтральном и кислом рН и, следовательно, легко адсорбируется на отрицательно заряженных наночастицах. Сшивание желатина и связывание аффинных молекул осуществляли при рН 7, поскольку глутаровый альдегид реагирует с первичными аминами при нейтральном и щелочном рН. Следует отметить, что существенное количество (приблизительно 40 %) наночастиц берлинской лазури было потеряно из-за гидролиза после инкубации в течение ночи при рН 7 (потери наночастиц оценивали, измеряя разницу в поглощении при 700 нм до и после инкубации).

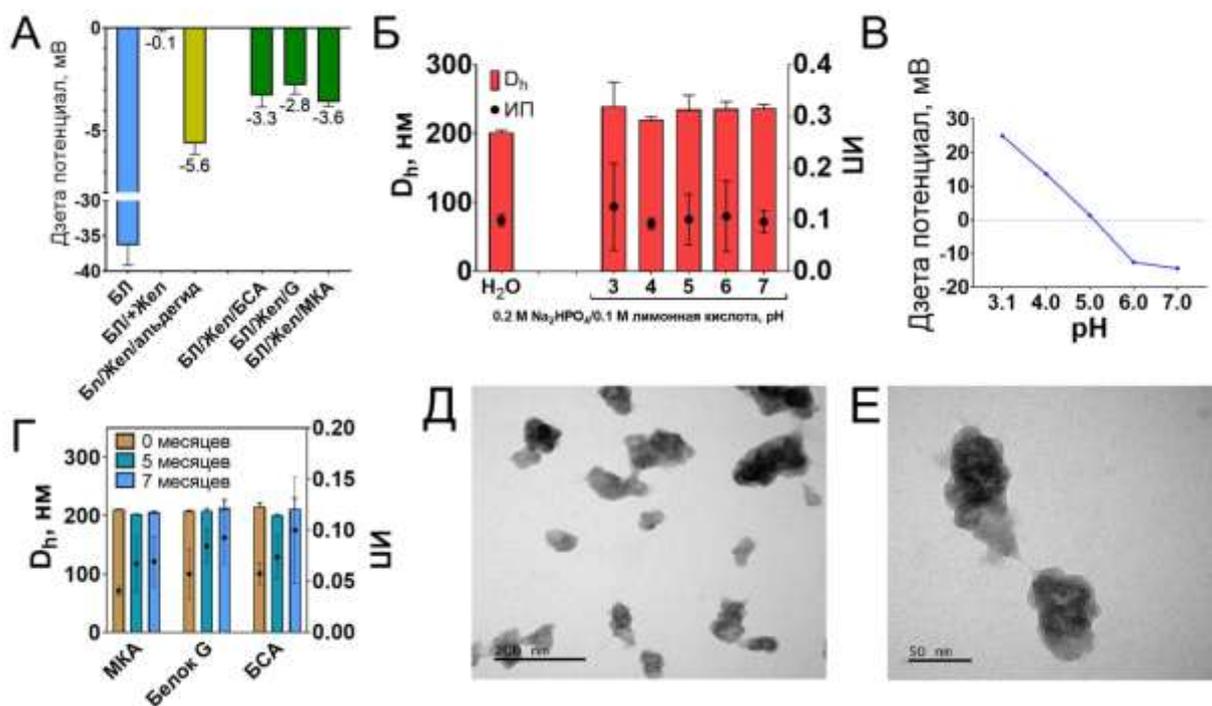


**Рисунок 17 – Конъюгирование покрытых желатином наночастиц берлинской лазури с моноклональными антителами**

*Примечание:* Аминогруппы желатина были сшиты глутаровым альдегидом, после чего аминогруппы антител реагировали с карбонильными группами на поверхности наночастиц.

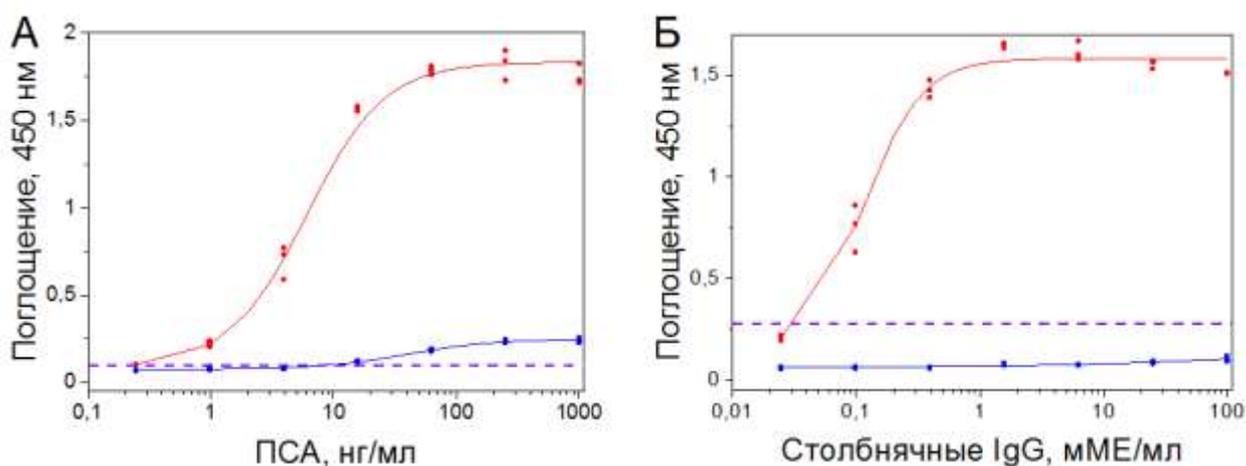
Успешная функционализация была подтверждена измерением коллоидной стабильности, дзета-потенциала и функциональной активности наночастиц. Изменение дзета-потенциала отражает изменение структуры поверхности наночастиц (рисунки 17). Непокрытые наночастицы имеют сильный отрицательный

заряд (-36,3 мВ), тогда как после покрытия желатином значение дзета-потенциала становится близким к нулю: -0,1 мВ. Обработка глутаральдегидом приводит к уменьшению дзета-потенциала (-5,6 мВ), что объясняется уменьшением количества поверхностных первичных аминов. Присоединение аффинных молекул и блокирование глицином делало дзета-потенциал более положительным. В отличие от наночастиц берлинской лазури без покрытия, модифицированные желатином наночастицы были стабильны в буфере Макильвена с рН от 3 до 7 после 60 мин инкубации (рисунки 18). Коллоидная стабильность наночастиц не зависела от величины дзета-потенциала, и, по-видимому, обеспечивалась стерическим отталкиванием или другими силами (рисунки 18). Белковое покрытие снижало каталитическую активность наночастиц более чем в три раза. Очевидно, молекулы желатина препятствуют взаимодействию субстрата с каталитическими центрами наночастиц. Морфологию наночастиц изучали с помощью ПЭМ (рисунки 18). Наночастицы имеют неправильную форму, а их размеры неоднородны, что не согласуется с данными ДРС, которые свидетельствуют об их низкой полидисперсности. Возможной причиной является недоучет более мелких наночастиц при измерении размеров с помощью ДРС, что является хорошо известной особенностью этого метода.



**Рисунок 18 – Физико-химические свойства наночастиц:** А – изменение дзета-потенциала наночастиц в процессе конъюгирования; Б - коллоидная стабильность БЛ/Жел А/белок G в воде и буфере Макильвена с рН 3-8 (инкубация 60 мин); В - дзета-потенциал БЛ/Жел А/белок G в буфере 5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/лимонная кислота, рН 3,1-7; Г - коллоидная стабильность БЛ/Жел А/МКА, БЛ/Жел А/белок G и БЛ/Жел А/БСА при длительном хранении в воде; Д, Е - ПЭМ-изображения БЛ/Жел А/МКА. *Примечание:* Линейка: Д - 200 нм, Е - 50 нм. n=3, среднее ± стандартное отклонение

Практическая применимость БЛ/Жел А/МКА и БЛ/Жел А/Белок G в качестве диагностических реагентов для колориметрического иммуноанализа была доказана количественным определением двух модельных аналитов: простатспецифического антигена (ПСА) и противостолбнячного IgG. Нижний предел детекции определялся как концентрация анализируемого вещества, которая соответствует среднему значению поглощения нулевых калибраторов плюс три стандартных отклонения. Для анализа ПСА предел детекции составил 0,189 нг/мл, для столбнячного анатоксина — 0,035 мМЕ/мл. В экспериментах, где наночастицы, конъюгированные с моноклональными антителами и белком G, были заменены контрольными наночастицами (конъюгированными с БСА), наблюдалось лишь незначительное увеличение поглощения при самых высоких уровнях анализируемого вещества (рисунк 19). Этот результат демонстрирует, что способность наноконъюгатов взаимодействовать с анализируемыми веществами обусловлена присутствием аффинных молекул на их поверхности. В любом случае, несмотря на то, что мы не проводили полную систематическую оптимизацию процедур иммуноанализа, обе они позволяют обнаруживать анализируемые вещества в концентрациях, которые имеют отношение к клиническому применению. Для ПСА это диапазон концентраций составил от 0,1–0,2 до более чем 20 нг/мл, в случае столбнячных антител серологические анализы должны быть способны обнаруживать антитела от самых низких защитных титров (10-100 мМЕ/мл) до самых высоких титров у иммунизированных лиц (несколько Ед/мл). Можно видеть, что аналитическая чувствительности разработанного иммуноанализа достаточна для обнаружения ПСА в неразбавленной сыворотке/плазме крови, тогда как обнаружение противостолбнячных IgG возможно даже в сильно разбавленных образцах.



**Рисунок 19 – Колориметрический анализ ПСА (А) и антистолбнячных IgG (Б)**

*Примечание:* Красные линии - калибровочные кривые ПСА и противостолбнячных IgG. Синие линии - кривые доза-реакция, полученные с использованием контрольного конъюгата БЛ/Жел А/БСА. Фиолетовая пунктирная линия показывает значение оптической плотности равное среднему значению поглощения нулевого калибратора + 3 стандартных отклонения. n=3.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностические реагенты в существенной степени определяют свойства тест-систем: нижний предел детекции, селективность, надежность, воспроизводимость, а также влияют на саму процедуру анализа. Таким образом, совершенствование методов иммунодиагностики в существенной степени связано с разработкой новых диагностических реагентов, лишенных недостатков традиционных диагностикумов или даже превосходящих их по каким-либо параметрам. Создание новых диагностикумов, таким образом, должно быть основано на применении новых, оригинальных технологий и подходов.

Итогом диссертационного исследования являются новые технологии получения диагностических реагентов для ЯМР-иммуноанализа и колориметрического иммуноанализа, которые представляют собой наночастицы с белковым покрытием. Эти диагностикумы стали основой для создания тест-систем, предназначенных для количественного обнаружения противостолбнячных антител и простатспецифического антигена. Необходимо обратить внимание на то, что выбранные мишени совершенно не исчерпывают спектр возможного применения реагентов, полученных с помощью представленных разработок. Это лишь характерные примеры, призванные продемонстрировать возможности новых диагностикумов. Разработанные технологические подходы представляют собой методологию, по сути, технологическую платформу, способную удовлетворить актуальный запрос со стороны области диагностического тестирования. Все вышеизложенное объясняет столь существенный объем исследований, который был посвящен анализу структурно-морфологических характеристик синтезируемых материалов и оптимизации синтетических процессов, а также детальное описание этого в представленной диссертационной работе.

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в проведении сравнительных исследований диагностикумов на основе пероксидазы из корней хрена и наночастиц, обладающих наиболее высокой пероксидазной активностью, в частности, наночастиц на основе соединений платины, металлосодержащих графеноподобных структур и наночастиц берлинской лазури.

## ВЫВОДЫ

1. Разработанный метод в формате твердофазного ЯМР-иммуноанализа, основанный на применении диагностических реагентов, представляющих собой магнитные наночастицы с белковым покрытием, позволяет осуществлять количественное обнаружение противостолбнячных антител в образцах сыворотки крови и может быть использован для оценки эффективности иммунизации против столбняка.

2. Сочетание таких методов как гель-электрофорез в денатурирующих и неденатурирующих условиях, щелочной и ферментативный гидролиз, измерение спектров флуоресценции в ультрафиолетовой и видимой области спектра,

гравиметрический анализ и количественный анализ белков при помощи специфических красителей позволяют осуществлять всестороннюю оценку тех свойств диагностикумов на основе белковых наночастиц, которые являются критически важными для практического применения: концентрации, стабильности, проницаемости для низкомолекулярных соединений и содержания репортерных молекул.

3. Для количественной детекции противостолбнячных антител целесообразным является метод с использованием альбуминовых наночастиц, содержащих гемин в качестве каталитической метки, позволяющий выявлять противостолбнячные антитела в концентрациях от 0,57 мМЕ/мл и выше, что делает его подходящим для оценки напряженности поствакцинального иммунитета к столбняку.

4. Применение диагностических реагентов для колориметрического иммуноанализа, представляющих собой конъюгаты наночастиц берлинской лазури, покрытых желатином, с широким спектром аффинных соединений позволяет измерять концентрацию простатспецифического антигена (нижний предел детекции 0,189 нг/мл) и противостолбнячных антител (нижний предел детекции 0,035 мМЕ/мл) в диапазоне клинически значимых показателей.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Для получения диагностикумов на основе наноматериалов с белковым покрытием следует использовать один из двух подходов. Первый заключается в инкубации наноразмерных меток в избытке белковых молекул, с последующей поперечной ковалентной сшивкой белковой молекулой гомо- или гетеробифункциональными кросс-линкерами, например, глутаральдегидом, глиоксалем, эпихлоргидрином, диглицидиловыми эфирами, карбодиимидами, генипином и т.д. Варьирование pH, ионной силы и концентрации реагентов позволяет управлять свойствами диагностикумов. Второй способ заключается в добавлении плохого растворителя (обычно спиртов) к концентрированному раствору белка. Это приводит к выпадению в осадок белковых наночастиц диаметром от 100 до 300-400 нм. В зависимости от типа репортерных молекул или частиц (водорастворимые или спирторастворимые), их следует либо предварительно смешать с белком, либо добавить в плохой растворитель. Для получения готовых диагностикумов далее необходимо конъюгировать наночастицы с требуемыми распознающими молекулами.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus, RSCI:*

1. Раев, М. Функционализация поверхности углеродных наночастиц анти-IgE аптамером / М. Раев, М. Кропанева, **П. Храмцов** // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 11, № 2. – С. 207-211. (PubMed, ИФ РИНЦ – 0.234).

2. Comparison of anti-pertussis toxin ELISA and agglutination assays to assess immune responses to pertussis / **P. Khramtsov**, M. Bochkova, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev // *Infectious Diseases*. – 2017. – Т. 49, № 8. – С. 594-600. (WoS/ Scopus, IF - 4, Q1).

3. Dot immunoassay for the simultaneous determination of postvaccination immunity against pertussis, diphtheria, and tetanus / **P. Khramtsov**, M. Bochkova, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2017. – Т. 409. – P. 3831-3842. (WoS/Scopus, IF – 3.8, Q2).

4. Highly stable conjugates of carbon nanoparticles with DNA aptamers / **P. Khramtsov**, M. Kropaneva, T. Kalashnikova, M. Bochkova, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev // *Langmuir*. – 2018. – Т. 34, № 35. – P. 10321-10332. (WoS/ Scopus, IF -3.7, Q1).

5. Разработка иммуносорбента для твёрдофазного ЯМР-анализа / **П.В. Храпцов**, М.Д. Кропанева, М.С. Бочкова, В.П. Тимганова, С.А. Заморина, М.Б. Раев // *Доклады Академии наук*. – 2019. – Т. 484. – С. 69-72. (WoS/ Scopus, IF – N/A, Q4, ИФ РИИЦ – 1.036).

6. Conjugation of carbon coated-iron nanoparticles with biomolecules for NMR-based assay / P. Khramtsov, M. Kropaneva, I. Byzov, A. Minin, A. Mysik, V. Timganova, M. Bochkova, M. Uimin, S. Zamorina, A. Yermakov, M. Rayev // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2019. – Т. 176. – P. 256-264. (WoS/ Scopus, IF – 5.4, Q1).

7. Magnetic nanoclusters coated with albumin, casein, and gelatin: Size tuning, relaxivity, stability, protein corona, and application in nuclear magnetic resonance immunoassay / **P. Khramtsov**, I. Barkina, M. Kropaneva, M. Bochkova, V. Timganova, A. Nechaev, I. Byzov, S. Zamorina, A. Yermakov, M. Rayev // *Nanomaterials*. – 2019. – Т. 9, № 9. – 1345. (WoS/ Scopus, IF – 4.4, Q1)

8. Solid-phase nuclear magnetic resonance immunoassay for the prostate-specific antigen by using protein-coated magnetic nanoparticles / **P. Khramtsov**, M. Kropaneva, M. Bochkova, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev // *Microchimica Acta*. – 2019. – Т. 186. – P. 1-7. (WoS/ Scopus, IF – 5.3, Q1)

9. Measuring the concentration of protein nanoparticles synthesized by desolvation method: Comparison of Bradford assay, BCA assay, hydrolysis/UV spectroscopy and gravimetric analysis / **P. Khramtsov**, T. Kalashnikova, M. Bochkova, M. Kropaneva, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – № 599. – 120422. (WoS/ Scopus, IF – 5.3, Q1).

10. Modified desolvation method enables simple one-step synthesis of gelatin nanoparticles from different gelatin types with any bloom values / **P. Khramtsov**, M. Bochkova, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev, O. Burdina, S. Lazarev, A. Novokshonova, D. Kiselkov, A. Minin // *Pharmaceutics*. – 2021. – Т. 13, № 10. – 1537 (WoS/ Scopus, IF – 4.9, Q1).

11. Nuclear magnetic resonance immunoassay of tetanus antibodies based on the displacement of magnetic nanoparticles / **P. Khramtsov**, M. Kropaneva, M. Bochkova, D. Kiselkov, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2021. –Т. 413, № 5. – P. 1461-1471. (WoS/ Scopus, IF – 3.8, Q2).

12. Albumin nanoparticles loaded with hemin as peroxidase mimics for immunoassay / P. Khramtsov, M. Bochkova, V. Timganova, D. Kiselkov, S. Zamorina, M. Rayev // *ChemistrySelect*. – 2022. – Т. 7, № 3. – e202103892. (WoS/ Scopus, IF – 1.9, Q3; БАК, K1).

13. Prussian blue nanozymes with enhanced catalytic activity: size tuning and application in ELISA-like immunoassay / P. Khramtsov, M. Kropaneva, A. Minin, M. Bochkova,

V. Timganova, A. Maximov, A. Puzik, S. Zamorina, M. Rayev // *Nanomaterials*. – 2022. – Т. 12, № 10. – 1630. (WoS/ Scopus, IF – 4.4, Q1; ВАК, К1).

14. Synthesis and application of albumin nanoparticles loaded with prussian blue nanozymes / **P. Khramtsov**, M. Kropaneva, M. Bochkova, V. Timganova, D. Kiselkov, S. Zamorina, M. Rayev // *Colloids and Interfaces*. – 2022. – Т. 6, № 2. – 29. (WoS/ Scopus, IF – 2.5, Q2; ВАК, К1).

15. Разработка модельного иммунофильтрационного анализа с использованием конъюгата на основе пероксидазы хрена / М. Кропанева, **П. Храмцов**, М. Бочкова, М. Раев // *Российский иммунологический журнал*. – 2023. – Т. 26, № 3. – С. 313-320. (Scopus, IF – N/A, Q4; ИФ РИНЦ – 0.229, К2).

#### *Патенты:*

16. Патент № 2691753 РФ. Магнитная система для спектроскопии ядерного магнитного резонанса / авторы: Мысик А.А., Бызов И.В., Уймин М.А., Ермаков А.Е., Раев М.Б., **Храмцов П.В.**; патентообладатели: ФГБУН Институт физики металлов имени М.Н. Михеева УрО РАН (ИФМ УрО РАН) (RU). ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН (ПФИЦ УрО РАН) (RU); Дата подачи заявки: 2018.08.17 // опубл. Бюл. 2019. № 10.

17. Патент № 2684325 РФ. Способ получения конъюгата на основе магнитных металл - углеродных наночастиц, пригодного для диагностических и аналитических целей, с использованием ЯМР - релаксометрии в качестве метода детекции / авторы: Раев М.Б., Кропанева М.Д., **Храмцов П.В.**, Бочкова М.С., Тимганова В.П., Заморина С.А.; патентообладатель: ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН (ПФИЦ УрО РАН) (RU); Дата подачи заявки: 2018.05.03 // опубл. Бюл. 2019. № 10.

18. Патент № 2743426 РФ. Способ определения биологических макромолекул на основе ЯМР-релаксометрии / авторы: Раев М.Б., Кропанева М.Д., **Храмцов П.В.**, Бочкова М.С., Тимганова В.П., Заморина С.А.; патентообладатель: ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН (ПФИЦ УрО РАН) (RU); Дата подачи заявки: 2020.03.26 // опубл. Бюл. 2021. № 5.

19. Патент № 2751885 РФ. Способ синтеза желатиновых наночастиц / автор: **Храмцов П.В.**; патентообладатель: Храмцов П.В.; Дата подачи заявки: 2020.07.23 // опубл. Бюл. 2021. № 20.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Би-БСА	– биотинилированный бычий сывороточный альбумин
БСА	– бычий сывороточный альбумин
БХК	– бицинхониновая кислота
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДРС	– динамическое светорассеяние
ФБ	– забуференный фосфатами физраствор
ФБТ	– забуференный фосфатами физраствор с твином-20
ИП	– индекс полидисперсности
ИФА	– иммуноферментный анализ
ИХА	– иммунохроматография

KB	– коэффициент вариации
ME	– международные единицы
МКА	– моноклональные антитела
ОП	– оптическая плотность
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПХ	– пероксидаза хрена
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПЭМ	– просвечивающая электронная микроскопия
Стр	– стрептавидин
СЭМ	– сканирующая электронная микроскопия
ТГА	– термогравиметрический анализ
ТМБ	– тетраметилбензидин
ЧСА	– человеческий сывороточный альбумин
ЯМР	– ядерно-магнитный резонанс
Dh	– гидродинамический диаметр
FITC	– флуоресцеин изотиоционат
tIgG	– противостолбнячные иммуноглобулины G

Храмцов Павел Викторович

**ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ С БЕЛКОВЫМ ПОКРЫТИЕМ В  
КАЧЕСТВЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ  
ИММУНОАНАЛИЗА**

3.2.7. Иммунология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук