

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения
Российской академии наук
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

На правах рукописи

Храмцов Павел Викторович

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

3.2.7. Иммунология

Диссертация

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант:

Раев Михаил Борисович,

доктор биологических наук, доцент

Пермь – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 16 |
| 1.1 Наноматериалы в иммунодиагностике: понятие о наноматериалах | 16 |
| 1.2 Многообразие наночастиц, использующихся в иммуноанализах | 19 |
| 1.3 Колориметрические иммуноанализы | 20 |
| 1.4 ЯМР-иммуноанализы на основе магнитных наночастиц | 27 |
| 1.5 Наночастицы в иммунотерапии и иммунодиагностике: примеры коммерциализации | 30 |
| 1.6 Свойства и особенности альбумина, желатина и казеина | 34 |
| 1.7 Применение использование белковых молекул для синтеза и стабилизации наноматериалов..... | 38 |
| 1.8 Синтез белковых наночастиц методом десольватации..... | 40 |
| 1.9 Применение наночастиц, синтезированных методом десольватации в <i>in</i> <i>vitro</i> диагностике | 43 |
| 1.10 Метод динамического рассеяния света..... | 46 |
| 1.11 Оценка морфологии, кристаллической структуры и элементного состава наночастиц | 48 |
| 1.12 Измерение удельной поверхности наночастиц..... | 50 |
| 1.13 Перспективы разработки и применения диагностических реагентов на основе белковых наночастиц | 51 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 54 |
| 2.1 Синтез диагностических реагентов для ЯМР-иммуноанализа | 54 |
| 2.2 Синтез диагностических реагентов на основе белковых наночастиц..... | 62 |
| 2.3 Синтез диагностических реагентов на основе белковых наночастиц, нагруженных гемином | 74 |
| 2.4 Синтез диагностических реагентов на основе белковых наночастиц, нагруженных берлинской лазурью..... | 79 |
| 2.5 Синтез диагностических реагентов на основе нанозимов «искусственная пероксидаза» | 85 |

| | |
|--|-----|
| ГЛАВА 3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ЯМР-ИММУНОАНАЛИЗА НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ, ПОКРЫТЫХ РАЗЛИЧНЫМИ БЕЛКАМИ..... | 96 |
| 3.1 Оптимизация иммунодиагностикумов на основе магнитных наночастиц | 96 |
| 3.2 ЯМР-иммуноанализ противостолбнячных антител | 118 |
| ГЛАВА 4. НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА БЕЛКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ | 126 |
| 4.1 Технологические сложности, возникающие при получении препаратов белковых наночастиц..... | 127 |
| 4.2 Воспроизводимость метода десольватации..... | 132 |
| 4.3 Характеризация белковых наночастиц, синтезированных методом десольватации | 137 |
| 4.4 Стандартизация препаратов белковых наночастиц: сравнение оценки методов определения их концентрации..... | 145 |
| 4.5 Оптимизация синтеза желатиновых наночастиц методом десольватации | 162 |
| 4.6 Синтез наночастиц из различных желатинов в масштабе сотен миллиграммов..... | 173 |
| 4.7 Контроль качества препаратов желатиновых наночастиц..... | 180 |
| 4.8 Инкапсулирование модельной флуоресцентной метки в желатиновые наночастицы..... | 184 |
| 4.9 Стерилизация наночастиц желатина | 187 |
| 4.10 Влияние наночастиц желатина на жизнеспособность мононуклеарных клеток периферической крови | 191 |
| ГЛАВА 5. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ ИММУНОАНАЛИЗ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ ПОМОЩИ АЛЬБУМИНОВЫХ НАНОЧАСТИЦ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕМИН..... | 195 |
| 5.1 Оптимизация диагностикумов на основе наночастиц БСА/гемин | 197 |
| 5.2 Колориметрический иммуноанализ проивостолбнячных антител при помощи наночастиц БСА/гемин | 206 |
| ГЛАВА 6. ДИАГНОСТИКУМЫ НА ОСНОВЕ НАНОЗИМОВ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В АЛЬБУМИНОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ | 213 |
| 6.1 Получение дианостикумов на основе альбуминовых наночастиц, содержащих берлинскую лазурь | 216 |

| | |
|---|-----|
| 6.2 Колориметрический иммуноанализ простатспецифического антигена.. | 222 |
| ГЛАВА 7. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ «ИСКУССТВЕННАЯ ПЕРОКСИДАЗА», МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЖЕЛАТИНОМ..... | 230 |
| 7.1 Разработка и оптимизация дианостикумов на основе наночастиц берлинской лазури, покрытых желатином | 232 |
| 7.2 Применение наночастиц берлинской лазури, покрытых желатином, в иммуноанализе противостолбнячных антител и ПСА..... | 246 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 252 |
| ВЫВОДЫ | 258 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... | 260 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 261 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 262 |

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 [150].

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 иммуноферментный 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 [80].

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) [322]. 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 [144]

3) Гетерогенность: выделенный фермент представляет собой смесь изоформ и может иметь разную степень гликозилирования. Гетерогенность фермента мало предсказуема и зависит от условий выращивания хрена [182, 322].

4) Чувствительность фермента к воздействию физико-химических факторов ограничивает спектр условий их хранения и применений [42, 220]

5) Деактивация в присутствии некоторых реагентов, например, широко используемого в биотехнологии консерванта азиды натрия [263], а также тяжелых металлов, в частности меди, свинца, кадмия, никеля и других [261, 257].

Несмотря на то, что с момента создания ИФА прошло более 50-ти 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 [302].

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 [180].

Среди многочисленных полимеров естественного и искусственного происхождения, белковые молекулы обладают некоторыми особенностями, которые делают их перспективными для модификации поверхности наночастиц [68]. 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 так далее) 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 диагностиком 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 диагностикомов подтверждали путем использования различных контрольных образцов, включая контрольные диагностикомы, 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 конференции с международным участием: Техническая химия. От теории к практике (Пермь, 2019), Материалы XI Всероссийского конгресса 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. 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 ПГНИУ к.х.н. Александром Сергеевичем Максимовым и сотрудником лаборатории биогеохимии техногенных ландшафтов Естественнонаучного 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, характеристики магнитных наночастиц и желатиновых наночастиц выполнены сотрудниками лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии 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, г. Пермь, 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 диагностикумов 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 диагностикумы 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 диагностикумов 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 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, получено 4 патента РФ.

Объем и структура работы. Работа изложена на 303 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, глав с результатами собственных исследований, обсуждения, выводов, списка сокращений и списка литературы и приложений. Список литературы включает 190 источников. Работа проиллюстрирована 70 рисунками и 11 таблицами.

ГЛАВА 1 - ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 – Наноматериалы в иммунодиагностике: понятие о наноматериалах

При уменьшении частиц материалов до нанометровых размеров у них появляются новые, зачастую уникальные свойства. Интерес к наноразмерным частицам и осознание огромных перспектив их практического применения привел к появлению новой области науки – нанотехнологии. Согласно ГОСТ ISO/TS 80004-1—2017 под нанотехнологией понимают «Применение научных знаний для изучения, проектирования, производства и управления строением материальных объектов преимущественно в нанодиапазоне с использованием зависящих от размера и структуры свойств этих объектов или присущих им явлений, которые могут отсутствовать у отдельных атомов и молекул или аналогичных макрообъектов» [1]. В том же стандарте задаются границы нанодиапазона: от 1 до 100 нм. Соответственно, к нанобъектам относятся дискретные элементы с линейными размерами в границах нанодиапазона хотя бы в одном из трех измерений. Аналогичное определение наноматериалам дают и многие другие организации, занимающиеся разработкой национальных и международных стандартов [16].

В этой работе мы, однако, будем понимать под наночастицами частицы, имеющие размеры в диапазоне от 1 до 1000 нм. Использование таких, менее строгих, рамок обусловлено рядом причин. Во-первых, препараты наночастиц обычно содержат частицы разного размера. Более того, получение однородных по размеру наночастиц обычно требует либо особой процедуры синтеза [18], либо их пост-синтетического фракционирования [289]. В связи с этим в подавляющем большинстве случаев, корректно говорить не о конкретном размере, а о распределении по размерам. Распределение может существенно отличаться от нормального. В связи с этим возникает целый ряд вопросов: можно ли охарактеризовать размер наночастиц какой-то одной величиной (например,

среднее или медиана)? Можно ли относить к наноматериалам препараты, которые содержат частицы как менее, так и более 100 нм [238]?

Во-вторых, существующие методы измерения размеров наночастиц могут давать отличающиеся результаты, что обусловлено как особенностями физических принципов, лежащих в их основе, так и особенностями подготовки образцов перед анализом [37, 50, 188]. В последующих разделах мы подробно рассмотрим характерные черты некоторых методов измерения размеров наночастиц. Здесь же мы приведем показательный пример из наших собственных исследований [283]. Мы оценивали размеры углеродных наночастиц, покрытых белком, методом динамического светорассеяния (ДРС) и атомно-силовой микроскопией (АСМ). Эти методы относятся к числу наиболее популярных и общепринятых [37]. Микроскопия показала, что средний размер наночастиц составляет 98 нм, причем в препарате присутствовали частицы от 56 до 142 нм. Согласно ДРС, средний размер наночастиц составлял 139 нм, а распределение по размерам было еще шире. Таким образом, согласно одному из методов наши частицы можно назвать наночастицами, а согласно другому среднее значение их размера лежало вне диапазона 1–100 нм, а, значит, наночастицами они не являются.

В-третьих, распределение наночастиц по размерам в существенной степени зависит от условий, в которых они находятся. Так, при лиофильной сушке стабильной суспензии наночастиц они могут обратимо или необратимо агрегировать в зависимости от наличия и природы стабилизаторов. При нахождении в виде суспензии размеры наночастиц могут существенно зависеть от природы растворителя, рН, ионной силы, присутствия различных молекул [274, 50]. При этом в одних и тех же условиях разные наночастицы могут иметь противоположную коллоидную стабильность, что усложняет стандартизацию оценки их размеров. Многие методы не позволяют с достаточной уверенностью отличать неправильные по форме наночастицы от аггломератов мелких наночастиц [238]. Кроме того, при контакте с физиологическими жидкостями, культуральными средами, растворами биомолекул происходит адсорбция

содержащихся в них малых и макромолекул на поверхности наночастиц, что приводит к увеличению их гидродинамического диаметра или агрегации [50, 68]. Так, при контакте с сывороткой крови или блокирующим раствором размер наночастиц может увеличиваться непосредственно ходе иммуноанализа. Эти и другие факторы приводят к «размыванию» понятия о размере частиц, поскольку размер является не только свойством самих наночастиц, но и производным от условий, в которых проводятся измерения.

Все эти факторы привели к тому, что в 2011 г. Европейская Комиссия утвердила определение термина «наноматериал» как материала, в котором частицы с размером от 1 до 100 нм могут составлять от 1 до 50% от общего количества частиц в образце [238]. Сам факт внедрения столь гибкого определения подчеркивает ограниченную применимость привычного диапазона 1-100 нм. Это определение, однако, не решает многих методических проблем, поскольку, как мы уже отмечали выше, оценка распределения частиц по размерам зависит от метода и условий измерения [238]. В связи с этим мы будем называть наночастицами частицы размером от 1 до 1000 нм. По сути, это в полной мере соответствует содержанию современной международной научной литературы. Просматривая многочисленные статьи, посвященные наноматериалам, мы отмечаем, что авторы называют наноразмерными частицы диаметром 200, 300, 400 нм и более, не ограничивая себя рамками «1-100 нм» [50, 115, 126, 160,]. В своем недавнем руководстве для промышленных производителей американский регулятор FDA также назвал наноматериалами частицы размером до 1 мкм [70]. На наш взгляд это связано с тем, что для многих материалов нет четкой границы изменения свойств при превышении порога в 100 нм. Кроме того, не ясно, как называть наночастицы от 100 до 1000 нм. Субмикрочастицы? Микрочастицы? В конечном счёте, строгое определение границ нанодиапазона важно в первую очередь для регулирующих органов, оценивающих безопасность и практическую применимость коммерческих продуктов, состоящих из или содержащих наноматериалы. Для научных исследований подобная строгость является, на наш

взгляд, излишней, если тому нет причин (например, если речь идет о разработке или исследовании продукта, вот-вот ожидающего сертификации).

1.2 – Многообразие наночастиц, использующихся в иммуноанализах

Коллоидные частицы использовались в качестве меток в иммуноанализе задолго до старта Национальной Нанотехнологической Инициативы США в 2000 г. [107]. Главным образом, это были цветные метки для твердофазных и гомогенных колориметрических анализов: частицы из неметаллов и металлов (прежде всего, золотые) [133], латекс, коллоидный уголь [344], частицы красителей [107]. В некоторых случаях использовались другие режимы детекции, например, элементный анализ [199] или микроскопическое обнаружение наночастиц [124]. После 2000 г. начался взрывной рост количества публикаций, посвященных наночастицам: от 5000 в 2000 г. до 329000 в 2022 г. (Рисунок 1.1). За этот период существенно увеличилось структурное разнообразие наноматериалов, используемых в иммуноанализах. Появилось множество новых способов их детекции, основанных на многочисленных магнитных, оптических, электрохимических и других свойствах наночастиц, а также применении недоступного ранее оборудования. Многообразие новых методов иммуноанализа на основе наноматериалов столь велико, что полная классификация была бы слишком громоздка. Поэтому, далее мы уделим внимание лишь тем видам наночастиц, которые использованы в нашей работе.

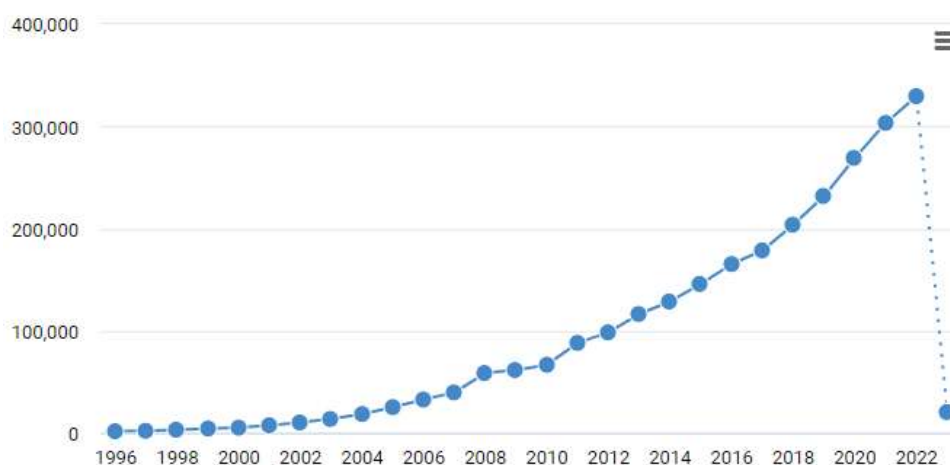


Рисунок 1.1 – Количество публикаций по запросу «nanoparticles» с 1996 по 2023 гг. (по данным dimensions.ai)

1.3 – Колориметрические иммуноанализы

В колориметрических иммуноанализах наночастицы играют роль цветных меток либо генерируют цветной сигнал, используя свои каталитические свойства.

Наиболее значимым типом анализов с окрашенными частицами является иммунохроматография. Подавляющее большинство иммунохроматографических тестов используют в качестве меток наночастицы золота или латекса [95]. Золотые наночастицы отличаются высокой интенсивностью окраски, хорошей стабильностью, гидрофильностью, инертностью. Процесс синтеза золотых наночастиц тщательно исследован, вследствие чего разработаны многочисленные протоколы, которые позволяют получить наночастицы требуемого размера. Весьма прост процесс конъюгирования золотых наночастиц с распознающими молекулами (в первую очередь моноклональными антителами): он заключается в адсорбции антител на поверхности наночастиц, за которой следует блокирование незанятой антителами поверхности наночастиц при помощи инертного белка, обычно бычьего сывороточного альбумина (БСА) [164].

Помимо золотых наночастиц в коммерческих тестах используются частицы латекса [285]. Хорошо известным примером их применения является тест на беременность Clearblue™. Преимуществом латексных наночастиц является то, на рынке доступны частицы различных диаметров и цветов (Рисунок 1.2), несущие различные функциональные группы, что позволяет ковалентно присоединять к ним распознающие молекулы [232].

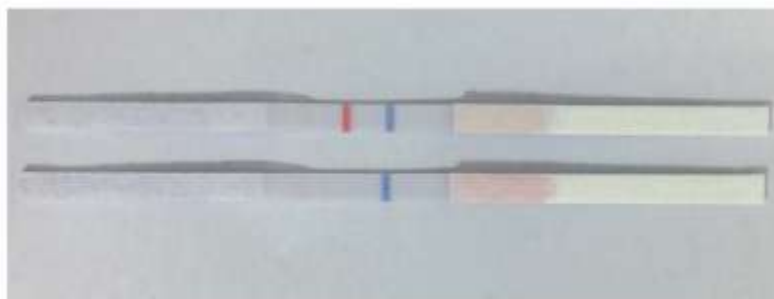


Рисунок 1.2 – Двухцветный иммунохроматографический анализ на бруцеллёз с использованием красных и синих латексных наночастиц. Воспроизведено с изменениями из [404] с разрешения Королевского химического общества.

Углеродные наночастицы также используются в качестве меток в иммунохроматографии (Рисунок 1.3). В ряде исследований показано, что они обеспечивают более низкие пределы детекции в сравнении с золотыми наночастицами [211, 278, 397], однако, есть и примеры работ, в которых золотые наночастицы были более эффективны [212]. Недостатки углеродных наночастиц заключаются в их гидрофобности и склонности к агрегации в водных растворах. Эта проблема может быть решена за счет гидрофилизации поверхности углеродных наночастиц бычьим сывороточным альбумином [284]. Как и в случае с золотыми наночастицами, наиболее популярным способом функционализации углеродных наночастиц является прямая адсорбция моноклональных антител на их поверхности.

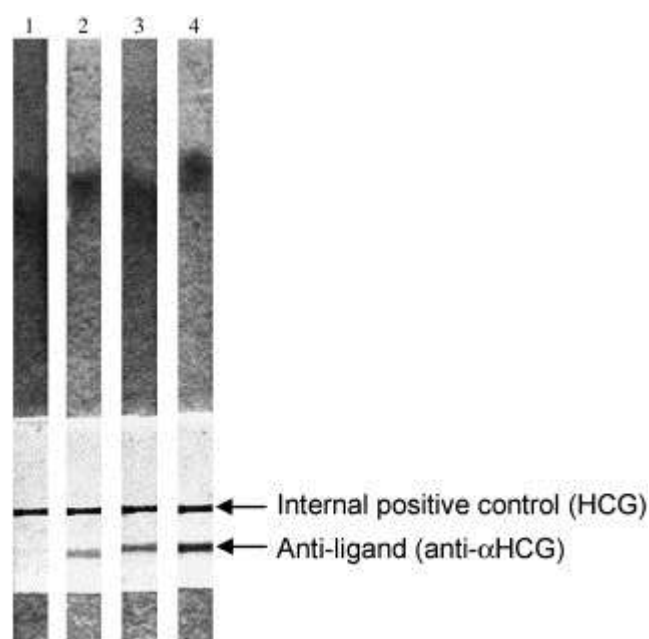


Рисунок 1.3 – Иммунохроматографический анализ хорионического гонадотропина при помощи наночастиц аморфного углерода. Перепечатано из [284] с разрешения Elsevier.

На настоящий момент разработаны многочисленные способы усиления сигнала и улучшения специфичности иммунохроматографических анализов, основанные на различных свойствах наноматериалов [302]. В частности, магнитные наночастицы, конъюгированные с моноклональными антителами

используются для прекоцентрирования аналита. Обычно процедура прекоцентрирования заключается в добавлении магнитных наночастиц к исследуемому образцу. После связывания аналита наночастицы отмывают от образца, разводят в небольшом объеме и наносят на тест-полоску. В этом случае магнитные наночастицы служат одновременно и цветной меткой [31]. Для дополнительного усиления сигнала к магнитным наночастицам добавляют золотые наночастицы, что приводит к усилению окрашивания и формированию агрегатов наночастиц (это возможно при обнаружении поливалентного аналита), которые также имеют более яркую окраску, чем отдельные частицы [286].

Корпускулярная природа наночастиц позволяет использовать их для разработки гомогенных агрегационных иммуноанализов. В первую очередь для этих целей используются золотые наночастицы, для которых процесс агрегации легко регистрируется визуально по изменению цвета суспензии с красного (отдельные наночастицы) на синий (агрегаты наночастиц) [247]. Агрегационные иммуноанализы с использованием микрочастиц и эритроцитов известны с середины XX в. Преимуществом наноматериалов при разработке таких анализов является лучшая стабильность и меньшая мутность их суспензий, что увеличивает чувствительность турбидиметрических измерений. Помимо этого, суспензии наночастиц менее склонны к спонтанной агрегации. В одной из пионерских работ, выполненных под руководством Чедда Миркина (Chad Mirkin) золотые наночастицы, несущие на поверхности олигонуклеотиды, агрегировали в присутствии комплементарной цепи ДНК. При этом цвет суспензии наночастиц менялся с красного на фиолетовый. В дальнейшем аналогичный принцип был адаптирован для количественного обнаружения иммуноглобулинов [80]. С того времени были разработаны неинструментальные гомогенные иммуноанализы, предназначенные для выявления вирусов, в том числе SARS-CoV-2, патогенных бактерий, маркеров воспаления, малых органических молекул. Недостатками такого подхода являются наличие «хук-эффекта» (уменьшение степени агрегации при избытке аналита в образце), а также вероятность неспецифической агрегации

наночастиц при наличии в образце веществ, снижающих их коллоидную стабильность.

Традиционно клиническая лабораторная диагностика полагается главным образом на иммуноферментный анализ (ИФА), когда требуется выявление гормонов, опухолевых маркеров или антител против патогенов. Пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза являются двумя наиболее популярными ферментами, используемыми в коммерческих ИФА-наборах. Тем не менее пероксидаза хрена не лишена недостатков, которые ограничивают спектр ее применений.

По этой причине в настоящее время прилагается много усилий для разработки искусственных аналогов пероксидазы хрена, а также ряда других ферментов, использующихся при создании биосенсоров [80]. Эти исследования проистекают из идеи получения искусственных конструкторов с более высокой стабильностью, более низкой стоимостью и настраиваемыми свойствами, которые могут заменить ферменты, предоставляя больше возможностей производителям сенсоров и тест-систем [60]. Одним из таких конструкторов являются наночастицы, обладающие каталитической ферментоподобной активностью, так называемые нанозимы (от англ. nano+enzyme) [401].

Пероксидазоподобная активность различных железосодержащих молекул и комплексов известна достаточно давно. В частности, такой активностью обладают комплексы гемина и G-квадруплексов ДНК, гемоглобин, свободный гемин и его комплексы с полимерами, атомы Fe^{2+} (реакция Фентона) [140]. Закономерным результатом исследований в области наноматериалов стала демонстрация пероксидазоподобной активности наночастиц Fe_3O_4 в 2007 г. [92]. В этой же работе было показано, что наночастицы оксида железа могут выступить в качестве альтернативы пероксидазе хрена на примере количественных иммуноанализов антител к поверхностному антигену вируса гепатита В и маркера инфаркта миокарда тропонина I. Эта работа, в совокупности с трендом на замену природных молекул и клеток искусственными аналогами [391], стимулировала взрывной рост исследований, посвященных использованию нанозимов в иммуноанализе [392]. Были разработаны каталитические наноконпозиты,

обладающие высокой пероксидазоподобной активностью, превосходящие по своей активности оксиды железа [176]. Более того, новые материалы в прямом сравнении в иммуноанализе показали лучшие результаты, чем пероксидаза хрена. Например, Ni-Pt наночастицы, содержащие одинаковое количество никеля и платины обеспечивали в 300 раз более низкий предел детекции карциоэмбрионального антигена в иммуноферментном анализе в сравнении с пероксидазным конъюгатом. Наночастицы Pt-Sn позволяли снижать предел детекции того же антигена в 400 раз по сравнению с пероксидазой [103]. Помимо планшетных колориметрических иммуноанализов, нанозимы используются и в качестве меток в иммунохроматографии. В этом случае существует возможность усиления цветного сигнала, обусловленного окраской самих наночастиц, путем погружения тест-полоски в субстратный буфер (Рисунок 1.4). Такой способ позволяет существенно снизить пределы детекции анализа, однако усложняет процедуру анализа. Учитывая, что ключевым преимуществом иммунохроматографических тестов является их простота, перспективы нанозимов в этом направлении пока не ясны.

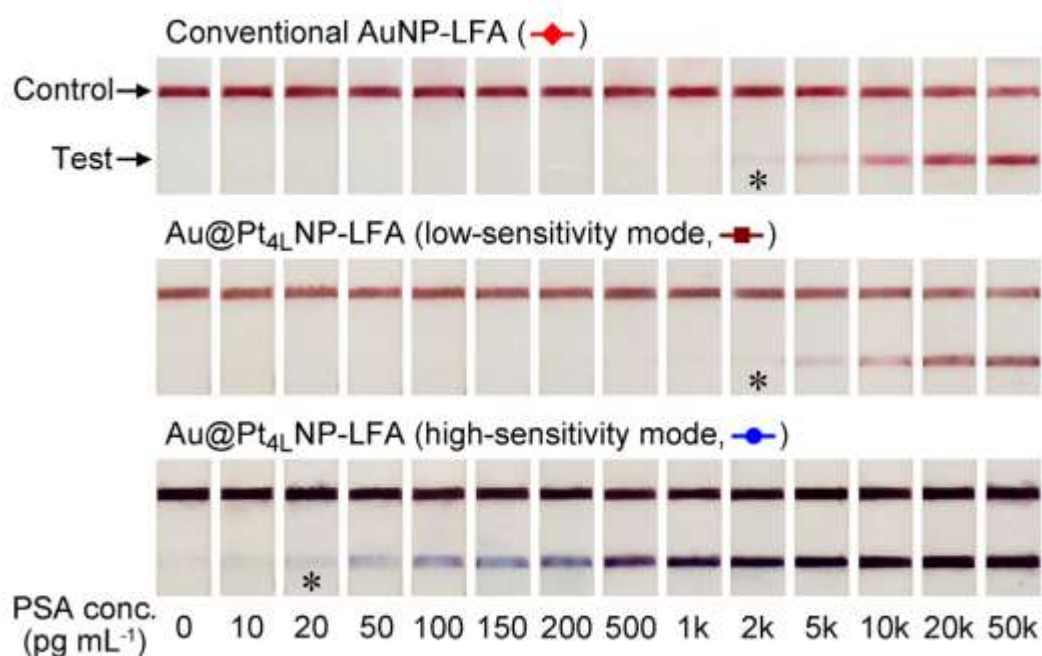


Рисунок 1.4 – Усиление сигнала в иммунохроматографическом анализе при помощи нанозимов – золотых наночастиц, покрытых платиной. В качестве субстрата использован тетраметилбензидин. Перепечатано с изменениями с разрешения из [94]. Copyright 2023 American Chemical Society.

Стоит, однако, отметить, что приведенные результаты сравнения наночастиц и ферментов в иммуноанализе стоит воспринимать с известной долей скепсиса. В первую очередь потому, что для анализа с различными конъюгатами в этих работах используются одни и те же условия, не являющиеся оптимальными для них обоих. Кроме того, настораживают достаточно низкие значения оптических плотностей при высоких концентрациях аналитов. Это опять же свидетельствует о том, что используемые условия являются субоптимальными. Тем не менее, высокая концентрация усилий на получении высокоактивных нанозимов позволяет ожидать, что они со временем превзойдут пероксидазу хрена.

Описанные выше нанозимы на основе благородных металлов не являются дешёвой альтернативой пероксидазе, а их синтез достаточно сложен, требует инкубации многокомпонентных реакционных смесей при повышенных температурах. Однако, высокоэффективные нанозимы можно получать в куда более мягких условиях из дешевых реагентов. Так, в 2018 г. сотрудниками кафедры аналитической химии химического факультета МГУ под руководством профессора Аркадия Аркадьевич Карякина были синтезированы наночастицы берлинской лазури, превосходящие по каталитической активности пероксидазу хрена (сравнивали активность одной молекулы пероксидазы и одной наночастицы) [176]. Берлинская лазурь представляет собой железосодержащее координационное соединение с составом, варьирующим от $AFe^{III}[Fe^{II}(CN)_6] \cdot xH_2O$ (где А это К, Na, или NH_4) до $Fe^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_3 \cdot xH_2O$. Элементарной структурной единицей берлинской лазури является куб, в углах которого расположены разновалентные атомы железа, а ребра образованы $C \equiv N$ группами. Помимо этого, берлинская лазурь может содержать внутри элементарных ячеек различные катионы. При их отсутствии на месте некоторых атомов железа находятся пустоты, дефекты кристаллической решетки. Существуют различные способы синтеза наночастиц берлинской лазури. Наиболее часто для этого используют реакцию солей двух- и трехвалентного железа, например, $FeCl_3$ и $K_4[Fe(CN)_6]$. Авторы статьи [176] показали, что наночастицы, полученные восстановлением

смеси FeCl_3 и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ перекисью водорода, обладают большей каталитической активностью, являясь перспективным аналогом пероксидазы хрена. Авторы назвали эти наночастицы «искусственная пероксидаза».

Стоит отметить, что наночастицы берлинской лазури, синтезированные традиционным способом уже использовались в колориметрических анализа как заменители пероксидазы. Исследователи из Масарикова университета (Брно, Чехия) использовали наночастицы берлинской лазури, покрытые белковой оболочкой, в колориметрическом сэндвич-иммуноанализе человеческого сывороточного альбумина в моче (Рисунок 1.5) [81].

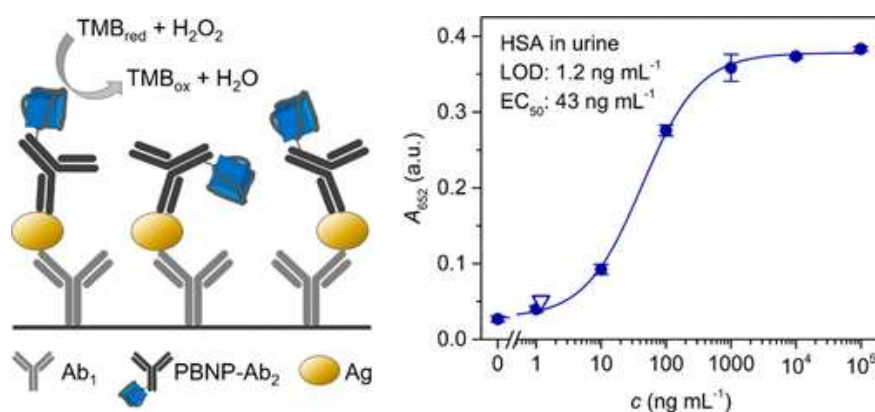


Рисунок 1.5 – Схема сэндвич-анализа человеческого сывороточного альбумина в моче при помощи наночастиц берлинской лазури (слева) и соответствующая калибровочная кривая (справа). Перепечатано с разрешения из [81]. Copyright 2023 American Chemical Society.

Яркий синий цвет, простота и дешевизна синтеза наночастиц берлинской лазури, имеющих размеры несколько десятков нанометров, способствовали их использованию в качестве меток в иммунохроматографическом иммуноанализе. В этом случае возможны варианты детекции без каталитического усиления [81], когда регистрируется синие окрашивание наночастиц в аналитической зоне, или же с усилением, когда полоска погружается в раствор субстрата [341]. На настоящий момент нет примеров использования наночастиц берлинской лазури «искусственная пероксидаза» в колориметрических иммуноанализах. Одной из

задач диссертационного исследования являлось применение этих наночастиц в качестве альтернативы пероксидазе хрена.

1.4 – ЯМР-иммуноанализы на основе магнитных наночастиц

Магнитные наночастицы находят применение во многих областях биомедицины, включая иммуноаналитику, доставку лекарств, тканевую инженерию, медицинскую визуализацию и многие другие [80]. Выделение клеток, белков, ДНК и других анализируемых веществ с помощью магнитных наночастиц из таких сложных матриц, как цельная кровь, сыворотка или плазма крови, моча, экстракты тканей, пищевые продукты и ликвор, является мощным инструментом биосенсорики, способствующим повышению аналитической чувствительности и специфичности [143]. Магнитные наночастицы применяются в оптических, электрохимических и пьезоэлектрических биосенсорах, а также в колориметрических экспресс-тестах, выступая в качестве меток или их (например, ферментов) носителей [291, 335].

Существует множество режимов детекции с использованием магнитных свойств наноматериалов [4], однако до реального применения дошло ограниченное число методов. На настоящий момент коммерциализированы сенсоры на основе ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), предназначенные для выявления сепсиса и патогенных микроорганизмов.

Принцип ЯМР-иммуноанализов заключается в следующем. При помещении протонов в однородное магнитное поле их магнитные моменты ориентируются сонаправленно или противоположно направлению магнитному полю. При воздействии радиочастотного импульса магнитные моменты протонов ориентируются хаотично, а после прекращения воздействия импульса возвращаются к исходному состоянию за некоторое время, именуемое временем релаксации протонов (T_2). Время релаксации протонов может быть измерено при помощи специального прибора – ЯМР-релаксометра. Если вблизи протонов находятся магнитные наночастицы, то это может повлиять на время релаксации протонов. Направленность влияния (увеличение или уменьшение T_2) зависит от размеров и природы наночастиц. Этот же физический феномен лежит в основе

магнитно-резонансной томографии (МРТ), в которой магнитные наночастицы могут использоваться как ЯМР-контрасты [86, 203]. Подробное описание физических принципов, лежащих в основе ЯМР-сенсоров, можно найти в обзорах [4, 120, 307]. Способность наночастиц снижать T_2 называется r_2 релаксивностью. Чем выше r_2 , тем ниже предел детекции ЯМР-иммуноанализа [307].

Существует два основных подхода к ЯМР-анализу *in vitro*. Первый - это переключение магнитной релаксации, которое основано на агрегации магнитных наночастиц, вызванной добавлением анализируемого вещества (Рисунок 1.6). Формирование или разрушение агрегатов наночастиц под действием аналита приводит к изменению T_2 [173].

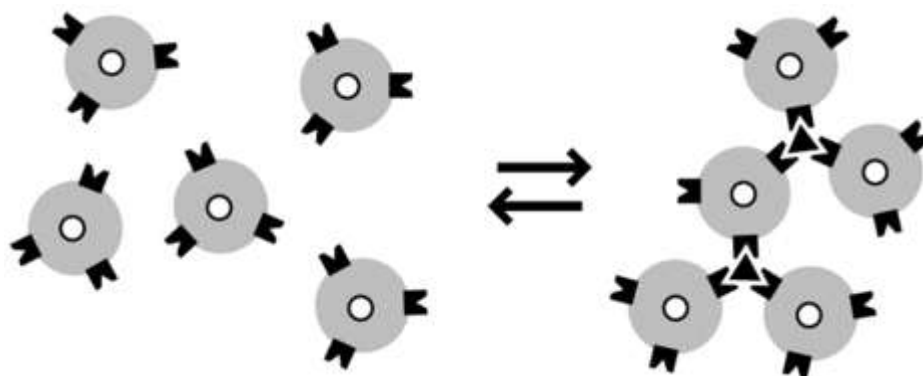


Рисунок 1.6 – Общий принцип анализов, основанных на переключении магнитной релаксации. Добавление аналита приводит к формированию или разрушению агрегатов магнитных частиц. В зависимости от размера частиц (микро- или наночастицы) происходит снижение или увеличение T_2 (перепечатано с изменениями из [173]).

Второй подход основан на связывании магнитных наночастиц с мишенью и удалении несвязанных частиц. В этом случае время релаксации зависит от количества наночастиц в образце; это число пропорционально концентрации анализируемого вещества. Такие сенсоры в основном основаны на микрофлюидных технологиях: после добавления аналита к суспензии наночастиц их смесь пропускают через мембрану. На мембране застревают агрегаты наночастиц, образовавшиеся под действием аналита, а отдельные наночастицы проходят сквозь нее. После этого в области мембраны производят замер T_2 ,

которое зависит от количества задержанных мембраной магнитных агрегатов [194]. Такой анализ может быть реализован и в планшетном варианте. Вместо мембраны фиксация аналита происходит на поверхности лунки планшета. Не связавшиеся с аналитом наночастицы удаляют, а связавшиеся отрывают от стенок лунки путем изменения рН или другим способом. После этого в каждой лунке измеряют T_2 , которое зависит от количества связавшихся с аналитом магнитных наночастиц, а, значит, и от концентрации аналита. Мы использовали (Рисунок 1.7) такой метод анализа для количественного определения противостолбнячных антител [167]. Недавно аналогичный подход был применен для выявления *Salmonella enterica* в свинине [66]

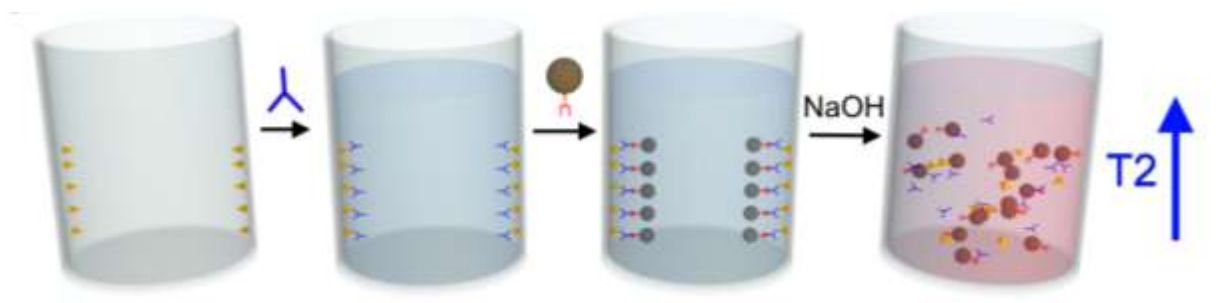


Рисунок 1.7 – Принцип обнаружения противостолбнячных антител при помощи магнитных наночастиц методом ЯМР-анализа. Материал из: “Khrantsov et al. Nuclear magnetic resonance immunoassay of tetanus antibodies based on the displacement of magnetic nanoparticles, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, опубликовано в 2021, издатель - SpringerNature” [167].

ЯМР-иммуноанализы используются для оценки безопасности пищевых продуктов, диагностика сепсиса, нарушений гемостаза и инфекционных заболеваний, а также для обнаружения внеклеточных везикул, онкомаркеров, ферментов и ионов [4, 87, 229]. Несмотря на большой прогресс в области разработки магнитных иммуноанализов, задачи по улучшению стабильности, релаксивности и биосовместимости магнитных нанодиагностикомов не теряют своей актуальности [375, 398, 402].

В ходе выполнения этой работы мы разрабатывали диагностические реагенты на основе магнитных наночастиц с особой структурой: железное ядро-

углеродная оболочка. Это частицы, обладающие большой r_2 релаксивностью, т.е. способностью изменять T2 и обеспечивать низкие пределы детекции аналитов. Эти частицы, однако, крайне нестабильны в водных растворах из-за своей гидрофобной углеродной поверхности. Нашей задачей было модифицировать поверхность этих наночастиц белком для придания им гидрофильности и коллоидной стабильности, а далее конъюгировать их с различными распознающими молекулами.

1.5 – Наночастицы в иммунотерапии и иммунодиагностике: примеры коммерциализации

Размер рынка наноматериалов медицинского назначения составит порядка 261 млрд. долларов США к 2023 г. [3] На данный момент в области биомедицины известно более 1100 продуктов на основе наноматериалов. Если говорить о лекарствах на основе наночастиц, то по состоянию на 2022 г. коммерчески доступны 100 нанолекарств, еще 563 находятся на различных стадиях клинических исследований [305] Разработаны нанопрепараты для лечения заболеваний нервной системы, психических заболеваний, заболеваний крови, эндокринных и метаболических заболеваний, иммунологических заболеваний, воспалений, сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний глаз, кожных заболеваний и т.д. Большинство из одобренных для клинического применения лекарств представляют собой биополимерные наноконструкты (белковые частицы и конъюгаты, липосомы и т.д.), содержащие лекарственное средство. Основные положительные эффекты от использования наноразмерных препаратов это меньшая токсичность, улучшенная стабильность или биодоступность лекарственного средства, а также настройка длительности его циркуляции в кровотоке [3]. С 2016 г. были одобрены для клинического применения 15 препаратов. В первую очередь это системы доставки на основе липосом и липидных кристаллов (включая РНК-вакцины для профилактики COVID-19), и белки, модифицированные полимерами. В 2019 г. был одобрен радиосенсибилизирующий препарат NBTXR3/Hensify на основе неограниченных наночастиц (оксид гафния). На различных стадиях клинических испытаний

находятся белковые, липидные, металлические наночастицы, а также липосомы. Помимо них, тестируются лекарственные и терапевтические средства на основе кремниевых, углеродных наноматериалов, квантовых точек, а также композитов, включающих перечисленные материалы [137, 148, 252].

Среди коммерческих иммуноанализов, использующих наночастицы, доминирующее положение занимают иммунохроматографические тесты на основе золотых меток [111]. Помимо тест-систем на рынке доступен широкий спектр золотых наноматериалов для решения исследовательских задач и разработки новых коммерческих тест-систем. Фирма Nanoprobe выпускает метки на основе золотых наночастиц под наименованием Nanogold, которые используются для визуализации молекул при помощи просвечивающей электронной микроскопии, в иммуноблоттинге для идентификации рекомбинантных белков, а также в качестве меток при рентгенографии.

Помимо традиционных колориметрических тестов доступны для приобретения и диагностические системы, использующие уникальные физико-химические свойства наночастиц. Так, американской компанией T2 Biosystems разработана платформа (Рисунок 1.8) для диагностики бактериальных инфекций, кандидозов, а также короновиральной инфекции [184, 389]. В основе метода лежит принцип T2-релаксометрии с использованием магнитных наночастиц в качестве меток. Анализ основан на амплификации бактериальной ДНК и последующей детекции ампликонов при помощи магнитных наночастиц. При связывании наночастиц с ампликонами происходит изменение T2, которое и измеряет прибор. В образцы добавляется внутренний положительный контроль. Результат теста валиден лишь в случае успешной амплификации этого контрольного ДНК-конструкта. Здесь стоит упомянуть и турбидиметрические иммуноанализы с использованием наночастиц от фирмы Gentian для диагностики заболеваний почек, воспаления, вирусных инфекций и т.д.



Рисунок 1.8 – Настольный прибор для ЯМР-анализа от фирмы T2 Biosystems (перепечатано с изменениями из [389]).

Представлены на рынке и диагностические платформы, в которых используются одновременно несколько наноматериалов. Прекрасным примером такой платформы является система быстрой детекции бактерий в смывах с поверхностей на основе поверхностно-усиленной рамановской спектроскопии от компании Certus. Тест основан на образовании иммунного сэндвич-комплекса бактерий с магнитными микрочастицами и золотыми наночастицами, мечеными моноклональными антителами. Реакция происходит в герметично закрытой пробирке, куда вносится образец, диагностические реагенты и обогащающая культуральная среда. Магнитные частицы необходимы для концентрирования иммунных комплексов на одном из концов пробирки, золотые наночастицы генерируют аналитический сигнал. В ходе инкубации каждые 10-30 минут магнитные частицы притягиваются к одному из концов пробирки, далее происходит регистрация сигнала, после чего при помощи магнитного поля магнитные частицы возвращаются в культуральную среду. Золотые частицы не способны притягиваться магнитом, поэтому интенсивность сигнала зависит от количества золотых частиц, связанных с магнитными частицами, которое в свою очередь прямо пропорционально концентрации бактерий в среде. С течением

времени происходит размножение бактерий в культуральной среде. Новые бактерии связываются с магнитными и золотыми частицами, формируя все больше новых комплексов, что приводит к постепенному нарастанию интенсивности сигнала. Таким образом, метод дает возможность обнаруживать очень малые концентрации бактерий, а также осуществлять мониторинг их размножения в реальном времени [365]. Валидация тест-набора для определения бактерий рода *Listeria* продемонстрировала высокую чувствительность, специфичность и надежность метода [26].

На рынке доступно большое разнообразие флуоресцентных наноматериалов, предназначенных для решения различных задач клинической и экспериментальной иммунологии. Флуоресцентные наночастицы позволяют оценивать функции иммунных клеток, например, фагоцитирующую активность при помощи флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Фирмы Abscam и Poly-DTech производят флуоресцентные наночастицы, содержащие лантаниды (европий, тербий и др.), доступны для быстрой разработки тест-систем, предназначенных для исследовательских целей. CD-Bioparticles предлагает наночастицы для иммуноанализа и биовизуализации, в том числе альбуминовые наночастицы. В Китае был зарегистрирован иммунохроматографический тест-набор, предназначенный для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2, основанный на применении флуоресцентных наночастиц, содержащих европий [351]. Тест основан на гибридизации ДНК-зондов с молекулами вирусной РНК и последующей детекции дуплексов при помощи моноклональных антител S9.6, специфичных к дуплексам ДНК-РНК. Детекция сигнала производится при помощи коммерческого сканера при облучении тест-полоски ультрафиолетом.

Помимо флуоресцентных наночастиц, для исследовательских и коммерческих лабораторий доступен широкий спектр магнитных нано- и микрочастиц для решения задач лабораторной и промышленной биотехнологии и клеточной биологии: выделения нуклеиновых кислот, сортировки и сепарации клеток и органелл, очистки иммуноглобулинов и рекомбинантных белков,

концентрирования и улавливания аналитов в ходе иммуноанализа [318]. Коммерческие микросферы на основе различных биополимеров, таких как коллаген, желатин, альгинат используются в качестве матрикса для увеличения продуктивности адгезивных клеточных культур [318].

Приведенные примеры демонстрируют, что разработки в области наноматериалов не ограничиваются рамками лабораторий. Большое число лекарственных и диагностических препаратов получили одобрение регуляторов и используются в реальном секторе экономики. Конечно, темпы появления новых биомедицинских продуктов, использующих особенности наноматериалов, не всегда соответствуют ожиданиям потребителей, особенно учитывая гигантское количество научных статей по этой тематике. Тем не менее, на наш взгляд те физико-химические свойства наночастиц, которые отличают их от традиционных материалов (каталитические, оптические, магнитные и т.д.), рано или поздно найдут свое применение при создании новых коммерческих продуктов. Это позволит наночастицам если и не вытеснить привычные препараты и диагностикумы, то как минимум успешно конкурировать с ними, особенно в нишевых применениях. Более того, можно ожидать и создание новых продвинутых методов и технологий, которые невозможны без использования наночастиц.

1.6 – Свойства и особенности альбумина, желатина и казеина

Для модификации поверхности наночастиц и синтеза функциональных нанокompозитов используются такие белки как альбумин (бычий или человеческий), желатин, казеин, зеин, глиадин, фиброин и другие [168]. В этом исследовании в ходе функционализации наночастиц мы применяли бычий сывороточный альбумин (БСА), желатин и казеин. Ниже мы рассмотрим те свойства этих белков, которые являются наиболее существенными для нашей работы.

Бычий сывороточный альбумин — это белок с молекулярной массой 66 кДа. Он состоит из трех сходных по структуре доменов. Полипептидная цепочка каждого из доменов уложена главным образом в виде альфа-спиралей. Также, как

и человеческий сывороточный альбумин, БСА содержит 7 карманов, обладающих сродством к жирным кислотам [32]. Это обуславливает роль БСА как белка-переносчика широкого спектра молекул, таких как жирные кислоты, гормоны, билирубин, а также различных лекарственных препаратов [17]. Альбумин участвует в транспорте ионов кальция, магния и цинка, чему способствует наличие сайтов связывания для этих катионов [231]. Жесткость структуры БСА поддерживается семнадцатью дисульфидными мостиками. Помимо этого, в молекуле содержится единственный неспаренный цистеин в 34-ом положении [32]. Молекула БСА содержит многочисленные карбоксильные (40 остатков аспарагина и 59 остатков глутамина), гидроксильные (21 остаток тирозина) и аминогруппы (60 лизиновых остатков), которые, наряду с тиоловыми группами, могут быть использованы для формирования межмолекулярных сшивок и конъюгирования с целевыми молекулами [276]. Среди других особенностей бычьего сывороточного альбумина хорошая растворимость в воде, стабильность в широком диапазоне pH, а также способность выдерживать нагревание до +60 °С в течение нескольких часов [168].

Способность альбумина связывать разнообразные гидрофобные молекулы используется для создания терапевтических и диагностических препаратов. Отметим, что в настоящее время именно в терапии наиболее интенсивно реализуется потенциал альбумина как белка-переносчика. В 2005 г. был одобрен для химиотерапии рака молочной железы препарат Абраксан, представляющий собой наноразмерные альбуминовые частицы, содержащие паклитаксел [25]. Связанный с альбумином паклитаксел продемонстрировал лучшую эффективность и безопасность в сравнении со стандартной терапией (паклитаксел+Кремофор) [237]. Успех препарата стимулировал разработку новых наноразмерных препаратов на основе альбумина, многие из которых находятся на различных стадиях клинических исследований [48].

Желатин – это продукт частичного щелочного или кислотного гидролиза коллагена, который получают из шкур, костей, сухожилий млекопитающих, птиц и рыб. Для производства желатина ткани животных обрабатывают кислотой или

щелочью, а также выдерживают в течение длительного времени при повышенных температурах. При помощи осаждения, фильтрации и центрифугирования получают конечный продукт. На структуру и свойства желатина влияют такие факторы как вид животного и режим экстракции желатина. В зависимости от типа сырья и способа обработки различают желатины типа А (свиной, кислотный гидролиз) и типа Б (говяжий, щелочной гидролиз) [5, 65]. Эти два типа желатина отличаются по аминокислотному составу и изоэлектрической точке. У желатина типа А изоэлектрическая точка находится при рН 6-9, у желатина типа Б – при рН около 5. Важной характеристикой желатина является сила геля, который он образует. Для определения силы геля получают гель из раствора желатина с концентрацией 6,67%. Сила этого геля численно равна массе плунжера, которая достаточна, чтобы продавить гель на 4 мм без его повреждения. В целом, сила геля, который формирует желатин, прямо пропорциональна его молекулярной массе. Силу геля выражают в специальных единицах, Блумах. Сила гелей большинства желатинов находится в пределах от 50 до 320 Блум. Поскольку желатин представляет собой достаточно гетерогенную смесь продуктов белкового гидролиза, именно силу геля, а не молекулярную массу используют в качестве основной характеристики желатина. Стоит отметить, что сила геля зависит не только от размера молекул желатина, но и от их аминокислотного состава.

Свойства рыбьего желатина отличаются от желатина, получаемого из млекопитающих и зависят от места обитания рыбы: как правило, желатин из холодноводных рыб формирует слабые гели, в то время как желатин из рыб, обитающих в теплых водах, ближе по своим свойствам к желатину млекопитающих. Желатин из холодноводных рыб содержит меньше пролина и гидроксипролина [62]. Различная температура гелеобразования определяет ту роль, которую желатин может играть в синтезе функциональных наноматериалов. Так, рыбий желатин может быть использован в качестве стабилизатора суспензий при длительном хранении на холоде без риска образования геля. В то же время применение желатинов из млекопитающих может требовать поддержания

высокой температуры реакционной среды (+30... +40 С) в ходе синтеза и функционализации для предотвращения гелеобразования.

Как уже было сказано выше, свойства желатина зависят от сырья и способа его обработки, т.е. молекулярной массы и аминокислотного состава. Особенностью желатина является высокое содержание глицина, пролина и гидроксипролина (более половины всех аминокислот), среди остальных лидируют по количеству аргинин, аланин, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота [5]. Желатин не содержит триптофана, а также беден метионином, цистеином и тирозином, поскольку боковые цепи этих аминокислот разрушаются при гидролизе [116]. Особенности аминокислотного состава желатина ограничивают использование для оценки его концентрации таких популярных методов, как УФ-спектроскопия и анализ белка по Бредфорду.

Казеин – это белок грудного молока, выполняющий функции транспорта незаменимых аминокислота, кальция, цинка и фосфатов от матери к ребенку [64, 131], биоминерализации. Казеин представлен четырьмя белковыми цепочками: α_{s1} -казеин (23,6 кДа), α_{s2} -казеин (25,3 кДа), β -казеин (23,9 кДа), κ -казеин (19,0 кДа) [30]. Эти полипептидные цепочки существуют как в виде свободных молекул, так и в виде объединений – мицелл размером 50-500 нм. Белковые цепочки казеина образуют мицеллы благодаря склонности к формированию межмолекулярных связей в основе которых лежат гидрофобные и электростатические взаимодействия, а также «минерал-белковые» взаимодействия. Под последними имеются в виду взаимодействия фосфатных групп казеина с наноразмерными включениями фосфата кальция. Казеин относится к группе неструктурированных белков [345], он практически не содержит цистеина [30]. За взаимодействие с фосфатом кальция отвечает регион, обогащенный фосфорилированными аминокислотными остатками [129], в частности тирозином и серином [64]. Изоэлектрическая точка зависит от типа казеина и находится в диапазоне от 4,1 до 5,3 [208]. Будучи гибким амфифильным белком, казеин является отличным стабилизатором суспензий и эмульсий [30].

1.7 – Применение использование белковых молекул для синтеза и стабилизации наноматериалов

Применение альбуминовых нано- и микрокапсул для доставки лекарственных средств было описано в начале 70-х годов. Для формирования частиц использовались обратные мицеллы, а сшивка белковых молекул производилась при помощи нагревания, приводившего к образованию связей между молекулами альбумина [183]. Синтез белковых наночастиц методом десольватации (осаждением белковых частиц плохим растворителем) был впервые описан в середине 70-х годов группой австралийских исследователей: Richard Charles Oppenheim, Jennifer Joy Marty, Peter Speiser и N.F. Stewart. Общая процедура синтеза заключалась в добавлении к раствору белка этанола, изопропилового спирта, сульфата натрия или сульфата аммония, что вызывало осаждение белка в виде микро- и наночастиц. Иногда использовались два десольватирующих агента: один вызывал осаждение белка, второй, менее эффективный, добавляли для уменьшения их диаметра. С того времени были одобрены для *in vivo* диагностики и терапии альбуминовые наночастицы, наноразмерные конъюгаты лекарственных средств и альбумина, в частности Абраксан. На данный момент белковые наночастицы и конъюгаты полимеров, лекарств и белков составляют в сумме 14% от всех нанопрепаратов, включая одобренные для клинического использования и находящиеся на разных стадиях клинических испытаний [305].

Модификация поверхности наночастиц биополимерами улучшает их стабильность в физиологических средах, биосовместимость, а также снижает неспецифическую адсорбцию. Разнообразие белков, используемых для стабилизации наноматериалов, очень велико: альбумины, желатин, казеин, фиброин, ферритин, самособирающиеся белки вирусных капсидов [8, 75, 105, 108, 109, 301, 323]. В нашей работе для модификации поверхности магнитных наночастиц и нанозимов берлинской лазури мы использовали бычий сывороточный альбумин, желатин и казеин. Перечисленные белки были выбраны по следующим причинам:

1) Покрытия из сывороточного альбумина и казеина могут повышать релаксивность r_2 магнитных наночастиц благодаря их высокой гидрофильности и способности удерживать молекулы воды [396, 402]. Желатин обладает сильным сродством к молекулам воды [85]; поэтому мы предположили, что он также может повышать релаксивность магнитных наночастиц.

2) Все исследуемые белки широко используются для получения наноплатформ для доставки лекарств и тераностики из-за их биосовместимости и превосходной стабильности в физиологических растворах [74, 105, 378]. Потенциальные риски воздействия наночастиц на человека до сих пор недостаточно изучены [300]; поэтому важно использовать материалы с низкой токсичностью, даже если они предназначены для применения диагностики *in vitro*.

3) БСА, желатин и казеин широко используются в качестве носителей для флуорофоров, T1-контрастных агентов, ферментов и терапевтических средств [74, 105, 378], поэтому возможна загрузка белковой оболочки наночастиц агентами (флуорохромами, ферментами и т.п.), обеспечивающими мультимодальную детекцию аналита.

4) Альбуминовые покрытия уменьшают неспецифическую адсорбцию сывороточных белков на поверхности наночастиц [8], способствуя уменьшению ложноотрицательных результатов анализов.

5) Бычий сывороточный альбумин, казеин и желатин являются относительно недорогими и широко доступными биополимерами.

Подчеркнем, что белки как покрытия для наноматериалов обладают и некоторыми недостатками: чувствительностью к ряду физико-химических воздействий (нагревание, присутствие некоторых денатурирующих агентов, органических растворителей) и микробной контаминации. Это обуславливает необходимость хранения их при пониженной температуре. Присутствие разнообразных функциональных групп и чувствительность к воздействию органических растворителей ограничивает спектр способов конъюгирования: для химической модификации белков сложно использовать водонерастворимые

линкеры. Использование смешивающихся с водой органических растворителей для разведения таких линкеров, а также добавление линкеров в высоких концентрациях может привести к агрегации белковых молекул. Присутствие на поверхности белковых частиц одновременно карбоксильных, тиоловых, гидроксильных и аминогрупп усложняет использование ряда бифункциональных сшивающих агентов, в частности карбодиимидов, поскольку они могут спровоцировать ковалентную кросс-сшивку соседних наночастиц и образование агрегатов [255]. В большинстве случаев, при синтезе наноматериалов используют белки натурального происхождения, хотя иногда используют и рекомбинантные белковые конструкторы. Использование белков, выделенных из живых организмов, несет в себе ряд рисков, а именно ограниченная доступность сырья, проблемы этического характера, вероятность присутствия в препаратах возбудителей заболеваний животных и человека, вариабельность между партиями и производителями. В этой связи применение синтетических полимеров выглядит более целесообразным. Тем не менее, успешное клиническое применение альбуминовых наночастиц (AbraXane) и микрочастиц, стабилизированных альбумином (Optison), демонстрирует, что коммерциализация нанопрепаратов, содержащих в своей структуре белковые молекулы, вполне возможна.

1.8 – Синтез белковых наночастиц методом десольватации

Метод десольватации основан на добавлении плохого растворителя (ацетон, ацетонитрил, этанол, метанол и т.д.) к раствору белка. При достижении определённой концентрации плохого растворителя, растворимость белка снижается и его молекулы начинают агрегировать, формируя наночастицы. Сформированные наночастицы необходимо стабилизировать, в противном случае при переносе в водный раствор произойдёт их диссоциация. Существует ряд способов стабилизации наночастиц, а именно ковалентная сшивка белковых наночастиц при помощи низкомолекулярных кросс-линкеров, температуры или ферментов, а также стабилизация наночастиц за счет электростатических взаимодействий [115].

Наиболее популярным методом является химическая сшивка, при которой к суспензии наночастиц добавляют низкомолекулярные гомо- или гетеробифункциональные линкеры, например, глутаровый альдегид, формальдегид, ацетальдегид, карбодиимиды, генипин. В ряде случаев используются более сложные и дорогостоящие стимул-чувствительные линкеры. Такой тип сшивающих реагентов позволяет управляемо разрушать наночастицы в заданных условиях (рН, присутствие восстановителей, воздействие излучения и т.д.). Одним из вариантов химической сшивки является использование для синтеза белковых молекул с восстановленными дисульфидными связями. В процессе десольватации тиоловые группы соседних молекул формируют межмолекулярные дисульфидные связи, стабилизирующие наночастицу [115]. Ферменты, способные катализировать образование ковалентных связей между аминокислотами, также используются при синтезе наночастиц. Наиболее яркими примерами являются трансглутаминаза и лакказа. Трансглутаминаза катализирует образование изопептидных связей между первичными аминами аминокислот и карбоксамидными группами глутамина [217]. Лакказа способствует образованию ковалентных связей между молекулами белка, содержащими тирозин, триптофан и цистеин [217].

Химическая сшивка белковых молекул сопряжена с необходимостью использования токсичных веществ, таких как глутаровый альдегид. В связи с этим разработаны альтернативные способы сшивки, основанные как на применении более безопасных (таких как генипин) сшивающих реагентов, так и принципиально иных подходов к стабилизации белковых наночастиц. Одним из таких подходов является покрытие поверхности наночастиц слоем полимера, например, хитозана [206] или окисленного декстрана [210]. Другим способом решения этой проблемы является использование физических методов сшивки, таким как нагревание, радиационное излучение, ультрафиолетовое излучение, а также сшивка за счет электростатических взаимодействий [336]. При термической сшивке наночастицы после десольватации подвергают нагреванию в течение нескольких часов, что приводит к формированию связей различной природы

между белковыми молекулами. Существенную роль при таком типе стабилизации играют роль дисульфидные межмолекулярные связи [166].

Метод десольватации позволяет регулировать размер и выход белковых наночастиц путем изменения условий синтеза. На размер наночастиц влияют множество факторов: исходная концентрация белка, природа плохого растворителя, рН, присутствие солей, скорость добавления плохого растворителя, скорость перемешивания и т.д. [91, 113, 190, 216, 349]. В целом, размеры наночастиц зависят от условий синтеза следующим образом. При удалении рН от изоэлектрической точки размер наночастиц уменьшается. Это связано с тем, что поверхностный заряд белковых молекул увеличивается. Электростатическое отталкивание противостоит агрегации молекул при добавлении плохого растворителя. Добавление солей увеличивает размер частиц, поскольку происходит экранирование поверхностных зарядов белковых молекул. При большей исходной концентрации белка образуются более крупные наночастицы [91]. Увеличение полярности плохого растворителя приводит к увеличению размеров наночастиц [333, 349]. Согласно литературным данным, более быстрое добавление органического растворителя снижает размер наночастиц [91], однако в своих исследованиях мы наблюдали обратную картину.

Наночастицы, получаемые методом десольватации, обладают хорошей коллоидной стабильностью [91]. Кроме того, при необходимости длительного хранения они могут быть лиофильно высушены [57]. Несмотря на применение органических растворителей и токсичных сшивающих агентов, получаемые в итоге наночастицы обладают хорошей биосовместимостью, биodeградируемы, т.е. не представляют опасности для человека и окружающей среды [147]. Это весьма важно ввиду настороженного отношения общества к применению наноматериалов в медицине.

Помимо собственно синтеза белковых наночастиц технология десольватации позволяет инкапсулировать внутрь них различные малые молекулы (включая лекарственные средства), полимеры, биополимеры, наночастицы [163, 196, 258, 359, 363]. Для инкапсулирования достаточно

добавить требуемое вещество к раствору альбумина (для водорастворимых молекул и наночастиц) или растворить его в плохом растворителе. В обоих случаях целевая молекула/частица будет захвачена внутрь наночастицы. Малые молекулы могут со временем выходить из наночастицы в окружающий раствор за счет диффузии. Эта особенность используется для создания систем доставки лекарств на основе белковых наночастиц. При попадании в организм белковые наноконтейнеры обеспечивают медленное выделение лекарственного средства в окружающую среду, в том числе и под действием протеолитических ферментов.

1.9 – Применение наночастиц, синтезированных методом десольватации в *in vitro* диагностике

Метод десольватации наиболее часто используется для синтеза наночастиц, предназначенных для адресной доставки лекарственных средств, биоимаджинга или тераностики. Это связано с низкой токсичностью белковых наночастиц, а также с их способностью инкапсулировать лекарственные средства и различные метки (люминесцентные, магнитные, радиоактивные и т.д.). Функционализация поверхности наночастиц распознающими молекулами, прежде всего моноклональными антителами, увеличивает эффективность доставки наночастиц к клеткам-мишеням. Точно такой же принцип молекулярного распознавания лежит в основе лабораторных иммуноанализов, поэтому неудивительно, что были предприняты попытки (хотя и не столько многочисленные) использовать преимущества белковых наночастиц в области клинической лабораторной диагностики. Ниже мы приведем найденные нами в литературе примеры использования подобных диагностикумов.

Принимая во внимание возможность синтеза наночастиц, состоящих из белковых молекул, логичным способом увеличения чувствительности иммуноанализа является приготовление наночастиц из ферментов, использующихся для генерации сигнала в ИФА, т.е. пероксидазы хрена или щелочной фосфатазы [256]. Эта возможность была реализована в 2005 г., когда Liu с соавт. [213] использовали наночастицы пероксидазы хрена в электрохимическом анализе. В дальнейшем эти наночастицы были использованы

в качестве усилителей сигнала в электрохимическом сэндвич-иммуноанализе альфа-фетопротейна [207].

Иммуноанализ на основе наночастиц пероксидазы хрена применяли для обнаружения альфа-фетопротейна [403]. Поверхность стеклоуглеродного электрода модифицировали наночастицами гексацианоферрата никеля, наночастицами Au/Pt, а также наночастицами пероксидазы хрена. Моноклональные антитела против альфа-фетопротейна служили распознающим элементом сенсора. Чувствительность детекции гормона составила 17 пг/мл, кроме того была показана высокая сходимость результатов, полученных при помощи сенсора и ИФА.

Иммуносенсор карциоэмбрионального антигена, основанный на принципе пьезоэлектрического микровзвешивания был разработан Chi с соавт. [46]. Особенностью метода является использование наночастиц пероксидазы хрена, которые катализируют реакцию образования нерастворимого продукта из 4-хлор-1-нафтола на поверхности сенсора. По изменению массы продукта может быть установлена концентрация антигена в исследуемом образце. Нижний предел детекции составил 7,8 пг/мл, линейный диапазон сенсора составляет 4 порядка концентраций.

Пероксидаза хрена – далеко не единственный фермент, служивший прекурсором при синтезе наночастиц. Мы упомянем одну работу, в которой наночастицы, сделанные из уреазы методом десольватации, были использованы в количественном анализе липокалина-2 [330]. Уреаза – это фермент, катализирующий гидролиз мочевины, продуктами которого являются аммиак и углекислый газ. Накопление продуктов реакции приводит к повышению pH реакционной среды, которое может быть детектировано при помощи портативного pH-метра. Авторы статьи синтезировали наночастицы уреазы при помощи десольватации с использованием этанола и глутаральдегида. Поверхность наночастиц покрыли полиаспартатом, который служил источником многочисленных карбоксильных групп. Карбодимидный метод применяли для ковалентной пришивки к наночастицам моноклональных антител против

липокалина. Анализ проводили в традиционном сэндвич-варианте. Чувствительность детекции липокалина составила 5,2 пг/мл, что сопоставимо с коммерческими ИФА-наборами.

Интересный способ усовершенствования иммуноферментного анализа антител к гаптенам при помощи желатиновых наночастиц был разработан Ghoshdastidar с соавт. [99]. Авторы работы покрывали дно 96-луночного планшета желатиновыми частицами, к которым были ковалентно прикреплены конъюгаты альбумина и 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (гаптена). Такой способ приготовления иммуносорбента позволил уменьшить десорбцию конъюгата «альбумин-гаптен» в ходе анализа, а также снизить предел детекции антител. Схожий подход был использован при разработке чипа для улавливания опухолевых клеток, циркулирующих в кровотоке [377]. На поверхности чипа (оксид олова, легированный фтором) ковалентно закрепляли желатиновые наночастицы, несущие на поверхности молекулы стрептавидина. При помощи биотин-стрептавидинового взаимодействия чип модифицировали моноклональными антителами против молекул адгезии CD326 (EpcAM). Чип с эффективностью более 88% улавливал клетки опухолевых линий MCF-7 и HCT116, несущие на своей поверхности маркер EpcAM (Рисунок 1.9). Неспецифическая адсорбция составляла около 5%. Преимуществами использования желатиновых наночастиц авторы назвали их биосовместимость, простоту синтеза, возможность ковалентной пришивки благодаря наличию карбоксильных и аминогрупп, а также возможность их контролируемого и избирательного разрушения при помощи металлопротеиназ для мягкого отделения клеток с поверхности чипа.

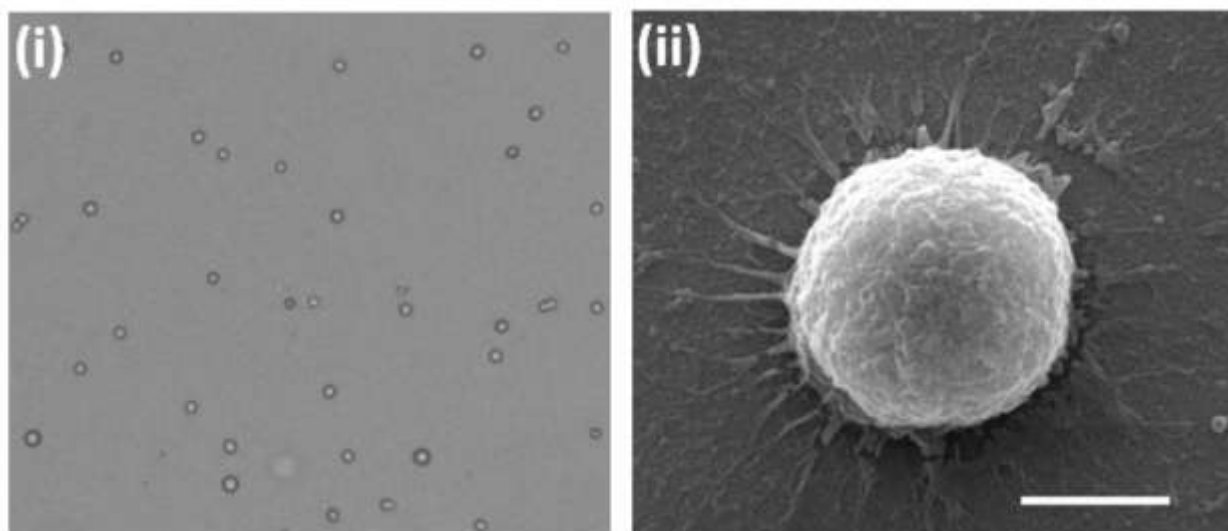


Рисунок 1.9 – Чип, покрытый желатиновыми частицами, до (i) и после (ii) захвата опухолевой клетки (перепечатано с изменениями из [377]). Фото сделаны при помощи сканирующей электронной микроскопии. Линейка – 5 мкм.

1.10 – Метод динамического рассеяния света

Ниже будут кратко рассмотрены ключевые принципы тех методов оценки физико-химических свойств наночастиц, которые были использованы в этой работе.

Метод динамического рассеяния света (ДРС) позволяет оценивать распределение наночастиц по размеру при помощи воздействия на разбавленный раствор наночастиц лазерным лучом. Принцип метода «основан на измерении и анализе флуктуаций интенсивности рассеянного света в объеме, содержащем коллоидные частицы в растворе, в разные моменты времени» [2]. Преимуществами метода являются простота и оперативность измерения (анализ одной пробы обычно занимает 1-2 минуты), а также возможность анализировать наночастицы в их нативном состоянии, т.е. в виде суспензии без необходимости высушивания или иной обработки, которая может привести к агрегации и получению некорректных данных. Метод позволяет оценивать стабильность наночастиц в стандартных буферных растворах, биологических жидкостях (сыворотка/плазма крови), культуральных средах. Это весьма привлекательно с точки зрения оценки потенциального спектра их практического применения.

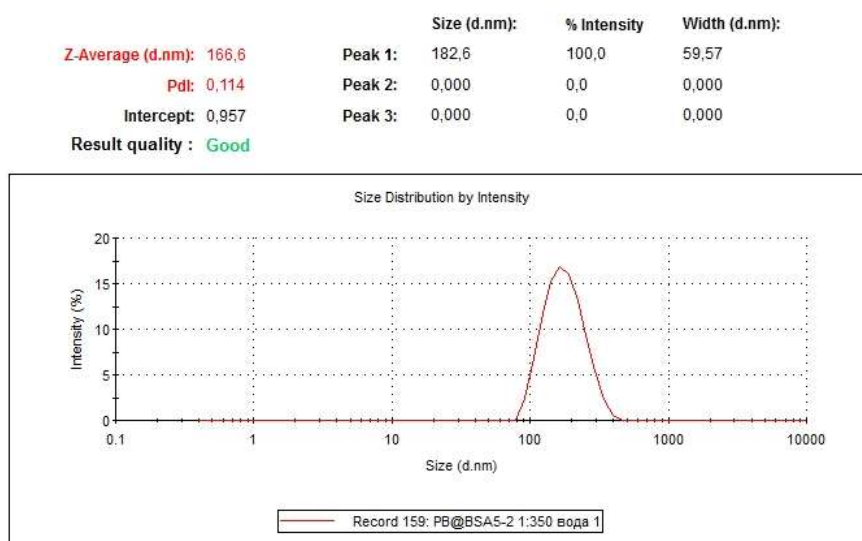


Рисунок 1.10 – Распределение наночастиц по размерам, измеренное при помощи ДРС (показан интерфейс программы Zetasizer Software)

Результатом применения метода являются такие данные как распределение наночастиц по размеру (Рисунок 1.10, выражается графически как доля интенсивности светорассеяния образца, приходящаяся на частицы разного диаметра), средний гидродинамический диаметр (Dh), а также индекс полидисперсности. Индекс полидисперсности (ИП) – это безразмерная величина, которая равна

$$\text{ИП} = \left(\frac{\sigma}{D}\right)^2 \quad (1),$$

где σ – стандартное отклонение, а D – гидродинамический диаметр наночастиц.

Значение ИП находится в диапазоне от 0 до 1. Чем более однородны наночастицы по размерам, тем ниже ИП. Как правило, $\text{ИП} < 0,2-0,3$ обычно считается приемлемым в области адресной доставки лекарственных средств [58]. В настоящее время нет каких-либо нормативных документов, которые устанавливали бы допустимые диапазоны ИП для конкретных отраслей науки и техники. В связи с этим в нашей работе мы пытались добиться как можно меньшей полидисперсности наших наночастиц, верхней допустимой границей ИП мы считали значение 0,3.

Одной из особенностей метода ДРС является небольшое завышение значения среднего диаметра наночастиц по сравнению с результатами электронной микроскопии [20]. Это обусловлено такими факторами как наличие сольватной оболочки вокруг наночастиц в суспензии, а также в целом большей чувствительностью ДРС в отношении более крупных частиц, поскольку они рассеивают свет с большей интенсивностью.

1.11 – Оценка морфологии, кристаллической структуры и элементного состава наночастиц

Для характеристики морфологии наночастиц используются различные микроскопические методы, наиболее распространёнными из которых являются сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Метод СЭМ основан на взаимодействии образца с тонким пучком электронов. Под воздействием пучка электронов происходит генерация вторичных электронов, т.е. отрыв электронов атомов образца. Детектируя вторичные электроны можно охарактеризовать рельеф поверхности образца, т.е. оценить форму, размеры и структуру поверхности наночастиц (Рисунок 1.11). ПЭМ основана на способности образца частично или полностью поглощать электроны. Не поглощенные электроны попадают на детектор, что позволяет получить изображение исследуемых объектов, содержащие информацию об их форме и толщине (если они частично проницаемы для электронов). При работе с наночастицами ПЭМ используется прежде всего для характеристики размеров и морфологии наночастиц. Если наноматериал изготовлен из полупроницаемого материала, например, полимеров, метод дает возможность изучить их внутреннюю неоднородность. Это актуально для полимерных частиц, нагруженных более мелкими наночастицами, в частности золотыми наночастицами или квантовыми точками (Рисунок 1.12) [266].

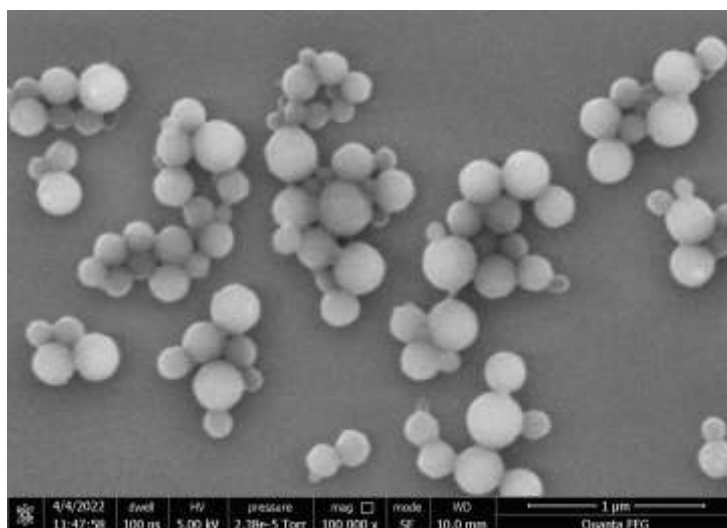


Рисунок 1.11 – Типичный пример СЭМ-фотографии наночастиц. Фото получено в ходе исследований в нашей лаборатории. Образец – альбуминовые наночастицы. Линейка – 1 мкм.

При воздействии электронного пучка на атомы образца происходит испускание последними рентгеновского излучения, характеристики уникальны для каждого элемента. Это позволяет производить качественный и количественный элементный анализ образца параллельно с оценкой его морфологии. Такой метод исследования элементного состава наноматериалов носит название энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭРС). ЭРС используется в комбинации с СЭМ и ПЭМ для исследования элементного состава наноматериала (Рисунок 1.13). При помощи этого метода можно оценить распределение химических элементов в объеме наночастицы.

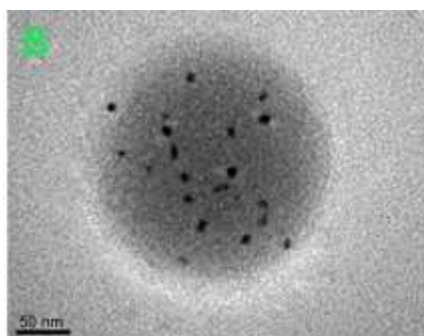


Рисунок 1.12 – ПЭМ-изображение полимерной наночастицы, нагруженной квантовыми точками (Перепечатано из [266] © (2009), с разрешения Elsevier).

Еще одним способом оценки элементного состава наноматериалов является масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС). Это высокочувствительный метод анализа, основанный на переводе исследуемого образца в состояние плазмы с последующим анализом его масс-спектра. ИСП-МС позволяет точно оценить элементный состав наночастиц, что может быть использовано для подтверждения их структуры, обнаружения примесей, определения их концентрации в суспензии и т.д.

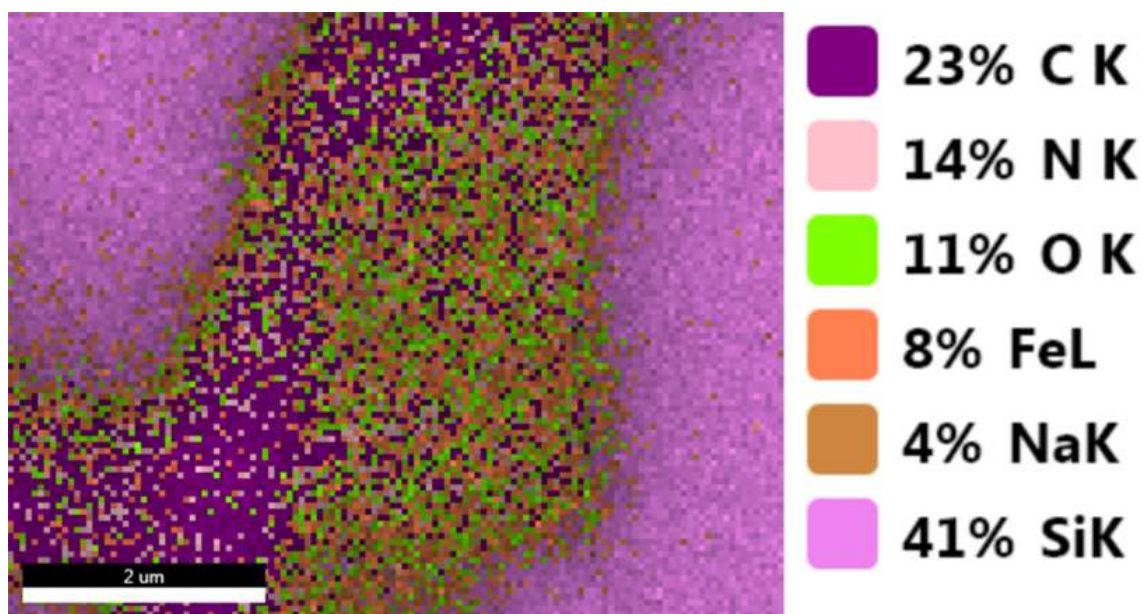


Рисунок 1.13 – Карта распределения химических элементов в образце, полученная при помощи ЭРС (образец из нашей лаборатории, полученный в ходе выполнения диссертационного исследования).

1.12 – Измерение удельной поверхности наночастиц

Удельную площадь поверхности наночастиц чаще всего оценивают методом измерения объема адсорбированного азота (или других инертных в отношении адсорбента газов), приходящегося на единицу массы твердых тел, в условиях постоянного повышения давления при постоянной температуре. Расчет удельной площади поверхности обычно производится с использованием уравнения Брунауэра-Эммета-Теллера [315]. В основе метода лежат представления о зависимости количества адсорбированного газа от удельной

площади поверхности и пористости материала. Анализируя зависимости адсорбции и десорбции азота от давления (Рисунок 1.14) можно установить не только площадь поверхности материала, но и размер и объем пор материала.

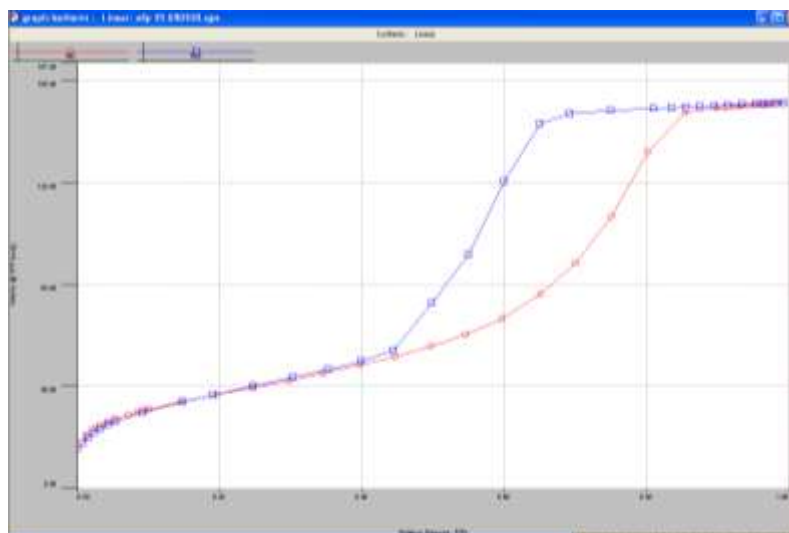


Рисунок 1.14 – Типичный вид изотерм адсорбции (красная линия) и десорбции (синяя линия) азота. Результаты получены в ходе исследований образца наночастиц берлинской лазури в нашей лаборатории.

1.13 – Перспективы разработки и применения диагностических реагентов на основе белковых наночастиц

Обобщая содержание предыдущих параграфов, можно сделать о том, что белковые наночастицы и наночастицы с белковым покрытием обладают целым рядом преимуществ с точки зрения их применения в качестве диагностических реагентов в иммуноанализах. Во-первых, это стабильность при длительном хранении, необходимая для использования в составе тест-наборов, срок хранения которых обычно составляет не менее одного года. Способность белков взаимодействовать как ковалентно, так и нековалентно с широким спектром разнообразных меток способствует созданию наноразмерных частиц (наноконтейнеров), включающих в себя многочисленные метки и усиливающих интенсивность генерируемого сигнала, а, значит, снижающих предел детекции иммуноанализа. Примеры из литературы, а также разработанные нами методы

синтеза белковых наночастиц, позволяют говорить об универсальности таких наноконтейнеров, т.е. о возможности их применения для создания диагностических реагентов на основе самых разнообразных меток: магнитных, цветных, флуоресцентных, каталитических, радиоактивных и т.д. Таким образом, реагенты на основе белковых наночастиц могут существенно улучшить аналитические и технологические характеристики анализов, используемых в области клинической иммунологии.

Еще одним преимуществом, которое необходимо отметить, является безопасность белковых реагентов для человека и окружающей среды. Это делает такие реагенты более привлекательными для конечных пользователей. Кроме того, безопасность компонентов тест-систем весьма существенна с точки зрения организации их производства и утилизации его отходов. Существование одобренных для клинического применения терапевтических средств на основе белковых наночастиц и комплексов «белок-лекарство» подчеркивает реалистичность подхода к получению диагностических реагентов, представленного в этой диссертации, поскольку требования, предъявляемые к терапевтическим препаратам весьма строги. Белковые наноматериалы этим требованиям в полной мере соответствуют.

Несмотря на существование примеров из литературы, описывающих диагностикумы, представляющие собой белковые наночастицы или, чаще, наночастицы с белковым покрытием, мы считаем, что потенциал таких материалов в области иммунодиагностики раскрыт лишь отчасти. Своей работой мы пытались продемонстрировать возможности использования белков как покрытий и белковых частиц как контейнеров для диагностических меток, а также гибкость такого подхода, заключающуюся в том, что тип и способ создания белкового покрытия позволяют подстроиться под нужды конкретной диагностической задачи.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ,
ИЗЛОЖЕННЫМ В ГЛАВЕ 1

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в
международных базах данных WoS, Scopus*

1. Khramtsov, P. 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. – P. 120422.

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

ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 – Получение и исследование свойств диагностикумов для ЯМР-иммуноанализа

Наночастицы Fe@C были синтезированы по методике, описанной в статье [240].

Образцы сыворотки 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.

Для ЯМР-анализа антител и исследований стабильности наночастиц использовали ЯМР-релаксометр, разработанный и собранный сотрудниками лаборатории прикладного магнетизма Института физики металлов им. М.Н. Михеева (заведующий лабораторией к.ф.-м.н. Михаил Александрович Уймин). Магнитный узел устройства был основан на постоянных SmCo магнитах с полем ~ 2 кЭ (0,2 Тесла), с неоднородностью не более 3×10^{-5} в объеме образца (1 см³), что обеспечивает частоту измерения приблизительно 7,75 МГц. Опорная частота устройства была настроена с точностью 10 Гц на резонансную частоту ларморовских протонов воды в образце, чтобы компенсировать температурный дрейф поля перед измерением.

Устройство было основано на процессоре Analog Devices BF-937 DSP. Связь с компьютером осуществляли через USB-порт; для взаимодействия с ПК использовали специально разработанное программное обеспечение, через которое осуществлялось управление устройством. То же программное обеспечение

использовали для математической обработки результатов, включая расчет времени релаксации.

Измерительный блок был вставлен в магнитный узел ЯМР-релаксометра и состоял из радиочастотных катушек и конденсаторов в пластиковом корпусе. Использовали два различных измерительных блока: один для жидкого образцов объема от 10 до 100 мкл, помещенных в лунки стандартного 96-луночного ИФА-планшета, а другой с уплощенной катушкой ($10 \times 10 \times 1$ мм) для ЯМР-измерений времени релаксации жидкостей в плоских пористых мембранах. Для объемной измерительной системы отношение сигнал/шум составляло 43 для объема жидкости 10 мкл и 378 для объема жидкости 100 мкл. Для уплощенной системы соотношение сигнал/шум составляло 15 для 10 мкл жидкости, нанесенной на мембрану. Полученные значения отношения сигнал/шум являются достаточно высокими проведения надежных измерений времени релаксации T_2 .

Получение аминированного Fe@C (Fe@C-NH₂). Сначала 100 мг порошка Fe@C добавляли к 10 мл 1 М HCl и оставляли на 60 мин при комнатной температуре (КТ), затем пять раз промывали 10 мл деионизированной воды при помощи неодимового магнита и повторно диспергировали в 10 мл 1 М HCl. Добавляли 120 мкл 4-аминобензиламина; затем стеклянную пробирку с наночастицами выдерживали при -20 °С в течение 30 мин, затем добавляли 70 мг NaNO₂, после чего смесь обрабатывали ультразвуком (зонд 6 мм, 100% усиление). Как только смесь закипала, ультразвук отключали, смесь охлаждали, после чего ультразвуковую обработку возобновляли. Общее время обработки ультразвуком доводили до 60 мин. После этого суспензию трижды диализовали против 2 л деионизированной воды, диализат переносили в пластиковую пробирку, добавляли 100 мкл 1 М HCl для предотвращения осаждения аминированных наночастиц и хранили при температуре +4 °С.

Исследование влияния pH, ионной силы и соотношения белка и наночастиц на размер нанокластеров, покрытых белком. Казеин, БСА и желатины А и В разводили в буферах с pH, которых находился в пределах от 4 до 9 (pH 4 и 5 — ацетатный буфер, pH 6, 7 и 8 — фосфатный буфер и pH 9 — боратный буфер).

Начальная ионная сила буферов составляла 0,01 М, и при необходимости ее доводили до 0,15 и 0,5 М с добавлением 5 М NaCl. Пятьдесят микролитров Fe@C-NH₂ (10 мг/мл) добавляли по каплям к раствору белка при вихревом перемешивании, затем добавляли воду и 1 М NaOH/1 М HCl для получения конечного объема 500 мкл и рН 7,2–7,6. Итоговые соотношения массы белка к массе наночастиц были 10:1, 5:1, 2,5:1, и 1,25:1. Суспензии обрабатывали ультразвуком в течение 10 с (30% усиление, 3 мм зонд), добавляли при перемешивании в равный объем 25% раствора глутарового альдегида и инкубировали в течение 30 мин на ротационном смесителе. Для БСА и казеина все стадии проводили при комнатной температуре, в то время как растворы желатина и нанокластеры, покрытые желатином, выдерживали при +37... +40 °С для предотвращения образования геля.

Синтез покрытых белком нанокластеров Fe@C-NH₂, конъюгированных со стрептавидином и белком G. Суспензию Fe@C-NH₂ (10 мг/мл) добавляли по каплям при вихревом перемешивании в раствор белка. При необходимости рН доводили до 7,25 с помощью 1 М NaOH, а объем регулировали с помощью фосфатного буфера (ФБ). Конечное соотношение белка к наночастицам (мг/мг) составляло 5:1. Полученную суспензию добавляли по каплям при вихревом перемешивании к равному объему 25% раствора глутарового альдегида и выдерживали на ротационном смесителе (здесь и далее угол поворота был 99°, а скорость вращения составляла 5 об/мин) в течение 30 мин. Затем нанокластеры, обработанные глутаровым альдегидом, пропускали через хроматографическую колонку для удаления избытка белка и глутарового альдегида. Фракции, содержащие нанокластеры Fe@C-NH₂/Белок, собирали и концентрировали в диализной трубке (предел исключения 10 кДа, 2 мл/см), покрытой слоем ПЭГ 35 кДа. Через 2-3 ч концентрированную суспензию извлекали из диализной трубки и центрифугировали при 1600 g в течение 5 мин. Супернатант, содержащий нанокластеры Fe@C-NH₂/Белок, активированные глутаровым альдегидом, добавляли к раствору целевых распознающих молекул (стрептавидина или белка G) в ФБ при вихревом перемешивании. Конечные соотношения распознающих

молекул к Fe@C-NH₂/Белок (мкг/мг) были 10:1, 20:1, 40:1, 80:1, и 160:1. Конъюгацию проводили в течение ночи на ротационном смесителе при +4 °С. После этого добавляли глицин до 6 мМ для инактивации непрореагировавших альдегидных групп, и смесь инкубировали при КТ еще один час. Избыток реагентов удаляли с помощью гель-хроматографии. Фракции с наибольшей концентрацией нанокластеров объединяли. Добавляли глицерин, БСА и глицин до конечных концентраций 20%, 1% и 6 мМ соответственно. Конъюгаты хранили при температуре +4 °С. Концентрацию нанокластеров определяли по поглощению при 450 нм.

ЯМР-иммуноанализ антител против столбнячного анатоксина. Здесь описан оптимизированный вариант ЯМР-иммуноанализа и технические детали его исполнения. Процесс разработки и оптимизации иммуноанализа рассмотрен в Главе 3.

Иммуноанализ на основе твердофазного ЯМР на нитроцеллюлозных полосках использовали для оценки функциональной активности нанокластеров Fe@C-NH₂/Белок/Стр различных размеров. Тест-полоски (5 × 60 мм) вырезали из нитроцеллюлозной мембраны с размером пор 8 мкм. Тест-полоски вымачивали в ФБ в течение 5 мин при температуре +37 °С. Два микролитра биотинилированного БСА (Би-БСА), 10-кратно разведенного в ФБ (от 100 мкг/мл до 0,1 мкг/мл), наносили на влажные полоски [295], которые затем сушили при +37 °С в течение 30 мин и при КТ в течение 15 мин. В контрольной зоне тест-полоски сорбировали 2 мкл 100 мкг/мл БСА. Все последующие этапы выполняли при температуре +37 °С на орбитальном шейкере, за исключением измерения. Тест-полоски блокировали 3,5 мл 1% БСА в ФБ с 0,1% твином-20 (ФБТ), трижды промывали в течение 5 мин в 5 мл ФБТ, инкубировали в 3,5 мл 0,05 мг/мл раствора Fe@C-NH₂/Белок/Стр в ФБТ с 1% БСА в течение 60 мин, а затем 12 раз промывали в 5 мл ФБТ. Участки тест-полоски с сорбированным Би-БСА помещали внутрь катушки релаксометра.

Для выявления противостолбнячных IgG нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 8 мкм разрезали на кусочки размером 6 × 80 мм и замачивали в 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 °С в течение 30 мин и при комнатной температуре в течение 15 мин, блокировали в 1,5 мл 1% БСА + 2% казеина в ФБТ и трижды промывают 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-NH₂/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 T₂ проводили путем помещения тест-полосок внутрь катушки релаксометра. Все этапы анализа проводили при температуре +37°C на орбитальном шейкере, за исключением измерения.

Электрофорез в агарозном геле. Электрофорез в агарозном геле был использован для изучения размера нанокластеров и подтверждения наличия белкового покрытия на их поверхности [117]. Образцы (5 мкл на лунку) подвергали электрофорезу в 0,5% агарозном геле в 0,5 × ТБЕ (трис-боратном) буфере, рН 8,3 при 75 В. После этого гели окрашивали раствором, содержащим 0,25 г Кумасси синего в 100 мл фиксирующего раствора: метанол:уксусная кислота:вода = 4:1:4, после чего отмывали фиксирующим раствором.

Исследование адсорбции белков сыворотки/плазмы крови на наночастицах. В этих экспериментах использовали конъюгаты Fe@C-NH₂/Белок/Стр без стабилизаторов (1% БСА и 20% глицерина), поскольку они могут повлиять на результаты теста. Различные объемы суспензий Fe@C-NH₂/БСА/Стр, Fe@C-NH₂/Казеин/Стр, Fe@C-NH₂/Желатин В/Стр и Fe@C-NH₂/Желатин А/Стр, содержащих 100 мкг нанокластеров, центрифугировали в течение 90 мин при

10000 g. Супернатант удаляли и добавляли 100 мкл цельной человеческой сыворотки или плазмы (объединенной сыворотки/плазмы от нескольких доноров) для достижения конечной концентрации нанокластеров 1 мг/мл. Для изучения адсорбции белка на непокрытых аминированных наночастицах 10 мкл 10 мг/мл Fe@C-NH₂ смешивали с сывороткой/плазмой без предварительного центрифугирования наночастиц. Наночастицы или нанокластеры обрабатывали ультразвуком в течение 1 с (30% усиление, 3 мм зонд), перемешивали на вихревом смесителе и выдерживали на ротационном смесителе в термостате при +37 °C в течение 1 ч. Известно, что ультразвук может повреждать биополимеры [288], поэтому мы предварительно подтвердили, что центрифугирование и обработка ультразвуком не влияли на размер и дзета-потенциал нанокластеров. Несвязанные белки удаляли путем трехкратной промывки 1 мл ФБ центрифугированием при 20000 g в течение 15 мин. Осажденные нанокластеры смешивали с 20 мкл буфера для образцов (0,5 М ТРИС-НСl, pH 6,8, 5% β-меркаптоэтанола, 10% SDS, 50% глицерина и 0,1% бромфенолового синего), прогревали в течение 5 мин при +95 °C и обрабатывали ультразвуком, как описано выше. Десять микролитров образца подвергали электрофорезу в 10%-ном полиакриламидном геле при 100 В на пластину геля в ТРИС-НСl буфере до тех пор, пока белки не достигали края геля. Количественное определение адсорбированных белков проводили следующим образом. Образцы готовили таким же образом, за исключением того, что белки элюировали с использованием 50 мкл ФБ, содержащего 0,025% SDS и 4 М мочевины, при нагревании (+95 °C, 5 мин); мочевина и SDS в указанных концентрациях не влияют на анализ белка по Бредфорду, согласно заявлению производителя. Элюированные сывороточные белки отделяли от наночастиц центрифугированием (10000, 15 мин), а затем концентрацию белка определяли методом Бредфорда (5 мкл неразбавленной пробы + 250 мкл реагента Бредфорда) с использованием БСА для получения калибровочной кривой. В качестве контроля использовали образцы без добавления сыворотки. Концентрации элюированных белков в контрольных

образцах были вычтены из концентраций исследуемых образцов. Были сделаны три повторности как для тестовых, так и для контрольных образцов.

Коллоидная стабильность диагностикумов. Для оценки коллоидной стабильности использовали метод ДРС. Измерения проводили в следующих буферах: 0,1 М ацетатный буфер (рН 4 и 5), 0,05 М натрий-фосфатный буфер (рН 6, 7 и 8), 0,1 М натрий-боратный буфер (рН 9 и 10). Ионную силу доводили до 0,15, 0,5 и 2 М при помощи концентрированного раствора NaCl. Все буферы фильтровали через шприцевые фильтры из полиэфирсульфона с диаметром пор 0,2 мкм. В качестве консерванта использовали 0,1% азида натрия. Образцы Fe@C-NH₂/Белок/белок G разбавляли до 20 мкг/мл в конечном объеме 750 мкл в одноразовых пластиковых кюветах. Для каждого типа условий были подготовлены три независимых образца. После перемешивания в течение 60 мин при комнатной температуре размер нанокластеров измеряли с помощью ДРС. Затем кюветы с образцами оставляли во увлажненной камере при комнатной температуре и проводили повторные измерения через 24 часа.

Коллоидную стабильность также оценивали с помощью ЯМР-релаксометрии. Образцы Fe@C-NH₂/Белок/Белок G разбавляли до 10 мкг/мл в 500 мкл буфера, а затем 100 мкл образцов добавляли в лунки плоскодонных 96-луночных полистирольных планшетов. Лунки с образцами отрывали и помещали внутрь катушки релаксометра. Буферы и временные точки измерений были такими же, как описанные выше.

Стабильность диагностикумов при хранении. Образцы Fe@C-NH₂/Белок/Белок G в ФБ с 1% БСА, 20% глицерина и 6 мМ глицина хранили при +4°C и +37°C (по одному образцу на конъюгат). Их гидродинамический диаметр контролировали в течение одного месяца. Конъюгаты разбавляли до 1:350 в 750 мкл отфильтрованного ФБ. Размер измеряли в трех повторностях: три независимых разведения каждого образца.

Образцы конъюгатов Fe@C-NH₂/Белок/Стр, приготовленные в ходе экспериментов по контролю размера наночастиц, хранили при температуре +4°C в течение 3-4 месяцев, и их размер измеряли таким же образом.

Стабильность диагностикумов в сложных средах. Красное вино, апельсиновый сок, пиво и молоко были куплены в местном супермаркете. Объединенную сыворотку/плазму крови, полученную от трех здоровых добровольцев, размораживали и центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин для удаления агрегатов. Fe@C-NH₂/Белок/Стр и Fe@C-NH₂/Белок/Белок G разбавляли до 10 мкг/мл в 500 мкл исследуемой среды, а затем 100 мкл образца добавляли в лунки 96-луночного полистирольного планшета и помещали внутрь катушки релаксометра. Измерения проводили сразу после добавления нанокластеров, а затем через 1 и 5 ч. Образцы хранили при комнатной температуре на протяжении всего исследования.

Устойчивость диагностикумов к воздействию протеаз. Образцы Fe@C-NH₂/Белок/Стр без стабилизаторов (БСА, глицерина и глицина) разбавляли до 10 мкг/мл ФБ (контрольные образцы) или ФБ, содержащим 100 мкг/мл трипсина (тестовые образцы). Образцы выдерживали при температуре +37 °C (по три образца для каждого типа белкового покрытия) в твердотельном термостате в течение 24 ч. Размер нанокластеров в тестируемых образцах измеряли через 0,5, 1, 2 и 24 ч; в контрольных образцах – через 2 и 24 ч.

Определение релаксивности наночастиц. Измерения релаксации проводили с помощью портативного ЯМР-релаксометра. Время спин-спиновой релаксации (T₂) измеряли с использованием последовательности импульсов Карра–Перселла–Мейбума–Гилла (CPMG) с интервалом между эхо-сигналами TE = 1 мс. Были приготовлены последовательные 10-кратные разведения магнитных нанокластеров. Начальная концентрация магнитных нанокластеров составляла приблизительно 0,02–0,03 мг/мл. После разбавления суспензию нанокластеров обрабатывали ультразвуком в течение 10 с (использовали зонд погружного типа). Затем 100 мкл суспензии помещали в лунку 96-луночного культурального планшета. Ячейку помещали в объемную измерительную катушку релаксометра. Линейная зависимость между релаксивностью и концентрацией нанокластеров указывала на отсутствие агломерации во время измерения.

2.2 – Синтез диагностических реагентов на основе белковых наночастиц

Синтез желатиновых наночастиц в масштабе сотен миллиграмм.

Желатин А (62 и 180 Блюм), желатин В (75 и 225 Блюм) и рыбий желатин разводили в воде до 10 мг/мл, затем рН доводили до 10 (до 11 для желатина А и рыбьего желатина) при помощи 1 М NaOH. К 100 мл полученного раствора добавляли 500 мл изопропилового спирта, полученную смесь инкубировали в течение 30 мин при +37 °С на водяной бане. Растворы желатина и изопропилового спирта перед смешиванием выдерживали на водяной бане при температуре +37 °С. Затем быстро добавляли 22,5 мл 0,8%-ного глутарового альдегида с последующей 30-минутной инкубацией при +37 °С на водяной бане. Сшитые наночастицы переносили в поликарбонатные центрифужные пробирки объемом 85 мл и центрифугировали при 15000 g в течение 60 мин. Наночастицы объединяли и повторно диспергировали в 60 мл воды при помощи ультразвука (10-30 с, усиление 60%, зонд 3 мм, мощность ок. 8 Вт). Полученные суспензии центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин еще два раза. После окончательного центрифугирования к осадку добавляли 40 мл воды, и полученную суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин (усиление 60%, зонд 6 мм, мощность ок. 25 Вт) на льду. Концентрацию наночастиц определяли при помощи гравиметрического анализа.

Для измерения флуоресценции образцы наночастиц разбавляли водой до 1 мг/мл; затем по 100 мкл каждого образца переносили в лунки черных 96-луночных планшетов. Размер наночастиц определяли методом динамического рассеяния света (ДРС). Для этого наночастицы разводили в воде в соотношении 1:375. Далее в этой главе размеры выражены в форме средневзвешенного гидродинамического диаметра (*Z-average diameter, Dh*). Для получения микрофотографий наночастиц методом сканирующей электронной микроскопии (SEM) их разводили в воде до 1 мкг/мл, наносили на кремниевую пластину размером 5 × 5 мм и высушивали в течение ночи при комнатной температуре. Для этих экспериментов были взяты наночастицы, обработанные глицином, чтобы уменьшить возможность взаимодействия между свободными альдегидными

группами и аминогруппами, расположенными на поверхности наночастиц в процессе высушивания.

Получение наночастиц желатина, нагруженных флуоресцентными хелатами европия. Желатин А (62 и 180 Блюм), желатин В (75 и 225 Блюм) и рыбий желатин разводили в воде до 10 мг/мл, затем рН доводили до 10 (до 11 для желатина А и рыбьего желатина) при помощи 1 М NaOH. К 4 мл полученного раствора добавляли 20 мл этанола, содержащего 4-(4-метилфенил)-2,4-диоксобутановую кислоту, 1,10-фенантролин и хлорид европия (концентрации составляли 180, 60 и 60 мкМ соответственно), и смесь инкубировали в течение 30 мин при +37 °С в термостате. Растворы, содержащие желатин и флуоресцентные комплексы, перед смешиванием выдерживали на водяной бане при температуре +37 °С. Затем добавляли 900 мкл 0,8% глутарового альдегида с последующей 30-минутной инкубацией при +37 °С. Наночастицы переносили в поликарбонатные центрифужные пробирки объемом 85 мл и центрифугировали при 15000 g в течение 60 мин. Наночастицы повторно диспергировали в 4 мл воды с помощью ультразвука и центрифугировали три раза при 20000 g в течение 30 мин. После каждой промывки наночастицы повторно диспергировали в воде с помощью ультразвука (10-30 с, усиление 60%, зонд 3 мм, мощность ок. 8 Вт). Супернатанты, полученные после заключительной стадии промывки, объединяли. Для измерения флуоресценции готовили 10-кратные разведения наночастиц в воде; затем по 100 мкл каждого разведения переносили в лунки черных 96-луночных планшетов.

Стерилизация наночастиц автоклавированием. Непрореагировавшие карбонильные группы инактивировали глицином. Перед стерилизацией к суспензии наночастиц желатина добавляли 1 М глицин-NaOH буфера, рН 9,3 (1 часть буфера на 9 частей суспензии), полученную смесь инкубировали в течение 1 ч при +37 °С на ротационном смесителе (10 об/мин, 360 градусов). Затем наночастицы трижды промывали водой центрифугированием при 15000 g в течение 1 ч. Концентрацию наночастиц определяли методом гравиметрического анализа.

Автоклавирование. Пять миллилитров суспензии наночастиц помещали во флаконы из темного стекла объемом 15 мл и подвергали автоклавированию в течение 15 мин при +121 °С и давлении на 0,5 атм выше атмосферного. Суспензии охлаждали при комнатной температуре и хранили при температуре +4 °С. Контрольные наночастицы выдерживали при температуре +4 °С.

Удаление агрегатов наночастиц после автоклавирования. В центрифужные пробирки помещали 1 мл суспензии наночастиц. Наночастицы центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. После центрифугирования размер наночастиц измеряли с помощью ДРС. Для каждого образца были сделаны три повторности.

Характеризация. Оптическую плотность суспензий наночастиц при 600 нм измеряли до и после центрифугирования. Суспензию разводили в дистиллированной воде. Для измерений ДРС наночастицы разводили в соотношении 1:375 в ФБ (рН 7). Дзета-потенциал автоклавированных наночастиц измеряли при рН 7 и ионной силе 0,06 М. Ионную силу регулировали с помощью 1 М KNO₃. Для каждого образца были приготовлены 3 технические повторности.

Оценка стабильности желатиновых наночастиц при различных значениях рН и высоких концентрациях солей. Стабильность наночастиц при различных значениях рН. Наночастицы разбавляли до 50 мкг/мл в буферные растворы с рН в диапазоне от 4 до 10. Использовали следующие буферы: 10 мМ ацетатный буфер, рН 4 и 5; 10 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 6, 7 и 8; 10 мМ боратный буфер, рН 9 и 10. Ионную силу доводили до 0,15 М добавлением NaCl. Размер наночастиц при каждом значении рН немедленно измеряли с помощью ДРС. Для каждого набора условий делали три технические повторности. Суспензии наночастиц хранили в течение 7 дней в пластиковых кюветах, которые помещали во влажную камеру. Спустя 1 и 7 дней вновь проводили измерения размеров наночастиц.

Стабильность наночастиц при различных концентрациях солей. Наночастицы разбавляли до 50 мкг/мл в фосфатном буфере, рН 7. Ионную силу раствора доводили до 0,5, 1, 2 и 3 М добавлением NaCl. Размер наночастиц измеряли с помощью ДРС для каждой концентрации соли. Вязкость растворов NaCl определяли с помощью вискозиметра и она составила 1,265 МПа·с (3 М

NaCl), 1,145 МПа·с (2 М NaCl), 0,992 МПа·с (1 М NaCl) и 0,983 МПа·с (0,5 М NaCl).

Измерение дзета-потенциала наночастиц при различных значениях pH. Суспензии наночастиц разбавляли до 50 мкг/мл в следующих буферах: 10 мМ ацетатный буфер, pH 4 и 5; 10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 6, 7 и 8; 10 мМ боратный буфер, pH 9 и 10. Ионную силу доводили до 0,06 М добавлением KNO_3 . Каждого измерение было выполнено в трех повторностях.

Исследование влияния желатиновых наночастиц на жизнеспособность мононуклеарных клеток крови человека. Венозная кровь была взята у трех здоровых добровольцев (в возрасте от 23 до 31 года) в вакуумные пробирки, содержащие гепарин. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из плазмы крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла (1,077 г/л) при 400 g в течение 40 мин. Выделенные клетки трижды промывали раствором Хэнкса; затем клетки высевали в дублях в 96-луночные планшеты (200 мкл на лунку, 1×10^6 клеток/мл). В каждую лунку добавляли тридцать микролитров стерилизованных наночастиц желатина, разведенных в воде для инъекций. Конечные концентрации наночастиц желатина составляли 1000, 250, 62,5, 15,6 и 3,9 мкг/мл. Отрицательным и положительным контролем были вода для инъекций и 15% DMSO соответственно. Клетки инкубировали в течение 24 ч в увлажненной атмосфере в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 , +37 °C), окрашивали йодидом пропидия (PI) (1 мкг/мл, 5 мкл на 100 мкл клеточной суспензии) в течение одной минуты и анализировали методом проточной цитометрии. Процентное содержание PI^- (живых) клеток определяли для каждого образца.

Мононуклеарные клетки, поглоившие наночастицы, флуоресцируют в спектре излучения йодида пропидия (максимум около 615 нм). Следовательно, гейты для живых (PI^-) и мертвых (PI^+) клеток были установлены в соответствии с неокрашенными образцами и положительным/отрицательным контролем.

При поглощении наночастиц увеличивается зернистость клеток и, соответственно, боковое рассеяние света (SSC). Следовательно, поглощение

частиц моноцитами определяли по среднему геометрическому значению интенсивности бокового светорассеяния.

Синтез альбуминовых наночастиц, сшитых глутаровым альдегидом. Наночастицы синтезировали с использованием готовых растворов БСА. рН растворов БСА варьировал от 7 до 7,5, перед началом синтеза его доводили до 9 с использованием 1 М NaOH (приблизительно 8-10 мкл раствора 1 М NaOH на 1 мл БСА). Конечная концентрация NaOH в растворе БСА составляла 8-10 мМ. Раствор БСА (4 мл) наливали в стеклянный флакон и нагревали до +35 °С. При постоянном перемешивании на магнитной мешалке (1400 об/мин) добавляли 96%-ный этанол (4 мл/мин) (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Условия синтеза белковых наночастиц

| Название партии | Белок и производитель | Метод сшивки | Степень сшивки | Объем добавленного этанола, мл |
|------------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| NP1 | БСА, “VWR” | глутаральдегид | 540% ¹ (640) | 11.73 |
| NP2 | БСА, “VWR” | глутаральдегид | 540% (640) | 16 |
| NP3 | БСА, “VWR” | глутаральдегид | 540% (640) | 16 |
| NP4 | БСА, “Roche” | глутаральдегид | 540% (640) | 20 |
| NP5 | БСА, “Roche” | глутаральдегид | 540% (640) | 18 |
| NP6 | БСА, “VWR” | Нагревание, +70 °С | - | 16 |
| NP7 | БСА, “Biosera” | Нагревание, +70 °С | - | 13.3 |
| NP8 | Желатин В, “Sigma” | глутаральдегид | 5400% (360) | 12 |
| NP9 | Желатин В, “Sigma” | глутаральдегид | 5400% (360) | 12 |

| | | | | |
|------|----------------|----------------|------------|-------|
| NP10 | БСА, “Biosera” | глутаральдегид | 540% (640) | 13.3 |
| NP11 | БСА, “Biosera” | глутаральдегид | 40% (47) | 13.3 |
| NP12 | БСА, “VWR” | глутаральдегид | 540% (640) | 11.73 |
| NP13 | БСА, “Biosera” | глутаральдегид | 540% (640) | 11.46 |

Примечание: ¹Количество глутарового альдегида/(количество первичных аминов/2)×100%

Температуру раствора контролировали с помощью датчика температуры. Через пять минут после окончания добавления этанола к суспензии добавляли 640 мкл (или 47 мкл для партии NP11) 8%-ного водного раствора глутарового альдегида. Подогревание суспензии прекращали; сшивку наночастиц проводили при комнатной температуре в течение 60 минут. Цвет суспензии постепенно менялся с белого на светло-коричневый. Суспензию наночастиц разделяли на аликвоты по 1 мл и переносили в центрифужные пробирки. Наночастицы отмывали водой от остатков БСА, этанола и глутарового альдегида с использованием четырех 30-минутных циклов центрифугирования при 20000 g. Супернатанты после каждого цикла промывки объединяли и хранили при температуре +4 °С. После каждого центрифугирования осадок ресуспендировали с помощью ультразвуковой обработки (диаметр зонда – 3 мм, усиление - 60%, мощность – 8 Вт, продолжительность – 20 сек). После окончательной промывки наночастицы повторно ресуспендировали в определенном объеме деионизированной воды и хранили при температуре +4 °С.

Концентрация глутарового альдегида была выбрана на основе метода измерения дзета-потенциала наночастиц, предложенный в статье [91].

Объемы супернатантов и очищенных наночастиц измеряли с помощью градуированных цилиндров или автоматических пипеток. Образцы десольватированных наночастиц (500 мкл) были отобраны для анализа концентрации белка.

Синтез альбуминовых наночастиц, сшитых нагреванием. В целом, синтез наночастиц осуществлялся таким же образом, как и при использовании глутарового альдегида для сшивания. После добавления этанола суспензию нагревали до +70 °С и выдерживали в течение двух часов при постоянном перемешивании. Цвет суспензии оставался белым. Суспензию наночастиц разделяли на аликвоты по 1 мл, переносили в центрифужные пробирки, а затем наночастицы промывали водой центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин. Супернатанты после каждого цикла промывки объединяли и хранили при температуре +4 °С. После каждого центрифугирования гранулы ресуспендировали с помощью ультразвуковой обработки (диаметр зонда – 3 мм, усиление – 60%, мощность – 8 Вт, продолжительность – 20 сек). После окончательной промывки наночастицы повторно ресуспендировали в определенном объеме деионизированной воды и хранили при температуре +4 °С.

Синтез желатиновых наночастиц. Желатин растворяли в воде до 26,6 мг/мл (по данным гравиметрического анализа); рН доводили до 9, используя 1 М NaOH (приблизительно 15 мкл 1 М NaOH на 1 мл желатина), полученный раствор доводили до +37 °С. Двенадцать миллилитров 96%-ного этанола добавляли к 4 мл раствора желатина, а затем смесь медленно перемешивали и оставляли на 5 мин. К образовавшимся наночастицам добавляли 360 мкл 8%-ного глутарового альдегида, медленно перемешивали и оставляли на 30 мин. Концентрацию глутарового альдегида выбирали в соответствии с рекомендациями Geh с соавт. [97] с четырехкратным избытком. Наночастицы разделяли на аликвоты объемом ≈1 мл и центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость хранили при температуре +4 °С для последующего анализа концентрации белка; к осадку добавляли 1 мл воды, наночастицы ресуспендировали ультразвуком (20 сек, 60% амплификация, 3 мм зонд). Промывку повторяли 4 раза. После последней промывки наночастицы ресуспендировали в определенном объеме деионизированной воды и хранили при температуре +4 °С.

Степень сшивания желатина. Хотя глутаровый альдегид реагирует с различными аминокислотами [239], степень сшивания измеряли по отношению к

числу первичных аминов боковых цепей лизина. Желатин В содержит приблизительно 11 остатков лизина на 1000 аминокислот [116]. Средняя молекулярная масса одной аминокислоты составляет приблизительно 110 Да. Молекулярная масса желатина В с числом Блюма 75 составляет от 20 до 25 кДа. Следовательно, каждая молекула желатина В содержит 2-2,5 остатка лизина. 4 мл раствора желатина В (26,63 мг/мл) содержит ок. 5,3 мкМ белка (10,6 мкМ лизинов). Добавление 288 мкМ глутарового альдегида приводит к степени сшивания 5400% (54 молекулы глутарового альдегида на пару остатков лизина).

Анализ белка по Брэдфорду и анализ с бицинхониновой кислотой (БХК). Оба анализа проводили в плоскодонных 96-луночных планшетах. При проведении анализа по Брэдфорду в лунки добавляли 5 мкл образца и 250 мкл раствора красителя. Планшет инкубировали при +37 °С в течение 5 мин, после чего измеряли поглощение раствора при 595 нм с помощью планшетного спектрофотометра. При проведении анализа БХК к 25 мкл образца добавляли 200 мкл раствора красителя. Смесь инкубировали при +37 °С в течение 30 мин в термошейкере, после чего оценивали поглощение растворов при 562 нм. Анализировали аликвоты, взятые сразу после десольватации, пробы супернатантов и образцы очищенных наночастиц. Все образцы были разбавлены 1:1, 1:3, 1:9 и 1:27 в воде; образцы концентрированных наночастиц (партии NP9 и NP10) были разбавлены 1:5, 1:15, 1:45, 1:135. Концентрации белка рассчитывали с использованием значений поглощения самого низкого разведения, которое попадало в диапазон калибровки.

Для приготовления калибраторов использовали стандартные растворы БСА. Поскольку концентрации БСА, полученные с помощью УФ-спектрометрии и гравиметрического анализа, отличались, то при измерении концентрации наночастиц использовали оба. При построении калибровочной кривой для желатина использовали значение концентрации белка, измеренное с помощью гравиметрического анализа.

Концентрацию наночастиц рассчитывали прямым методом (концентрация очищенных наночастиц) и косвенным методом:

$$\text{Концентрация} = \frac{\text{Начальная масса БСА} - (0,5 \times \text{Сдес.} + \text{Ссуп.1} \times \text{Vсуп.1} + \text{Ссуп.2} \times \text{Vсуп.2} + \text{Ссуп.3} \times \text{Vсуп.3} + \text{Ссуп.4} \times \text{Vсуп.4})}{V_{\text{Наночастиц}}}$$

где Сдес. – концентрация белка после десольватации (500 мкл десольватированного белка было собрано для анализа белка, поэтому Сдес. умножали на 0,5), Ссуп.1 – концентрация белка в супернатанте после 1–й промывки, Vсуп.1 - объем супернатанта после 1-й промывки.

Кислотный и щелочной гидролиз. Оптимизацию условий гидролиза в предварительных экспериментах проводили следующим образом. К 1 мл образца добавляли 10 М NaOH или HCl до конечной концентрации 1, 2 или 4 М. Объем смеси доводили водой до 1666 мкл. Во время гидролиза БСА в каждую пробирку добавляли 3,2 мкл 8%-ного глутарового альдегида на 1 мг БСА. Гидролиз проводили в микропробирках объемом 2 мл при температуре +37 °С при постоянном перемешивании на ротационном смесителе (угол 360°, 10 об/мин). Гидролизат разводили 1:10 в воде, добавляли в кварцевые кюветы и оценивали поглощение при 280 нм. Для каждого образца гидролиз проводили в трех микропробирках.

Щелочной гидролиз образцов из партий NP1-13. Сто микролитров суспензии альбуминовых наночастиц добавляли к 900 мкл 4,4 М NaOH, наночастицы из партии NP10 предварительно разводили 1:10 в воде. Желатиновые наночастицы (500 мкл) смешивали с 500 мкл 8 М NaOH в конечном объеме 1 мл; наночастицы из партии NP9 предварительно разводили 1:5 в воде.

Калибровочные кривые были построены с использованием необработанных или обработанных глутаровым альдегидом исходных растворов БСА (от “Roche”) и желатина. pH раствора БСА доводили до 9 на 1 М раствора NaOH. К 1 мл полученного раствора добавляли 8%-ный глутаровый альдегид в количестве 160, 11,5 или 0 мкл и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого объем всех растворов уравнивали водой. Раствор желатина с концентрацией 26,6 мг/мл доводили до pH 9 с использованием 1 М раствора NaOH. К 1 мл

полученного раствора добавляли 90 мкл или 0 мкл 8%-ного глутарового альдегида и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Объемы растворов уравнивали водой. Двукратные разведения полученных растворов использовали в качестве калибраторов; для этого 900 мкл 4,4 М NaOH добавляли к 100 мкл калибровочных растворов БСА, 500 мкл 8 М NaOH добавляли к 500 мкл калибровочных растворов желатина.

Калибровочные растворы БСА и желатина готовили в присутствии избытка глутарового альдегида, и они, следовательно, содержали свободный глутаровый альдегид. Чтобы компенсировать поглощение при 280 нм, обусловленное присутствием свободного глутарового альдегида, калибровочные растворы с различными концентрациями глутарового альдегида были обработаны 4 М NaOH. Скорректированное поглощение калибраторов БСА/желатина рассчитывали следующим образом:

$$A_{280} \text{ калибратора белка} - A_{280} \text{ калибратора глутаральдегида}$$

Невозможно точно рассчитать количество молекул глутарового альдегида, вступивших в реакцию с аминогруппами БСА/желатина; таким образом, предполагалось, что весь глутаровый альдегид находится в калибраторах в свободной форме.

Поскольку концентрации БСА, определенные с помощью УФ-спектрометрии и гравиметрического анализа, были разными, калибровочные кривые для БСА были построены для них обоих. В частности, начальная концентрация БСА составляла 51,60 мг/мл по данным УФ-спектрометрии и 56,56 мг/мл по данным гравиметрического анализа.

Гидролиз проводили в течение 48 ч в микропробирках объемом 2 мл при температуре +37 °С при постоянном перемешивании на ротационном смесителе (угол 360°, 10 об/мин). Для каждого образца гидролиз проводили в трех микропробирках (три повторности). Поглощение неразбавленных гидролизатов оценивали при 280 нм.

Гравиметрический анализ. Фарфоровые тигли нагревали при температуре +140 °С до постоянной массы. Затем в них наливали образцы в объеме 100 мкл (партии NP9 и NP10) или 1 мл. Воду выпаривали при температуре +95 °С, после чего образцы высушивали до постоянной массы при температуре +140 °С.

Измерения флуоресценции. Были приготовлены водные растворы желатина, БСА и наночастиц из желатина В и БСА с концентрацией 1 мг/мл (согласно гравиметрическому анализу). Сто микролитров полученных растворов добавляли в лунки черных 96-луночных планшетов. Флуоресценцию оценивали с использованием диапазона длин волн возбуждения от 280 до 600 нм (с интервалом 20 нм). Спектры излучения регистрировали, начиная с длины волны, на 30 нм превышающей длину волны возбуждения. При оценке наличия долгоживущей флуоресценции задержка перед измерением составляла 100 нс. Измерения проводили при комнатной температуре.

Гель-электрофорез. Гель-электрофорез наночастиц и супернатантов проводили в полиакриламидных гелях. Гели готовили с использованием 0,1 М ТРИС-НСl буфера, рН 8,8, содержащем 0,1% SDS. В качестве электродного буфера использовали ТРИС-глициновый буфер, рН ~ 8,3. Электрофорез проводили без использования концентрирующего геля. Толщина геля составляла 0,75 мм. Наночастицы смешивали с буфером для образцов (10% SDS, 0,1 М ЭДТА, 50% глицерина, 0,5 М ТРИС, 0,1% бромфеноловый синий, с или без 50 мМ бета-меркаптоэтанолом) 5:1, 10 мкл смеси наносили на гель. В некоторых экспериментах образцы нагревали при температуре +95 °С в течение 5 мин перед нанесением на гель. Образцы надосадочной жидкости смешивали 1:1 с 90%-ным раствором глицерина в воде. При добавлении меньшего количества глицерина, образцы перетекали в соседние лунки геля из-за различий в плотности этанола и воды. Концентрация БСА составляла 1 мг/мл. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 200 В. Гели окрашивали в течение 60 мин Кумасси синим G-250, а затем промывали окрашивали фиксирующим раствором (20% метанол, 7,5% уксусная кислота). Окрашенные гели фотографировали с помощью

смартфона. Фотографии были обрезаны и представлены без каких-либо дополнительных манипуляций с цветами или контрастностью.

Термогравиметрический анализ. В общей сложности 100 мкл образцов наночастиц были высушены при +95 °С и помещены в анализатор. Измерение проводилось на воздухе при скорости нагрева 10 К/мин от +25 до +1000 °С.

Измерения размера и дзета-потенциала. Размеры наночастиц измеряли методом динамического рассеяния света (ДРС). Наночастицы разводили 1:350 в 750 мкл воды. Измерения проводили в пластиковых кюветах объемом 2 мл, для каждого образца выполняли 3 технических повторности. Перед измерением наночастицы тщательно перемешивали. Для измерения дзета-потенциала фосфатный буфер разбавляли десятикратно водой (рН разбавленного буфера составлял 7,47, ионная сила составляла 0,018 М), затем к 700 мкл разбавленного буфера добавляли 7 мкл суспензии наночастиц. Измерение проводили в кюветах объемом 4 мл, и для каждого образца было выполнено 3 технических повторности.

УФ–Вид спектроскопия. Спектр поглощения наночастиц (1 мг/мл) был получен в диапазоне длин волн от 190 до 1000 нм.

Устойчивость наночастиц к протеолитическому расщеплению. Наночастицы разбавляли до 2 мг/мл 0,1х ФБ; затем 200 мкл полученных наночастиц переносили в лунки 96-луночного планшета. В каждую лунку добавляли десять микролитров 1 мг/мл трипсина или воды (контрольные образцы). Планшеты заклеивали пленкой и выдерживали при температуре +37 °С в термостате в течение 24 ч без перемешивания. Для каждой партии наночастиц были сделаны три повторности.

Анализ данных. Полученные данные обрабатывались в MS Office Excel, Microsoft (США). Графики были подготовлены в GraphPad Prism 6.01, GraphPad Inc. (США) и Origin 2020, OriginLab (США). Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 6.01.

Выход синтеза определяли, как процентное содержание БСА/желатина, превращенного в наночастицы. Выходы рассчитывали отдельно для начальных

концентраций БСА, измеренных с помощью УФ-спектрометрии и гравиметрического анализа, следующим образом:

$$\text{Выход, \%} = \frac{\text{Концентрация наночастиц} \times \text{объем наночастиц}}{\text{Исходная масса белка}}$$

2.3 – Получение диагностических реагентов на основе белковых наночастиц, нагруженных гемином

Синтез наночастиц БСА, нагруженных гемином (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. рН полученного раствора составлял от 10 до 10,5. Затем рН раствора доводили до 11 с помощью рН-метра. Раствор выдерживали на ротационном смесителе (360 градусов, 10 об/мин) в течение 1 ч при температуре +37 °С, а затем обрабатывали ультразвуком (20 с, 18 Вт, 3 мм зонд). Четыре миллилитра полученного раствора переносили в стеклянный флакон и нагревали до +35 °С 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 увеличения поглощения. Наночастицы сшивали в течение 2 часов нагреванием при +70 °С при перемешивании. После этого суспензию охлаждали до комнатной температуры, переносили в центрифужные пробирки объемом 2 мл и центрифугировали при 20000 g 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 °С.

Незагруженные наночастицы готовили таким же образом, за исключением того, что рН раствора БСА составлял 9,3, а контроль поглощения не проводился. Добавляли этанол до тех пор, пока раствор не становился мутным.

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).

Характеризация наночастиц. Размер (z-взвешенный гидродинамический диаметр), полидисперсность и дзета-потенциал наночастиц оценивали с помощью динамического рассеяния света (ДРС). Для измерения размера наночастицы разводили в деионизированной воде в соотношении 1:100. Для измерения дзета-потенциала наночастицы разводили в 10 мм фосфатном буфере, рН 7 (ионная сила 0,05). Ионную силу регулировали с помощью 1 М KNO_3 . Измерения проводились в автоматическом режиме с использованием модели общего назначения. Измерения проводились в трех повторностях.

Спектры поглощения наночастиц записывали при длинах волн от 200 до 900 нм. Наночастицы разводили в деионизированной воде до 50 мкг/мл и переносили в кварцевую кювету (длина оптического пути 1 см).

Концентрацию наночастиц измеряли с помощью гравиметрического анализа. Образец суспензии наночастиц (1 мл) добавляли в фарфоровый тигель и сушили сначала при +95 °С, а после удаления избытка воды при +140 °С до постоянной массы. Как белок, так и гемин не разлагаются при этих температурах [403].

Количество гемина, загруженного в альбуминовые наночастицы, определяли спектрофотометрически. Образцы наночастиц (100 мкл) смешивали с 900 мкл 1% раствора БСА в 1,1 М NaOH. Калибраторы гемина (100 мкл) смешивали с 900 мкл 1% раствора БСА в 1 М NaOH. Наночастицы анализировали

неразбавленными и разведенными 1:2 и 1:4 в воде. Гемин разводили в 1 М NaOH. Следовательно, конечная концентрация NaOH составляла 1 М во всех образцах. Избыток БСА добавляли к каждому образцу, чтобы устранить различия в поглощении между образцами наночастиц и калибраторами, вызванные присутствием гидролизованного БСА в первых. После 72 ч инкубации на ротационном смесителе (10 об/мин, 360 градусов) при +37 °С измеряли поглощение при 382 нм (. Поглощение нулевого калибратора (1% БСА в 1 М NaOH) вычитали из значений поглощения всех других образцов. Калибровочная кривая была получена с помощью линейного регрессионного анализа.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Раствор наночастиц в воде (1-10 мкг/мл) наносили на кремниевую подложку с помощью микропипетки и сушили при комнатной температуре в течение ночи. Образцы анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа FEI Quanta 650FEG.

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%-ного глутарового альдегида. Реакцию проводили в течение 60 мин при температуре +37 °С 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 g 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 °С на ротационном смесителе (10 об/мин, 360 градусов). 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.

Прямое обнаружение IgG с помощью наночастиц БСА/Гемин, конъюгированных с белком G. Человеческий IgG разбавляли до 10, 1 и 0,1 мкг/мл в 0,2 М карбонатном буфере, pH 9,6. БСА разбавляли до 10 мкг/мл в том же буфере. Сто микролитров этих растворов добавляли в лунки 96-луночного планшета и инкубировали при +37 °С в течение 2 часов. Далее, все этапы анализа проводили при температуре +37 °С на орбитальном шейкере (400 об/мин). Планшеты трижды промывали ФБТ (300 мкл на лунку), затем добавляли 200 мкл блокирующего раствора (ФБТ+1% казеина+1% БСА, pH 7). Через 60 мин лунки промывали и добавляли 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 (8,7 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 5; 0,3 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буфера, pH 5; 1 мл 10 мг/мл ТМБ в ДМСО; 10 мкл 30% H₂O₂) и инкубировали в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М H₂SO₄. Поглощение при 450 нм измеряли при помощи планшетного спектрофотометра.

Скрининг субстратных буферов. Человеческий IgG разводили до 1 мкг/мл в 0,2 М карбонатном буфере, pH 9,6. Сто микролитров этого раствора добавляли в лунки 96-луночного планшета. Контрольные лунки оставались пустыми. Планшеты инкубировали при температуре +37 °С в течение 2 часов. Далее, все

этапы анализа проводили при температуре +37 °С на орбитальном шейкере (400 об/мин). Лунки (как с покрытием, так и без покрытия) трижды промывали ФБТ (300 мкл на лунку), затем добавляли 200 мкл блокирующего раствора (ФБТ+1% казеин+1% БСА, рН 7). Через 60 мин лунки промывали, и 100 мкл NP20-G80 или NP10-G20, разведенных до 100 мкг/мл в блокирующем растворе, добавляли только в лунки, покрытые IgG. Планшет инкубировали в течение 60 мин и промывали. Лунки заполняли 100 мкл раствора субстрата (9 мл буфера; 1 мл 1 мг/мл ТМБ в ДМСО; 10 мкл 30% H₂O₂) и инкубировали в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М H₂SO₄. Поглощение при 450 нм измеряли при помощи планшетного спектрофотометра.

Мечение IgG флуоресцеином. Флуоресцеин изотиоцианат (FITC) разводили до 1 мг/мл в ДМСО. 100 мкл полученного раствора добавляли к 400 мкл 1 мг/мл IgG в 0,1 М карбонатном буфере, рН 9,5. Смесь выдерживали на ротационном смесителе (10 об/мин, 360 градусов) в течение 2 часов при комнатной температуре в темноте. Несвязанные молекулы FITC удаляли диализом по сравнению с ФБ с использованием диализных кассет Slide-A-Lyzer.

Количественное определение связывания IgG наночастицами БСА/Гемин, конъюгированными с белком G. Наночастицы и IgG-FITC разбавляли до 80 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно в ФБТ. Полученные растворы смешивали 1:1 в общем объеме 400 мкл и выдерживали на ротационном смесителе в течение 1 часа при температуре +37 °С в темной комнате. Калибраторы готовили путем разведения IgG-FITC в том же буфере. Наночастицы удаляли центрифугированием (20000 g, 60 мин); в черные 96-луночные планшеты добавляли 100 мкл супернатантов и калибраторов, после чего измеряли флуоресценцию (480/512 нм) с помощью планшетного ридера.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Гели готовили с использованием 0,1 М буфера ТРИС-НСl, рН 8,8, который содержал 0,1% SDS. В качестве электродного буфера использовали ТРИС-глициновый буфер рН ~ 8,3. Электрофорез проводили без использования концентрирующего геля. Толщина геля составляла 0,75 мм. Образцы смешивали с буфером для образцов (10% SDS,

0,1 М ЭДТА, 50% глицерина, 0,5 М ТРИС, 0,1% бромфеноловый синий, с 5% бета-меркаптоэтанолом или без него) 5:1, 10 мкл смеси наносили на гель. В некоторых экспериментах образцы нагревали при температуре +95 °С перед нанесением на гель. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 200 В. Гели окрашивали в течение 60 мин Кумасси синим G-250, а затем промывали фиксирующим раствором (20% метанол, 7,5% уксусная кислота). Окрашенные гели фотографировали с помощью смартфона. Фотографии обрезали. Каких-либо иных манипуляций с цветом или контрастностью не производили.

Иммуноанализ противостолбнячных IgG. Столбнячный анатоксин разводили до 2 мкг/мл в 0,2 М карбонатном буфере, рН 9,6. Сто микролитров этого раствора добавляли в лунки 96-луночного планшета. Планшеты инкубировали при температуре +37 °С 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, рН 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, рН 4 или цитратно-фосфатного буфера, рН 4; 1 мл 1 мг/мл ТМБ в ДМСО; 10 мкл 30% H₂O₂) и инкубировали в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М H₂SO₄. Поглощение при 450 нм измеряли с помощью планшетного спектрофотометра.

2.4 – Синтез диагностических реагентов на основе белковых наночастиц, нагруженных берлинской лазурью

Синтез нанозимов берлинской лазури. Мы приготовили 100 мл растворов 50 мМ FeCl₃ и 50 мМ K₄[Fe(CN)₆]. Оба раствора нагревали до +55 °С. Растворы смешивали путем быстрого добавления K₄[Fe(CN)₆] в FeCl₃ при перемешивании

при 700 об/мин на магнитной мешалке. После смешивания температуру смеси поддерживали на уровне +55 °С 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 °С (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 °С.

Контрольные наночастицы (БСА НЧ) получали без добавления нанозимов тем же способом.

Характеризация наночастиц БЛ@БСА. Концентрация. Концентрацию наночастиц определяли методом гравиметрического анализа. Один миллилитр суспензии наночастиц добавляли в фарфоровые тигли и сушили до постоянной массы при +140 °С (воду предварительно выпаривали при +95 °С). Для каждого образца были сделаны три повторности.

Размер. Гидродинамический диаметр (Dh) и индекс полидисперсности (ИП) измеряли методом динамического рассеяния света (ДРС). Наночастицы разводили до 10 мкг/мл в деионизированной воде. Для каждого образца были сделаны три повторности.

Дзета-потенциал. Дзета-потенциал измеряли с помощью метода МЗ-PALS. Образцы разбавляли до 50 мкг/мл в 10 мМ фосфатном буфере, рН 7, и анализировали в автоматическом режиме. Для каждого образца были сделаны три повторности.

Спектры поглощения. Наночастицы разводили до 400 мкг/мл в деионизированной воде и переносили в кварцевую кювету (длина оптического пути 1 см). Измеряли поглощение при 200-1000 нм.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) и элементный анализ. Водный раствор наночастиц (1-10 мкг/мл) наносили на кремниевую подложку и сушили при комнатной температуре. Образцы анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа FEI Quanta 650FEG.

Эффективность загрузки нанозимов берлинской лазури. Калибраторы готовили путем добавления 100 мкл водного раствора нанозима к 900 мкл 5 мг/мл БСА в Н₂О. Полученные растворы содержали 5, 10, 20, 40 и 80 мкг/мл наночастиц. Наночастицы БЛ@БСА разводили 1:10 (БСА НЧ; БЛ@БСА1; и БЛ@БСА2), 1:20 (БЛ@БСА3 и БЛ@БСА4) или 1:40 (БЛ@БСА5) в 5 мг/мл БСА. К каждому образцу добавляли раствор трипсина (10 мг/мл в 1 мМ HCl) (10 мкл на 1 мл). Образцы инкубировали при +37 °С на ротационном смесителе в течение 36 ч, затем измеряли поглощение при 700 нм. Для каждого образца были сделаны три повторности.

Для расчета концентрации наночастиц в обработанных трипсином образцах использовали регрессионный анализ.

Выход синтеза, эффективность инкапсулирования и степень загрузки нанозимов были рассчитаны следующим образом:

$$\text{Выход} = \frac{\text{Масса наночастиц БЛ@БСА}}{\text{начальная масса нанозимов} + \text{начальная масса БСА}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} & \text{Эффективность инкапсулирования} \\ & = \frac{\text{Масса инкапсулированных нанозимов}}{\text{Масса инкапсулированных нанозимов} - \text{исходная масса нанозимов}} \times 100\% \end{aligned}$$

$$\text{Степень загрузки} = \frac{\text{Масса инкапсулированных нанозимов}}{\text{Масса наночастиц БЛ@БСА}}$$

Функционализация наночастиц БЛ@БСА 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 g. 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 °С 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 °С. Наночастицы промывали водой три раза, как описано выше. Концентрацию наночастиц определяли путем измерения A_{450} .

Наночастицы с присоединенными 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 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 °С 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 °С 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 °С 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 °С в течение 1 ч, затем их промывали и добавляли 100 мкл раствора субстрата (9 мл 5 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 °С добавляли 100 мкл 2 М H_2SO_4 и немедленно измеряли A_{450} .

Регуляция размеров альбуминовых наночастиц, нагруженных нанозимом. В стеклянный флакон добавляли четыре миллилитра водного раствора, содержащего 20 мг/мл БСА+2 мг/мл нанозимов или 30 мг/мл БСА+3 мг/мл нанозимов, или 40 мг/мл БСА+4 мг/мл нанозимов. По каплям добавляли 16 мл 95% этанола (4 мл/мин), при этом раствор перемешивали на магнитной мешалке (1000 об/мин). Затем в суспензию погружали термодатчик и постепенно повышали температуру до +70 °С. Нагретую суспензию перемешивали в течение

2 ч, затем охлаждали до комнатной температуры. Наночастицы собирали в центрифужные пробирки объемом 2 мл и трижды промывали деионизированной водой путем центрифугирования при 20000 g в течение 20 мин. После каждого цикла центрифугирования осадок редиспергировали ультразвуком (диаметр зонда - 3 мм, продолжительность - 15 с, мощность - около 8-9 Вт). Полученные наночастицы объединяли и хранили при +4 °С.

Оптимизация субстрата для колориметрического иммуноанализа. рН. 96-луночные планшеты заполняли 100 мкл 100 нг/мл Би-БСА в 0,1 М карбонатном буфере, рН 9,5. Планшеты выдерживали при +37 °С 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 (250 мкл; ФБТ с 1% казеина и 1% БСА). После этого планшеты инкубировали на шейкере (300 об/мин) при +37 °С в течение 60 мин и трижды промывали. В 48 из 96 лунок добавляли по 100 мкл БЛ@БСА/Стр, разбавленные блокирующим буфером до концентрации 0,1 мг/мл. Остальные 48 лунок вместо конъюгата заполняли блокирующим буфером. После 60 мин инкубации и трехкратной промывки добавляли 100 мкл раствора субстрата. Субстраты готовили путем смешивания 900 мкл 0,1 М цитратного/0,2 М фосфатного буфера (буфер Макильвена) со 100 мкл 1 мг/мл ТМБ в ДМСО и 10 мкл 30% H₂O₂. рН буфера Макильвена составлял от 2,5 до 8,0. Субстрат каждого типа добавляли в 8 лунок (4 обработанные и 4 не обработанные конъюгатом). Развитие окраски происходило в течение 30 мин, затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл 2 М H₂SO₄. После этого немедленно измеряли поглощение при 450 нм. Все этапы анализа, кроме промывки, проводили при +37 °С на шейкере (300 об/мин). В процессе адсорбции Би-БСА планшеты также не встряхивали.

Состав буфера. Сорок восемь субстратных буферов готовили из набора из 6 кислот (0,1 М уксусной, 0,1 М щавелевой, 0,1 М лимонной, 0,1 М пропионовой, 0,1 М масляной и 0,1 М муравьиной) и 8 оснований (1 М КОН, 1 М NaOH, 1 М NH₄OH, 1 М имидазол, 1 М ТРИС, 1 М HEPES, 0,1 М Na₂HPO₄ и 1 М глицин). рН всех буферов составлял 4,00±0,02. Анализ проводили, как описано в предыдущем

разделе, за исключением того, что вместо одного использовали два 96-луночных планшета. Каждый буфер добавляли в 4 лунки: 2 обрабатывали БЛ@БСА/Стр и еще 2 заполняли блокирующим раствором. Пять буферов с самым высоким усиливающим эффектом (0,1 М цитрат/1 М КОН, 0,1 М цитрат/1 М NH₄ОН, 0,1 М формиат/1 М КОН, 0,1 М формиат/1 М NH₄ОН, 0,1 М бутират/1 М NH₄ОН) вместе с буфером Макильвена, рН 4, повторно тестировали в дополнительном эксперименте следующим образом. 96-луночный планшет покрывали 1, 10, 100 и 1000 нг/мл Би-БСА в 0,1 М карбонатном буфере, рН 9,5. После блокирования добавляли 100 мкл БЛ@БСА/Стр, разбавленного блокирующим буфером до 0,1 мг/мл, на 60 мин. Затем добавляли субстраты, приготовленные с использованием вышеупомянутых буферов (четыре технических повтора для каждого субстрата). Реакцию останавливали 100 мкл 2 М серной кислоты.

2.5 – Получение и исследование свойств диагностикумов на основе нанозимов «искусственная пероксидаза»

Регулирование размера наночастиц «искусственная пероксидаза» путем изменения концентрации солей железа и H₂O₂. Метод регулирования размера наночастиц был основан на методике [176]. Синтез проводили в стеклянных флаконах объемом 10 мл при комнатной температуре. Длина магнита соответствовала диаметру дна флакона. 8,8 М раствор перекиси водорода быстро добавляли (до 2,27-176 мМ) в эквимольный водный раствор FeCl₃ и K₃[Fe(CN)₆] (1,56-25 мМ) при интенсивном перемешивании (1000 об/мин). Общий объем смеси составлял 8,9 мл. Через 60 мин суспензию разделяли на 8 частей по 1 мл, переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали при 20000 g в течение 60 мин. Темно-синий осадок трижды промывали 1 мл деионизированной воды центрифугированием при 20000 g в течение 15 мин. После окончательного центрифугирования в каждую пробирку добавляли по 100 мкл воды. Наночастицы были повторно диспергированы кратковременным воздействием ультразвука и объединены. 800 мкл полученной суспензии подвергали ультразвуковой обработке на ледяной бане (диаметр зонда - 3 мм; усиление - 60%;

продолжительность - 1 мин). Оставшиеся агрегаты удаляли центрифугированием при 1600 g в течение 5 мин. Супернатанты, содержащие наночастицы, объединяли

Размер наночастиц измеряли методом динамического рассеяния света (ДРС). Для этого наночастицы разводили в воде в соотношении 1:375.

Влияние различных факторов на размер наночастиц «искусственной пероксидазы». Синтез наночастиц берлинской лазури проводили в стеклянном стакане при интенсивном перемешивании (1000 об/мин) с контролем температуры. Длина магнита соответствовала диаметру дна стакана. В деионизированную воду добавляли 0,1 М растворы FeCl_3 и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ до 3,125 мМ, затем в зависимости от эксперимента добавляли различные химические соединения: лимонную кислоту (до 2,0-5,5 мМ), щавелевую кислоту (до 1,0-4,0 мМ), HCl (до pH 1 или 2), KOH (до pH 4) или KCl (до 0,1-3,0 М). В некоторых экспериментах соотношение FeCl_3 к $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ составляло 5:1 (15,65 мМ FeCl_3 + 3,125 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), 2:1 (6,250 мМ FeCl_3 + 3,125 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), 1:1 (3,125 мМ FeCl_3 + 3,125 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), 1:2 (3,125 мМ FeCl_3 + 6,250 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), 1:5 (3,125 мМ FeCl_3 + 15,65 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$). В экспериментах, посвященных изучению влияния температуры, раствор, содержащий 3,125 мМ растворы FeCl_3 и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, нагревали до +60 °С. Во всех других синтезах температура реакционной среды составляла +30 °С. Осаждение наночастиц берлинской лазури инициировали добавлением 8,8 М H_2O_2 (до 22 мМ). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мл.

Аликвоты объемом 500 мкл отбирали из реакционной смеси в разные моменты времени: после смешивания FeCl_3 и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, после добавления химических соединений (при необходимости), сразу после добавления H_2O_2 (0 мин), а затем через 10, 30, 60, 90, 120, 150 мин для контроля процесса образования наночастиц во время синтеза. Образовавшиеся наночастицы промывали водой центрифугированием при 20000 g и обрабатывали ультразвуком на льду в течение 60 с (диаметр зонда - 3 мм; усиление - 60%; продолжительность - 1 мин). Размер, дзета-потенциал и количество наночастиц измеряли до (образцы *in situ*) и после промывки (промытые образцы).

После 150 мин синтеза 8 мл наночастиц промывали центрифугированием при 20000 g, повторно диспергировали в 0,8 мл воды, обрабатывали ультразвуком на льду в течение 60 с (диаметр зонда - 3 мм; усиление - 60%; продолжительность - 1 мин) и центрифугировали в течение 5 мин при 1600 или 100 g для удаления крупных агрегатов. Скорость центрифугирования зависела от метода синтеза. Например, после центрифугирования при 1600 g наблюдалось осаждение наночастиц размером более 200 нм. Таким образом, суспензии наночастиц, синтезированных добавлением лимонной и щавелевой кислот, центрифугировали при 100 g. После этого были измерены размеры, дзета-потенциал и A_{700} , как описано ниже.

Получение наночастиц берлинской лазури различных размеров в 10-кратном масштабе. Наночастицы берлинской лазури были получены восстановительным (5 типов) и традиционным (3 типа) способом. Были получены три партии для каждого типа наночастиц, за исключением наночастиц T/dw/rt, для которых были приготовлены только две партии. Общее описание синтеза наночастиц приведено ниже. Подробная информация о процедуре синтеза, специфичной для каждого типа, приведена в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Детали синтеза наночастиц берлинской лазури

| Обозначение | Условия синтеза |
|-------------|--|
| R | FeCl ₃ и K ₃ [Fe(CN) ₆] – 3,125 мМ; H ₂ O ₂ – 22 мМ; +30 °С, перемешивание - 1000 об/мин, ультразвуковая обработка - 40 мин, итоговое центрифугирование при 1600 g в течение 15 мин |
| R4.5C | FeCl ₃ и K ₃ [Fe(CN) ₆] – 3,125 мМ; Лимонная кислота - 4,5 мМ; H ₂ O ₂ – 22 мМ; +30 °С, перемешивание - 1000 об/мин, ультразвуковая обработка - 60 мин, итоговое центрифугирование при 100 g в течение 5 мин |
| R2C | FeCl ₃ и K ₃ [Fe(CN) ₆] – 3,125 мМ; Лимонная кислота - 2 мМ; H ₂ O ₂ – 22 мМ; +30 °С, перемешивание - 1000 об/мин, ультразвуковая обработка - 60 мин, итоговое центрифугирование при 100 g в течение 15 мин |
| R2O | FeCl ₃ и K ₃ [Fe(CN) ₆] – 3.125 мМ; Щавелевая кислота - 2 мМ; H ₂ O ₂ – 22 мМ; +30 °С, перемешивание - 1000 об/мин, ультразвуковая обработка - 40 мин, итоговое центрифугирование при 100 g в течение 15 мин |
| RKH | FeCl ₃ и K ₃ [Fe(CN) ₆] – 3.125 мМ; HCl - 0.1 М; KCl - 0.1 М; H ₂ O ₂ – 22 мМ; +30 °С, перемешивание - 1000 об/мин, ультразвуковая обработка - 60 мин, итоговое центрифугирование при 1600 g в течение 10 мин |
| T25C | FeCl ₃ и K ₄ [Fe(CN) ₆] – 1 мМ; Лимонная кислота- 25 мМ; +55 °С, перемешивание - 1000 об/мин, ультразвуковая обработка - 30 мин, итоговое центрифугирование при 1600 g в течение 10 мин |
| T | FeCl ₃ и K ₄ [Fe(CN) ₆] – 1 мМ; +55 °С, перемешивание - 1000 об/мин, ультразвуковая обработка - 30 мин, итоговое центрифугирование при 1600 g в течение 10 мин |
| T/dw/rt | FeCl ₃ и K ₄ [Fe(CN) ₆] – 1 мМ; раствор K ₄ [Fe(CN) ₆] добавляли к FeCl ₃ по каплям со скоростью 10 мл/час; комнатная температура перемешивание - 7000 об/мин, ультразвуковая обработка - 30 мин, итоговое центрифугирование при 1600 g в течение 10 мин |

Синтез наночастиц берлинской лазури традиционным способом. Водные растворы 1 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$ и 1 мМ $FeCl_3$ предварительно нагревали до +55 °С и затем смешивали, вливая 125 мл 1 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$ в 125 мл 1 мМ $FeCl_3$ при перемешивании на магнитной мешалке. При необходимости к растворам солей железа перед их смешиванием добавляли лимонную кислоту. Конечный объем реакционной смеси составлял 250 мл. Смесь выдерживали при температуре +55 °С в течение 10 мин. Раствору давали остыть до комнатной температуры при перемешивании. $NaCl$ добавляли до 1 М к раствору наночастиц, что индуцировало их агрегацию. Наночастицы центрифугировали при 16000 g до полного осаждения; надосадочную жидкость осторожно удаляли, а осадок наночастиц повторно диспергировали в 1 М $NaCl$. Процедуру промывки повторили 3 раза. После этого темно-синий осадок повторно диспергировали в 25 мл H_2O , обрабатывали ультразвуком с 60% усилением в течение 30 мин и центрифугировали при 1600 g в течение 5-15 мин. Наночастицы диализовали в диализном мешке (10 кДа) против 2 л деионизированной воды. Воду меняли три раза. Полученные суспензии хранили при температуре +4 °С.

Получение наночастиц берлинской лазури восстановительным способом (наночастицы «искусственной пероксидазы»). В деионизированную воду добавляли 0,1 М растворы $FeCl_3$ и $K_3[Fe(CN)_6]$ до 3,125 мМ. Затем добавляли лимонную, щавелевую кислоты, HCl и KCl (в зависимости от способа синтеза) до требуемой концентрации. Осаждение наночастиц берлинской лазури инициировали добавлением H_2O_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 H_2O путем встряхивания на вортексе. Наночастицы промывали 3 раза. После этого их повторно диспергировали в 25 мл H_2O , обрабатывали ультразвуком (зонд 6 мм, усиление 60%) и центрифугировали. Полученные суспензии хранили при температуре +4 °С

Получение конъюгатов наночастиц берлинской лазури с моноклональным антителом против ПСА, белка G и бычьего сывороточного альбумина. 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 °С 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 °С 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 центрировали 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/Gel 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 °С. Глицин добавляли до 0,1 М для гашения непрореагировавших карбонильных групп, и смесь инкубировали при +37 °С еще два часа. Наночастицы промывали водой, как описано выше. После окончательной промывки наночастицы повторно

диспергировали в H_2O при помощи ультразвука (диаметр зонда - 3 мм; усиление - 60%, продолжительность - 30 с). Конъюгаты хранили при температуре +4 °С.

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, pH 9,6. Планшеты выдерживали при температуре +4 °С в течение ночи. Планшеты трижды промывали 300 мкл натрий-фосфатного буфера с 0,1% Твин-20, pH 7 (ФБТ), а затем добавляли 250 мкл блокирующего буфера (ФБТ + 2% казеина + 1% БСА, pH 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_2O_2). 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 °С (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 (pH 9,6). Планшеты выдерживали при температуре +4 °С в течение ночи. Планшеты трижды промывали 300 мкл натрий-фосфатного буфера с 0,1% Твин-20, pH 7 (ФБТ), а затем добавляли 250 мкл блокирующего буфера (ФБТ + 2% казеина + 1% БСА, pH 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% H₂O₂). 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 °С (скорость перемешивания - 300 об/мин).

Калибровочная кривая была подогнана к четырехпараметровой логистической модели (использовалась схема взвешивания 1/Y²). Общее уравнение логистической функции имеет вид:

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ

В ГЛАВЕ 2

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

1. Khramtsov P. 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.
2. Khramtsov P. 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. – Р. 3831-3842.

3. 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.
4. Khramtsov P. 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.
5. Khramtsov P. 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.
6. Храмцов П.В. разработка иммуносорбента для твёрдофазного ЯМР-анализа / П.В. Храмцов, М.Д. Кропанева, М.С. Бочкова, В.П. Тимганова, С.А. Заморина, М.Б. Раев // Доклады Академии наук. – 2019. – Т. 484. – С. 69-72.
7. Khramtsov P. 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. – P. 1345.
8. Khramtsov P. 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.
9. Khramtsov, P. 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. – P. 120422.
10. Khramtsov, P. Modified desolvation method enables simple one-step synthesis of gelatin nanoparticles from different gelatin types with any bloom values /

M. Bochkova, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev, O. Burdina, S. Lazarev, A. Novokshonova, D. Kiselkov, A. Minin // *Pharmaceutics*. – 2021. – Т. 13, № 10 – P. 1537

11. Khramtsov, P. 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.

12. Khramtsov P. 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. – P. e202103892.

13. Khramtsov P. 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. – P. 1630.

14. Khramtsov P. 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. – P. 29.

15. Кропанева М. 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.

Патенты

16. Патент РФ № 2691753. Магнитная система для спектроскопии ядерного магнитного резонанса. (Бюл. № 10, 2019 г.). Авторы: А.А. Мысик, И.В. Бызов, М.А. Уймин, А.Е. Ермаков, М.Б. Раев, П.В. Храмцов

17. Патент РФ № 2684325. Способ получения конъюгата на основе магнитных металл - углеродных наночастиц, пригодного для диагностических и аналитических целей, с использованием ЯМР - релаксометрии в качестве метода

детекции. (Бюл. № 10, 2019 г.). Авторы: Раев М.Б., Кропанева М.Д., Храмцов П.В. Бочкова М.С., Тимганова В.П., Заморина С.А.

18. Патент РФ № 2743426. Способ определения биологических макромолекул на основе ЯМР-релаксометрии. (Бюл. № 5, 2021 г.). Авторы: Раев М.Б., Кропанева М.Д., Храмцов П.В., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Заморина С.А.

19. Патент РФ № 2751885. Способ синтеза желатиновых наночастиц. (Бюл. № 20, 2021 г.). Автор: Храмцов П.В.

ГЛАВА 3 – ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ЯМР-ИММУНОАНАЛИЗА НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ, ПОКРЫТЫХ РАЗЛИЧНЫМИ БЕЛКАМИ

3.1 – Оптимизация иммунодиагностикомов на основе магнитных наночастиц

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 нашей работе (как в этой главе, так и в последующих), большое внимание было уделено детальной характеристике физико-химических свойств разрабатываемых диагностических реагентов. Всестороннее понимание свойств диагностикомов 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 [165], полученные наночастицы (Fe@C-NH₂) 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 в этой главе, 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-NH₂ (формирование нанокластеров) и стабилизация нанокластеров молекулами белка (Fe@C-NH₂/Белок). Сформированный поверхностный белковый слой сшивали глутаровым альдегидом, а затем с нанокластерами конъюгировали распознающие молекулы: стрептавидин (Fe@C-NH₂/Белок/Стр) или белок G (Fe@C-NH₂/Белок/G) посредством реакции первичных аминов с карбонильными группами (Рисунок 3.1). Следует отметить, что сшивание предотвращает разрушение нанокластеров, вследствие чего их размер зависит только от условий в которых происходило смешивание аминированных наночастиц с белком.

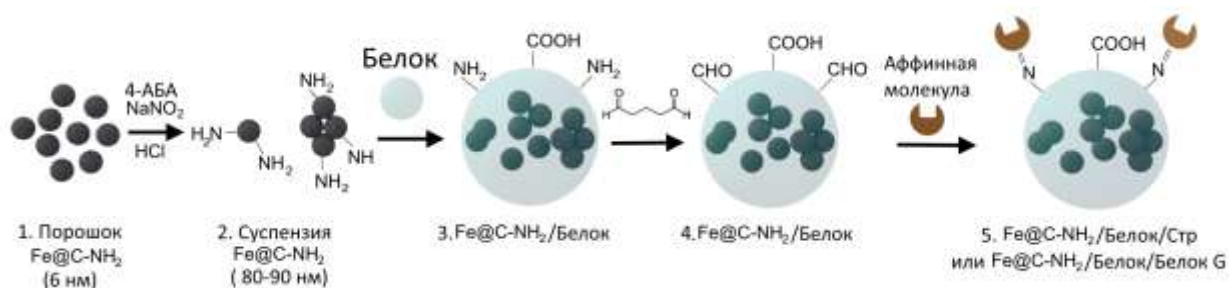


Рисунок 3.1 – Схема функционализации наночастиц. 4-АБА – 4-аминобензиламин

Изменения pH могут быть применены для настройки размера нанокластеров, покрытых БСА [165]. На первом этапе исследования мы оценивали влияние условий нанесения покрытия (pH, ионной силы, массового отношения белка к наночастицам и времени обработки ультразвуком) на взаимодействие между различными белками (казеином, БСА и желатином) и Fe@C-NH₂ для получения нанокластеров с белковым покрытием желаемого размера. Аминированные наночастицы покрывали белками при различных условиях: pH от 4 до 9, ионная сила от 0,01 до 0,5 и массовое соотношение белка

и наночастиц от 10:1 до 1,25:1. Размер нанокластеров измеряли в после сшивания белкового слоя глутаровым альдегидом.

В наших экспериментах размер нанокластеров был результатом соотношения интенсивностей двух процессов: агрегации Fe@C-NH₂ при pH > 4 и стабилизации белком агрегатов Fe@C-NH₂. Fe@C-NH₂ стабильны при pH 4 [165] и медленно агрегируют при pH 5 и 9, в то время как при pH 6-8 происходит быстрая агрегация. Как правило, небольшое увеличение размера наблюдалось при нанесении покрытия при pH 6-8; этот эффект был более выражен для желатина В. При высокой ионной силе только самые большие соотношения масс белка и наночастиц обеспечивали стабильность нанокомпозитов при смешивании при pH от 6 до 8. Увеличение ионной силы приводило к общему росту размера и полидисперсности нанокластеров. Интересно, что по сравнению с БСА и особенно казеином желатиновое покрытие эффективно стабилизировало нанокластеры даже при самой высокой концентрации соли без резкого увеличения среднего диаметра. В целом, уменьшение отношения массы белка к наночастицам приводило к увеличению нанокластеров, особенно при использовании БСА. Известно, что силы ван-дер-Ваальса, водородные связи, кулоновские силы и гидрофобные взаимодействия являются основными движущими механизмами адсорбции белка на наночастицах [198]. По-видимому, кулоновские силы играют доминирующую роль в стабилизации Fe@C-NH₂ казеином, поскольку этот белок обеспечивает хорошую стабильность в растворах с более низкими концентрациями солей. Напротив, гидрофобные взаимодействия преобладают в случае желатина В. Желатин А показал плохую способность стабилизировать аминированные наночастицы даже при самой низкой ионной силе. Поэтому среды с более высокими концентрациями солей мы не тестировали.

Интенсивность обработки ультразвуком - еще один параметр, который можно использовать для управления размером наночастиц, покрытых белком [299]. Длительное воздействие ультразвуком позволяло уменьшить размер частиц и полидисперсность в два раза.

В дальнейших экспериментах мы подобрали условия синтеза, позволяющие получить покрытые белком магнитные нанокластеры различных размеров, чтобы исследовать их стабильность, и функциональную активность в твердофазном ЯМР-иммуноанализе. В качестве модели мы использовали простую и надежную биотин-стрептавидиновую систему, широко используемую в иммунохимии при оптимизации условий анализа и реагентов, а также для усиления сигнала в ИФА и иммуноблоттинге. Стрептавидин конъюгировали с магнитными метками (нанокластерами), а биотинилированный БСА иммобилизовали на нитроцеллюлозных тест полосках в разных концентрациях.

Необходимо отдельно выделить еще одно свойство диагностических реагентов, которые мы оценивали, а именно релаксивность (сокращенно « r_2 »). Релаксивность – это способность наночастиц изменять время релаксации протонов, а значит генерировать аналитический сигнал в ЯМР-иммуноанализе. Чем выше релаксивность наночастиц, тем ниже предел детекции анализа. В этой связи одной из наших задач было добиться как можно большей релаксивности наноконъюгатов.

Для различных аспектов иммуноанализов может иметь решающее значение размер магнитных наночастиц, который влияет на их релаксивность r_2 и другие функциональные особенности, важные для использования в качестве меток в иммуноанализе. [402]. Ван с соавт. продемонстрировали, что скорость миграции магнитных наночастиц внутри пористой тест-полоски иммунохроматографически аранжированного анализа зависит от их диаметра и, в свою очередь, оказывает существенное влияние на продолжительность и чувствительность анализа [358]. Магнитные наночастицы меньшего размера обеспечивают более эффективное преданалитическое обогащение образцов с помощью магнитного поля [143]. В то же время, применение более крупных наночастиц и даже микрочастиц в гомогенных ЯМР-сенсорах может улучшить нижний предел обнаружения [174].

Мы синтезировали нанокластеры железоуглеродных магнитных наночастиц, покрытых казеином, БСА и желатином В и конъюгированных со стрептавидином. Для каждого типа покрытия были получены три группы

конъюгатов: “маленькие”, “средние” и “большие”. Следует отметить, что размер каждой группы зависел от типа покрытия, например, мы не смогли получить частицы Fe@C-NH₂/Желатин В/Стр диаметром менее 140 нм; в то же время нанокластеры размером 100-110 нм можно легко синтезировать при использовании альбуминового покрытия. Несмотря на разницу в абсолютных диаметрах, оба конъюгата были обозначены как “маленькие”. Кроме того, для всех групп использовали различные соотношения стрептавидина к наночастицам: от 10:1 до 160:1 (мкг:мг), и в общей сложности было получено 45 конъюгатов. Основные характеристики конъюгатов приведены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 - Свойства конъюгатов, синтезированных в ходе экспериментов по контролю размеров

| Покрытие | Fe@C-NH ₂ /БСА/Стр | | | Fe@C-NH ₂ /Казеин/Стр | | | Fe@C-NH ₂ /Желатин В/Стр | | |
|--|-------------------------------|-------------|-------------|----------------------------------|-------------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| | «Малые» | «Средние» | «Большие» | «Малые» | «Средние» | «Большие» | «Малые» | «Средние» | «Большие» |
| Группа | | | | | | | | | |
| D _h , нм | 114-121 | 172-186 | 211-233 | 114-131 | 194-198 | 235-274 | 142-160 | 212-243 | 279-309 |
| ИП | 0.188-0.208 | 0.158-0.175 | 0.247-0.258 | 0.178-0.201 | 0.132-0.169 | 0.202-0.243 | 0.211-0.248 | 0.200-0.260 | 0.227-0.257 |
| Дзета-потенциал, мВ | -24... -25 | -23... -25 | -24... -25 | -25... -27 | -25... -26 | -24... -26 | -10... -12 | -9... -10 | -9... -10 |
| Релаксивность, I/мм ² × с ⁻¹ | 234-265 | 262-322 | 186-230 | 310-354 | 318-340 | 303-345 | 266-306 | 296-377 | 282-324 |

Примечание: агрегация наблюдалась в образце Fe@C-NH₂/Желатин В/Стр, синтезированных при соотношении стрептавидина к нанокластерам 10:1, в связи с чем данные для этого образца не учитывались

Размер $\text{Fe@C-NH}_2/\text{Белок/Стр}$ измеряли с помощью ДРС. Миграцию нанокластеров в агарозном геле использовали как дополнительный метод характеристики их размеров. Подвижность нанокластеров в геле агарозы зависит от их размера и дзета-потенциала; характер миграции нанокластеров подтвердил результаты ДРС: нанокластеры, покрытые казеином и БСА, с самыми высокими дзета-потенциалами перемещаются в сторону положительного электрода. “Крупные” нанокластеры с трудом проникали в гель даже через 30 мин после начала анализа.

Функциональную активность каждого конъюгата $\text{Fe@C-NH}_2/\text{Белок/Стр}$ исследовали с помощью модельного твердофазного ЯМР-анализа. Осуществляли прямое определение Би-БСА на нитроцеллюлозных тест-полосках. На тест-полоски сорбировали Би-БСА в 10-кратных разведениях, затем добавляли разбавленные конъюгаты и измеряли время релаксации в зависимости от количества нанокластеров, связавшихся с нитроцеллюлозой в области сорбции Би-БСА. По результатам эксперимента, мы подтвердили способность нанокластеров взаимодействовать с биотинилированной мишенью и их применимость в ЯМР-анализе. Для всех нанокластеров были получены практически идентичные калибровочные кривые.

Из литературы известно, что белковое покрытие магнитных наночастиц может повысить их релаксивность r_2 , а значит и усилить сигнал в иммуноанализе [402]. Ранее этот эффект был продемонстрирован для казеина [54] и БСА [270, 304]. В связи с этим, мы сравнили релаксивность r_2 наночастиц $\text{Fe@C-NH}_2/\text{Белок/Стр}$ разных размеров. Значения релаксивности $\text{Fe@C-NH}_2/\text{Казеин/Стр}$ и $\text{Fe@C-NH}_2/\text{Желатин В/Стр}$ не зависят от их размера и выше по сравнению с $\text{Fe@C-NH}_2/\text{БСА/Стр}$ (Рисунок 3.2). Более того, релаксивность r_2 $\text{Fe@C-NH}_2/\text{БСА/Стр}$ была даже ниже, чем у исходного Fe@C-NH_2 . Мы предположили, что различия в структуре нанокластеров $\text{Fe@C-NH}_2/\text{Белок/Стр}$ могут быть причиной различий в их значениях релаксивности r_2 . Исследование $\text{Fe@C-NH}_2/\text{Белок/Стр}$ с помощью просвечивающей электронной микроскопии показало,

что отдельные частицы Fe@C-NH₂ распределены более равномерно (Рисунок 3.3А) в Fe@C-NH₂/Казеин/Стр по сравнению с Fe@C-NH₂/Желатин В/Стр (Рисунок 3.3В) и особенно Fe@C-NH₂/БСА/Стр (Рисунок 3.3Б). Мы предполагаем, что равномерность распределения наночастиц Fe@C-NH₂ внутри нанокластера, а не размер нанокластера Fe@C-NH₂/Белок/Стр, влияет на релаксивность r_2 нанокластеров. Роса с соавт. [290] отметили, что влияние магнитных наночастиц на скорость релаксации протонов определяется не только свойствами отдельной частицы (намагниченность насыщения, размер наночастиц), но и тем, как магнитные наночастицы распределены внутри их агломерата.

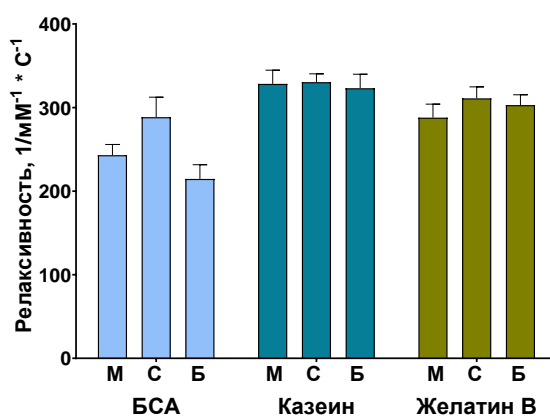


Рисунок 3.2 – Релаксивность нанокластеров разного размера с различным покрытием, $n = 5$, среднее \pm станд. отклонение. Буквы “М”, “С” и “Б” обозначают “малые”, “средние” и “большие” нанокластеры, соответственно; r_2 релаксивность исходных частиц Fe@C-NH₂ составляла 285 1/mM⁻¹ × s⁻¹. Конъюгат Fe@C-NH₂/Желатин В/Стр с наибольшей релаксивностью был исключен из анализа.

Таким образом, распределение наночастиц Fe@C-NH₂ в белковой матрице влияет на релаксивность нанокластеров Fe@C-NH₂/Белок/Стр. Равномерность распределения, в свою очередь, зависит от природы белка и процедуры синтеза Fe@C-NH₂/Белок/Стр. Следует отметить, что, несмотря на то, что Fe@C-NH₂/Белок/Стр из каждой размерной группы (“маленькие”, “средние” и “большие”) готовили с использованием одной и той же партии Fe@C-NH₂/Белок,

результатирующая релаксивность значительно различалась между конъюгатами из групп одинакового размера (таблица 3.1). Это отражает значительное влияние вариабельности процедуры синтеза на релаксивность. Дальнейшее повышение релаксационных характеристик может быть достигнуто путем выбора таких условий синтеза, которые обеспечивают равномерное распределение отдельных наночастиц в белковой оболочке и предотвращают образование их агрегатов. Следует подчеркнуть, что релаксивность синтезированных наноконъюгатов сравнима с релаксивностью МРТ-контрастов на основе оксидов железа [396].

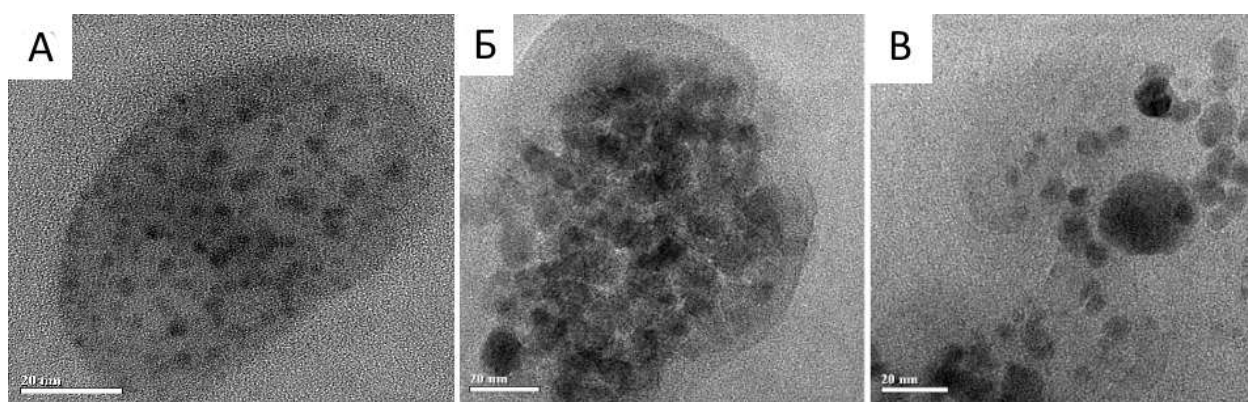


Рисунок 3.3 – ПЭМ-микрофотографии нанокластеров Fe@C-NH₂/Казеин/Стр (А), Fe@C-NH₂/БСА/Стр (Б), Fe@C-NH₂/Желатин В/Стр (В). Линейка – 20 нм.

Структуру и морфологию нанокластеров оценивали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) и ПЭМ. Как показано на Рисунок 3.4А–Г, Fe@C-NH₂/Белок/Стр имеют почти сферическую форму. Мы не оценивали средний размер конъюгатов с помощью микроскопии, поскольку во время подготовки образца наблюдалось образование агрегатов.

Присутствие белка в составе Fe@C-NH₂/Белок/Стр и Fe@C-NH₂/Белок/Белок G было подтверждено различными методами. При помощи УФ-вид спектроскопии мы наблюдали выраженный пик поглощения при 190-250 нм, указывающий на успешную функционализацию (Рисунок 3.4Д-З). Более того, изменения электрофоретической подвижности и коллоидной стабильности при различных значениях рН (Рисунок 3.4К) также доказывают наличие белкового

покрытия. Fe@C оседают при pH 4 и 7, Fe@C-NH₂ стабильны при pH 4 из-за электростатического отталкивания между протонированными аминогруппами, но агрегируют при pH 7. Нанокластеры, покрытые желатином, стабильны как при pH 4, так и при pH 7, и это противоположно поведению нанокластеров, покрытых казеином и БСА, размер которых остается неизменным при pH 7, но медленно растет при pH 4.

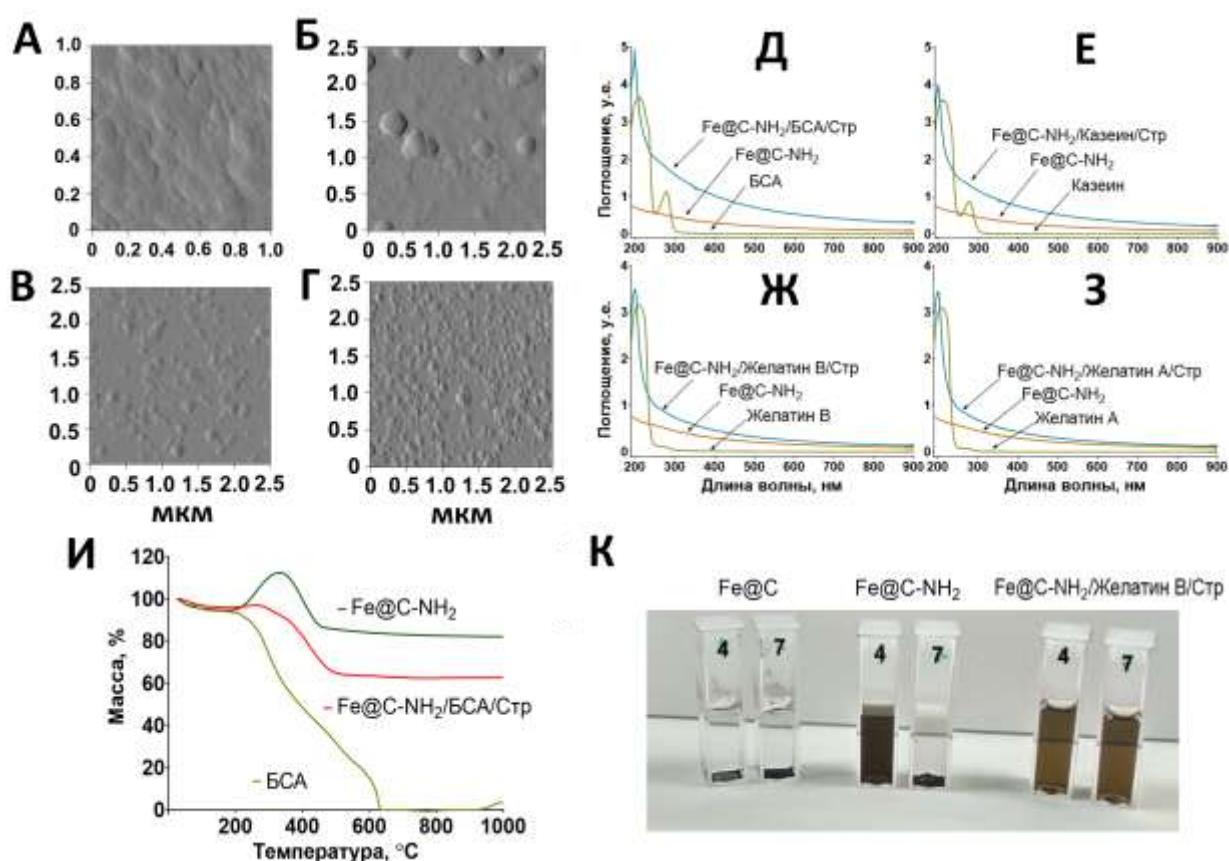


Рисунок 3.4 – Свойства нанокластеров, покрытых разными белками. Слева вверху: АСМ-микротографии нанокластеров: (А) БСА, (Б) казеин, (В) желатин А и (Г) желатин В; слева внизу: (И) термогравиметрический анализ Fe@C-NH₂, БСА и Fe@C-NH₂/БСА/Стр в воздушной атмосфере; справа вверху: УФ-Вид спектры Fe@C-NH₂, Fe@C-NH₂/Белок/Стр и белков: (Д) БСА, (Е) казеин, (Ж) Желатин В и (З) желатин А; справа внизу: (К) стабильность Fe@C, Fe@C-NH₂, Fe@C-NH₂/Желатин В/Стр в буферах с pH 4 и 7.

Термогравиметрический анализ (ТГА) использовали для определения концентрации железа в Fe@C-NH₂ и подтверждения наличия белкового покрытия. Кривые ТГА для Fe@C-NH₂, БСА и Fe@C-NH₂/БСА/Стр (Рисунок 3.4И) показали, что при температуре ниже +180 °С потеря веса всех образцов была довольно небольшой (5-7%) из-за удаления физически и химически адсорбированной воды. В диапазоне от +190 до +330 °С кривая ТГА Fe@C-NH₂ демонстрирует постепенное увеличение массы. Это увеличение массы связано с окислением железных ядер. Данные также указывают на то, что наночастицы Fe@C стабильны при температуре ниже +190 °С на воздухе. Из данных ТГА мы вычислили, что концентрация магнитного железа в образце Fe@C-NH₂ составляет 68,1 мас.%. В отличие от Fe@C-NH₂, при анализе нанокластеров Fe@C-NH₂/БСА/Стр не наблюдалось увеличения массы, очевидно, из-за присутствия белкового покрытия. Полное разложение БСА происходило в диапазоне от +200 до +640 °С, и только Fe₂O₃ оставался в тигле после +650 °С. Мы рассчитали, что концентрации железа и БСА в нанокластерах Fe@C-NH₂/БСА/Стр составили 45,7 и 31,5 мас.% соответственно.

Коллоидная стабильность магнитных дианоцикумов при повышенных температурах имеет важное значение для применения в новейших методах иммуноанализа и молекулярной диагностики. Например, в анализах, в которых усиление сигнала основано на изотермической амплификации ДНК (например, петлевой изотермической амплификации или амплификации методом катящегося кольца) [340] или ПЦР [149], когда реакционные смеси необходимо нагревать до +95 °С. Агрегация наночастиц может отрицательно повлиять на эффективность анализа. Мы проверили, как нагревание влияет на размер нанокластеров, покрытых белком. Как правило, взаимодействие с наночастицами и межмолекулярная ковалентная сшивка повышают термостабильность белков [24, 36], и наоборот, белковые покрытия могут защищать наночастицы от агрегации, вызванной нагреванием [34].

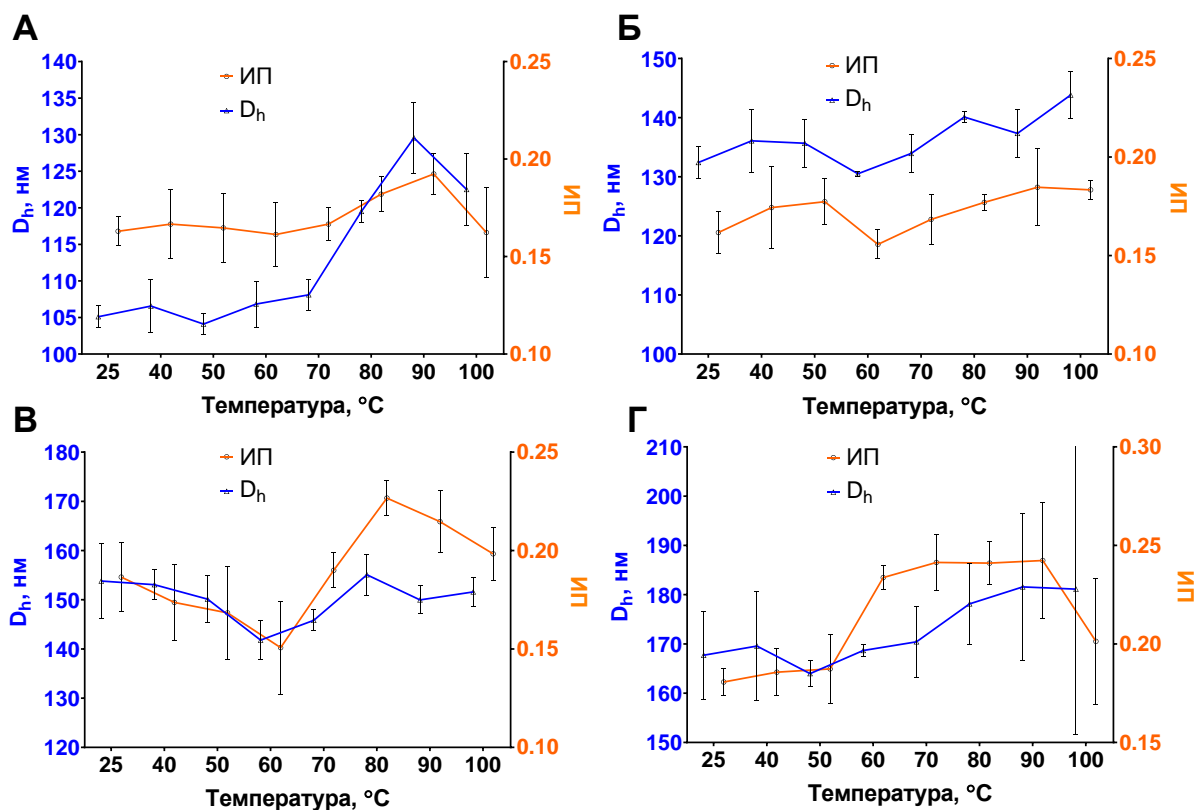


Рисунок 3.5 – Термостабильность наночастиц. А – Fe@C-NH₂/Казеин/Белок G; Б – Fe@C-NH₂/Казеин/Белок G; В – Fe@C-NH₂/Желатин В/Белок G; Г – Fe@C-NH₂/Желатин А/Белок G. Синяя – гидродинамический диаметр (D_h); оранжевая линия – индекс полидисперсности (ИП), $n = 3$, среднее \pm стандартное отклонение.

Размер Fe@C-NH₂/БСА/Белок G не изменялся вплоть до температуры +80 °C; при повышении температуры от +80 до +100 °C диаметр наночастиц резко увеличился (Рисунок 3.5). Между тем диаметр Fe@C-NH₂/Казеин/Белок G постепенно увеличивался с 132 до 144 нм, но показатели полидисперсности обоих конъюгатов не превышали 0,2, что отражает их хорошую термостабильность. Согласно [250], необратимая тепловая денатурация БСА начинается при +50 °C и становится более выраженной с повышением температуры; напротив, казеин является изначально неструктурированным белком с лучшей термостабильностью [345]. Эти различия могут объяснить поведение нанокластеров при нагревании. Гидродинамический диаметр нанокластеров, покрытых желатином В,

существенно не изменился, однако индекс полидисперсности увеличивался при температурах +70 °С и выше. Увеличение полидисперсности Fe@C-NH₂/Желатин А/Белок G происходило при +60°C и выше. Эти данные согласуются с выводами Bigi с соавт., продемонстрировавшими денатурацию желатиновых гелей, сшитых глутаровым альдегидом, при +70 °С [24]. В целом, термическая стабильность нанокластеров, покрытых белком, подходит для применения в гомогенных анализах, которые требуют нагрева. Судя по полученным данным увеличение размера наночастиц на 10-30 нм не должно существенно влиять на отношение их суммарной поверхности к объему и релаксированность, особенно для казеиновых и желатиновых покрытий.

Наноразмерные реагенты для иммунодиагностики должны быть устойчивы к агрегации в растворах с нейтральным и близким к нейтральному рН, для чтобы быть пригодными для большинства биоаналитических применений. Кроме того, может быть необходима устойчивость наночастиц при экстремальных значениях рН или ионной силы, по крайней мере, кратковременная (например, при ковалентном конъюгировании с аффинными соединениями). В ходе проведения исследования мы сравнивали гидродинамический диаметр и полидисперсность магнитных нанокластеров, покрытых БСА, казеином и желатинами А и В, после 1 и 24 ч инкубации в буферах с рН 4-10 и ионной силой от 0,15 до 2 М. Были использованы два различных метода: динамическое рассеяние света и T₂-релаксометрия. Последний чувствителен к размеру магнитных нанокластеров, поскольку их агрегация приводит к росту T₂. Этот метод является полуколичественным, а не количественным, и был применен только для верификации результатов, полученных с помощью ДРС.

Наночастицы, покрытые БСА и казеином, были стабильны в растворах с рН 6-10, когда ионная сила не превышала 0,5 М; однако при рН 6 наблюдалась агрегация в 2 М ФБ. Небольшое увеличение размера нанокластеров, покрытых казеином, можно наблюдать после 24 ч инкубации. Этот рост был более заметен в 2 М растворах, где увеличение нанокластеров происходило даже при щелочном рН. Важно отметить, что через 24 часа не наблюдалось значительной агрегации

нанокластеров, покрытых желатином, вне зависимости от pH и ионной силы. Мы должны подчеркнуть довольно низкую воспроизводимость измерений ДРС. Для каждого образца были подготовлены три технические повторности, и в некоторых случаях наблюдалось значительное расхождение между ними. Повторные измерения в одной и той же кювете иногда давали противоположные результаты (низкая/высокая полидисперсность). Более того, иногда при повторных измерениях одного и того же образца после 24 ч инкубации наблюдалось резкое уменьшение размера и полидисперсности, что едва ли возможно. По этим причинам мы исключили невоспроизводимые результаты из анализа, использованного для построения графиков (Рисунок 3.6). Кроме того, кратковременную стабильность конъюгатов в тех же условиях оценивали с помощью T2-релаксометрии (Рисунок 3.7). Результаты измерений T2 подтвердили предыдущие выводы. Значительное увеличение T2 наблюдалось после инкубации Fe@C-NH₂, покрытых БСА и казеином, в буферах с кислым pH. Увеличение T2 для нанокластеров, покрытых казеином, через 24 ч было более заметным, чем для Fe@C-NH₂/БСА/Белок G, особенно в растворах с ионной силой выше 0,5 М. Интересно, что небольшое увеличение T2 было обнаружено для нанокластеров, покрытых желатином, разведенных в буферах с pH 4 и ионной силой 0,15 и 0,5 М, но не 2 М. Некоторая степень агрегации нанокластеров, покрытых желатинами А и В, вероятно, имеет место при этом pH, но мы не выявили ее с помощью ДРС.

Наши наблюдения противоречат выводам [142], которые продемонстрировали агрегацию желатиновых наночастиц, сшитого глутаровым альдегидом, при pH 5. В то же время Gaihre с соавт. [90] и Sivera с соавт. [316] получили суспензии наночастиц, соответственно, Fe₃O₄ и Ag, покрытых желатином, которые были стабильны в диапазоне pH 2-12. Gaihre с соавт. синтезировали наночастицы оксида железа, покрытые желатином А и желатином В, которые были стабильны при pH 4-8. Небольшое осаждение наблюдалось для наночастиц, инкапсулированных в желатин В, но не в желатин А, при ионной силе выше 0,1. Этот результат был объяснен более заметным высаливанием

первых, вызванным большим количеством желатина В, адсорбированного на наночастицах оксида железа [89]. Кроме того, покрытие желатином А предотвращало агрегацию золотых наночастиц при высокой ионной силе [328].

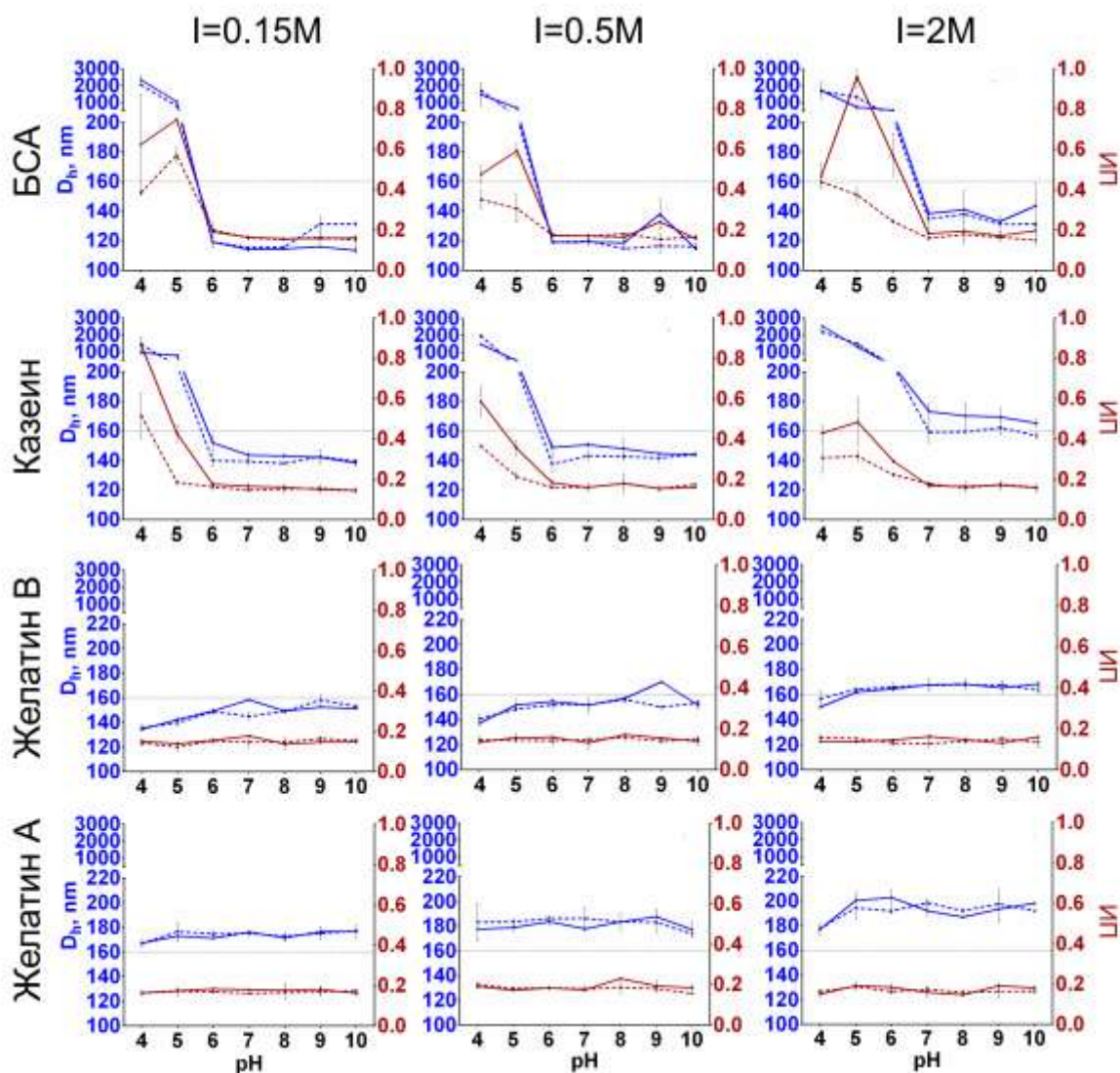


Рисунок 3.6 – Коллоидная стабильность Fe@C-NH₂/Белок/Белок G в буферах с различными значениями pH и ионной силы. Значения ионной силы указаны вверху рисунка. «БСА», «Казеин», «Желатин А» и «Желатин В» обозначают покрывающий белок. Синяя линия — гидродинамический диаметр в 0 (штриховая линия) и 24 ч (сплошная линия); красная линия — индекс полидисперсности в 0 (штриховая линия) и через 24 ч (сплошная линия), n = 3, среднее значение ± стандартное отклонение.

Несколько исследовательских групп также изучали стабильность наночастиц, функционализированных казеином и БСА. Инкапсулированные в казеин наночастицы оксида железа были стабильны при pH 2-8, за исключением

pH 4 [138]. Наночастицы, покрытые казеином, были стабильны при ионной силе 0-200 мМ и pH 2-9. Однако наблюдалось увеличение диаметра при pH 4 и 5 [6]. Интенсивная агрегация серебряных наночастиц, покрытых казеином, наблюдалась при pH ниже изоэлектрической точки казеина, но не при pH 8-13; в то время как при pH ниже 8 наблюдалась лишь незначительная агрегация. Концентрация NaCl вплоть до 0,5 М не вызывали изменения их размера [12]. Композиты из квантовых точек и магнитных наночастиц, покрытые БСА, были стабильны при ионной силе до 0,5 М и при pH 5-13, но агрегировали при pH 3 и 4 [79]. Zhang с соавт. продемонстрировали хорошую стабильность квантовых точек, покрытых БСА, при ионной силе до 2 М и при pH в диапазоне от 2-12 с небольшой агрегацией при pH 5,6 и 6,1 [395]. Магнитные наночастицы, покрытые БСА, были стабильны при pH 4-13, за исключением pH 5,6, и при ионной силе от 10 мМ до 1 М [356]. Наночастицы золота с оболочкой из БСА также были стабильны при pH 1,5–10, за исключением pH около 4,5–5 [327].

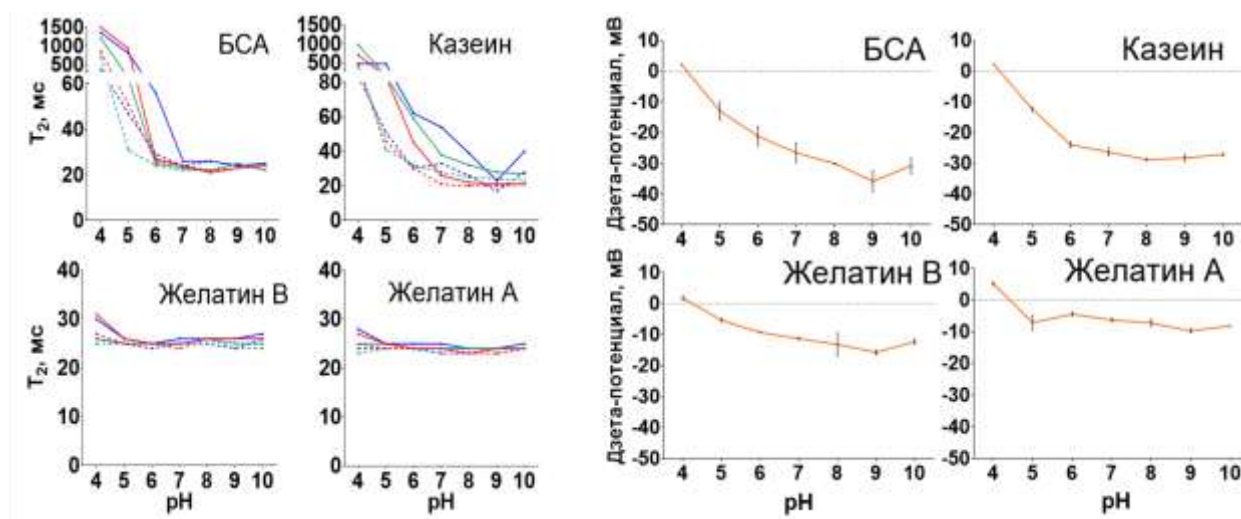


Рисунок 3.7 – Время релаксации T_2 Fe@C-NH₂/Белок/Белок G, разведенных в буферах с различными значениями pH и ионной силы, и дзета-потенциалы Fe@C-NH₂/Белок/Белок G. «БСА», «Казеин», «Желатин А» и «Желатин В» обозначают покрывающий белок. T_2 в буферах 0,15 М (красная линия), 0,5 М (зеленая линия) и 2 М (синяя линия) в 0 (пунктирная линия) и через 24 ч (сплошная линия), $n = 3$, среднее значение \pm стандартное отклонение.

Мы можем сделать вывод, что наши результаты согласуются с результатами предыдущих исследований; однако прямое сравнение затруднено из-за различных

стратегий функционализации. В нашем исследовании магнитные нанокластеры, покрытые желатином, были почти нечувствительны к колебаниям pH в диапазоне от 4 до 10, а нанокластеры, покрытые БСА и казеином, агрегировали при значениях pH близким к изоэлектрическим точкам этих белков. Примечательно, что такое поведение соответствует изменениям дзета-потенциала: дзета-потенциалы Fe@C-NH₂/БСА/Белок G и Fe@C-NH₂/Казеин/Белок G находятся в диапазоне от 0 до -20 мВ при pH 4 и 5 (Рисунок 3.7). Интересно, что нет такой четкой взаимосвязи между дзета-потенциалом Fe@C-NH₂, покрытых желатинами, и их коллоидной стабильностью. Более того, несмотря на то, что дзета-потенциалы как Fe@C-NH₂/Желатин А/Белок G, так и Fe@C-NH₂/Желатин В/Белок G очень низки по сравнению с общепринятым порогом стабильности ± 30 мВ, они выдерживают агрегацию даже при высокой ионной силе, что указывает на более значительную роль гидратационных сил [248] и стерического, а не электростатического отталкивания между наночастицами, покрытыми желатином [249]. Нанокластеры, покрытые казеином, более чувствительны к увеличению концентрации соли. Поэтому мы предполагаем, что главным образом поверхностный заряд обеспечивает стабильность этих нанокластеров.

Для практического применения диагностических реагентов на основе наночастиц требуется, чтобы они были стабильны в течение длительных периодов времени [192]. Мы оценивали размер и полидисперсность Fe@C-NH₂/Белок/Белок G, которые хранили при +4 и +37 °C в течение четырех недель. Температурный диапазон от +2 до +8 °C широко используется для хранения биореагентов, включая тест-наборы и диагностические реагенты (например, конъюгаты ферментов). Воздействие на компоненты тест-наборов повышенных температур является быстрым и эффективным способом оценки их долгосрочной стабильности. Согласно [56], семь дней при температуре +37 °C эквивалентны одному году при температуре +4 °C. По-видимому, это приближение применимо в основном к белковым реагентам, которые подвержены термической денатурации. Однако наночастицы, предназначенные для использования *in vivo*, также тестируют в подобных условиях [147].

Гидродинамический диаметр и полидисперсность нанокластеров, покрытых белком, не изменились после одного месяца хранения. Наиболее заметное изменение наблюдалось для Fe@C-NH₂/Казеин/Белок G, хранившегося при +4 °С: их размер увеличился со 128 до 142 нм (Рисунок 3.8).

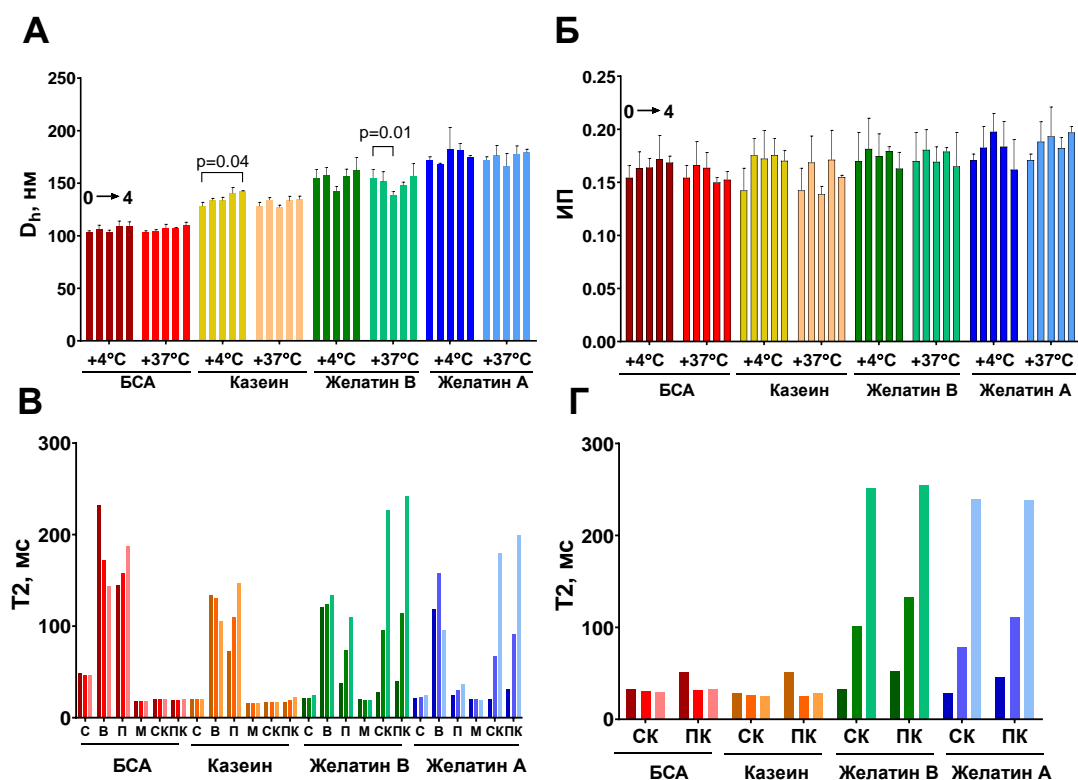


Рисунок 3.8 – Стабильность при хранении Fe@C-NH₂/Белок/Белок G и стабильность Fe@C-NH₂/Белок/Белок G и Fe@C-NH₂/Белок/Стр в сложных средах. Верхний ряд: изменение гидродинамического диаметра (А) и индекса полидисперсности (Б) в течение четырех недель хранения при разных температурах; пять столбцов показывают D_h или ИП в разные недели: 0, 1, 2, 3 и 4 (слева направо), статистика: двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Даннета, n = 3, среднее значение ± стандартное отклонение; нижний ряд: T₂ Fe@C-NH₂/Белок/Белок G (В) и Fe@C-NH₂/Белок/Стр (Г), разведенных в соке (С), вине (В), пиве (П), молоке М), сыворотке крови (СК) и плазме крови (ПК); три столбца показывают T₂ спустя 0, 1 и 5 ч (слева направо) после начала эксперимента.

В то же время повышенные температуры не влияли на размер этого конъюгата. Следовательно, увеличение размеров нанокластеров при +4 °С был скорее обусловлен вариабельностью измерений. Чтобы подтвердить эти

результаты, мы оценили изменения диаметра и полидисперсности нанокластеров, полученных в ходе экспериментов по контролю размеров, которые хранились в течение четырех месяцев. Систематических изменений гидродинамического диаметра не наблюдалось. Изменение размера в некоторых образцах, скорее всего, объясняется вариабельностью метода ДРС, поскольку наблюдалось не только увеличение, но и уменьшение среднего диаметра нанокластеров при хранении.

Магнитные наночастицы широко используются в гомогенных иммуноанализах патогенов, токсинов, тяжелых металлов и других аналитов в пищевых продуктах, физиологических средах и пробах, взятых из окружающей среды. При постановке этих иммуноанализов наночастицы контактируют со сложной смесью ионов, белков, углеводов, липидов и их комплексов, которые могут вызывать агрегацию наночастиц и последующую потерю их функциональных свойств. Неспецифическая коагуляция нежелательна для анализов, основанных на агрегации наночастиц (например, T2-релаксометрии), поскольку она приводит к ложноположительным результатам. Более того, агрегация наночастиц может снизить эффективность магнитного прекоцентрирования исследуемых образцов [14]. Мы изучили стабильность нанокластеров, покрытых белком, в сыворотке/плазме крови, апельсиновом соке, молоке, красном вине и пиве методом T2-релаксометрии. Плазма и сыворотка являются одними из наиболее важных образцов в клинической диагностике; молоко, соки, пиво и вино являются популярными продуктами питания, которые обычно тестируют на наличие патогенов и их токсинов. Все тестируемые среды не содержат никакого магнитного материала и, следовательно, не влияют на результаты релаксометрии T2, которая зависит только от агрегации магнитных наночастиц, разведенных в этих средах [367]. Большинство анализов на основе наночастиц требуют инкубации нанозондов в исследуемых образцах продолжительностью от нескольких минут до нескольких часов. Поэтому мы оценили изменение T2 разбавленных суспензий нанокластеров спустя 1 и 5 часов после их приготовления.

Не было никаких существенных изменений в T2 после инкубации нанокластеров, покрытых казеином и БСА, в соке, молоке и сыворотке/плазме крови. Увеличение T2 наблюдалось для всех четырех типов нанокластеров, разведенных в пиве. Однако наблюдалось резкое увеличение T2 для нанокластеров, покрытых желатином, после разведения в сыворотке и плазме. Более того, скопления нанокластеров, инкапсулированных в желатин, в образцах крови были видны невооруженным глазом. Агрегация нанокластеров, покрытых желатином, не была связана с взаимодействием между белком G и IgG из плазмы/сыворотки, поскольку эксперимент с Fe@C-NH₂/Белок/Стр дал тот же результат (Рисунок 3.8). Все тестируемые конъюгаты выпали в осадок в красном вине. Сложная взаимосвязь между размером и структурой поверхности наночастиц и их релаксивностью хорошо известна [402]. Таким образом, мы не можем полностью объяснить изменение T2 в каждом конкретном случае. Тем не менее, агрегация нанокластеров и адсорбция компонентов среды на их поверхности, безусловно, оказывают значительное влияние. По полученным результатам можно сделать вывод, что нанокластеры, покрытые желатином, не подходят для определения анализируемых веществ как в неразбавленной сыворотке, так и в плазме. Все четыре конъюгата можно добавлять в цельное молоко и сок.

Неспецифические взаимодействия наночастиц с компонентами сыворотки крови неизбежны, когда их смешивание происходит во время процедуры анализа. Кроме того, было показано, что способность наночастиц адсорбировать сывороточные белки при контакте с сывороткой крови пропорциональна фоновому сигналу, который они производят в ходе анализа. Подобные неспецифические взаимодействия являются серьезной проблемой при конструировании тест-систем на основе магнитных наночастиц [234]. Согласно недавним публикациям, белковые покрытия наночастиц могут обеспечивать противоположающиеся свойства за счет уменьшения количества неспецифического связывания клеток и компонентов среды, прежде всего сывороточных белков [200, 272, 395]. В то же время, известно, что покрытие наночастиц

биосовместимыми природными полимерами может увеличить неспецифическое связывание с белками [251]. В связи с этим, мы оценили адсорбцию сывороточных белков на поверхности Fe@C-NH₂/Белок/Стр с помощью анализов гель-электрофореза в полиакриламидном геле и анализа белка по Бредфорду.

После инкубации нанокластеров в сыворотке и плазме образуются различные белковые короны (Рисунок 3.9). Общее количество белка, адсорбированного из сыворотки крови, было одинаковым как для нанокластеров с покрытием, так и для исходных наночастиц без покрытия (Fe@C-NH₂), за исключением Fe@C-NH₂/Желатин А/Стр, который сорбировал вдвое больше белка. Однако мы должны отметить, что прямые сравнения способности связывать белки не совсем корректны, поскольку количественное определение белка с помощью реактива Бредфорда зависит от его аминокислотного состава. Мы считаем, что объяснить повышенное связывание сывороточных белков нанокластерами, покрытыми желатином А, довольно сложно, особенно в свете того факта, что желатины А и В связывают одни и те же белки и что белковые полосы в окрашенных гелях имеют одинаковую интенсивность. Более того, методом гель-электрофореза была выявлена значительно более высокая адсорбция белков плазмы наночастицами Fe@C-NH₂/Желатин В/Стр (Рисунок 3.9). Белковое покрытие не уменьшало неспецифическое связывание сывороточных белков, а скорее приводило к изменению состава белковой короны. Этот факт соответствует результатам Mirshafiee и соавт., которые продемонстрировали, что белковое покрытие может способствовать адсорбции определенных групп сывороточных белков и снижать адсорбцию других по сравнению с непокрытыми наночастицами [244]. Кроме того, наночастицы меньшего размера связывают меньше белка из сыворотки/плазмы в расчете как на одну наночастицу [96], так и на единицу площади [134]. непокрытые наночастицы Fe@C-NH₂ имеют наименьший гидродинамический диаметр; однако они быстро агрегируют при смешивании с сывороткой, и точное определение их диаметра затруднено. Нанокластеры, покрытые желатином А, являются самыми крупными, но их размер всего на 30 нм больше, чем у Fe@C-NH₂/Желатин В/Стр

(186 нм против 154 нм). В то же время Fe@C-NH₂/БСА/Стр (111 нм) и Fe@C-NH₂/Казеин/Стр (119 нм) примерно на 30-40 нм меньше, чем Fe@C-NH₂/Желатин В/Стр, тем не менее все они адсорбируют одинаковое количество белка.

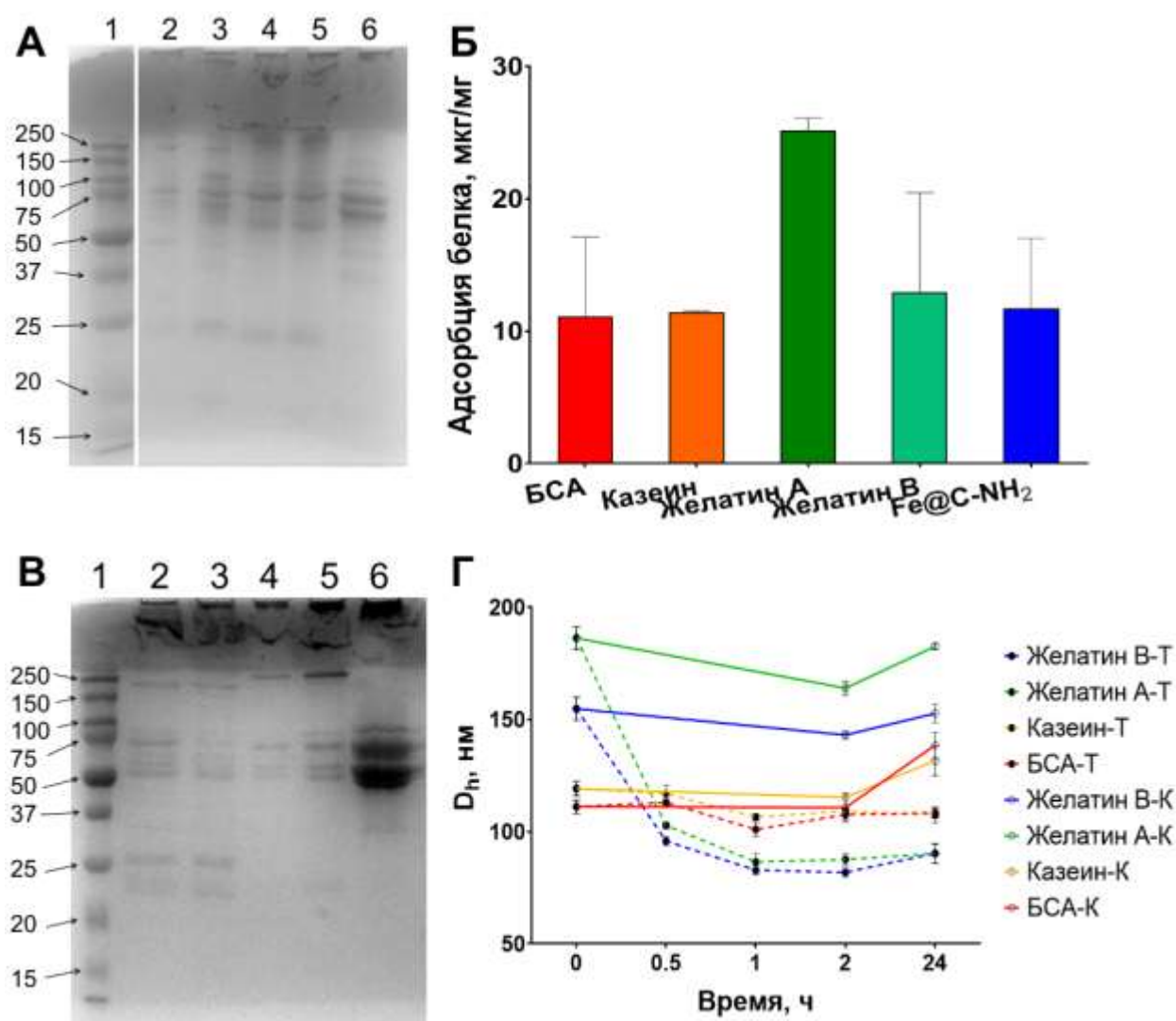


Рисунок 3.9 – Белковая корона и устойчивость нанокластеров к протеолизу. Белковые короны Fe@C-NH₂/БСА/Стр (дорожка 2), Fe@C-NH₂/Казеин/Стр (дорожка 3), Fe@C-NH₂/Желатин А/Стр (дорожка 4), Fe@C-NH₂/Желатин В/Стр (дорожка 5) и Fe@C-NH₂ (дорожка 6) в сыворотке крови (А) и плазме (В), белковые маркеры (кДа) – дорожка 1. (Б) Сорбция белков сыворотки на Fe@C-NH₂/Белок/Стр и Fe@C-NH₂. (Г) Размер Fe@C-NH₂/Белок/Стр после инкубации в растворе трипсина (штриховая линия, заштрихованные символы) или PBS (сплошная линия, незаштрихованные символы). Покрытие: БСА (красный), казеин (желтый), желатин А (зеленый) и желатин В (синий), n = 3, среднее значение ± стандартное отклонение.

Воздействие протеаз, содержащихся в средах для хранения, сокращает срок годности белков и их конъюгатов [314]. Чтобы оценить влияние протеолитических ферментов на структурную целостность магнитных нанокластеров, покрытых белком, мы смешивали их с раствором трипсина и осуществляли мониторинг их размеров течение 24 часов. Для ускорения эксперимента, мы использовали трипсин в высокой концентрации (100 мкг/мл), аналогичной его концентрации в кишечнике взрослого человека (приблизительно 100-500 мкг/мл).

Почти двукратное снижение среднего диаметра нанокластеров, покрытых желатином, наблюдалось после 1 ч инкубации (Рисунок 3.9) без каких-либо дальнейших изменений. С другой стороны, размеры нанокластеров, покрытых БСА и казеином, изменялись незначительно. После 24 ч перемешивания при +37 °С размер нанокластеров увеличился в контрольных образцах (без трипсина), но не в тестовых образцах. В предыдущих разделах мы отмечали, что все конъюгаты были устойчивы к нагреванию; однако в этом эксперименте использовались сильно разбавленные (10 мкг/мл) суспензии без добавления стабилизаторов (БСА, глицерина и глицина). Эти результаты демонстрируют, что стабилизаторы необходимы для сохранения свойств конъюгатов. Интересно, что после обработки трипсином средневзвешенный диаметр нанокластеров (*Z*-average diameter), покрытых желатином, составлял приблизительно 60-80 нм, что равно диаметру исходного Fe@C-NH₂. Возможное объяснение различной устойчивости покрытий к протеолитическому расщеплению приведено ниже.

Согласно [191], скорость деградации альбуминовых наночастиц, ковалентно сшитых глутаровым альдегидом, под воздействием трипсина обратно пропорциональна количеству сшитых аминокислотных групп лизинов. При избыточной сшивке, когда задействовано большинство доступных аминокислотных групп молекул БСА, лишь 9% наночастиц разрушались в течение 24 ч. Аналогичные результаты были получены для электростатически сшитых наночастиц казеина [76]. В нашей работе мы использовали большой молярный избыток глутарового альдегида, способный вовлекать все доступные первичные аминокислотные группы в реакции

сшивания. Желатины А и В содержат наименьшее количество (3,29% и 4,01%) лизина [259] по сравнению с казеином (8,10%) и БСА (15,30%) [154, 325]. Следовательно, между первичными аминами молекул желатина образуется меньше поперечных связей [313]. Другие факторы, такие как различия в конформации адсорбированных белков и их доступность для протеолитического расщепления, также могут способствовать повышению/снижению устойчивости наночастиц к трипсинолизу. Например, Сао с соавт. продемонстрировали, что адсорбция на наночастицах диоксида титана может защитить казеин от разрушения под воздействием ферментов желудка и кишечника [35], а наночастицы золота, покрытые белками, были стабильны в течение нескольких дней в ФБ, содержащем протеолитический фермент [39].

Таким образом, дианостикумы на основе БСА и казеина обладают наилучшей устойчивостью к воздействию протеаз, а, значит, более стабильны при длительном хранении.

3.2 – ЯМР-иммуноанализ противостолбнячных антител

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 [360].

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 бичом 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_2 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) как раз-таки 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 попросту оказываются неспособными воздействовать на их время релаксации T2 и сигнал попросту 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 T2 в модельных анализах.

Таким образом, нашей задачей было подобрать такие условия, которые бы способствовали проникновению иммунных комплексов в толщу мембраны. Для этого, по сути, необходимо было «заставить» противостолбнячный анатоксин проникнуть внутрь тест-полоски. Мы протестировали 2 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 T2 при увеличении концентрации антител, однако второй способ (вымачивание) обеспечивал более низкие пределы детекции, в связи с чем 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 (Рисунок 3.10).

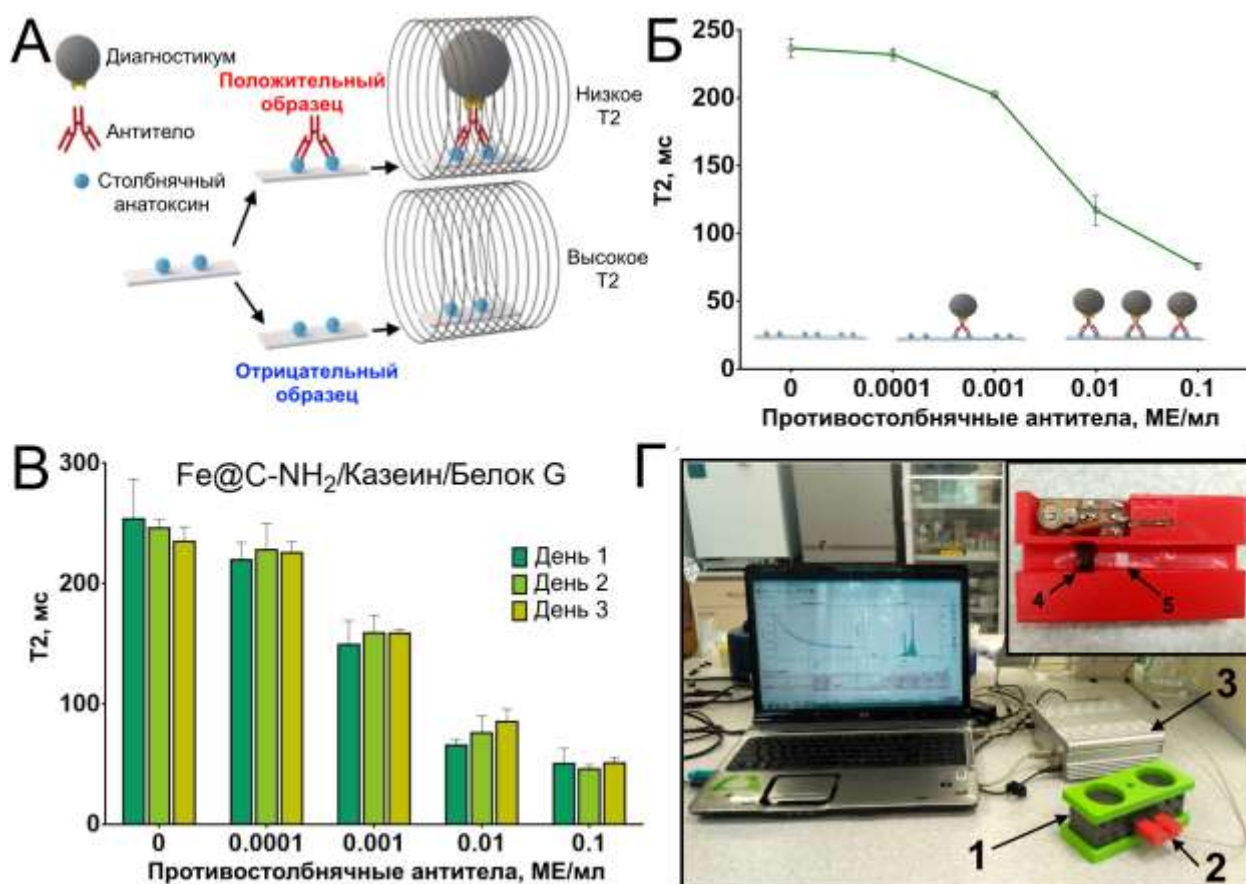


Рисунок 3.10 – Применение покрытых белком магнитных нанокластеров в ЯМР-иммуноанализе IgG против столбнячного анатоксина. А – принцип анализа; Б – калибровочная кривая, полученная с использованием Fe@C-NH₂/Казеин/Белок G; В – воспроизводимость ЯМР-иммуноанализа; Г – ЯМР-релаксометр и держатель образца (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-NH₂/БСА/Белок G и Fe@C-NH₂/Казеин/Белок G обеспечивали лучшую аналитическую чувствительность. В то же время нанокластеры, покрытые желатином, обеспечивали более уровень сигнала в отрицательном контроле и более крутой наклон калибровочной кривой. Для всех конъюгатов была получена хорошая межсерийная воспроизводимость анализа, за исключением сигнала в негативном контроле для конъюгата Fe@C-NH₂/Желатин A/Белок G. Для демонстрации принципиальной применимости анализа, мы протестировали 10 образцов сыворотки крови, полученных от вакцинированных лиц. В анализе использовали конъюгат Fe@C-NH₂/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 (таблица 3.2). Тем не менее, аналитическая чувствительность анализа была намного ниже защитного порога и позволяла количественно определять противостолбнячные IgG у незащищенных лиц. Была продемонстрирована хорошая корреляция ($r^2 = 0,97$) с результатами ИФА.

Таблица 3.2 – Сравнение методов детекции противостолбнячных антител

| Тип анализа | Метка | Предел детекции, мМЕ/мл | Длительность анализа, часы | Ссылка |
|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------|--------|
| ИФА | Пероксидаза хрена | 0.01 | 4 | [167] |
| Мультиплексный иммуноанализ | Флуоресцентные микросферы | 0.01 | 1.25 | [167] |

| Тип анализа | Метка | Предел детекци и, мМЕ/м л | Длительно сть анализа, часы | Ссылка |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------|
| Иммунохроматография | Золотые наночастицы | 10 | 0.25 | [167] |
| Поверхностный плазмонный резонанс | Золотые наночастицы | 5 | 2.15 | [167] |
| ИФА на полимерных волокнах | Пероксидаза хрена | 0.5 | 2.15 | [147] |
| Микрофлюидный анализ | Флуоресцентный краситель | 100 | Менее 1 | [167] |
| ЯМР-иммуноанализ | Железоуглеродные наночастицы | 0.52 | 3–4 | Эта работа |

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В ГЛАВЕ 3

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

1. Khramtsov P. 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.

2. Khramtsov P. V. Development of an Immunosorbent for Solid-Phase NMR-Based Assay / P. Khramtsov, M. Kropaneva, M. Bochkova, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2019. – Т. 484. – С. 69-72.

3. Khramtsov P. 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. – P. 1345.

4. Khramtsov P. 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.

5. Khramtsov, P. 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.

Патенты

6. Патент РФ № 2691753. Магнитная система для спектроскопии ядерного магнитного резонанса. (Бюл. № 10, 2019 г.). Авторы: А.А. Мысик, И.В. Бызов, М.А. Уймин, А.Е. Ермаков, М.Б. Раев, П.В. Храмцов

7. Патент РФ № 2684325. Способ получения конъюгата на основе магнитных металл - углеродных наночастиц, пригодного для диагностических и аналитических целей, с использованием ЯМР - релаксометрии в качестве метода детекции. (Бюл. № 10, 2019 г.). Авторы: Раев М.Б., Кропанева М.Д., Храмцов П.В. Бочкова М.С., Тимганова В.П., Заморина С.А.

8. Патент РФ № 2743426. Способ определения биологических макромолекул на основе ЯМР-релаксометрии. (Бюл. № 5, 2021 г.). Авторы: Раев

М.Б., Кропанева М.Д., Храмцов П.В., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Заморина
С.А.

ГЛАВА 4 – НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА БЕЛКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ

Одним из направлений диссертационного исследования была разработка диагностических реагентов на основе белковых наночастиц. Ранее (см. Главу 1) мы уже упоминали о важной особенности таких наночастиц, а именно их способности инкапсулировать в себе различные метки. Это их свойство находит многочисленные применения в адресной доставке лекарств, но почти полностью игнорируется разработчиками иммунодиагностикомов. В то же время идея использовать белковые наночастицы как своего рода универсальные контейнеры для молекул-меток является очень заманчивой. Наночастицу можно нагрузить существенным количеством целевых молекул или частиц, которые будут генерировать в разы более интенсивный сигнал в сравнении с единичной молекулой. В то же время белковая наночастица несет на поверхности множество функциональных групп, пригодных для ковалентной пришивки аффинных молекул, таких как моноклональные антитела, стрептавидин или белки A/G/L.

Мы планировали использовать для создания диагностикомов два типа наночастиц: наночастицы из бычьего сывороточного альбумина и желатина. Несмотря на кажущуюся простоту их синтеза и множество методик, описанных в литературе, мы столкнулись с целым рядом технологических проблем. Первая была связана с недостаточной воспроизводимостью их синтеза. В случае с альбуминовыми наночастицами это было обусловлено, по всей видимости, вариабельностью исходных белковых препаратов. В случае желатина – с особенностями самой процедуры, предполагавшей двукратное осаждение белка органическим растворителем. Помимо этого, мы столкнулись проблемой измерения концентрации альбуминовых наночастиц и количества содержащихся в них молекул-меток. На стадии предварительных экспериментов мы выяснили, что

традиционный анализ белка, обычно используемый в литературе, дает некорректные результаты. Это приводило к сложностям при оптимизации иммуноанализов и получению невоспроизводимых результатов.

В связи с этим, задачей этого этапа исследования была разработка воспроизводимых способов синтеза альбуминовых и желатиновых наночастиц, а также обоснование и оптимизация технологических подходов к контролю их ключевых характеристик: концентрации, физико-химических свойств, стабильности при хранении. В дальнейшем, разработанные подходы были использованы при получении диагностических реагентов для колориметрического иммуноанализа (см. Главы 5 и 6).

4.1 – Технологические сложности, возникающие при получении препаратов белковых наночастиц

Белковые наночастицы используются в различных областях биомедицины включая терапию, диагностику *in vitro* и *in vivo* и пищевую биотехнологию, благодаря их биосовместимости, способности инкапсулировать нерастворимые лекарственные средства, разнообразной химической структуре, облегчающей функционализацию, и другим полезным свойствам. Альбумины (бычий сывороточный альбумин (БСА), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), овальбумин), желатин, казеин, фиброин, а также растительные белки, такие как зеин и глиадин, являются одними из наиболее популярных примеров белковых носителей [22]. Наночастицы, состоящие из функциональных белков и полипептидов, например, вирусных антигенов или ферментов [256, 346, 357, 360], являются перспективными инструментами при разработке вакцин и биосенсоров.

Помимо успешной и коммерциализированной технологии Nab, существует ряд других эффективных методов синтеза белковых наночастиц, одним из которых является десольватация [72]. Принцип десольватации основан на снижении растворимости белка при добавлении плохого растворителя (например, этанола, ацетона, хлороформа) в водный раствор белка. Молекулы белка изменяют свою конформацию и агрегируют, образуя наночастицы, которые стабилизируют посредством химической, термической или радиационной сшивки

[127]. После этого удаляют непрореагировавший белок, сшивающий агент и органические растворители, а очищенные наночастицы диспергируют в целевом растворителе.

Определение концентрации наночастиц является важной частью процесса их характеристики наряду со структурными и микроскопическими исследованиями. Существует несколько методов измерения концентрации белковых наночастиц:

(1) Использование красителей, взаимодействующих с белками. Как правило, используются анализ с бидинхониновой кислотой (БХК) или анализ по Бредфорду. Эти анализы могут быть непрямые, когда концентрация наночастиц оценивается путем измерения концентрации белка, не вошедшего в состав наночастиц [91, 384], или прямые, когда производится оценка концентрации белка непосредственно в суспензии очищенных наночастиц [40, 41, 61, 114, 279].

(2) Измерение поглощения при 280 нм (A_{280}) очищенных наночастиц [10, 222, 298, 339] или белка, не превратившегося в наночастицы, [353]

(3) Гидролитическое разрушение наночастиц с последующим определением A_{280} в гидролизате [235, 236]

(4) Гравиметрический анализ [7, 350, 369]

(5) Турбидиметрия с использованием растворов наночастиц с известными концентрациями в качестве калибраторов [350]

(6) Определение белка, не превратившегося в наночастицы, при помощи гель-хроматографии или ВЭЖХ [349, 350].

Когда белковые наночастицы синтезируют с целью их применения как контейнеров для адресной доставки лекарств, загрузка лекарственных препаратов производится непосредственно в ходе десольватации (обычно путем растворения целевых молекул в плохом растворителе). После этого очищенные белковые наночастицы, как правило, лиофилизируют с последующим взвешиванием для определения эффективности инкапсулирования молекулы-мишени. В этом случае прямое измерение количества наночастиц является неотъемлемой частью процесса синтеза наноносителя. Однако, в некоторых

случаях лиофилизация нежелательна или же суспензия белковых наночастиц должна быть использована для последующей функционализации. При этом возникает определять концентрацию белковых наночастиц непосредственно в суспензии. Более того, оценка концентрации наночастиц в суспензии может быть частью промежуточного контроля в процессе их производства [350]. Ниже перечислены конкретные ситуации, когда измерение концентрации белковых наночастиц в суспензии является необходимым:

(1) Наноносители на основе белковых наночастиц нагружают терапевтическими препаратами при помощи адсорбции. Наряду с загрузкой *in situ*, приготовленные заранее белковые наночастицы могут быть загружены путем последующей инкубации с раствором, содержащим целевое вещество: терапевтические пептиды [136], противовирусные олигонуклеотиды [235], пролекарства [205], радиопротекторы [186], противоопухолевые средства [155], средства против биопленок [104], радиосенсибилизаторы [141].

(2) Белковые наночастицы используют в качестве носителей для моноклональных антител [265, 406], однодоменных антител [7, 128], пептидных гаптенных [386], иммуностимулирующих олигонуклеотидов [407]

(3) Наночастицы ферментов и альбумина используются для модификации электродов в биосенсорах [213, 256, 379] и усиления сигнала в иммуноанализах [196]. Наночастицы желатина применяются в качестве носителя для иммобилизации гаптенных в твердофазных иммуноанализах [99].

(4) Белковые наночастицы, полученные методом десольватации, обладают люминесцентными свойствами [33, 381] и могут быть использованы, при условии дальнейшей функционализации, качестве меток в иммуноанализах или биоимаджинге.

(5) Суспензии белковых наночастиц также используются при приготовлении пленок для упаковки пищевых продуктов [100], носителей пищевых добавок [233], стабилизации эмульсий Пикеринга в пищевой химии и фармацевтике [336], производстве трехмерных пористых каркасов для культивирования клеток [337], регенерации костной ткани [361].

При проведении предварительных исследований мы синтезировали три партии альбуминовых наночастиц методом десольватации (Рисунок 4.1). После десольватации мы определили их концентрации с помощью гравиметрического анализа, гидролиза в сочетании с УФ-спектроскопией и анализа белка по Брэдфорду (прямого и непрямого). Удивительно, но наблюдалось существенное расхождение в результатах. Непрямые и прямые анализы по Брэдфорду, соответственно, завышали и занижали концентрацию наночастиц по отношению к гравиметрическому анализу. В то же время значения концентрации, полученные с помощью гравиметрического анализа и гидролиза/УФ, существенно не различались. Эти результаты побудили нас тщательно изучить различные методы количественного определения белковых наночастиц. Насколько нам известно, сравнительных исследований на эту тему не проводилось; однако в нескольких работах, посвященных приготовлению нанотерапевтических препаратов, концентрация белковых наночастиц измерялась различными методами [10, 235, 350]. Несмотря на это, подробных сравнительных исследований на эту тему до сих пор не проводилось.

В связи с этим целью этого этапа исследования было сравнение различных методов определения концентрации белковых наночастиц, полученных методом десольватации. Одиннадцать партий альбуминовых наночастиц и две партии желатиновых наночастиц были синтезированы в различных экспериментальных условиях. Затем концентрацию наночастиц определяли несколькими методами: гравиметрическим анализом, прямым и косвенным анализами с бикарбонатной кислотой (БК) и реактивом Брэдфорда, а также щелочным гидролизом в сочетании с УФ-спектроскопией. Мы выявили факторы, влияющие на результаты упомянутых анализов, и сформулировали рекомендации, которые позволяют осуществлять точный контроль над качеством и дозировкой диагностических реагентов.

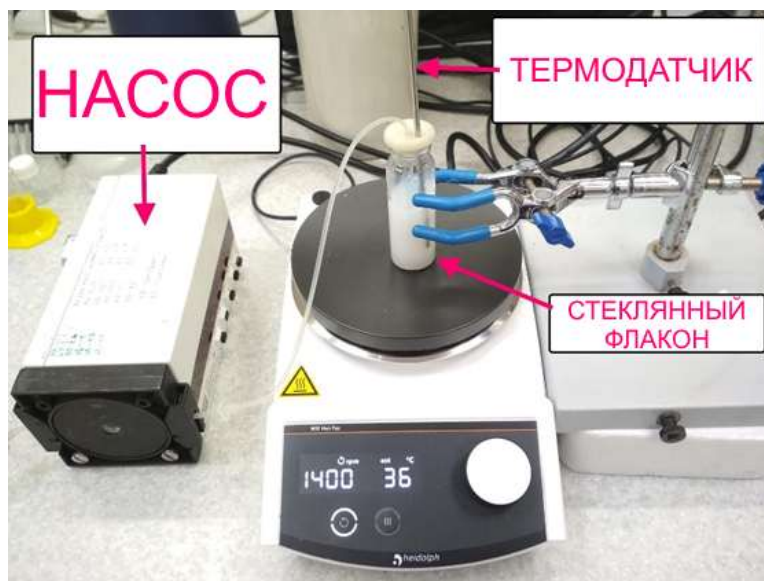


Рисунок 4.1 – Синтез альбуминовых наночастиц

Для оценки достоверности полученных результатов было синтезировано несколько партий белковых наночастиц. Для синтеза был использован БСА от трех производителей; кроме того, желатиновые наночастицы были синтезированы по аналогичной технологии. Для сшивания наночастиц использовали глутаровый альдегид; наночастицы из еще двух партий были стабилизированы путем термической обработки. В ходе исследования мы не пытались достичь максимально возможного выхода при каждом синтезе. Наша цель состояла в том, чтобы синтезировать разными методами достаточно большое количество партий белковых наночастиц, чтобы оценить влияние различных факторов на определение концентраций наночастиц с помощью анализов с БХК и по Брэдфорду, гравиметрического анализа и гидролиза в сочетании с УФ-спектроскопией.

Конечная концентрация наночастиц в суспензии (при прочих равных условиях) зависит от количества десольвататирующего агента. Для БСА от каждого производителя в предварительных экспериментах мы подбирали объем этанола, при котором достигается максимально возможная мутность суспензии (высокий выход), но не происходит образования агрегатов. Важно, что при большем объеме этанола наблюдалось образование крупных частиц, видимых

невооруженным глазом. Мы намеренно уменьшили количество этанола для нескольких партий (NP1, NP5, NP12 и NP13), чтобы оценить эффективность различных методов количественного определения при низком выходе десольватации.

4.2 – Воспроизводимость синтеза диагностикумов

Лишь немногочисленные статьи посвящены вопросу воспроизводимости синтеза белковых наночастиц, особенно с использованием реагентов от различных производителей. Недавно Jahanban-Esfahlan с соавт. [146] обсудили некоторые расхождения в результатах, полученных разными авторами. В частности, они обнаружили, что десольватация белка в буферных растворах и в присутствии хлорида натрия приводит к образованию крупных белковых агрегатов, хотя во многих работах описывается успешная десольватация БСА или ЧСА разведенных в буферах [например, 91, 338, 369]. В то же время Langer с соавт. [191] не смогли синтезировать наночастицы из ЧСА в присутствии буферных солей, но успешно синтезировали их с использованием 10 мМ NaCl в качестве фонового электролита. В нашей работе мы столкнулись с той же проблемой: все попытки синтезировать наночастицы в присутствии солей приводили к образованию большого белкового агрегата, подобного тому, который описан в статье [146]. По этой причине мы растворяли БСА и желатин в деионизированной воде с добавлением небольшого количества гидроксида натрия. Интересно, что мы не смогли воспроизвести синтез альбуминовых наночастиц с помощью карбодимидной сшивки, о котором сообщалось в работе [146]. Это еще раз подчеркивает необходимость сравнения реагентов от разных производителей. Ранее Langer с соавт. [190] приготовили наночастицы методом десольватации с использованием различных партий нативного и рекомбинантного ЧСА и показали, что присутствие молекулярных агрегатов, а также ди- и тримеров ЧСА может влиять на размер, полидисперсность и выход синтеза наночастиц. Однако четкой связи между содержанием высокомолекулярных форм и результатом синтеза наночастиц не было. Авторы упомянутой работы предположили, что низкомолекулярные примеси также могут

влиять на результат синтеза. Это неудивительно, поскольку ранее было показано, что присутствие низкомолекулярных фракций желатина приводит к образованию агрегатов во время синтеза желатиновых наночастиц [51]. Тип белка (нативный, рекомбинантный) влияет на размер наночастиц, кроме того, также имеет место вариабельность от партии к партии [226].

Для инициации десольватации БСА от разных производителей требовалось добавление разных объемов этанола: “VWR” - 2,83 мл (мл этанола на мл БСА), “Roche” - 4 мл, “Biosera” - 2,66 мл. Более того, в случае БСА от “VWR” это значение также менялось изо дня в день (до 3,16 мл). Видимые глазом микрочастицы образовывались во время десольватации, и их количество зависело от добавленного объема этанола. Наиболее интенсивное образование микрочастиц наблюдалось при приготовлении партии NP4. Интересно, что в растворах очищенных наночастиц, микрочастицы не были обнаружены, скорее всего, из-за многократной обработки ультразвуком во время промывки. Показатели полидисперсности были ниже 0,2 для всех партий (таблица 4.1). В ходе почти всех синтезов десольватированный белок оседал на стенках флакона и на магните. После синтеза мы тщательно собирали осажденный белок, чтобы свести к минимуму его потери.

Таблица 4.1 – Характеристики белковых наночастиц

| Партия | Объем суспензии, мл | Dh, nm (среднее±стандартное отклонение) | ИП (среднее±стандартное отклонение)¹ | Дзета-потенциал, мВ (среднее±стандартное отклонение) |
|---------------|----------------------------|--|--|---|
| NP1 | 13.9 | 146.3±0.0 ² | 0.096±0.008 | -33.2±0.5 |
| NP2 | 17.5 | 157.3±1.6 | 0.088±0.003 | -37.6±1.2 |
| NP3 | 16 | 153.8±1.1 | 0.076±0.007 | -36.4±0.6 |
| NP4 | 15.5 | 139.4±2.3 | 0.127±0.016 | -36.3±0.3 |
| NP5 | 15 | 143.1±1.7 | 0.151±0.003 | -37.1±1.9 |

Продолжение Таблицы 4.1

| | | | | |
|------|-------|------------|-------------|-----------|
| NP6 | 13.5 | 166.8±1.1 | 0.047±0.013 | -21.9±0.6 |
| NP7 | 12.4 | 208.0±25.4 | 0.086±0.039 | -20.0±1.2 |
| NP8 | 12.4 | 491.3±18.5 | 0.149±0.049 | -11.6±0.5 |
| NP9 | 2.116 | 495.7±35.3 | 0.130±0.074 | -11.8±0.2 |
| NP10 | 1.412 | 175.1±4.3 | 0.033±0.020 | -34.1±0.4 |
| NP11 | 14 | 172.8±1.3 | 0.046±0.025 | -22.1±0.6 |
| NP12 | 12.2 | 140.5±1.2 | 0.166±0.025 | -32.3±1.6 |
| NP13 | 12.2 | 163.3±2.1 | 0.109±0.023 | -32.3±0.6 |

Примечание: ¹ Индекс полидисперсности, ² n=3

Выход синтеза наночастиц зависел от производителя белка. Выходы были заметно ниже для наночастиц, полученных из БСА от Roche (NP5 и NP6), несмотря на добавление наибольших объемов этанола (4,5 и 5 мл этанола на 1 мл БСА “Roche”). Следует отметить, что концентрация БСА “Roche” в исходном растворе была несколько ниже (ок. 5% согласно гравиметрическому анализу; по поглощению УФ-излучения не было обнаружено различий), чем у БСА из VWR и Biosera (таблица 4.2). Однако мы предполагаем, что такая низкая разница в начальных концентрациях не может объяснить существенных различий в процессе десольватации. Кроме того, мы проанализировали результаты, предоставленные другими исследователями, и также выявили значительные различия в выходах десольватации. В проанализированных публикациях выходы составляли от 39 до 66% в аналогичных условиях синтеза (отсутствие солей, слабощелочный pH). В нашей работе выход составлял от 54 до 91% (по данным гравиметрического анализа). Обращает на себя внимание то, что выход может значительно различаться, даже если одна и та же исследовательская группа проводит десольватацию в идентичных условиях.

Таблица 4.2 – Концентрация БСА (мг/мл) в исходных растворах, измеренная разными методами

| Производитель БСА | Поглощение при 280 нм | Гравиметрический анализ | ТГА |
|-------------------|-----------------------|-------------------------|------|
| VWR | 51.8 | 59.03 | - |
| Roche | 51.6 | 56.27 | - |
| Biosera | 51.5 | 58.57 | 55.4 |

Присутствие сопутствующих веществ с высокой и низкой молекулярной массой может привести к изменениям в процессе десольватации. Мы проанализировали БСА от трех производителей с помощью гель-электрофореза в 6% и 12% полиакриламидных гелях (Рисунок 4.2). Некоторые образцы были нагреты и содержали бета-меркаптоэтанол. Существенных различий обнаружено не было, за исключением БСА от «Biosera», который содержал дополнительную белковую полосу с молекулярной массой, несколько меньшей, чем у БСА. Димеры БСА и другие белки с молекулярной массой от 100 до 200 кДа присутствовали в некотором количестве во всех образцах.

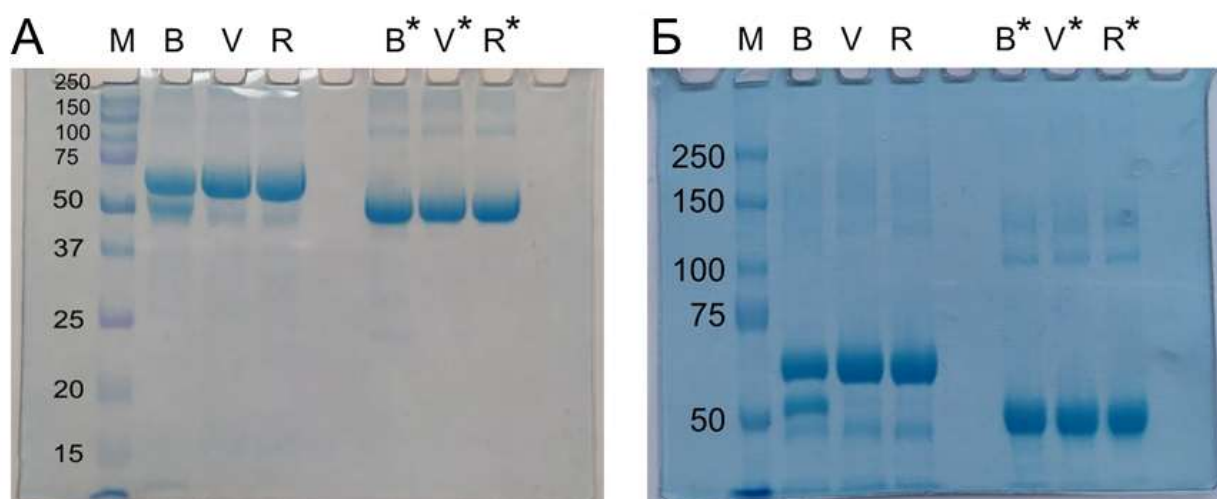


Рисунок 4.2 – Электрофорез БСА (1 мг/мл) от трех производителей в 12% (А) и 6% (Б) полиакриламидном геле в восстановительных (*) условиях (прогревание при +95 °С в течение 5 мин и добавление бета-меркаптоэтанол) или в невосстановительных условиях. Производители БСА: В – «Biosera», V– «VWR», R – «Roche». М - белковые маркеры.

Мы предполагаем, что различия в приготовлении наночастиц обусловлены присутствием жирных кислот в препаратах БСА. Недавно влияние жирных кислот как на размер, так и на выход альбуминовых наночастиц было подтверждено в исследовании Luebbert с соавт. [226].

Были приготовлены исходные растворы БСА от каждого из производителей с концентрацией около 50 мг/мл. Точную концентрацию БСА определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм и гравиметрически путем высушивания 1 мл раствора БСА при +140 °С. Неожиданно, концентрации БСА, измеренные с помощью гравиметрического анализа, оказались более чем на 10% выше (таблица 4.2). О подобных различиях ранее сообщали Расе с соавт. [Таблица 1 в 264]. Они обнаружили, что коэффициенты молярной экстинкции белков, измеренные с помощью гравиметрического анализа, ниже, чем те, которые были получены с помощью метода Эдельхоха. Причины, по которым гравиметрический анализ завышает концентрацию белка по сравнению с УФ-спектрометрией, ранее обсуждались Расе с соавт. и Anders с соавт. [9, 264] и остаточная влажность в порошке БСА является одним из них. Stamey с соавт. показали, что гравиметрический анализ завышал концентрацию простатспецифического антигена примерно на 20% по сравнению с аминокислотным анализом и приписали наблюдаемую разницу остаточной влажности в белковом препарате [324]. Мы предположили, что вся связанная вода не была удалена во время гравиметрического анализа. Чтобы подтвердить это предположение, мы оценили концентрацию БСА “Biosera” по ТГА. Согласно ТГА, концентрация БСА была ниже, чем концентрация, измеренная с помощью гравиметрического анализа, но все же выше, чем концентрация, измеренная с помощью УФ-спектрометрии (таблица 4.2). В дальнейшем в этой работе мы рассчитывали выход синтеза наночастиц и результаты анализов с БХК и по Бредфорду относительно концентраций БСА, полученных как гравиметрическим, так и спектрофотометрическими методами.

4.3 – Исследование свойств белковых наночастиц, синтезированных методом десольватации

Мы изготовили 11 партий альбуминовых наночастиц (NP1-7 и NP10-13) и 2 партии желатиновых наночастиц (NP8 и NP9) методом десольватации. Наночастицы из 2 партий (NP6 и NP7) сшивали нагреванием при +70 °С в течение 2 ч; другие наночастицы стабилизировали глутаровым альдегидом. Мы изменили степень сшивания с избыточной на частичную (40%, 0,4 альдегидных группы на 1 аминогруппу) для партии NP11. В ТГА анализе использовали партии NP9 и NP10 с повышенной концентрацией наночастиц. Мы получили наночастицы желатина с помощью модифицированной одностадийной технологии десольватации, которая позволяет использовать низкомолекулярный желатин в качестве источника наночастиц. Мы планировали выяснить, применимы ли наши выводы относительно методов измерения концентрации к наночастицам, полученным из белка, отличного от БСА. Характеристики наночастиц приведены в таблице 4.1.

Размер альбуминовых наночастиц находился в диапазоне от 140 до 200 нм (таблица 4.1). Желатиновые наночастицы имели гидродинамический диаметр 490 нм. Все препараты наночастиц были относительно монодисперсными (индекс полидисперсности от 0,03 до 0,17). Дзета-потенциал наночастиц NP6, NP7 и NP11 составлял от -20 до -22 мВ, тогда как наночастицы из других партий имели дзета-потенциал ниже -32 мВ. Наночастицы NP11 имели более низкую степень сшивания (40%), тогда как NP6-7 были стабилизированы нагреванием. Мы связываем более положительный дзета-потенциал с большим количеством аминогрупп на поверхности наночастиц. При синтезе других партий наночастиц использовался избыток глутарового альдегида, что приводило к снижению дзета-потенциала [91]. Дзета-потенциал желатиновых наночастиц составлял приблизительно -11 мВ, что объясняется более низким процентным содержанием полярных кислых и основных аминокислот (аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина) в желатине В по сравнению с БСА (10,9% против 44,7%) [116, 125]. Несмотря на то, что дзета-потенциал был ниже общепринятого порога стабильности $\pm 25-30$ мВ, все наночастицы были

стабильны в воде. Термически стабилизированные наночастицы быстро агрегируют в нейтральном фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl. Стабильность желатиновых наночастиц в буфере не оценивали.

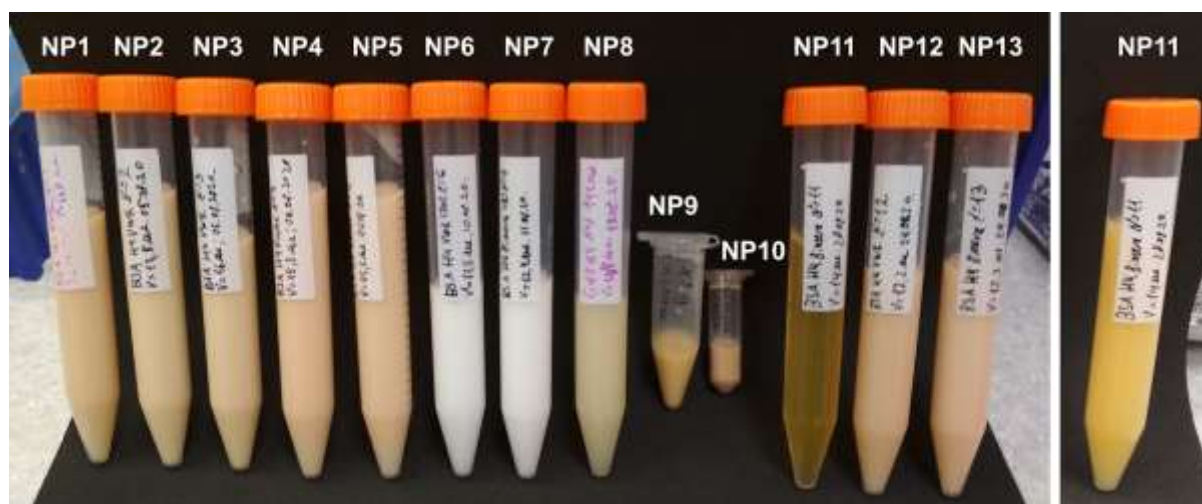


Рисунок 4.3 – Суспензии альбуминовых и желатиновых наночастиц через 1 неделю (NP12 и NP13) или 1,5-2 месяца (NP1-11) хранения (слева). Суспензия NP11 после 1 недели хранения (справа).

Наночастицы, которые хранили при температуре +4 °С, оставались стабильными в течение не менее 2 месяцев, за исключением NP11, которые растворились примерно через 1,5 месяца хранения (Рисунок 4.3). Партию NP11 синтезировали в соответствии с методом, опубликованным Langer с соавт. [191] для оценки влияния степени сшивания на определение концентрации наночастиц. Авторы упомянутой статьи обнаружили, что степень сшивания 40% и позволяет получить стабильные наночастицы из ЧСА, в то время как при более низкой степени сшивки наночастицы частично растворяются. Резкое уменьшение мутности NP11 не сопровождалось изменением гидродинамического диаметра наночастиц (диаметр – 176 ± 2 нм, ИП – $0,062 \pm 0,017$). Структуру NP11 после 1,5 месяцев хранения также оценивали с помощью гель-электрофореза в присутствии восстановителя и без него. Большие бесформенные белковые полосы присутствовали в верхней части геля, и не было обнаружено полос, соответствующих мономерам или олигомерам БСА. Добавление восстановителя

увеличивало количество белковых агрегатов, попадающих в гель. В целом, эти результаты указывают на то, что значительный процент наночастиц NP11 распался на более мелкие частицы (вероятно, десятки нанометров); однако наночастицы исходного диаметра все еще присутствовали, на что указывают результаты ДРС. Эти крупные наночастицы обеспечивали достаточно высокое рассеяние света, и, поэтому, не было обнаружено никакого изменения среднего гидродинамического диаметра. Величина рассеяния света небольшими частицами наночастиц незначительна и не вносит вклада в общее рассеяние образца.

В более ранних работах [190, 191] не сообщалось о стабильности наночастиц, сделанных из ЧСА со степенью сшивания 40%, при длительном хранении. Weber с соавт. [190] исследовали свойства таких наночастиц после двухнедельного хранения. Мы не можем однозначно объяснить механизм деградации NP11; однако мы предполагаем, что не только глутаровый альдегид стабилизировал эти наночастицы, но образовывались и другие типы ковалентных и нековалентных связей. Например, дисульфидные связи образуются между молекулами БСА в 50%-ном растворе этанола даже при комнатной температуре, т.е. этанол сам по себе обеспечивает сшивание [189]. Перераспределение дисульфидных связей, происходящее при хранении [292], может привести к распаду наночастиц на более мелкие частицы. Дальнейшего распада этих фрагментов на моно- и олигомеры БСА не происходит (по крайней мере, в течение 1-2 месяцев при температуре +4 °С), поскольку они стабилизированы глутаровым альдегидом. Существенно, что мы подтвердили частичное сшивание NP11 несколькими косвенными методами: цвет суспензии, флуоресценция, расщепление трипсином (см. ниже).

Партии NP6 и NP7 представляют собой наночастицы, которые были сшиты путем нагревания при +70 °С в течение 2 ч [190] а не глутаровым альдегидом. Эти наночастицы имеют белую окраску, в то время как суспензии наночастиц, стабилизированных альдегидом, светло-коричневого или желтого цвета. Цвет как молекул БСА, так и альбуминовых наночастиц, а также его интенсивность зависели от степени сшивки (Рисунок 4.3). Суспензия NP11 имеет желтый цвет,

NP1-7, NP10, NP12 и NP13 светло-коричневые. Интересно, что Yu с соавт. [388] сообщили, что наночастицы, обработанные глутаровым альдегидом, имели белый цвет, в то время как наночастицы, стабилизированные нагреванием, были желтыми. Мы не можем объяснить это противоречие. В наших экспериментах добавление глутарового альдегида приводило к образованию желтоватых или светло-коричневых частиц.

Langer с соавт. [190] предположили, что нагревание при +70 °С приводит к стабилизации агрегатов БСА за счет образования межмолекулярных амидных связей. Авторы ссылались на статью Esposito с соавт. [77]. Последние описывают образование амидных связей в белках при нагревании; однако авторы пришли к выводу, что реакция между первичными аминами и карбоксильными группами требует удаления молекул воды, низкого давления и длительного воздействия высокой температуры. Поэтому образование множественных амидных связей при короткой и умеренной термической обработке БСА в присутствии избытка воды маловероятно.

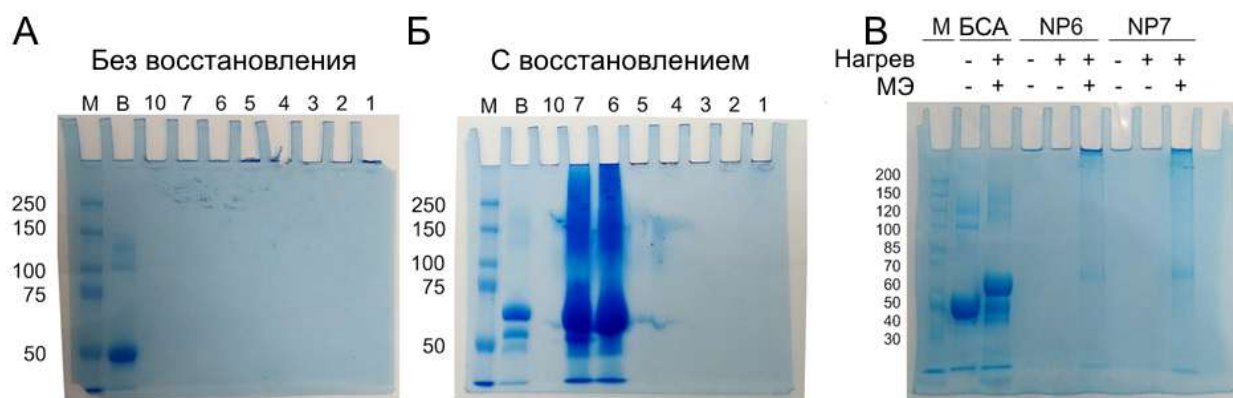


Рисунок 4.4 – Гель электрофорез в ПААГ NP1-NP7 и NP10 в невосстанавливающих (А) и восстанавливающих (Б) условиях (неразбавленные наночастицы). В – Электрофорез NP6 и NP7 в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (концентрация наночастиц - 1 мг/мл по данным гравиметрического анализа). Легенда: Температура нагрева - +95 °С. МЭ – бета-меркаптоэтанол. В - БСА. М - белковые маркеры (их массы указаны слева от геля). Концентрация БСА - 1 мг/мл. Концентрация полиакриламида 6%, напряжение 200 мВ.

Мы предполагаем, что дисульфидные связи играют основную роль в стабилизации термически сшитых альбуминовых наночастиц. Дисульфидные связи образуются между молекулами БСА в 50%-ном растворе этанола при комнатной температуре [189]. Дисульфидные и нековалентные (например, гидрофобные) связи [241] ответственны за агрегацию овалбумина [55], БСА [122], IgG [88] и образование овалбуминовых наночастиц при нагревании [55]. Li с соавт. синтезировали наночастицы из БСА с использованием тепловой агрегации и изучили изменение функциональных групп при нагревании [202]. Они обнаружили, что при нагревании происходит уменьшение концентрации тиоловых, amino и карбоксильных групп, и сделали вывод, что происходит образование дисульфидных и амидных связей. Тем не менее, мы должны подчеркнуть, что снижение содержания свободных аминов и карбоксильных групп было довольно небольшим, примерно на 4-6%. В то же время процент свободных тиоловых групп снизился примерно на 60%, что свидетельствует о том, что образование дисульфидных связей было гораздо более интенсивным. Мы изучили NP6 и NP7 с помощью гель-электрофореза в присутствии и без добавления восстановителя. Суспензии наночастиц обрабатывали тремя различными способами. Два образца нагревали при температуре +95 °C в течение 5 мин с бета-меркаптоэтанолом или без него; третий образец оставляли нетронутым. Образцы без бета-меркаптоэтанола не проникали в гель, тогда как добавление восстановителя приводило к появлению полосы около 70 кДа, что соответствует мономеру БСА (Рисунок 4.4Б, В). Более того, некоторое количество высокомолекулярных агрегатов попадало в гель, когда в образце присутствовал бета-меркаптоэтанол. Частичная деградация термически стабилизированных наночастиц показывает, что дисульфидные связи играют значительную роль в поддержании их структуры. С другой стороны, бета-меркаптоэтанол сам по себе не обеспечивал полного растворения термически сшитых альбуминовых наночастиц. Мы выдерживали NP6 и NP7 в течение нескольких дней в присутствии избытка восстанавливающих реагентов (бета-меркаптоэтанола и

дитиотреитола), но обе суспензии оставались мутными (данные не показаны). Для сравнения, редокс-чувствительные наночастицы, сшитые бифункциональными агентами, растворяются в течение десятков минут в присутствии восстановителя [376]. Gulzar с соавт. показали, что нагревание белка приводит к образованию межмолекулярных связей, отличных от дисульфидных [110]. Разнообразие возможных ковалентных связей между молекулами белка, вызванных различными физическими и химическими факторами, обсуждалось ранее [98].

По нашему мнению, стабилизированные температурой альбуминовые наночастицы обладают некоторым потенциалом для использования в качестве редокс-чувствительных носителей для внутриклеточной и внутриопухолевой доставки [112]. Как правило, редокс-чувствительные белковые наночастицы требуют предварительной обработки белка восстановителями, такими как глутатион [355] или применения специфических сшивающих агентов [112]. Преимущество термической стабилизации заключается в том, что она позволяет избежать предварительной обработки БСА восстановителем (например, дитиотреитолом) и необходимости его удаления [119].

Наночастицы, стабилизированные избытком глутарового альдегида, не попадали в гель независимо от присутствия восстановителя (Рисунок 4.4А, Б), как сообщалось ранее [279]. В статье Tarhini с соавт. полоса БСА была обнаружена в образце альбуминовых наночастиц [338]. Авторы этой работы сравнивали свойства сшитых и несшитых альбуминовых наночастиц и не уточнили, какие именно наночастицы анализировали. Диссоциация несшитых наночастиц могла привести к появлению полосы БСА. Наночастицы желатина не анализировали с помощью гель-электрофореза.

Измерение флуоресценции было использовано для дополнительной характеристики белковых наночастиц. Два остатка триптофана в молекуле БСА наделяют его способностью к флуоресценции в УФ-области ($\lambda_{ex} = 280$ нм). Сшивание глутаровым альдегидом подавляет флуоресценцию триптофана из-за взаимодействия альдегида с лизином или аргинином, расположенными поблизости от остатков триптофана [215]. Эти реакции приводят к изменению

микроокружения триптофана и, следовательно, к уменьшению и синему сдвигу собственной флуоресценции БСА. Аналогичным образом, снижение интенсивности флуоресценции триптофана при сшивании было показано для раствора α -лактальбумина [10]. Интенсивность флуоресценции альбуминовых наночастиц, при возбуждении светом с длиной волны 280 нм, обратно коррелировала с концентрацией глутарового альдегида (Рисунок 4.5Б). Падение флуоресценции триптофана наблюдалось в наночастицах, сшитых избытком глутарового альдегида, но не в наночастицах, сшитых нагреванием (NP6 и NP7). Интенсивность флуоресценции частично сшитых наночастиц (NP11) была существенно выше, чем у полностью сшитых наночастиц. Аналогичная картина флуоресценции наблюдалась для молекул БСА, обработанных глутаровым альдегидом: избыток альдегида снижал флуоресценцию. Флуоресценция наночастиц была смещена в синюю сторону по сравнению с БСА в соответствии с предыдущими публикациями [11, 271]. Таким образом, УФ-флуоресценция может быть использована для полуколичественной оценки степени сшивания молекул альбумина. В молекулах желатина В отсутствуют остатки триптофана, в связи с чем флуоресценция в УФ-области не была обнаружена.

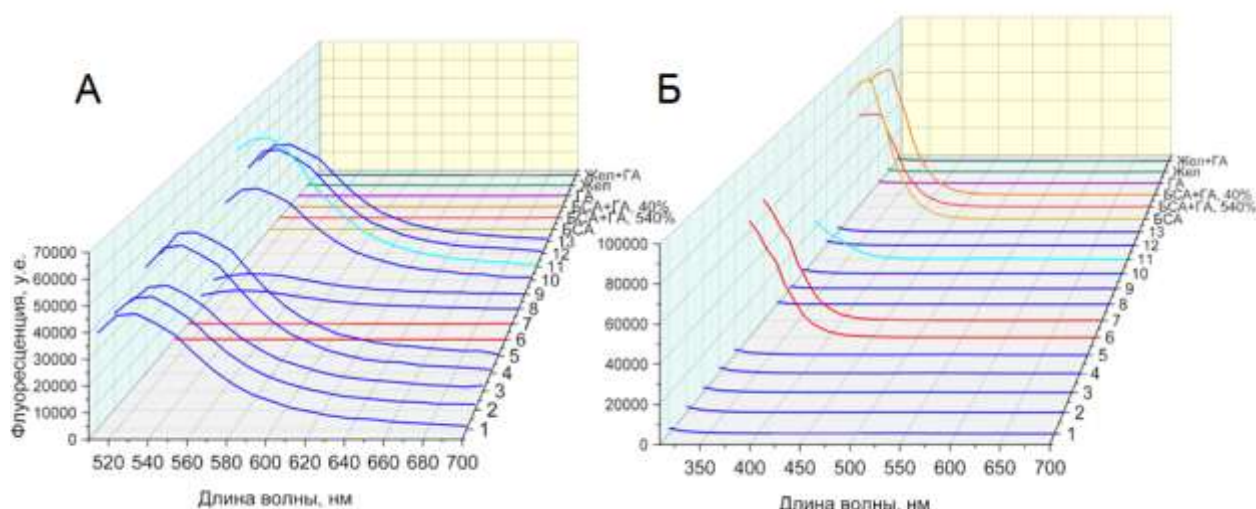


Рисунок 4.5 – Спектры флуоресценции наночастиц, глутарового альдегида и БСА/желатина. Длина волны возбуждения: А – 480 нм; Б – 280 нм.

Концентрация белков и наночастиц 1 мг/мл. ГА – глутаровый альдегид.

Желатиновые и альбуминовые наночастицы демонстрировали широкий пик излучения в области зеленого света с максимумом при 520-530 нм при возбуждении светом с длиной волны 480 нм (Рисунок 4.5А). Интенсивность излучения желатиновых наночастиц была примерно в 4-6 раз ниже. Термически сшитые альбуминовые наночастицы не флуоресцировали на этой длине волны. Зеленая флуоресценция обработанных глутаровым альдегидом альбуминовых и желатиновых наночастиц хорошо соответствует предыдущим результатам [33, 230]. Флуоресценцию объясняют π - π^* переходом двойной связи молекул глутарового альдегида и n - π^* переходу двойной связи оснований Шиффа. Примечательно, что обработанные глутаровым альдегидом БСА и желатин не флуоресцировали, что указывает на роль агрегации и сшивания белков в возникновении зеленой флуоресценции.

Из литературы известно, что интенсивность сшивки и аминокислотный состав белка влияют на устойчивость наночастиц, полученных из этого белка, к расщеплению протеазами [76]. Желатин содержит низкий процент (1,1% для желатина В) остатков лизина [116], в то время как БСА содержит 11,4% остатков лизина [125], таким образом, плотность сшивок значительно выше в альбуминовых наночастицах (при добавлении избытка глутарового альдегида). Мы инкубировали суспензии альбуминовых (NP3, NP4, NP6, NP11) и желатиновых наночастиц (NP8) с 50 мкг/мл трипсина [190] при pH 7 в течение 18 ч. Мутность всех протестированных суспензий наночастиц быстро уменьшилась до нуля, за исключением NP3 и NP4 (Рисунок 4.6А), что также согласуется с данными литературы [179, 190]. В контрольных образцах (без трипсина) поглощение при 600 нм оставалось неизменным (данные не показаны).

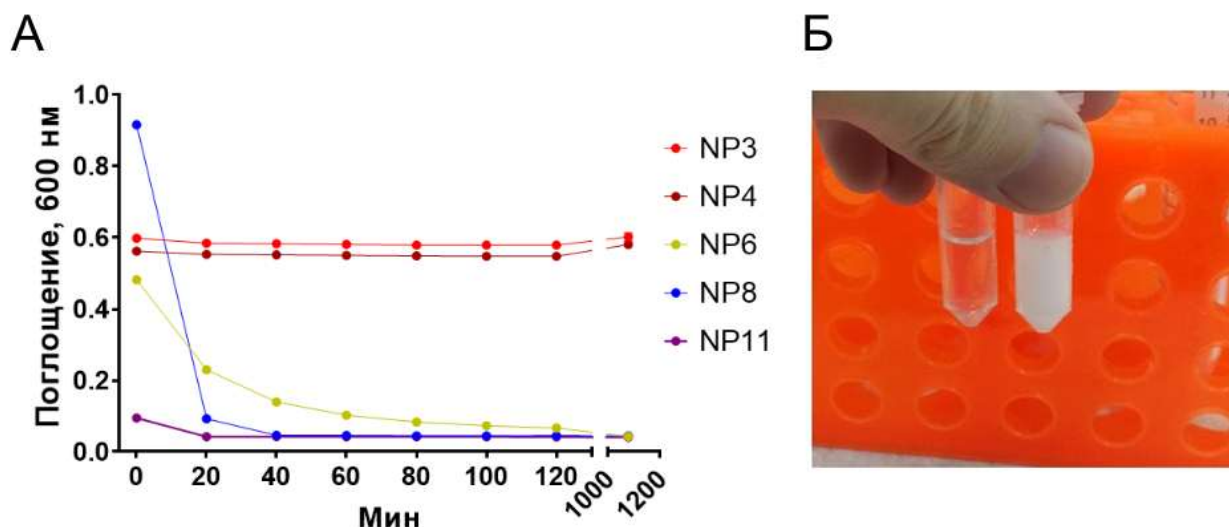


Рисунок 4.6 – А – Протеолиз альбуминовых и желатиновых наночастиц (n=3). Концентрация белков и наночастиц 1 мг/мл. Концентрация трипсина 50 мкг/мл. Б - NP6 (5 мг/мл) после 60-минутной инкубации с (слева) или без (справа) трипсина.

Мы можем сделать вывод, что способ и степень сшивания существенно влияют на их восприимчивость к протеолизу. В следующих разделах мы продемонстрируем, что структура наночастиц влияет на результаты анализов белка с БХК и по Бредфорду.

4.4 – Стандартизация препаратов белковых наночастиц: сравнение оценки методов определения их концентрации

Ранее мы перечислили наиболее популярные методы количественного определения белковых наночастиц. Для сравнительных исследований были выбраны следующие методы: анализ белка с БХК, анализ белка по Бредфорду, гравиметрический анализ и гидролиз в сочетании с УФ-спектроскопией. Мы рассчитали концентрацию наночастиц в конечной суспензии для каждой партии и определили выход синтеза (доля исходного количества белка, превращенного в наночастицы).

Мы провели расчеты с учетом того, что концентрации БСА в исходных растворах, измеренные с помощью УФ-спектроскопии (поглощение при 280 нм) и гравиметрического анализа, были разными. Концентрация БСА в исходных

растворах влияет на величину выхода, кроме того, исходные растворы БСА использовались для приготовления калибраторов для анализа с БХК и по Бредфорду и экспериментов по гидролизу. Мы определили концентрации и выходы по отношению к концентрациям БСА, определенным обоими методами отдельно. Концентрацию желатина в исходном растворе определяли только методом гравиметрического анализа. Концентрации и выходы синтеза для партий альбуминовых и желатиновых наночастиц приведены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Концентрации белковых наночастиц, измеренные разными методами (мг/мл)

| Партия | Гравиметрический анализ | По отношению к концентрации БСА, измеренной по оплощению при 280 нм | | | | По отношению к концентрации БСА, измеренной гравиметрическим анализом | | | | Гидролиз, по отношению к концентрации БСА, измеренной по оплощению при 280 нм | Гидролиз, по отношению к концентрации БСА, измеренной гравиметрическим анализом |
|--------|-------------------------|---|--------|--------------|--------|---|--------|--------------|--------|---|---|
| | | Анализ по Бредфорду | | Анализ с БХК | | Анализ по Бредфорду | | Анализ с БХК | | | |
| | | Непрямой | Прямой | Непрямой | Прямой | Непрямой | Прямой | Непрямой | Прямой | | |
| NP 1 | 11.36 | 11.29 | 4.55 | 11.13 | 4.63 | 12.86 | 5.19 | 12.69 | 5.28 | 8.39 | 9.53 |

Продолжение таблицы 4.3

| | | | | | | | | | | | |
|----------|-------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|-------|-------|
| NP 2 | 12.36 | 11. 29 | 3.7 8 | 11. 16 | 5.1 | 12. 87 | 4.3 1 | 12. 71 | 5.81 | 8.89 | 10.09 |
| NP 3 | 13.5 | 12. 21 | 4.0 5 | 12. 12 | 4.8 7 | 13. 94 | 4.7 | 13. 86 | 5.57 | 9.74 | 11.06 |
| NP 4 | 9.86 | 10. 65 | 3.2 6 | 10. 28 | 4.8 1 | 11. 61 | 3.5 5 | 11. 22 | 5.24 | 7.16 | 8.13 |
| NP 5 | 8.2 | 10. 57 | 2.5 8 | 9.8 8 | 3.5 3 | 11. 2 | 2.8 2 | 10. 78 | 3.84 | 5.88 | 6.67 |
| NP 6 | 13.3 | 12. 5 | 10. 12 | 12. 27 | 12. 96 | 14. 26 | 11. 53 | 13. 99 | 14.7 7 | 12.37 | 14.02 |
| NP 7 | 11.9 | 11. 09 | 10. 81 | 11. 75 | 12. 37 | 12. 61 | 12. 3 | 13. 34 | 14.0 7 | 11.22 | 12.71 |
| NP 8 | 3.5 | – | – | – | – | – | – | 3.2 7 | 4.42 | – | 2.44 |
| NP 9 | 18.6 | – | – | – | – | – | – | 15. 49 | 26.6 7 | – | 14.11 |
| NP 10 | 123 | 125 .29 | 34. 42 | 12 7.2 | 42. 37 | 142 .46 | 60. 28 | 147 .38 | 42.3 2 | 86.42 | 98.07 |
| NP 11 | 12.76 | 12. 85 | 10. 29 | 12. 1 | 11. 82 | 14. 61 | 11. 7 | 14. 4 | 13.4 3 | 12.27 | 13.93 |
| NP 12 | 11.63 | 12. 6 | 3.6 7 | 13. 02 | 3.8 1 | 14. 34 | 4.2 8 | 14. 77 | 4.44 | – | – |
| NP 13 | 10.87 | 10. 8 | 4.4 8 | 11. 21 | 3.8 6 | 12. 28 | 5.1 2 | 12. 68 | 4.42 | – | – |

Концентрацию наночастиц измеряли с помощью метода с БХК и анализа по Брэдфорду двумя способами: прямым и косвенным. Прямой метод заключается в определении содержания белка в суспензиях очищенных наночастиц. Для этого мы смешали наночастицы с реагентом для анализа с БХК или реагентом Брэдфорда и измерили поглощение на соответствующих длинах волн. Косвенный метод включает определение концентрации свободного белка в супернатантах, полученных при промывках наночастиц. Концентрацию наночастиц рассчитывали путем вычитания общего количества белка в супернатантах из исходного количества белка. Количество белка в исходных растворах определяли с помощью гравиметрии и УФ-спектроскопии, как упоминалось выше.

Концентрации альбуминовых наночастиц NP6, NP7 и NP11, определенные всеми испытанными методами, отличались незначительно в отличие от других партий наночастиц БСА (таблица 4.3). Партии NP6, NP7 и NP11 стабилизировали нагреванием или низкой концентрацией глутарового альдегида. Для партий NP1-5, NP10 и NP12-13 концентрация была значительно ниже при прямом анализе с помощью ВСА или анализе по Брэдфорду. Более сложная ситуация наблюдалась для желатиновых наночастиц (NP8 и NP9). Анализ и возможное объяснение различий приведены ниже. Мы обсудили результаты, полученные с помощью каждого метода, и выявили возможные источники неверных результатов.

Анализы белка при помощи красителей широко используются для количественного белковых наночастиц. Метод Брэдфорда основан на связывании красителя Кумасси синего G-250 с остатками аргинина, гистидина, фенилаланина, триптофана и тирозина и гидрофобных взаимодействиях красителя и белка. Спектр поглощения красителя изменяется при взаимодействии с белком, концентрацию которого можно рассчитать, измеряя поглощение при 595 нм [260]. Анализ с БХК основан на восстановлении Cu^{2+} до Cu^{1+} цистеином, цистином, триптофаном, тирозином и пептидными связями и образовании комплексов Cu^{1+} и БХК, имеющих фиолетовый цвет (поглощение при 562 нм) [260]. Концентрацию наночастиц желатина измеряли только методом БХК-анализа, поскольку краситель Кумасси плохо связывается с желатином.

Концентрацию белковых наночастиц обычно определяют с помощью анализов на основе красителей прямым (измеряя концентрацию белка в образце очищенных наночастиц) или непрямой способом (в супернатантах). Мы обнаружили, что прямой метод приводит к существенному занижению (более чем на 50%) концентрации альбуминовых наночастиц (таблица 4.3) по сравнению с другими методами. Примечательно, что ситуация была совершенно иной при анализе термически стабилизированных (NP6 и NP7) или частично сшитых наночастиц (NP11). Концентрация наночастиц желатина (NP8 и NP9), измеренная прямым анализом с БХК, была выше, чем концентрация, полученная другими методами. Эти различия можно объяснить более медленной реакцией красителей с молекулами БСА, входящими в состав наночастиц, чем со свободными молекулами БСА. Мы предположили, что для того, чтобы краситель Кумасси или ионы меди достигли внутренних частей белковой наночастицы, необходимо определенное количество времени; следовательно, для завершения реакции требуется больше времени.

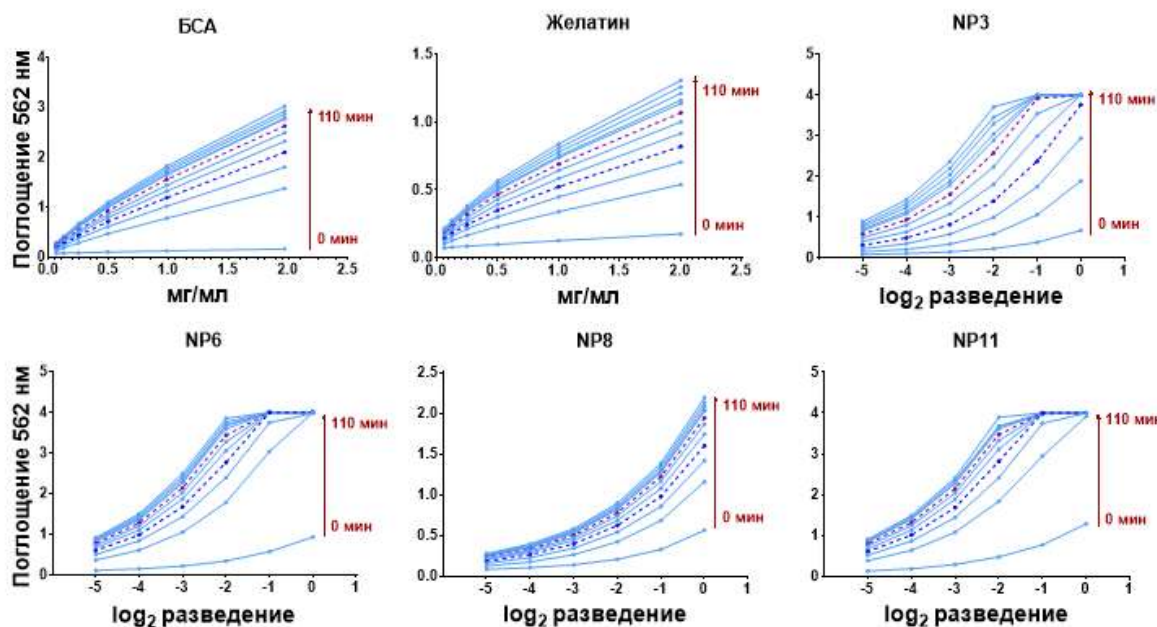


Рисунок 4.7 – Кривые доза-реакция анализа БХК, записанные с 10-минутными интервалами времени. Синие и фиолетовые пунктирные линии представляют собой кривые доза-реакция через 30 и 60 минут соответственно.

Чтобы подтвердить эту гипотезу, мы инкубировали последовательные разведения БСА, желатина и наночастиц, сшитых различными методами, с реагентом для БХК анализа в течение длительных периодов времени (до 110 мин). Калибровочные кривые записывались каждые 10 мин (Рисунок 4.7). Стандартный протокол производителя предписывает оценку результатов после 30 минут инкубации при температуре +37 °С. Значительно более медленный рост поглощения при 562 нм наблюдался для NP3, которые были сшиты избытком глутарового альдегида по сравнению с NP6 и NP11. После этого мы провели анализ по Брэдфорду и анализ с БХК наночастиц NP3 и NP6 при +37 °С и +60 °С. Мы оценили концентрацию наночастиц через разные промежутки времени. Концентрация NP6 была близка к той, которая была определена гравиметрическим анализом уже в самом начале измерения, и в дальнейшем наблюдался только медленный рост. Напротив, концентрация NP3 была очень низкой в начале эксперимента; однако затем наблюдалось существенное увеличение. Несмотря на это, даже когда реакция шла в 2-3 раза дольше в сравнении со стандартным протоколом, концентрация не достигала значений, сопоставимых с результатами гравиметрического анализа. Кроме того, мы разрушили наночастицы NP2, NP4 и NP12 щелочным гидролизом, что привело к увеличению сигнала в анализах с БХК и по Брэдфорду по сравнению с интактными наночастицами и наночастицами, смешанными со щелочью перед анализом. Эти результаты подтверждают, что наночастицы, сшитые избытком глутаральдегида, реагируют с красителями менее интенсивно по сравнению с чистым белком.

Реакция реагента БХК с альбуминовыми наночастицами, сшитыми нагреванием, желатиновыми наночастицами и альбуминовыми наночастицами с 40%-ной сшивкой глутаральдегидом протекала значительно быстрее, что указывает на влияние способа и степени сшивки на результат анализа. Эти наночастицы были более восприимчивы к протеолитической деградации, которая также зависит от степени сшивания (Рисунок 4.5). Следовательно, для белковых наночастиц с высокой степенью сшивания требуется большее время инкубации

при измерении концентрации белка прямым методом. Наши результаты согласуются с предыдущими публикациями, показывающими, что лекарства высвобождаются медленнее из наночастиц ЧСА с более высокой степенью сшивания [246, 43].

Другие данные, подтверждающие влияние присутствия наночастиц на результаты анализа белков с помощью красителей, были получены при измерении концентрации белка в десольватированных образцах. Мы измерили концентрацию БСА после десольватации и добавления глутарового альдегида. Концентрации белка после десольватации были более чем в два раза ниже ожидаемого значения, за исключением партий NP6, NP7 и NP11. К сожалению, десольватированный желатин быстро агрегировал при хранении и был непригоден для анализа белка. Наблюдаемые различия не были связаны с присутствием глутарового альдегида и этанола в десольватированных образцах, поскольку эти химические вещества увеличивают поглощение.

Концентрации очищенных альбуминовых наночастиц, измеренные с помощью анализа Брэдфорда, как правило, были ниже, чем концентрации, полученные с помощью анализа с БХК (за исключением партии NP13). Возможным объяснением является более медленная диффузия Кумасси синего в толще наночастиц по сравнению с ионами меди из-за его большего размера.

Концентрации желатиновых наночастиц, измеренные прямым анализом с БХК, были выше, чем полученные другими методами. Это может быть связано с более высокой интенсивностью рассеяния света наночастицами желатина, которые имеют больший диаметр по сравнению с наночастицами БСА (таблица 4.1). Мы не проводили коррекцию на величину светорассеяния, поскольку мутность растворов белковых наночастиц уменьшалась после инкубации с реагентом БХК.

Arroyo-Maya с соавт. [10] показали, что результаты прямого определения белка в суспензии наночастиц α -лактальбумина с помощью анализа Кьельдаля (эталонный метод) и анализа с БХК (анализ проводили при +60 °C в течение 15 мин) были почти одинаковыми. Они синтезировали наночастицы со степенью

сшивания 180%, но не наблюдали значительного занижения концентрации наночастиц. Учитывая, что оба белка содержат 10-11% лизина [125], количество межмолекулярных поперечных связей должно быть большим как для наночастиц БСА, так и для α -лактальбумина. Очевидно, что наночастицы α -лактальбумина быстро реагируют с реагентом ВСА, несмотря на множественные поперечные сшивки. Возможными причинами являются более высокая температура реакции, ускорение диффузии ионов меди внутри наночастиц и разница в плотности упаковки БСА (66 кДа) и α -лактальбумина (14 кДа). Однако в проведенных нами экспериментах прямой анализ с БХК занижал концентрацию альбуминовых наночастиц, сшитых избытком глutarальдегида, даже при повышенной температуре и длительной инкубации.

Количественное определение недесольватированного белка в супернатантах с помощью анализов с БХК и по Бредфорду (непрямой подход) широко используется для определения концентрации белковых наночастиц. В отличие от результатов прямого метода, концентрации, измеренные косвенным методом и гравиметрическим анализом, были сопоставимы (таблица 4.3). Во время проведения непрямого анализа были построены калибровочные кривые БСА с учетом того, что концентрации чистого БСА, измеренные по поглощению при 280 нм и гравиметрически, были разными. Как правило, концентрации были выше при определении их непрямым методом с БХК и методом Бредфорда при использовании для калибровки величин концентраций БСА, измеренных гравиметрическим анализом, из-за существенной разницы между исходными концентрациями БСА (например, исходная масса БСА составляла 207,2 мг в 4 мл по данным A_{280} против 236,12 мг в 4 мл по данным гравиметрии для БСА от "VWR"). Интересно, что цвет супернатантов соответствовал концентрации недесольватированного белка.

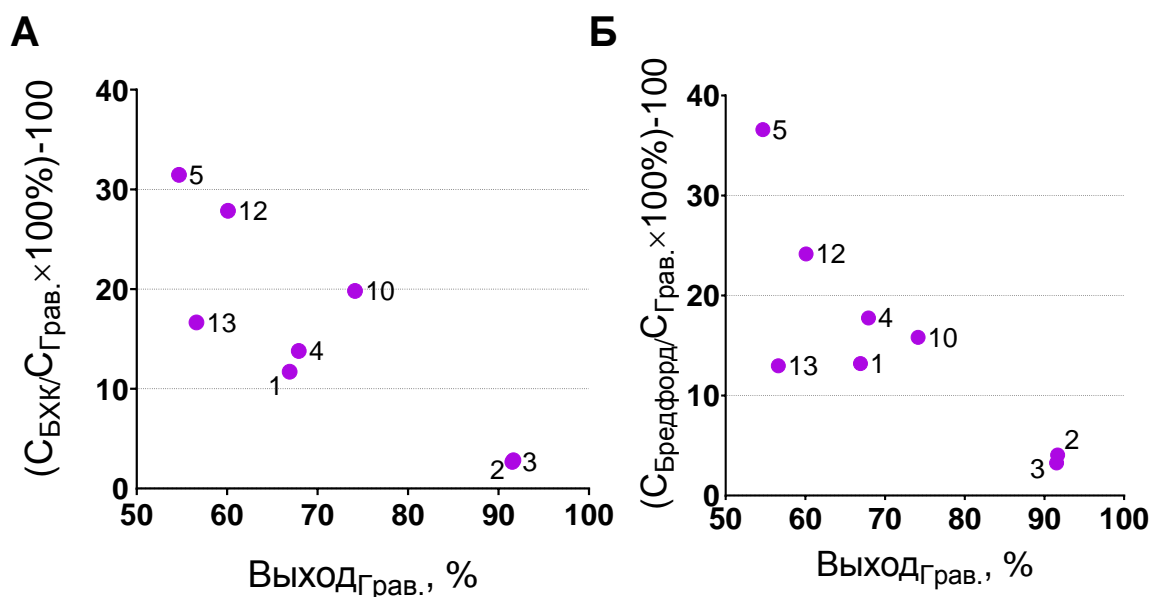


Рисунок 4.8 – Взаимосвязь между выходом синтеза и процентной разностью концентраций, измеренных непрямым анализом БХК (А) или методом Бредфорда (Б) и гравиметрическим анализом. Калибровочные кривые БСА в анализе БХК и анализе Бредфорда строили с использованием концентрации БСА, измеренной гравиметрическим анализом. Числа возле точек — это номера партий альбуминовых наночастиц. $C_{\text{БСА}}$ - концентрация БСА, измеренная косвенным методом, $C_{\text{Грав.}}$ - концентрация БСА, измеренная гравиметрически, $\text{Выход}_{\text{Грав.}}$ - выход наночастиц БСА, оцененный с помощью $C_{\text{Грав.}}$.

Мы выявили взаимосвязь (Рисунок 4.8) между выходом наночастиц БСА и разницей концентраций, измеренных с помощью анализа БХК или Бредфорда и гравиметрического анализа: чем ниже выход синтеза, тем выше завышение концентрации наночастиц (анализ с БХК: r^2 Пирсона = 0,7211, $r = -0,8492$, 95% ДИ от от -0,9721 до -0,3598, $p = 0,0076$, анализ Бредфорда: r^2 Пирсона = 0,6473, $r = -0,8046$, 95% ДИ от -0,9632 до -0,2307, $p = 0,0160$). В этот анализ были включены только партии, приготовленные с использованием избыточного сшивания глутаровым альдегидом. Для нескольких партий (NP5, NP10 и NP12) разница составляла 20% и более. С другой стороны, для партии NP13 (выход всего 56%) разница составляет менее 20%.

Мы объяснили разницу между анализами: непрямым анализом и гравиметрическим анализом присутствием в супернатантах небольших наночастиц БСА, которые не удалялись центрифугированием и медленно реагировали с красителем Кумасси и ионами меди. Супернатанты после первой промывки анализировали с помощью гель-электрофореза. Агрегаты БСА расположены в верхней части геля, и их количество обычно соответствовало выходу наночастиц.

Мы центрифугировали десольватированный БСА при 20000 g в течение 30 мин. В этих условиях образовывались относительно прозрачные супернатанты и плотные осадки наночастиц. Возможно, центрифугирование при 20000 g не позволяет осаждать мелкие наночастицы (десятки нанометров). При низких выходах наночастиц процентное содержание таких мелких наночастиц и агрегатов может быть достаточным для влияния на результаты анализов связывания красителя. Присутствие этих наночастиц приводит к недооценке концентрации БСА в супернатантах и, следовательно, к завышению концентрации очищенных наночастиц. В литературе сообщается о различных условиях центрифугирования наночастиц, сделанных из БСА или ЧСА: 6000 g в течение 5 мин [338], 16 000 g в течение 20 мин [384], 16 000 g в течение 10 мин для частиц размером 140 нм и 20 000 g для частиц меньшего размера [349], 20 000 g в течение 30 мин [153], 20 817 g в течение 10 мин [350], 41000 g в течение 20 мин [227]. Большинство исследователей центрифугировали наночастицы при 20000–25000 g и ниже. Количество нерастворимого белка также может зависеть от продолжительности десольватации. Стандартный протокол требует 24-часовой инкубации [190], в то время как мы сшивали наночастицы в течение 60 мин. Однако анализ литературных данных показывает, что выход синтеза наночастиц в большей степени зависит от условий десольватации (pH, ионная сила, начальная концентрация белка), а не от продолжительности этого процесса.

Другими возможными источниками неправильных результатов при непрямом анализе по Бредфорду и с БХК являются мутность образцов надосадочной жидкости и влияние сшивающих веществ и десольватирующих

агентов на формирование окраски. Мутность супернатантов зависела от типа сшивания и общей эффективности десольватации. Наибольшая мутность была у супернатантов из партий NP1, NP5-9 и NP12. Хотя в непрямых анализах с БХК и по Бредфорду мы анализировали супернатанты в разведениях 1:9 и 1:27 (поглощение в более низких разведениях выходило за пределы калибровочной кривой), рассеяние света могло привести к увеличению поглощения при 562 нм или 595 нм и, следовательно, к завышению концентрации белка в супернатанте. Как мы упоминали ранее, коррекция светорассеяния не проводилась, поскольку мутность образцов менялась во время инкубации с красителями.

Хорошо известно, что различные химические вещества (включая этанол и глутаровый альдегид) могут влиять на результаты анализа белков, связывающих краситель [260]. Мы изучили влияние глутарового альдегида и другого популярного сшивающего агента, EDC, на результаты анализов В с БХК и по Бредфорду (Рисунок 4.9). Как и ожидалось, глутаровый альдегид препятствует анализу с БХК из-за его способности восстанавливать ионы меди [342]. Присутствие 8-10% этанола и 0,025% глутарового альдегида (что соответствует разведению супернатанта 1:10) приводит к завышению концентрации белка в анализе с БХК как для желатина, так и для БСА. Также было обнаружено некоторое невоспроизводимое влияние на анализ по Бредфорду. Следует отметить, что степень влияния глутарового альдегида и этанола зависит от их концентрации. В этой работе глутаровый альдегид был добавлен в большом количестве: 5,4 альдегидных группы на 1 остаток лизина, что в 2,7 раза выше, чем обычно используется [191]. В предыдущем исследовании Weber с соавт. обнаружили, что влияние свободного глутарового альдегида в супернатантах наночастиц на анализ с БХК было незначительным [191]. Степень сшивания в этой статье была равна или ниже 2 альдегидных групп на 1 остаток лизина.

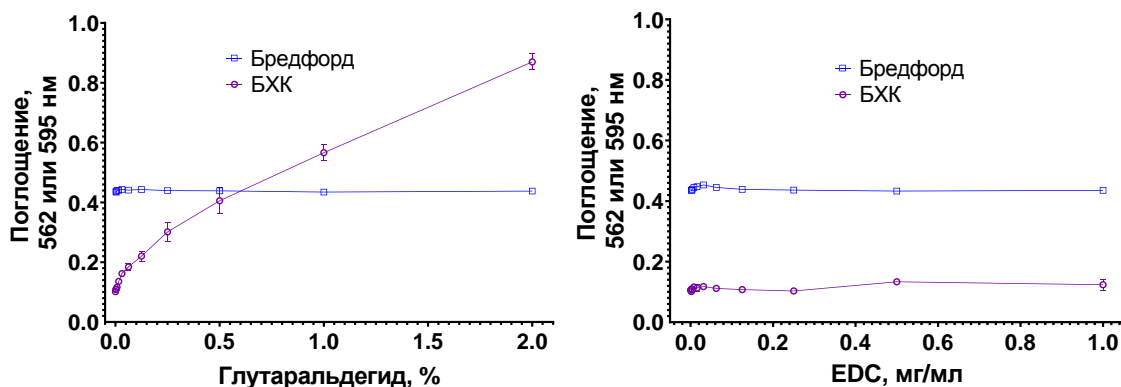


Рисунок 4.9 – Влияние EDC и глутарового альдегида на анализы БХК или методом Бредфорда.

Нагревание также оказывает некоторое влияние на анализы, основанные на связывании красителя. Известно, что денатурация белка повышает его восстановительную активность [245]. Нагревание БСА при температуре +70 °С в течение 120 мин приводит к денатурации большинства молекул [28]. В связи с этим можно ожидать, что поглощение прогретого БСА должно быть выше, чем у интактного; однако небольшое снижение поглощения в нагретых образцах наблюдалось в анализе с БХК, но не в анализе Бредфорда.

Сочетание описанных факторов объясняет различия в концентрациях между партиями NP6-9 и NP11, измеренные с помощью гравиметрии и непрямого анализа Бредфорда или БХК. Супернатанты партий NP8 и NP9 имели самую высокую мутность и рассеивали больше света. Супернатант NP11 содержал меньше глутарового альдегида; таким образом, его влияние на анализ было ниже по сравнению с партиями NP1-5, NP10 и NP12-13.

Гравиметрический анализ является методом прямого количественного измерения концентрации белковых наночастиц. Мы высушивали наночастицы в фарфоровых тиглях при температуре +140 °С до постоянной массы. Температуру сушки выбирали в соответствии с кривыми ТГА наночастиц, желатина и БСА. Потери веса не наблюдалось примерно до +250 °С. Согласно результатам Kasarda и Black [158], термическое разложение белка постепенно увеличивается со +130-

150 °С и становится более интенсивным со +180-200°С. Мы выбрали температуру сушки, близкую к этим значениям, чтобы удалить максимально возможное количество связанной воды. Стандартными условиями для определения сухой массы белка является нагревание при температуре +105 °С [187]. В литературе выход наночастиц часто определяется с помощью гравиметрического анализа, однако условия анализа редко указываются. В некоторых работах сообщалось о температуре сушки до +60 °С [262] и +80 °С. Трудно оценить, в какой степени температура нагрева может повлиять на результаты анализа, но это также следует принимать во внимание, поскольку известно, что она влияет на количество обнаруживаемой остаточной влаги [29].

Для проведения ТГА были приготовлены две партии концентрированных наночастиц желатина (NP9) и БСА (NP10). Концентрированные образцы требовались из-за низкой емкости тигля (максимальный объем составляет примерно 100 мкл). Мы сравнили результаты гравиметрического анализа с концентрациями, рассчитанными по кривым ТГА, и обнаружили, что обе концентрации практически точно совпадают для NP10 (123 мг/мл по гравиметрии и 125,7 мг/мл по ТГА), но не для NP9 (18,6 мг/мл по гравиметрии и 21,2 мг/мл по ТГА). Низкая концентрация наночастиц желатина может объяснить различия в результатах, полученных обоими методами для NP9. Только приблизительно 2 мг наночастиц содержится в 100 мкл суспензии наночастиц, добавленной в тигель, что слишком мало для точного измерения.

Следует также отметить, что масса глутарового альдегида, связанного с молекулами белка, не учитывалась при сравнении результатов гравиметрического анализа и других методов. Каждая молекула БСА содержит 59 остатков лизина; каждый из них теоретически может вступать в реакцию с одной молекулой глутарового альдегида. Реакция с 59 молекулами глутарового альдегида может увеличить массу каждой молекулы БСА на 5900 кДа (т.е. на 8-9%). Из-за наличия поперечных связей и свободных аминогрупп в наночастицах БСА, обработанных глутаровым альдегидом [190], вряд ли возможно рассчитать точное количество молекул глутарового альдегида, связанных с одной молекулой БСА.

Измерение поглощения при 280 нм является распространенным методом количественного определения белка, поэтому неудивительно, что он часто используется для оценки концентрации белковых наночастиц. В некоторых работах концентрацию наночастиц в суспензии определяли путем прямой оценки поглощения при 280 нм [222, 298, 339] или путем косвенного измерения содержания белка в супернатантах после промывки наночастиц [353]. Мы предполагаем, что оба подхода могут привести к ошибочным результатам по двум причинам. Первая причина заключается в том, что белковые наночастицы рассеивают свет, что приводит к завышенным значениям поглощения. Эта проблема была решена Argoyo-Maya et al. [10] путем применения поправки на рассеяние света. Несмотря на эту поправку, концентрация наночастиц α -лактальбумина, определенная с помощью УФ-поглощения, была на 60% выше, чем концентрация, определенная с помощью анализа Кьельдаля (эталонный метод). Возможное объяснение этого различия и второй источник неправильных результатов заключается в том, что белки изменяют поглощающую способность после обработки сшивающими агентами.

Поглощение при 280 нм как желатина, так и БСА существенно увеличивается после взаимодействия с глутаровым альдегидом; более того, поглощение прореагировавшего белка больше, чем сумма поглощений белка и глутарового альдегида по отдельности (Рисунок 11С). Другим следствием этого явления является сложность приготовления калибровочных растворов. Мы приготовили 1 мг/мл раствора БСА, обработанного глутаровым альдегидом, двумя способами. В первом случае мы смешали концентрированный (около 50 мг/мл) водный раствор БСА с соответствующим количеством глутарового альдегида, инкубировали в течение 1 ч и разбавили БСА до 1 мг/мл (Рисунок 4.9Г). Во втором случае мы добавили соответствующее количество глутарового альдегида к 1 мг/мл раствора БСА (Рисунок 4.9В). Поглощающая способность обработанного глутаровым альдегидом БСА, полученного по первому способу, была значительно выше. Разница заключается в более быстрой реакции между глутаровым альдегидом и белком в концентрированном растворе. Когда мы

готовили калибраторы для экспериментов по гидролизу, мы проводили реакции БСА или желатина с глутаровым альдегидом в тех же условиях (продолжительность, температура), в которых синтезировали наночастицы (Рисунок 4.9А, Б). Однако такой подход является достаточно трудоемким и не гарантирует высокой точности измерений.

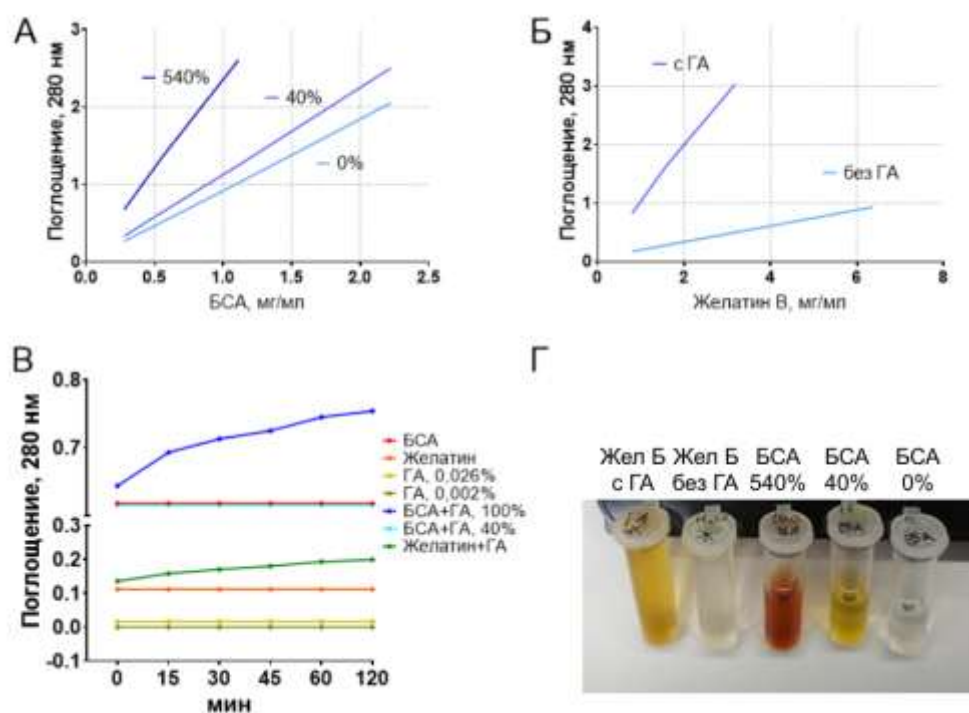


Рисунок 4.10 – А, Б – оптическая плотность БСА (А) или желатина Б (Б), обработанных различными количествами глутарового альдегида, после гидролиза в течение 48 ч в 4 М NaOH. В - изменение поглощения БСА, желатина, глутарового альдегида и белков, обработанных глутаровым альдегидом, во времени (концентрация белков 1 мг/мл). Г - растворы БСА (50 мг/мл) и желатина (26,6 мг/мл), обработанные различными количествами глутарового альдегида. ГА - глутаровый альдегид. Процент показывает исходное количество альдегидных групп на количество остатков лизина.

Другим методом определения концентрации белковых наночастиц является комбинация гидролиза с измерением поглощения при 280 нм [235, 236, 269]. В

предварительных экспериментах мы оптимизировали условия гидролиза. Гидролиз проводили в 1 М, 2 М и 4 М растворах HCl и NaOH в течение нескольких дней. Мы добавили 666 мкл 10 М HCl или NaOH к 1 мл неразбавленных наночастиц. Агрегация наночастиц происходила при всех концентрациях HCl (Рисунок 4.11). Скорость гидролиза в NaOH контролировали путем измерения поглощения при 280 нм и 600 нм. Гидролиз завершался через 48 ч при 4 М NaOH и через 96 ч при 2 М NaOH. Обратите внимание, что как поглощение при 280 нм, так и при 600 нм (мутность) уменьшилось, подчеркивая влияние рассеяния света на количественное определение наночастиц по поглощению УФ-излучения. Поглощение молекул БСА при инкубации в щелочи существенно не изменилось за четыре дня (данные не показаны).

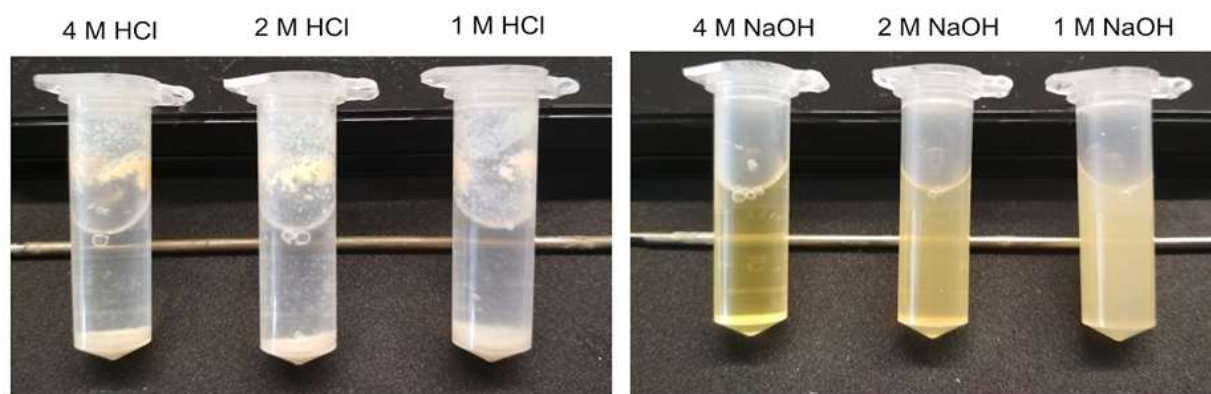


Рисунок 4.11 – Альбуминовые наночастицы после инкубации в течение 48 ч в водных растворах HCl и NaOH различной концентрации при +37 °С

Мы гидролизовали наночастицы БСА и желатина в 4 М NaOH в течение двух дней. Калибровочные кривые были построены с использованием БСА и желатина, обработанного глутаровым альдегидом, в условиях, имитирующих те, которые использовались при получении наночастиц. Концентрацию наночастиц, стабилизированных нагреванием, определяли по отношению к необработанному глутаровым альдегидом БСА. Концентрации, определенные методом гидролиза+УФ, были ниже по сравнению с результатами гравиметрического анализа и непрямых анализов белков методами с БХК и Бредфорда (таблица 4.3),

за исключением партий NP6, NP7 и NP11. В предварительных испытаниях концентрация наночастиц, определенная методом гидролиза, была лишь немного ниже концентрации, измеренной с помощью гравиметрического анализа. Причиной расхождения результатов анализа могли быть особенности подготовки калибровочных образцов для наночастиц, сшитых избытком глутарового альдегида, описанные выше. Действительно, партии NP6, NP и NP11 были синтезированы без добавления глутарового альдегида или имели низкую степень сшивания.

В работе [235] щелочной гидролиз+УФ и ВЭЖХ использовались для измерения концентрации наночастиц ЧСА и дали аналогичные результаты, несмотря на то, что калибровочные растворы ЧСА были приготовлены без добавления глутарового альдегида. Авторы использовали низкую концентрацию глутарового альдегида, 1,56 мкг на 1 мг ЧСА, тогда как для 100% сшивания необходимо приблизительно 47 мкг на 1 мг [191]. Такая низкая степень сшивания не должна приводить к значительному изменению поглощения по сравнению с интактным белком (Рисунок 4.10А).

Основным результатом этого этапа работы является то, что природа белка и условия анализа, а также способ и степень сшивания влияют на результаты измерения концентрации наночастиц. Наиболее четкие различия наблюдались при использовании прямого анализа белка в суспензии наночастиц при помощи красителей. Мы предполагаем, что высокая интенсивность сшивания приводит к более медленной диффузии красителя Кумасси и ионов меди в толще наночастиц. Следовательно, молекулам красителя и ионам меди требуется больше времени, чтобы достичь всех доступных белковых молекул. Присутствие наночастиц в супернатантах после десольватации является источником неверных результатов для непрямых анализов с красителями, что приводит к недооценке концентрации белка, не вошедшего в состав наночастиц. С другой стороны, присутствие наночастиц в супернатантах увеличивает поглощение за счет рассеяния света, что приводит к завышению количества недесольватированного белка. Присутствие мелких наночастиц в надосадочной жидкости может быть проблемой, когда нет

оптимизированного протокола десольватации (например, когда тестируются новые белки, десольватирующие агенты или методы сшивания). При низкой степени сшивания эффект замедления диффузии красителей внутрь наночастиц менее выражен и не влияет на измерения концентрации. Количество поперечных связей зависит от структуры белка, количества реакционноспособных аминокислот на молекулу и количества добавленного сшивающего агента.

Помимо этого, следует принимать во внимание взаимодействие сшивающих агентов с красителями, реагирующими с белком. В недавних работах сообщалось о множестве необычных сшивающих агентов: ванилин [201], персульфат рутения и аммония [223], цистеин [339], ионы цинка [72], 3,3'-дитиобис [сульфосукцинимидилпропионат] [61]. Применение новых протоколов сшивки белковых молекул должно сопровождаться проверкой того, влияют ли они на поглощение при определенных длинах волн и связывание красителей с белком. Изменение поглощения белка для различных соотношений сшивающего вещества к белку также должно быть проверено при использовании спектроскопических методов. Коррекция светорассеяния должна быть произведена при количественном определении белковых наночастиц путем прямого измерения поглощения ультрафиолетового излучения [10].

По нашему мнению, простой гравиметрический анализ является наиболее удобным способом измерения концентрации белковых наночастиц, особенно при уточнении с помощью ТГА. Некоторая остаточная влага может присутствовать в образцах белковых наночастиц даже после сушки при температурах выше +100 °С; поэтому применение ТГА позволяет более надежно оценить сухой вес наночастиц. Точное взвешивание наночастиц требует достаточного количества наночастиц с точки зрения количества и концентрации, которые зависят от точности лабораторных весов и объема тигля (в случае ТГА).

4.5 – Оптимизация синтеза желатиновых наночастиц методом десольватации

Желатин - это продукт частичного гидролиза коллагена. В процессе приготовления желатина коллаген предварительно обрабатывают в кислых или

щелочных условиях, в результате чего получают два типа желатина: тип А и тип В соответственно. Основными источниками желатина являются бычья кожа, шкуры крупного рогатого скота, а также кости крупного рогатого скота и свиней, в то время как желатины из соединительных тканей рыб и птиц используются менее широко [102]. Желатин из холодноводных рыб содержит меньший процент пролина и гидроксипролина, которые участвуют в образовании коллагеноподобных тройных спиралей и поэтому менее предпочтительны с точки зрения свойств образуемых ими гелей [62, 102]. Будучи биосовместимым (включен в список GRAS FDA), низкоиммуногенным, дешевым и общедоступным биополимером, желатин набирает популярность в биомедицине, биотехнологии и пищевой промышленности [162].

Желатин, как и многие другие белки, используется в виде желатиновых наночастиц. Желатиновые наночастицы состоят из многочисленных молекул желатина, которые ковалентно сшиты или стабилизированы при помощи какого-либо покрытия [162]. Доставка лекарств является научной областью, пожалуй, наиболее интенсивно использующей преимущества желатиновых наночастиц. Различные лекарственные средства, ДНК, агенты для визуализации (например, радиоизотопы или флуоресцентные красители) или питательные вещества могут быть физически захвачены наночастицами при синтезе или химически прикреплены к их поверхности [168]. Подбор диаметра наночастиц, типа покрытия и степени сшивки молекул желатина позволяет контролировать время циркуляции, поглощение клетками, а также скорость высвобождения лекарственного средства [130, 168]. Желатиновые наночастицы обладают рядом уникальных преимуществ, а именно, они обеспечивают улучшенную фармакокинетику, профиль высвобождения и локализованную доставку лекарств, сохраняя при этом благоприятные свойства желатина, включая способность к биodeградации в тканях наряду с низкой цитотоксичностью и иммуногенностью [130]. В последние годы было сделано много сообщений о нанотерапевтических препаратах и нановакцинах на основе желатина [383]. Ниже представлены

некоторые типичные примеры успешного применения наномедицинских препаратов на основе желатиновых наночастиц *in vivo*.

Применение желатиновых наночастиц позволило получить тот же терапевтический эффект при пятикратно меньшей дозе тимолола малеата для лечения глаукомы на мышинной модели по сравнению с традиционной терапией (свободный тимолол малеат) [78]. Желатиновые наночастицы и их аминированные аналоги проявляли иммуномодулирующую эффективность, сравнимую с эффективностью алюминиевых адьювантов, будучи не иммуногенными сами по себе [329]. Пегилированные желатиновые наночастицы показали превосходную биосовместимость и значительно улучшили кинетику высвобождения и биодоступность ибупрофена после парентерального введения [254]. Желатиновые наночастицы, нагруженные иммуностимулирующими CpG олигодезоксинуклеотидами, обеспечивали долгосрочный положительный эффект у лошадей с астмой и показали более высокую эффективность по сравнению со стандартной терапией [172]. Антимикробные желатиновые наночастицы, модифицированные наночастицами селена и комплексами рутения и покрытые мембранами эритроцитов, были протестированы *in vivo* на мышах. Наночастицы накапливались в месте повреждения и обеспечивали элиминацию метициллинрезистентного штамма золотистого стафилококка; их эффективность была равна эффективности ванкомицина [209].

Потенциальные области применения желатиновых наночастиц не ограничиваются терапией и разработкой вакцин. Желатиновые наночастицы и микрочастицы наряду с молекулярным желатином могут служить дешевыми заменителями коллагена, имитирующими внеклеточный матрикс, при культивировании клеток и тканевой инженерии [19]. Желатиновые наночастицы улучшали механические свойства биочернил для 3D-биопечати [49, 63] и увеличивают захват опухолевых клеток в микрофлюидном чипе, предназначенном для детекции циркулирующих опухолевых клеток [364]. Приготовление эмульсий Пикеринга в пищевой химии является еще одним важным применением желатиновых частиц [83].

Десольватация является одним из наиболее популярных методов синтеза желатиновых наночастиц [162]. Этот метод основан на добавлении плохих растворителей (обычно ацетона, спиртов или ацетонитрила) к водному раствору белка. Десольватацию желатина обычно проводят в два этапа в соответствии с методом, описанным Coester с соавт. [51] и оптимизированным исследователями из той же научной группы [190, 407]. Первая стадия десольватации включает добавление плохого растворителя к раствору желатина, что приводит к осаждению высокомолекулярных фракций. Осадок растворяют в воде, затем, после регулировки pH, повторное добавление плохого растворителя приводит к образованию желатиновых наночастиц. Являясь относительно простым и доступным методом синтеза стабильных и биосовместимых желатиновых наночастиц, двухстадийная десольватация широко используется в различных областях. Недостатками метода являются низкие выходы частиц, недостаточная воспроизводимость первой стадии десольватации и сложность масштабирования процесса [97]. Поэтому были предприняты многочисленные усилия для разработки более простой, одноэтапной методики. Показано, что присутствие низкомолекулярных фракций (более 20% фракций с молекулярной массой менее 65 кДа) в препаратах желатина приводит к образованию нестабильных и полидисперсных наночастиц. Именно эти фракции необходимо удалять на первой стадии десольватации [191, 407].

Было предложено несколько подходов для получения желатиновых наночастиц методом одностадийной десольватации. Первый подход заключается в использовании изготовленного на заказ натурального или рекомбинантного желатина, в котором отсутствуют низкомолекулярные фракции [191, 368]. Недостатком этого способа является ограниченная доступность и высокая стоимость исходного материала. Коммерчески доступный желатин с высоким числом Блюма (около 300) позволяет пропустить первую стадию десольватации [97], однако образующиеся наночастицы имеют тенденцию к агрегации. Вакуумная фильтрация использовалась для удаления высокомолекулярного желатина и повышения однородности желатина перед

десольватацией [326]. Shamarekh с соавт. готовили желатин, обогащенный высокомолекулярными фракциями, из коммерческого желатина и использовали его в качестве исходного материала [303]. Несмотря на то, что эти последние два метода позволяют проводить десольватацию за один этап, они скорее квазиодностадийные, чем истинно одностадийные, поскольку оба они все еще требуют предварительного удаления молекул желатина малого размера.

Интересно, что несколько исследовательских групп сообщили о синтезе однородных желатиновых наночастиц путем одностадийной десольватации без удаления низкомолекулярных фракций [78, 159, 179, 262]. Все эти группы использовали желатин с числом Блюма 225 или ниже, который, как следовало бы ожидать, должен приводить к формированию агрегатов при использовании одностадийного метода. В большинстве этих работ отсутствует объяснение того, почему предлагаемые протоколы синтеза эффективны, однако Ofokansi с соавт. предположили, что синтез при нейтральном pH способствовал стабильности и однородности наночастиц [262].

Нами впервые было показано, что скорость перемешивания раствора желатина существенно влияет на процесс десольватации. Интенсивное перемешивание способствует агрегации желатина. Используя простой одностадийный подход без перемешивания, мы ранее приготовили стабильные и гомогенные наночастицы желатина из желатина с числом Блюма 75 [166]. Основываясь на этих результатах, мы поставили цель разработать простой метод получения наночастиц из любого типа желатина с любым числом Блюма.

Мы обнаружили, что быстрое одномоментное добавление плохого растворителя в водный раствор желатина без перемешивания приводит к образованию монодисперсных наночастиц желатина. Более того, в ходе предварительных экспериментов наночастицы были успешно получены из желатина В с числом Блюма 75 (молекулярная масса в диапазоне от 20 до 25 кДа). Этот результат противоречит выводам, сделанным другими исследователями: обычно для получения стабильных и монодисперсных суспензий наночастиц необходимо удаление низкомолекулярных фракций желатина [407]. Мы

предполагаем, что перемешивание раствора желатина при добавлении плохого растворителя способствует агрегации молекул желатина и, таким образом, не является обязательным.

Чтобы доказать наше предположение, мы провели следующий эксперимент. Этанол быстро добавляли к растворам желатина В (75 Блум, 10 и 20 мг/мл). Затем суспензии перемешивали, используя три режима: (1) мягкое перемешивание на ротационном смесителе (10 об/мин); (2) медленное вихревое перемешивание (100 об/мин); (3) быстрое вихревое перемешивание (2500 об/мин). Для каждого набора условий были приготовлены три отдельные партии частиц. Размер и полидисперсность наночастиц, а также мутность суспензий (поглощение при 600 нм) измеряли сразу после синтеза.

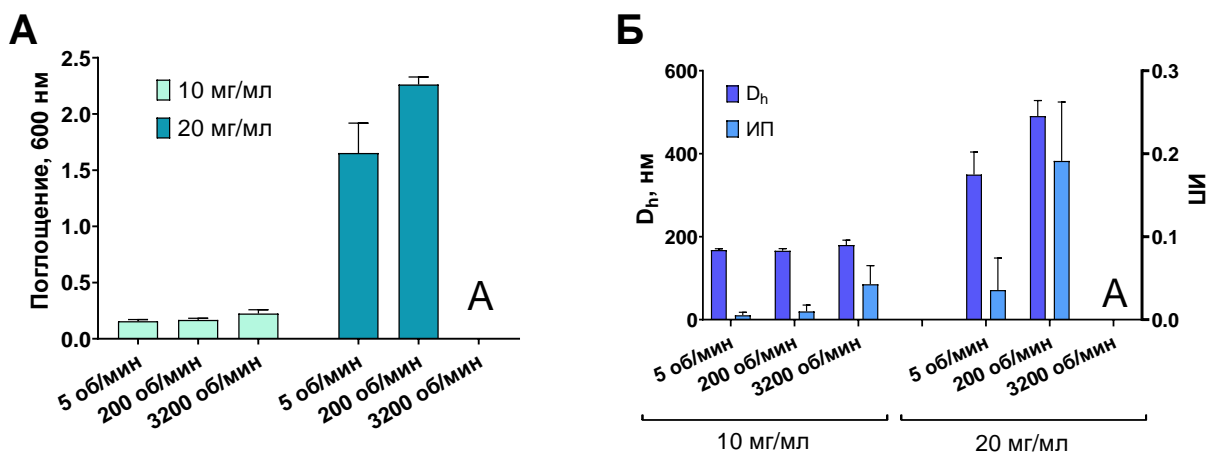


Рисунок 4.12 – Влияние интенсивности перемешивания на мутность (А) и размер (Б) желатиновых наночастиц. D_h – гидродинамический диаметр; ИП – индекс полидисперсности. Показаны средние значения трех отдельных партий, среднее значение \pm стандартное отклонение. Символ «А» означает агрегацию.

При концентрации желатина 10 мг/мл вихревое перемешивание оказывает незначительный эффект, и только самая высокая его скорость вызывает незначительное увеличение размера наночастиц и мутности. Однако вихревое перемешивание оказывало значительное влияние, когда концентрация желатина

была удвоена: почти 50%-ное увеличение среднего размера и мутности при низкой скорости и сильная агрегация при высокой скорости. В то же время при перемешивании на ротационном смесителе мы получали гомогенные суспензии наночастиц желатина с показателями полидисперсности ниже 0,1 (Рисунок 4.12). Мы не проводили экспериментов с более высокими концентрациями желатина, однако ранее мы успешно синтезировали наночастицы желатина, используя раствора желатина с концентрацией 30 мг/мл, который был десольватировали при непродолжительном осторожном перемешивании [166].

Полученные результаты объясняют, почему некоторые исследователи смогли осуществить одностадийный синтез наночастиц желатина без удаления низкомолекулярных фракций желатина [78, 159, 179, 262]. Они десольватировали растворы с низкой концентрацией желатина (1% или менее), при которой перемешивание не оказывает влияния.



Рисунок 4.13 – Препараты, полученные при добавлении этанола к раствору желатина В, 75 Блюм при быстром и медленном перемешивании. Крупные агрегаты желатина отмечены стрелками.

В то же время Geh с соавт. синтезировали монодисперсные наночастицы из растворов желатина с концентрацией 40 и 50 мг/мл путем добавления ацетона при перемешивании [97]. Авторы использовали коммерчески доступные желатины А и В числом Блюма 300 и средними молекулярными массами в диапазоне от 400 до 500 кДа. Поэтому мы предполагаем, что низкомолекулярные фракции в препаратах желатина могут способствовать агрегации в процессе десольватации при высоких общих концентрациях желатина (около 20 мг/мл и более) при перемешивании. Небольшой процент или отсутствие низкомолекулярных фракций позволяет избежать агрегации даже при интенсивном перемешивании. Чтобы подтвердить эти предположения и продемонстрировать роль перемешивания и низкомолекулярных фракций желатина в процессе десольватации, были проведены еще два эксперимента.

Во-первых, мы десольватировали раствор желатина В с низким числом Блюма (30 мг/мл, рН 9) этанолом при интенсивном перемешивании и без перемешивания. Одновременное добавление спирта приводило к образованию гомогенной суспензии наночастиц, тогда как добавление этанола при перемешивании по каплям приводило к образованию агрегатов на дне флакона (Рисунок 4.13).

Во втором эксперименте мы десольватировали изопропиловым спиртом растворы желатинов А с числом Блюма 300 и 62 (оба по 30 мг/мл, рН 10) или их смеси 3:1, 2:2 или 1:3. Общий объем раствора желатина составлял 4 мл. Объемная доля желатина А, 62 Блюм варьировали от 0% (4 мл желатина А, 300 Блюм + 0 мл желатина А, 62 Блюм) до 100% (0 мл желатина А, 300 Блюм + 4 мл желатина А, 62 Блюм). Как мы уже говорили ранее, Geh с соавт. успешно десольватировали [97] раствор желатина А, 300 Блюм при перемешивании. Таким образом, этот сорт желатина подходит для одноэтапной десольватации. И наоборот, желатин А, 62 Блюм имеет одно из самых низких чисел Блюма из коммерчески доступных желатинов и должен содержать в основном низкомолекулярные фракции, поэтому он несовместим с одностадийным способом. Путем увеличения процентного

содержания желатина с низким числом Блюма в смеси двух желатинов мы изучили роль низкомолекулярных фракций в процессе десольватации.

Как и ожидалось, десольватация при перемешивании желатиновых смесей, содержащих 75% и 100% желатина А, 62 Блюм, привела к формированию комка желатина на дне флакона. Напротив, в других флаконах не наблюдалось никаких признаков такой агрегации. Визуальная оценка показала, что более мутные суспензии получались, когда процентное содержание желатина с низким числом Блюма превышало 25%.

После этого мы выполнили десольватацию раствора желатина А с низким числом Блюма при перемешивании и без перемешивания, как это было сделано ранее для желатина В, 75 Блюм. Как и ранее, гомогенный коллоидный раствор был получен в отсутствие перемешивания, тогда как десольватация при перемешивании приводила к образованию мутной суспензии, содержащей видимые агрегаты и желатиновую массу на дне реакционного сосуда.

Основываясь на приведенных выше результатах, мы можем сделать вывод, что перемешивание способствует агрегации желатина в процессе десольватации. Агрегация происходит, когда низкомолекулярные фракции желатина присутствуют в достаточном количестве и общая концентрация желатина высока (примерно 20 мг/мл и более). Эти факторы делают невозможной одностадийную десольватацию желатинов со средним и низким числом Блюма, когда синтез проводят в обычных условиях: по каплям добавляют плохой растворитель при перемешивании. В то же время однократное добавление плохого растворителя с последующим коротким медленным перемешиванием позволяет синтезировать наночастицы из желатина с любым числом Блюма.

Добавление плохого растворителя по каплям при интенсивном перемешивании является неотъемлемой частью синтеза белковых наночастиц методом десольватации. Существует много исследований, в которых сообщается об уменьшении размера и/или полидисперсности наночастиц из альбумина [349], фиброина, α -лактальбумина при более высоких скоростях перемешивания. Те же результаты были получены для наночастиц желатина различными

исследовательскими группами. С другой стороны, Pei с соавт. показали, что увеличение концентрации желатина в водно-этанольной смеси при перемешивании приводит к увеличению размера наночастиц желатина и даже к гелеобразованию. Удаление низкомолекулярных фракций в этой работе не проводилось, поскольку она была направлена на изучение поведения желатина в смесях этанол-вода, а не на получение наночастиц.

Мы не можем объяснить, почему перемешивание влияет на десольватацию желатина. Morel с соавт. изучили агрегацию глютена, вызванную перемешиванием, и предположили, что образование дисульфидных и изопептидных связей, а также гидрофобные взаимодействия обуславливают агрегацию. В молекулах желатина мало остатков цистеина [5], поэтому в его случае, скорее всего, задействованы другие механизмы.

В более ранних работах были широко изучены факторы, влияющие на синтез желатиновых наночастиц [407, 97]. Однако авторы этих статей использовали традиционную методику, основанную на медленном добавлении десольватирующих агентов к раствору желатина при перемешивании. Мы же использовали модифицированный метод десольватации, который основан на однократном добавлении плохого растворителя к раствору желатина. Поэтому мы решили оценить, как различные факторы влияют на результат десольватации. Были проведены две серии экспериментов. Первая часть экспериментов проводилась с использованием очень малых объемов раствора желатина (200 мкл) и только одного вида желатина. Во второй части были протестированы пять видов желатина в 20-кратно больших объемах. Ниже мы приводим основные выводы о влиянии условий синтеза на свойства наночастиц.

Изопропиловый спирт был более эффективным десольватирующим агентом, чем этанол и метанол. Его применение получить суспензии гомогенных наночастиц со значительно более высокими выходами. Изопропиловый спирт менее полярен по сравнению с метанолом и этанолом. Сообщалось, что десольватация α -лактальбумина изопропиловым спиртом дает самые крупные наночастицы [10]. Кроме того, для полной десольватации бычьего сывороточного

альбумина требуется меньший объем изопропилового спирта по сравнению с этанолом [333].

Мы получали наночастицы меньшего размера с использованием этанола, что согласуется с предыдущими сообщениями [333]. Это различие, однако, было более отчетливым при концентрации желатина 18 мг/мл. При более низких концентрациях желатина, особенно при более высоком рН, количество желатина, превращаемого в наночастицы, было невелико, что приводило к нестабильным результатам ДРС. Большие объемы спиртов позволяли добиваться больших выходов из-за более низкой растворимости желатина при более высокой концентрации спирта. Диаметры наночастиц становились меньше, вероятно, потому, что добавление большого объема спирта уменьшало конечную концентрацию желатина. Аналогичные тенденции наблюдали Shamarekh с соавт. [303].

Увеличение концентрации желатина приводило к увеличению размера наночастиц. Этот эффект был более заметен для желатинов В и рыбьего желатина при рН 11. О такой тенденции ранее сообщали другие исследователи [97, 368, 303,]. Вероятно, более высокая локальная концентрация желатина способствует процессу десольватации, что также иллюстрируется более высоким выходом частиц при более высокой концентрации белка [303]. Однако другие факторы, такие как вязкость раствора желатина, также могут влиять на результаты десольватации.

Электростатическое отталкивание молекул желатина и зависящая от рН степень гидратации молекул влияют как на размер, так и на выход наночастиц, как было показано многими исследователями [97, 262]. В наших экспериментах более высокие значения рН (вдали от изоэлектрической точки желатина) приводили к более низким выходам и более мелким частицам.

Полученные результаты показывают, что контроль параметров синтеза позволяет настраивать свойства наночастиц и выход синтеза.

4.6 – Синтез наночастиц из различных желатинов в масштабе сотен миллиграммов

Чтобы продемонстрировать возможности модифицированного метода десольватации, мы синтезировали наночастицы из различных типов желатина с различными числами Блюма. На основе экспериментов по оптимизации мы решили десольватировать желатины изопропиловым спиртом для получения высоких выходов наночастиц. Мы намеревались получить наночастицы с гидродинамическим диаметром менее 200 нм, поэтому использовали растворы желатина с концентрацией 10 мг/мл с высоким рН.



Рисунок 4.14 – Стадии синтеза желатиновых наночастиц. (А) Растворы желатина и изопропилового спирта перед смешиванием; (Б) инкубация наночастиц на водяной бане; (В) внешний вид суспензии наночастиц после добавления глутарового альдегида; (Г) осадок наночастиц после центрифугирования; (Д) объединение промытых наночастиц желатина перед финальной обработкой ультразвуком; (Е) ультразвуковая обработка наночастиц на льду.

Масштабируемость является неотъемлемой частью внедрения продуктов на основе наночастиц. В идеале процедура синтеза должна быть не только

масштабируемой, но и воспроизводимой, обеспечивая минимальную вариабельность от партии к партии. Эксперименты по оптимизации проводились с использованием довольно небольших порций желатина (менее 80 мг). На данном этапе работы мы синтезировали желатиновые наночастицы в масштабе сотен миллиграммов модифицированным методом десольватации.

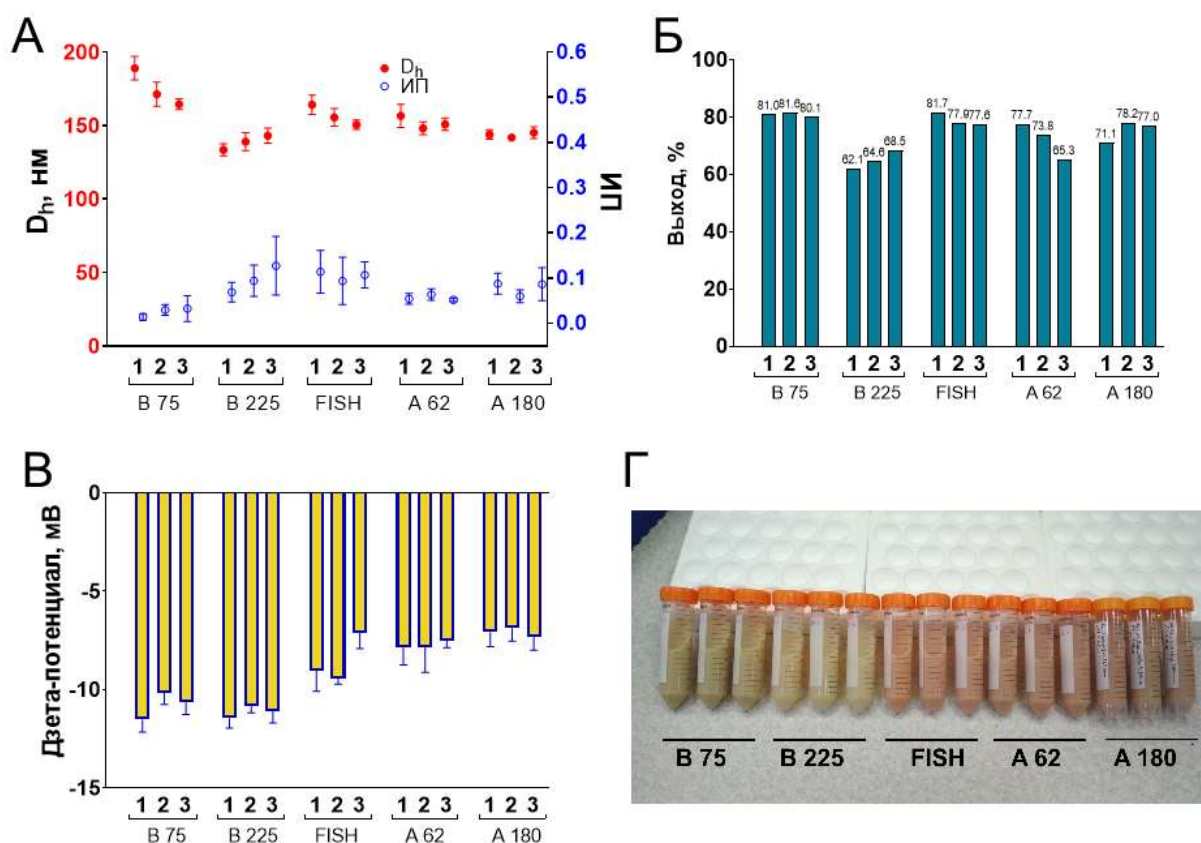


Рисунок 4.15 – Свойства желатиновых наночастиц, синтезированных из различных желатинов в масштабе сотен миллиграммов: (А) размер и индекс полидисперсности; (Б) выход синтеза; (В) дзета-потенциал (при pH 7); (Г) внешний вид суспензий желатиновых наночастиц. Цифры 1, 2 и 3 обозначают номера партий. D_h – гидродинамический диаметр; ИП – индекс полидисперсности. Показаны средние значения трех технических повторностей, среднее значение \pm стандартное отклонение.

Мы синтезировали наночастицы из свиного, бычьего и рыбьего желатина с различными числами Блюма, включая самые низкие из коммерчески доступных (62 и 75). Общее начальное количество желатина составляло 1000 мг, для каждого

вида желатина было синтезировано три партии. Каждая партия имела идентификационный номер, указывающий на тип желатина и номер повторности, например, "B225-2". Основные этапы процедуры синтеза представлены на рисунке 4.14. К раствору желатина добавляли изопропиловый спирт, полученную суспензию наночастиц желатина выдерживали на водяной бане в течение 30 мин, затем наночастицы стабилизировали глутаровым альдегидом, промывали центрифугированием, концентрировали и обрабатывали ультразвуком. Свойства синтезированных партий наночастиц обобщены в таблице 4.4 и на рисунке 4.15. В целом, мы подтвердили, что модифицированный метод десольватации позволяет синтезировать наночастицы из различных типов желатина с различным числом Блюма.

Таблица 4.4 – Свойства наночастиц, синтезированных из различных желатинов.

| Партия | Объем суспензии, мл | Концентрация, мг/мл | Масса наночастиц, мг | Выход, % | D_h , нм ¹ | ИП ² | Дзета-потенциал, мВ |
|--------|---------------------|---------------------|----------------------|----------|-------------------------|-----------------|---------------------|
| B75-1 | 45 | 18.0 | 810.0 | 81.0 | 189± 8 ³ | 0.014±0.0 07 | -11.5±0.6 |
| B75-2 | 46 | 17.7 | 815.6 | 81.6 | 171± 8 | 0.030±0.0 12 | -10.2±0.6 |
| B75-3 | 44 | 18.2 | 800.8 | 80.1 | 165± 4 | 0.033±0.0 29 | -10.7±0.6 |
| B225-1 | 45 | 13.8 | 621.0 | 62.1 | 133± 4 | 0.069±0.0 22 | -11.5±0.5 |

Продолжение таблицы 4.4

| | | | | | | | |
|--------|----|------|-------|------|-------|-------------|-----------|
| B225-2 | 45 | 14.4 | 646.2 | 64.6 | 139±6 | 0.094±0.034 | -10.9±0.3 |
| B225-3 | 45 | 15.2 | 685.4 | 68.5 | 143±5 | 0.127±0.065 | -11.1±0.6 |
| FISH-1 | 46 | 17.8 | 817.0 | 81.7 | 164±7 | 0.114±0.047 | -9.0±1.0 |
| FISH-2 | 46 | 16.9 | 778.8 | 77.9 | 156±6 | 0.094±0.052 | -9.4±0.3 |
| FISH-3 | 46 | 16.9 | 775.6 | 77.6 | 151±3 | 0.107±0.029 | -7.1±0.8 |
| A62-1 | 46 | 16.9 | 777.4 | 77.7 | 157±8 | 0.054±0.012 | -7.9±0.9 |
| A62-2 | 45 | 16.4 | 738.0 | 73.8 | 148±4 | 0.064±0.012 | -7.8±1.3 |
| A62-3 | 45 | 14.5 | 652.5 | 65.3 | 151±4 | 0.052±0.004 | -7.5±0.4 |
| A180-1 | 45 | 15.8 | 711.0 | 71.1 | 144±3 | 0.088±0.023 | -7.1±0.7 |
| A180-2 | 46 | 17.0 | 782.0 | 78.2 | 142±2 | 0.060±0.014 | -6.9±0.7 |
| A180-3 | 45 | 17.1 | 769.5 | 77.0 | 145±4 | 0.087±0.036 | -7.4±0.6 |

Примечание: ¹ Гидродинамический диаметр, ² Индекс полидисперсности, ³ Среднее значение ± стандартное отклонение

Гидродинамический диаметр большинства наночастиц составлял от 130 до 160 нм. Самые маленькие наночастицы были получены из желатина В, 225 Блюм.

Мы оценили воспроизводимость синтеза наночастиц, рассчитав коэффициенты вариации (КВ) для каждого типа желатина и сравнив их с имеющимися литературными данными. Воспроизводимость была самой низкой для наночастиц, полученных из желатина В, 75 Блюм (КВ = 7,2%), тогда как для других типов желатина КВ составляли от 1,2% до 4,4%. Воспроизводимость синтеза наночастиц из рекомбинантного ЧСА методом десольвации была исследована Langer с соавт. [190]. Было приготовлено три партии наночастиц, КВ составил 9,1% [190]. Ранее Zwioerek оптимизировал синтез желатиновых наночастиц методом двухстадийной десольвации [407]. Для каждого типа наночастиц желатина было синтезировано шесть партий; коэффициенты вариации составили 3,4% (наночастицы со средним диаметром 300 нм), 1,4% (150 нм) и 13,2% (100 нм). Таким образом, модифицированный метод десольвации обеспечивает высокую воспроизводимость синтеза желатиновых наночастиц. Индексы полидисперсности были ниже 0,2 для всех партий и ниже 0,1 для большинства партий, что указывает на то, что наночастицы имели однородное распределение по размерам.

Дзета-потенциал наночастиц измеряли в нейтральном фосфатном буфере с рН 7. Согласно информации от производителя, изоэлектрическая точка составляет 4,7–5,3 для желатина В, 7,0–9,5 для желатина А и 6,0 для рыбьего желатина. Наночастицы, полученные из желатина В, имели самый низкий дзета-потенциал: около -11 мВ, тогда как наночастицы, изготовленные из рыбьего желатина и желатина А, имели более положительный дзета-потенциал: от -7 до -9 мВ. Примечательно, что дзета-потенциал наночастиц желатина намного ниже условного порога стабильности ± 30 мВ, что указывает на то, что силы, отличные от электростатического отталкивания, обеспечивают их коллоидную стабильность, что подтверждается результатами детального исследования их коллоидной стабильности (см. далее).

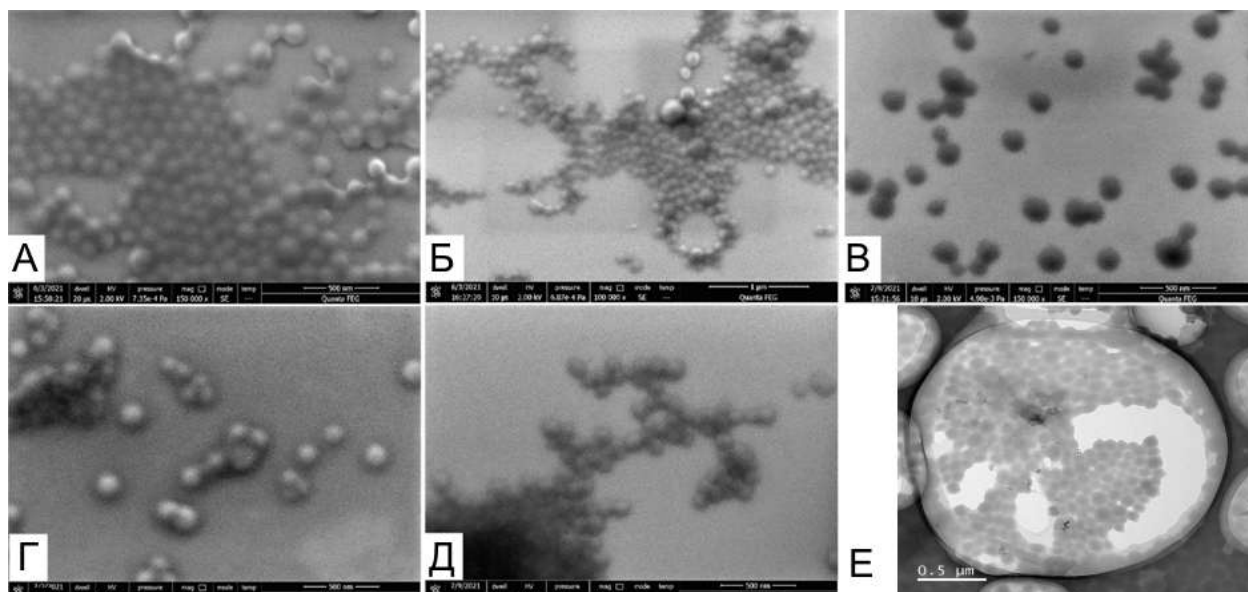


Рисунок 4.16 – СЭМ- (А-Д) и ПЭМ- (Е) фотографии желатиновых желатина. А, Е - Б75-1; Б - Б225-1; В - FISH-1; Г - А62-1; Д - А180-1. Линейка: 500 нм (А, В-Е) или 1000 нм (Б).

Сканирующая электронная микроскопия и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) показали, что наночастицы, полученные из всех типов желатина, имели сферическую форму (Рисунок 5). Недостаточное качество снимков SEM не позволило нам измерить их размеры. Тем не менее, визуальная оценка фотографий показала, что размеры большинства частиц находятся в диапазоне 100-200 нм, что совпадает с результатами ДРС. Средний диаметр В75-1, полученный с помощью ПЭМ, был ниже (100 ± 21 нм), чем гидродинамический диаметр, что объясняется хорошо известной склонностью ДРС переоценивать размер наночастиц. Микроскопия продемонстрировала присутствие в образцах крупных наночастиц (их можно увидеть на Рисунок 4.16Б) и некоторого количества агрегатов, однако в целом наночастицы были однородными.

Мы получили стабильные водные суспензии желатиновых наночастиц объемом 44-46 мл, содержащие от 13,8 до 18,2 миллиграммов наночастиц на миллилитр. Следовательно, разработанный способ синтеза позволяет получить 600-800 мг наночастиц за 6-7 ч. Это значение может быть увеличено путем применения больших объемов реагентов или путем изменения условий синтеза:

снижения рН, увеличения концентрации желатина и так далее. Выход синтеза (степень преобразования желатина в наночастицы) составлял от 62 до 82%, что превосходит результаты двухстадийной и одностадийной десольватации: 1,5-62%. Однако в особых условиях выходы обычных одно- и двухэтапных процедур десольватации могут достигать 70-80% [97]. Синтез методом нанопреципитации может достигать $90 \pm 5\%$ [197], однако в других работах этот метод имел более низкие выходы. Основываясь на экспериментах по оптимизации, мы полагаем, что выход вплоть до 95% может быть достигнут с помощью модифицированного метода десольватации благодаря высокой десольватирующей эффективности изопропилового спирта.

В методе десольватации часто существует компромисс между выходом и размером наночастиц. Условия, благоприятствующие десольватации белка, обеспечивают лучшие выходы, но больший размер наночастиц. Увеличение выхода может быть достигнуто за счет снижения рН или увеличения объема добавляемого спирта. Второй подход обеспечивает более высокие выходы и даже меньшие размеры, но за счет увеличения объема реакционной среды. Мы синтезировали наночастицы желатина при высоком рН (10 для желатина В и 11 для рыбьего желатина и желатина А), при этом объемное соотношение органического растворителя к желатину было равно 5. Используя более низкий рН и/или более высокие соотношения, можно было бы достичь более высоких выходов.

Еще одна вещь, которую необходимо объяснить, – это более низкие выходы, полученные для партий В225. Мы думаем, что причиной могут быть потери наночастиц в ходе промывок. Наночастицы В225-1/2/3 имели наименьший диаметр и требовали больше времени для полного осаждения. Когда проводили декантацию надосадочной жидкости, происходило и удаление некоторой (менее плотной) части осадка. Это наблюдалось для всех партий, но в случае В225-1/2/3 этот эффект был более выражен.

Белковые наночастицы, сшитые глутаровым альдегидом, флуоресцируют при возбуждении УФ или видимым светом [33]. Автофлуоресценцию наночастиц

желатина можно объяснить наличием в их структуре связей $C=C$ (образующихся в результате полимеризации глутарового альдегида) и $C=N$ (в составе оснований Шиффа). Флуоресцентные свойства наночастиц желатина могут быть использованы в медицинской визуализации и биосенсорике [33]. Более того, собственная флуоресценция наноматериалов может быть использована для измерения их поглощения клетками и обуславливает помехи, создаваемые наночастицами, при использовании различных флуоресцентных красителей. Учитывая, что наночастицы желатина не имеют отчетливых пиков поглощения, мы записали спектры флуоресценции наночастиц при длинах волн возбуждения от 260 до 560 нм. Наночастицы, полученные из всех типов желатина, обладают широкими пиками флуоресценции, которые смещаются в длинноволновую область с увеличением длины волны возбуждения. Впоследствии мы использовали флуоресцентные свойства наночастиц желатина для оценки изменения их структуры после процедуры стерилизации.

Цвет наночастиц желатина зависел от условий синтеза. Десольватация этанолом при любых значениях pH или изопропиловым спиртом при pH менее 11 приводила к образованию желтоватой суспензии. Наночастицы, полученные при pH 11 с использованием изопропилового спирта, имели красноватый оттенок, что указывает на возможные различия в химической структуре.

4.7 – Контроль качества препаратов желатиновых наночастиц

Как мы уже упоминали ранее, коллоидная стабильность наночастиц при различных значениях pH и в растворах с высокой ионной силой необходима для их применения в качестве диагностических реагентов. Кроме того, информация о зависимости коллоидной стабильности наночастиц от состава среды имеет существенное технологическое значение. Так, конъюгацию наночастиц с различными молекулами, включая аффинные соединения (например, моноклональные антитела), а также модификацию поверхности полимерами, обычно выполняют при pH и концентрации соли, которые являются оптимальными для конкретной технологии. В связи с этим мы проверили коллоидную стабильность наночастиц в буферах с pH в диапазоне от 4 до 10,

измеряя их размер с помощью ДРС сразу после добавления в буфер, затем на 1-й и 7-й дни. Наночастицы желатина, полученные из желатина В, рыбьего желатина и желатина А, 180 Блум, были стабильны в течение одной недели во всех буферах (Рисунок 4.17). Однако в нескольких образцах наблюдалось небольшое увеличение размера и полидисперсности. В этих образцах обычно одна из трех технических повторностей указывала на наличие агрегатов, тогда как другие демонстрировали однородное распределение по размерам. Скорее всего, имела место незначительная агрегация, а большинство частиц находилось в неагрегированном состоянии. Эти результаты совпадают с литературными данными, указывающими на то, что желатиновая оболочка обеспечивает хорошую коллоидную стабильность наночастиц в широком диапазоне значений рН [316].

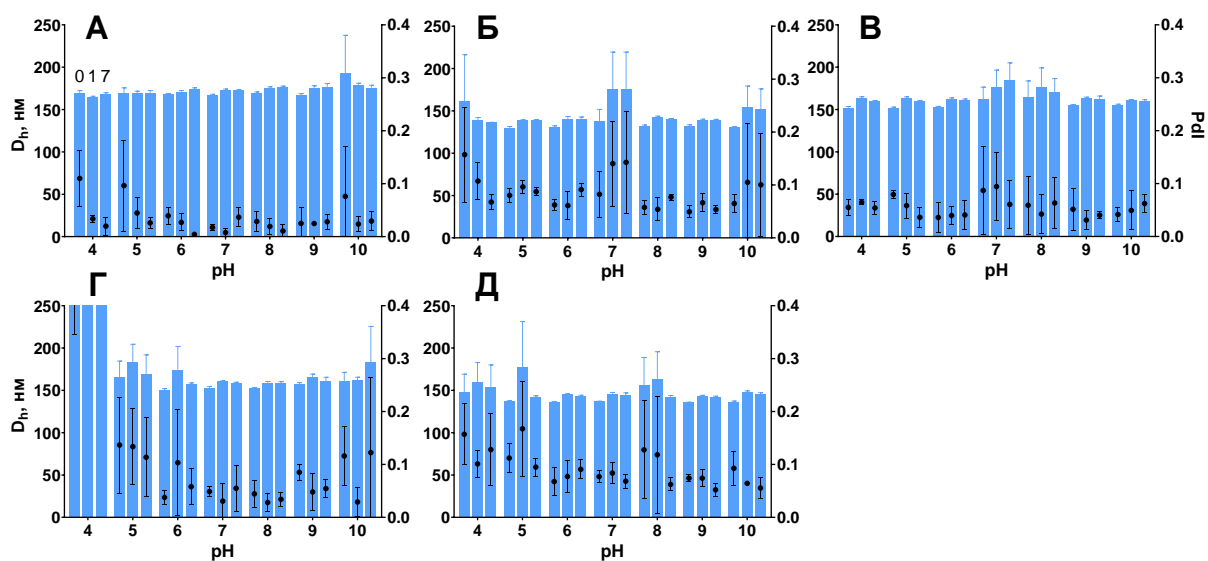


Рисунок 4.17 – Коллоидная стабильность желатиновых наночастиц при различных значениях рН в течение 7 дней. (А) В75-1; (Б) В225-1; (В) FISH-1; (Г) А62-1; (Д) А180-1. D_h – гидродинамический диаметр; ИП – индекс полидисперсности. Показаны средние значения трех технических повторностей, среднее значение \pm стандартное отклонение. Измерения проводились в дни 0, 1 и 7.

Наночастицы, полученные из желатина А с числом Блюма 62, были единственным типом наночастиц, для которых наблюдалась выраженная агрегация (Рисунок 4.17Г). Эти наночастицы быстро агрегировали при рН 4, но не в других буферах. Соотношение между дзета-потенциалом и рН было различным для наночастиц, полученных из разных типов желатина. Наночастицы В75 и В225 имели более отрицательный дзета-потенциал в диапазоне рН от 5 до 9, что объясняется различием в изоэлектрических точках между желатинами [Azarmi, 2006].

Высокие концентрации соли не оказывали существенного влияния на размер наночастиц желатина. Ранее было показано, что низкие (7-50 мМ), но не высокие (300 мМ) концентрации NaCl способствуют агрегации наночастиц желатина. Мы не наблюдали никаких признаков агрегации наночастиц в присутствии солей.

Следует отметить, что концентрация наночастиц в ходе экспериментов по исследованию стабильности составляла всего 50 мкг/мл. Возможно, более выраженная агрегация может быть обнаружена при более высоких концентрациях наночастиц. Для наночастиц А180-1/2/3 мы наблюдали агрегацию при низкой концентрации наночастиц (менее 80 мкг/мл) в воде, но не в фосфатном буфере. Обработка глицином стабилизировала эти наночастицы даже при низких концентрациях. Мы не можем объяснить это явление, более того, оно не наблюдалось для наночастиц, приготовленных из других видов желатина.

Стабильность наночастиц при хранении необходима для их практического применения. С точки зрения биомедицинских применений концентрированная водная суспензия наночастиц является, пожалуй, наиболее удобной формой для повседневного использования. Мы изучили размер и структурную целостность наночастиц желатина, полученных с использованием модифицированного метода десольватации после 4 недель хранения в воде при температуре +4 °С. Неожиданно, для всех партий было обнаружено уменьшение гидродинамического диаметра и показателей полидисперсности (Рисунок 4.18). Более того, после 4 недель хранения изменчивость размеров наночастиц от партии к партии также

стала ниже. Эти неожиданные результаты противоречат данным, приведенным в литературе. В предыдущих работах не сообщалось об изменении диаметра наночастиц [51]. Наблюдалось уменьшение гидродинамического диаметра наночастиц желатина, хранящихся в лиофилизированном состоянии, что объяснялось неполной регидратацией, однако в нашем исследовании наночастицы хранились в воде. Мы предположили, что могло произойти частичное разрушение наночастиц. Мы контролировали концентрацию свободного белка в суспензии наночастиц, а также мутность суспензии наночастиц. Мутность может отражать как изменение размера наночастиц, так и их растворение. Почти для всех наночастиц наблюдалось снижение мутности суспензии. Концентрация свободного желатина также была выше на 28-й день. Однако относительное количество свободного белка не превышало 1% от общего количества желатина.

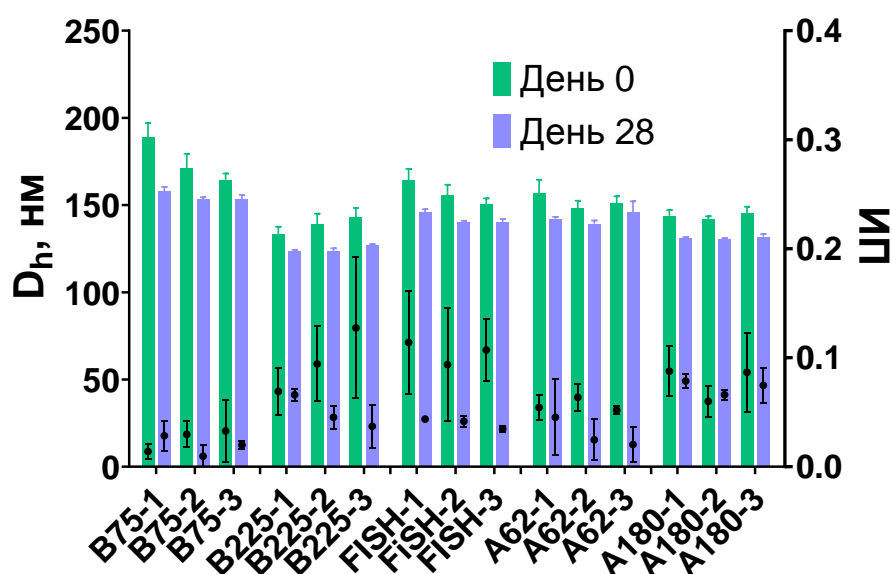


Рисунок 4.18 – Размер (D_h) и индекс полидисперсности (ИП) желатиновых наночастиц после синтеза и через 28 дней. Показаны средние значения трех технических повторностей, среднее значение \pm стандартное отклонение.

Можно предположить, что хранение наночастиц желатина сопровождается их частичным распадом. Вариабельность размеров между партиями после 4 недель хранения стала ниже, что указывает на то, что этот процесс влияет на

более крупные наночастицы и агрегаты. Процентное содержание свободного желатина определяли количественно путем центрифугирования наночастиц при 20000 g и измерения содержания белка в надосадочной жидкости. Упомянутая скорость недостаточно высока для осаждения мелких наночастиц (10-20 нм). Следовательно, небольшое увеличение концентрации белка в супернатантах можно объяснить, как высвобождением отдельных молекул желатина, так и распадом крупных наночастиц на более мелкие. Присутствие определенного количества наночастиц меньшего размера (в отличие от наночастиц большего размера) не может повлиять на результаты измерений ДРС, поскольку их способность к светорассеянию слишком мала. Принимая во внимание, что степень уменьшения мутности не коррелировала со степенью уменьшения диаметра частиц, мы предполагаем, что имел место частичный распад наночастиц на более мелкие наночастицы.

Литературные данные свидетельствуют о том, что сшивание глутаровым альдегида приводит к образованию стабильных наночастиц желатина [51], однако в большинстве случаев оценивался только размер частиц, но не другие свойства. Мы исследовали стабильность нестерильных препаратов наночастиц, которые хранились в деионизированной воде без какой-либо физической (автоклавирование, радиационное облучение) или химической (консерванты) обработки. Следовательно, микробная контаминация и воздействие протеаз могло играть определенную роль в деградации наночастиц. Несомненно, необходимо проводить дальнейшее изучение стабильности желатиновых наночастиц. Однако, даже если наночастицы нестабильны в виде суспензий, существуют оптимизированные способы их хранения в лиофилизированном состоянии.

4.8 – Инкапсулирование модельной флуоресцентной метки в желатиновые наночастицы

Основным мотивом использования белковых наночастиц для создания иммунодиагностикомов является их способность инкапсулировать различные молекулы (низкомолекулярные органические вещества, молекулы биополимеров) или частицы (например, квантовые точки, золотые наночастицы). Это позволяет

рассматривать их в качестве универсальных наноконтейнеров, которые могут быть использованы в качестве меток в иммуноанализе. Нужно лишь выбрать репортерную молекулу или частицу необходимого типа и инкапсулировать ее внутри белковой наночастицы. Результатом инкапсулирования будет наноразмерная частица, содержащая многочисленные репортерные молекулы и пригодная для ковалентной пришивки аффинных молекул (моноклональных антител, стрептавидина), которые обеспечат биоспецифическое распознавание целевого вещества в ходе иммуноанализа. Для альбуминовых наночастиц, синтезированных методом десольватации такая возможность уже была показана на различных примерах. Однако, пригодность разработанного нами модифицированного метода десольватации для инкапсулирования репортерных молекул, разумеется, является неизвестной.

В связи с этим, мы проверили, подходит ли модифицированный метод десольватации для инкапсулирования в наночастицы модельного гидрофобного вещества: флуоресцентного комплекса, содержащего катион европия и два лиганда, а именно 1,10-фенантролин и 4-(4-метилфенил)-2,4-диоксобутановую кислоту. Европий и лиганды растворяли в этаноле; затем желатины каждого типа десольватировали полученным раствором. Этанол был выбран из-за недостаточной растворимости флуоресцентных комплексов в изопропиловом спирте. Комплексы европия обладают яркой флуоресценцией, облегчающей подтверждение успешной загрузки, кроме того, они нерастворимы в воде, т.е. схожи с малыми органическими лекарственными молекулами. Более того, долгоживущая флуоресценция комплексов европия с большим стоксовым сдвигом может быть легко отличена от флуоресценции самих наночастиц.

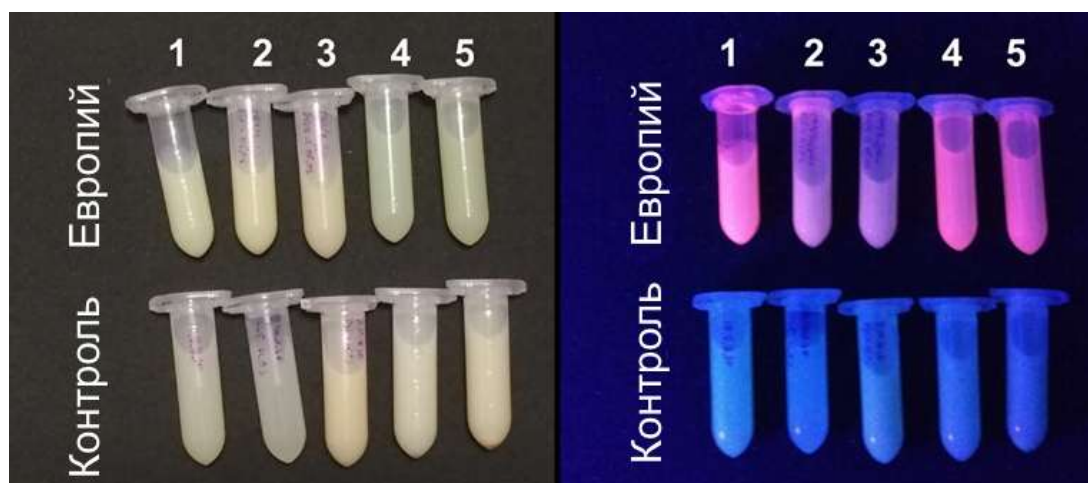


Рисунок 4.19 – Желатиновые наночастицы, содержащие и не содержащие комплексы европия, при дневном свете (слева) и в УФ-свете (360 нм, справа). Наночастицы синтезировали из желатина: 1 — Б, 75 Блюм; 2—Б, 225 Блюм; 3 — рыбий желатин; 4 — А, 62 Блюм; 5—А, 180 Блюм.

Наночастицы, синтезированные из всех типов желатина, были загружены флуоресцентными комплексами (Рисунок 4.19). Узкий пик (600-630 нм) излучения европия был обнаружен в суспензиях очищенных желатиновых наночастиц после десольватации раствором этанола, содержащим флуоресцентные комплексы, но не был обнаружен в контрольных наночастицах. Супернатанты, полученные при очистке флуоресцентных наночастиц желатина, обладали незначительной флуоресценцией, что подтверждает наличие флуоресцентных веществ внутри наночастиц. Мы не исследовали того, располагались ли они на поверхности или внутри наночастиц. Слабая флуоресценция в супернатантах, скорее всего, была вызвана утечкой флуоресцентных комплексов, вызванной обработкой ультразвуком, которая сопровождала отмывку наночастиц.

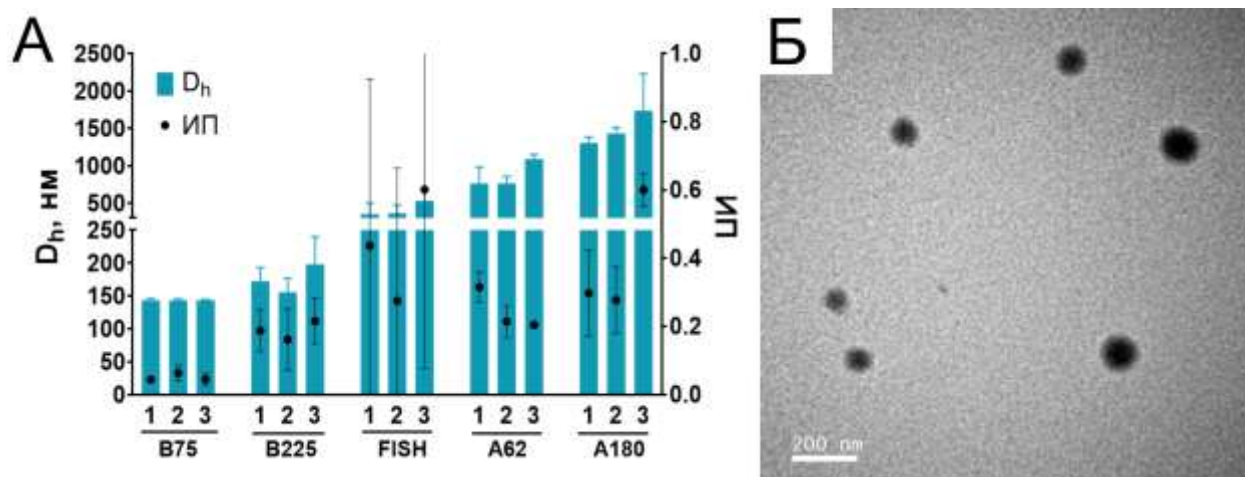


Рисунок 4.20 – Размер желатиновых наночастиц, нагруженных флуоресцентными комплексами европия (А), и ПЭМ-изображение наночастиц, нагруженных европием, полученных из желатина В 75 Блюм (Б). D_h – гидродинамический диаметр; ИП – индекс полидисперсности. Показаны средние значения трех технических повторностей, среднее значение \pm стандартное отклонение. Масштабная линейка: 200 нм.

Следует отметить, что субмикрочастицы и микрочастицы, а не наночастицы, были синтезированы из рыбьего желатина и желатинов типа А (Рис 44А). Наночастицы с самыми низкими показателями полидисперсности были получены из желатина В, 75 Блюм. Средний диаметр этих наночастиц составлял 115 ± 23 нм, что было немного больше, чем у ненагруженных наночастиц.

В этой работе мы не оптимизировали условия загрузки, было проведено только несколько предварительных экспериментов с желатинами типа В. Мы предполагаем, что надлежащая оптимизация может позволить получить наночастицы размером 100-200 нм, нагруженные гидрофобными молекулами, из любого типа желатина.

4.9 – Стерилизация наночастиц желатина

Контаминация наночастиц желатина микроорганизмами нежелательна практически для всех их потенциальных применений. Присутствие микроорганизмов или их фрагментов в препаратах с наночастицами может представлять риск для пользователей тест-систем, кроме того, микробные ферменты могут разрушать наночастицы и уменьшать срок их хранения. Geh с

соавт. обнаружили, что стерилизация желатиновых наночастиц в автоклаве приводит к частичному высвобождению молекул желатина и незначительному увеличению размеров наночастиц, тогда как более высокие степени сшивания глутаральдегидом и более мягкие условия автоклавирования делают наночастицы менее чувствительными к температурному разрушению [97]. В то же время Ма с соавт. успешно автоклавировали альбуминовые наночастицы, полученные методом десольватации [230]. Основываясь на этих результатах, мы решили стерилизовать желатиновые наночастицы путем автоклавирования в мягких условиях: 15 мин при давлении на 0,5 атм выше атмосферного. Контрольные (неавтоклавированные) наночастицы выдерживали при температуре +4 °С.

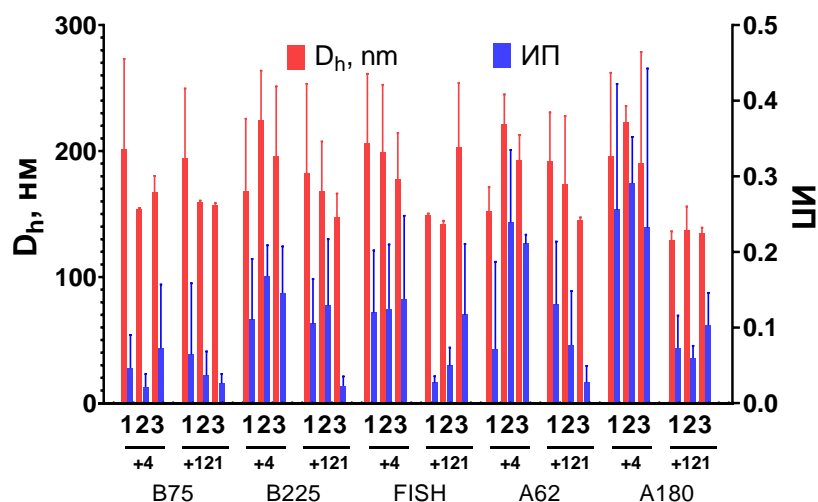


Рисунок 4.20 – Диаметр (D_h) и индекс полидисперсности (PDI) неавтоклавированных (+4) и автоклавированных (+121) желатиновых наночастиц. Показаны средние значения трех технических повторностей, среднее значение \pm стандартное отклонение.

В экспериментах по автоклавированию мы использовали наночастицы желатина, обработанные глицином. Хотя мы добавили избыток глутарового альдегида по отношению к количеству первичных аминов, небольшая часть непрореагировавших аминогрупп может оставаться на поверхности наночастиц. Глицин инактивировал свободные поверхностные карбонильные группы и предположительно снижал вероятность их реакции с оставшимися первичными аминами. К сожалению, обработка глицином привела к нестабильным

результатам ДРС. Результаты ДРС отличались даже между техническими повторностями: для некоторых образцов одно или два из трех измерений указывали на наличие агрегатов или увеличение среднего диаметра, тогда как другие измерения показали узкое распределение наночастиц по размерам.

Для получения более стабильных результатов ДРС мы центрифугировали автоклавированные наночастицы в течение 10 мин при 1000 g перед измерением размера (Рисунок 4.20). Мы предполагаем, что произошла незначительная агрегация, однако большинство частиц выдержали стерилизацию и сохранили свой первоначальный размер, поскольку видимых признаков агрегации обнаружено не было. Наличие агрегатов и свободного желатина может быть неприемлемо для приложений, которые требуют использования очень однородных наночастиц (например, для адресной доставки лекарств). Однако автоклавирование может быть хорошим и простым выбором в областях с менее строгими требованиями к распределению по размерам. Агрегаты могут быть быстро удалены с помощью низкоскоростного центрифугирования с использованием обычных стерильных центрифужных пробирок.

Дополнительно, мы оценили изменение мутности препаратов наночастиц после автоклавирования. Недавно Geh с соавт. наблюдали выраженное снижение мутности после стерилизации желатиновых наночастиц в автоклаве [97]. В нашем случае почти для всех партий наночастиц наблюдалось незначительное (не более 8%) снижение мутности. Как изменение размера, так и разрушение наночастиц могут повлиять на мутность (Рисунок 4.21).

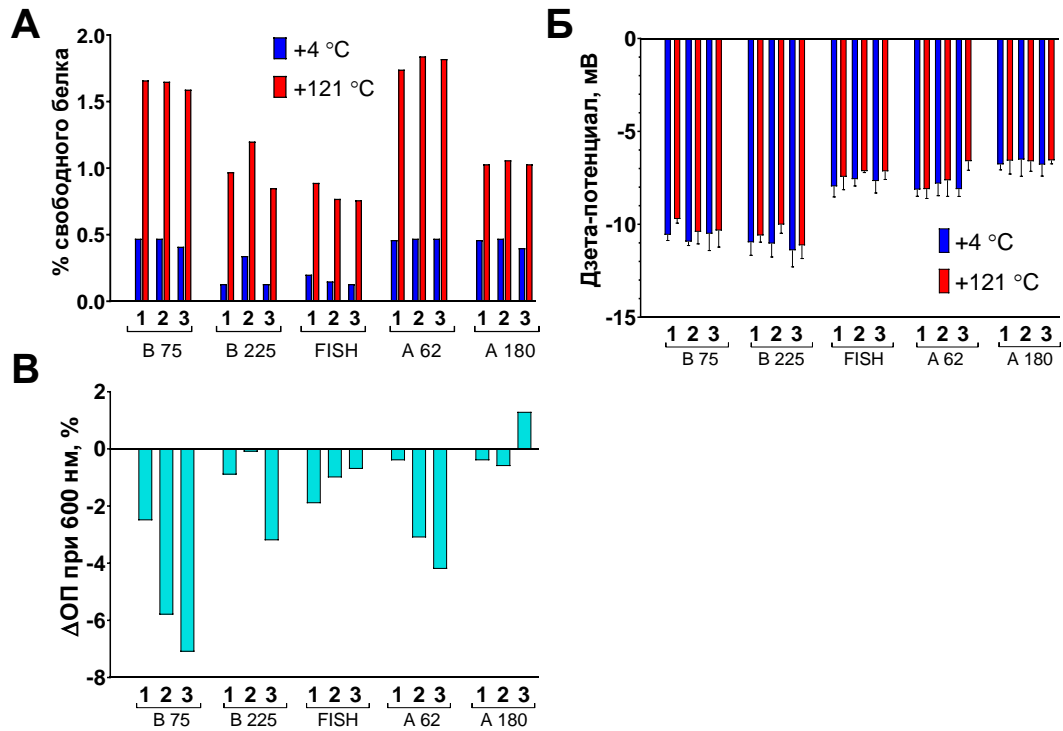


Рисунок 4.21 – Свойства стерилизованных (+121 °C) и нестерилизованных (+4 °C) наночастиц. (А) Процент свободного белка по отношению к концентрации наночастиц; (Б) дзета-потенциал при рН 7; (В) изменение мутности суспензий желатиновых наночастиц после стерилизации. Показаны средние значения дзета-потенциала трех технических повторностей, среднее значение ± стандартное отклонение.

Принимая во внимание данные ДРС и изменение концентрации свободного белка, мы предполагаем, что во время стерилизации может происходить растворение небольшого процента наночастиц.

Другой проблемой являются химические изменения, вызванные стерилизацией. Автоклавирование приводит к снижению степени сшивания и увеличению содержания свободных аминогрупп в наночастицах желатина [97]. Действительно, дзета-потенциал стерилизованных наночастиц был немного более положительным (на 1-2 мВ) по сравнению с обычными наночастицами (Рисунок 4.21Б). Кроме того, цвет суспензий наночастиц изменился после стерилизации. Образование новых химических связей в желатиновых наночастицах было косвенно оценено путем изучения их флуоресценции при различных длинах волн возбуждения. Мы сравнили спектры излучения наночастиц желатина до и после стерилизации. Длины волн возбуждения варьировали от 260 до 560 нм. При

возбуждении суспензий наночастиц светом с длиной волны 300 и 400 нм более высокая эмиссия наблюдалась в препаратах стерилизованных наночастиц, тогда при возбуждение светом с длиной волны 500 нм практически не было различий между стерилизованными и нестерилизованными образцами. Эти результаты подтверждают, что автоклавирование сопровождалось некоторыми структурными изменениями.

Несмотря на то, что стерилизованные наночастицы сохранили свои ключевые свойства, мы должны отметить, что использование автоклавирования для стерилизации желатиновых наночастиц ограничено областями, которые не требуют парентерального использования наночастиц. Автоклавирование убивает микроорганизмы, но не удаляет эндотоксин, который может препятствовать культивированию клеток и провоцировать активацию иммунной системы или даже эндотоксиновый шок. Автоклавирование может быть полезно для применений, в которых допустимо присутствие небольшого процента агрегатов и свободного белка. Для фармацевтических целей весь синтез должен быть выполнен в асептических условиях с использованием реагентов, не содержащих эндотоксин. Другим вариантом пост-синтетической обработки является удаление эндотоксина и стерилизация гамма-излучением, которая показала свою эффективность для желатиновых наночастиц.

4.10 – Влияние наночастиц желатина на жизнеспособность мононуклеарных клеток периферической крови

Несмотря на то, что использование наноматериалов в иммунодиагностике не подразумевает их непосредственного контакта с организмом человека, включая и операторов тест-систем, безопасность компонентов тест-систем важна с точки зрения организации их производства и утилизации (экоотоксичность). Так, одной из причин недовольства современными иммуноферментными тест-системами является использование в них потенциально токсичных и канцерогенных хромогенных субстратов, с которыми пользователи могут случайно контактировать, например, при нарушении целостности упаковок. В целом, использование биосовместимых и биodeградируемых компонентов является

весьма желательным, как и производителей, так и для пользователей тест-систем. Поэтому мы исследовали токсичность желатиновых наночастиц по отношению к модельному объекту: иммуннокомпетентным клеткам периферической крови. Мононуклеарные клетки периферической крови представляют собой сложную смесь клеток с ядром круглой формы, включающую регуляторные и эффекторные клетки, а именно Т-клетки, В-клетки, НК-клетки и моноциты. Мы использовали именно клетки, выделенные из крови доноров, а не линейные клетки, поскольку первые являются моделью, более приближенной к реальности. Мононуклеарные клетки выделяли из крови трех здоровых доноров и инкубировали с обработанными глицином стерилизованными желатиновыми наночастицами в течение 24 ч. Мертвые клетки окрашивали йодидом пропидия и количественно определяли методом проточной цитометрии. Диапазон концентраций наночастиц желатина был выбран на основе литературных данных, согласно которым концентрация наночастиц в крови может достигать значений в сотни микрограммов на миллилитр после парентерального введения.

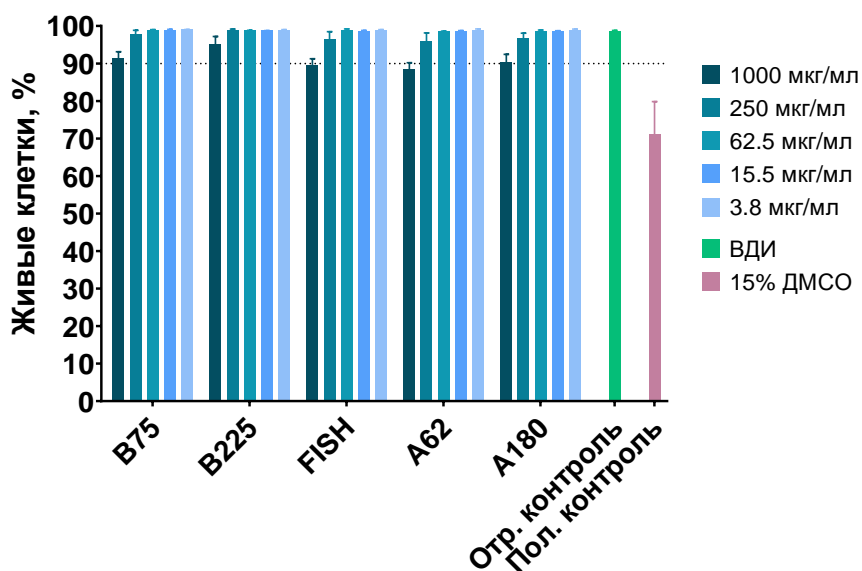


Рисунок 4.22 – Жизнеспособность мононуклеарных клеток в присутствии различных концентраций желатиновых наночастиц. ВДИ – вода для инъекций. Клетки были получены от трех добровольцев, среднее \pm стандартное отклонение.

Жизнеспособность мононуклеарных клеток была выше 88% во всем диапазоне концентраций наночастиц, что указывает на низкую цитотоксичность наночастиц желатина (Рисунок 4.22). Однако мы должны отметить, что наночастицы, поглощенные или адсорбированные клетками, мешают измерениям флуоресценции. Наночастицы флуоресцируют в диапазоне от 543 до 627 нм (канал обнаружения йодида пропидия), более того, при более высоких концентрациях наночастиц мононуклеарные клетки поглощают (или адсорбируют) больше наночастиц, что видно по увеличению зернистости клеток. Поэтому в будущем необходимо провести более тщательное изучение токсичности желатиновых наночастиц.

Итогом этой части диссертационного исследования является то, что нами были разработаны и оптимизированы подходы к контролю качества иммунореагентов на основе белковых наночастиц. В частности, был разработан надёжный и воспроизводимый метод точной оценки их концентрации, основанный на применении гравиметрического анализа. Помимо этого, нами впервые был применен комплексный подход к оценке свойств белковых наночастиц, основанный на сочетании гель-электрофореза, спектроскопии в УФ и видимом свете, анализе спектров флуоресценции, стабильности к воздействию протеаз и оценке диффузии красителей внутрь наночастиц. Этот комплекс методов позволяет всесторонне охарактеризовать свойства наноматериалов, существенные для их использования в качестве диагностических реагентов в иммуноанализах. Помимо этого, нами был разработан и оптимизирован способ количественной детекции меток, инкапсулированных внутрь белковой матрицы наночастиц, который основывается на их разрушении протеазами или щелочью, с последующим спектрофотометрическим анализом полученных гидролизатов. В дальнейших главах мы продемонстрируем как этот методический комплекс был использован для получения и характеристики свойств диагностических реагентов для иммуноанализа противостолбнячных антител и простатспецифического антигена.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ,
ИЗЛОЖЕННЫМ В ГЛАВЕ 4**

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

1. Khramtsov, P. 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. – P. 120422.

2. Khramtsov, P. Modified desolvation method enables simple one-step synthesis of gelatin nanoparticles from different gelatin types with any bloom values / M. Bochkova, V. Timganova, S. Zamorina, M. Rayev, O. Burdina, S. Lazarev, A. Novokshonova, D. Kiselkov, A. Minin // Pharmaceutics. – 2021. – Т. 13, № 10 – P. 153

Патент

3. Патент РФ № 2751885 Храмцов П.В. «Способ синтеза желатиновых наночастиц» (Бюл. № 20, 2021 г.). Автор: Храмцов П.В.

ГЛАВА 5 – КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ ИММУНОАНАЛИЗ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ ПОМОЩИ АЛЬБУМИНОВЫХ НАНОЧАСТИЦ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕМИН

Идея этой 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 обладает гораздо более высокой молярно-взвешенной каталитической активностью, нормированная по массе каталитическая активность гемина превышает таковую пероксидазы хрена. Гемин уже успешно использовался в качестве заменителя пероксидазы в середине 80-х годов. Ikarigayama с соавт. разработали хемилюминесцентные иммуноанализы с использованием белков, меченных гемином, с пределом обнаружения всего 1 нг/мл. [145]. Мы предположили, что более высокая чувствительность может быть

достигнута путем мечения аффинных соединений наночастицами, содержащими многочисленные молекулы гемина.

Наночастицы альбумина потенциально могут обеспечить доставку множества молекул гемина на одну молекулу анализируемого вещества, чтобы превзойти анализ на основе пероксидазы. Комплексы альбумин/гемин с пероксидазной активностью обычно обнаруживаются в крови человека и играют решающую роль в патогенезе гематологических заболеваний. Ковалентные и нековалентные комплексы альбумина и гемина обладают соответственно в 4 и 2 раза более высокой каталитической активностью по сравнению с интактным гемом. Эти результаты противоречат предыдущим исследованиям, показывающим, что альбумин заметно снижает пероксидазную и каталазоподобную активность гема. Другие примеры применения белковых каркасов для усиления каталитической активности гемина были описаны в статье [204]. Авторы этой работы получили каталитические комплексы, содержащие наночастицы золота, гемин и бычий сывороточный альбумин или апогемоглобин с высокой каталитической активностью. 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 рН 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. Он основан на добавлении органического растворителя, который способен смешиваться с водой (этанол, метанол, ацетон) к водному раствору белка [191]. При определенной концентрации органического растворителя растворимость белка снижается с последующим образованием белковых наночастиц. Распад

наночастиц на отдельные молекулы белка обычно предотвращают ковалентной сшивки, чаще с помощью глутарового альдегида. Различные метки, такие как флуоресцентные красители [394], наночастицы [393] и ферменты [196], 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 с белком. Различные функциональные группы на поверхности наночастиц обеспечивают 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 гемом. 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.

5.1 – Оптимизация диагностикумов на основе наночастиц БСА/гемин

Наночастицы БСА/гемин были синтезированы методом десольватации, который основан на капельном добавлении этанола к раствору, содержащему БСА и гемин (Рисунок 5.1). Ключевой особенностью процесса синтеза является то, что pH раствора был доведен до 11. Известно, что pH раствора БСА должен быть удален от изоэлектрической точки в процессе десольватации. Увеличение pH уменьшает как размер, так и выход наночастиц. Обычно pH раствора БСА находится между 7 и 9 [191], однако в нашей работе pH был выше, чтобы обеспечить лучшую растворимость гемина. Образовавшиеся наночастицы стабилизировали нагреванием при +70 °C [190], поскольку сшивание глутаровым альдегидом приводило к агрегации наночастиц.

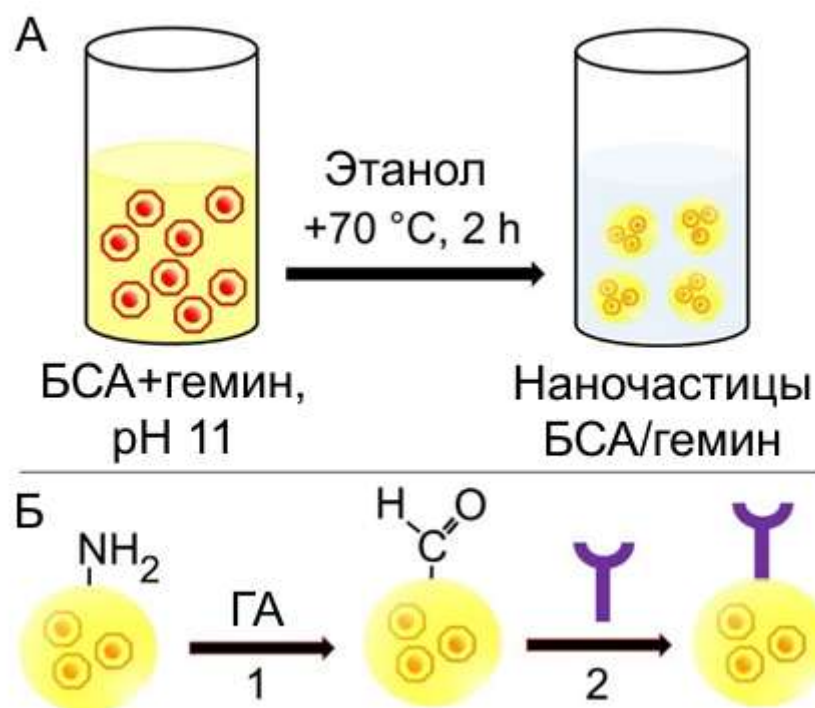


Рисунок 5.1 – Принцип получения дианоитикумов на основе БСА и гемина. А - схема приготовления наночастиц БСА/гемин; Б - схема конъюгации наночастиц БСА/гемин с белком G. 1 - добавление глутарового альдегида (ГА); 2 - добавление белка G (фиолетовая фигура).

Обычно при десольватации добавляемый объем этанола составляет примерно от 3 до 5 мл на 1 мл раствора БСА. Образование наночастиц можно контролировать путем визуальной оценки мутности суспензии. Однако в присутствии гемина цвет реакционной смеси темно-коричневый, поэтому визуальная оценка едва ли возможна. Кроме того, добавление избытка этанола приводило к образованию агрегатов при сшивке наночастиц нагреванием. В связи с этим мутность реакционной смеси контролировали путем измерения поглощения при 700 нм (гемин не поглощает при этой длине волны, Рисунок 5.2А). Добавление этанола прекращали, когда наблюдался рост поглощения. Этот подход позволил успешно синтезировать наночастицы БСА/гемина.

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 в таблице 5.1. 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 [191]. Наночастицы имели сферическую форму (Рисунок 5.3) в соответствии с данными СЭМ.

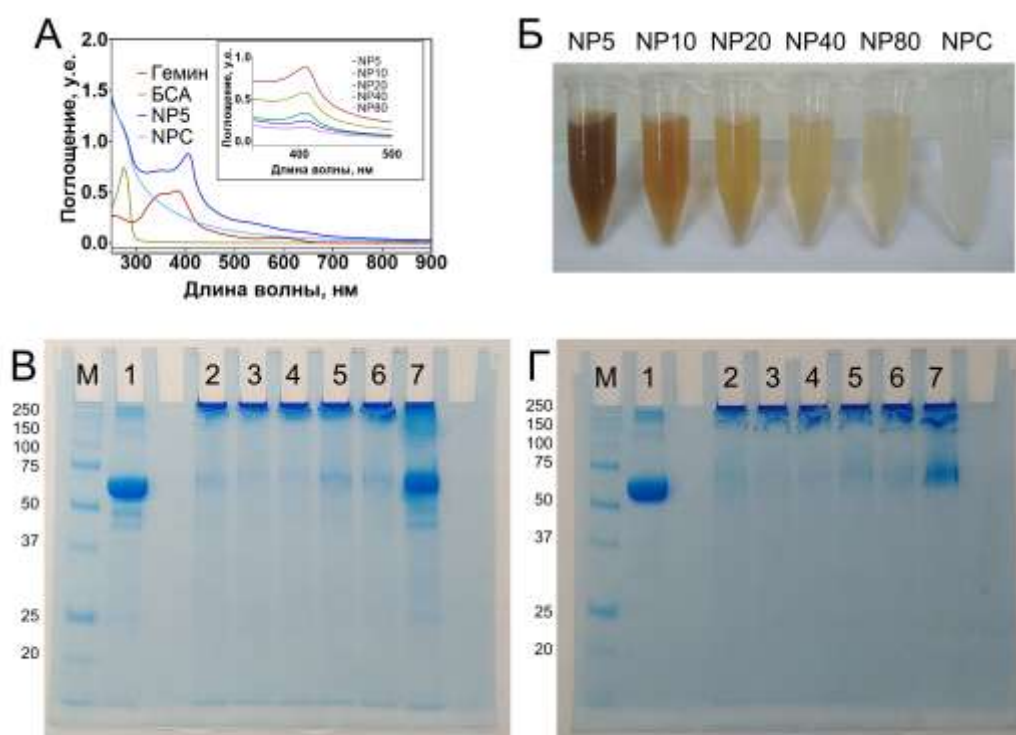


Рисунок 5.2 – А - спектры поглощения БСА (1 мг/мл), гемина (10 мкг/мл) и наночастиц NPC и NP5 (250 мкг/мл). Вставка - спектры поглощения наночастиц БСА/гемин (250 мкг/мл); Б - суспензии наночастиц БСА/гемин; электрофорез в ПААГ наночастиц БСА/гемин (1 мг/мл) без (В) или с (Г) нагреванием при +95 °С: М - белковые маркеры, 1 - БСА, 2 - NP5, 3 - NP10, 4 - NP20, 5 - NP40, 6 - NP80, 7 - NPC.

Не было четкой зависимости между массой добавленного гемина и диаметром частиц (Таблица 5.1). Это неудивительно, поскольку размер десольватированных белковых наночастиц зависит от множества факторов, включая количество загруженного соединения, объем органического растворителя, а также режим его добавления [349]. В наших экспериментах требовался больший объем этанола, чтобы вызвать десольватацию альбумина при более низких концентрациях гемина, что указывает на то, что сам гемин способствует агрегации белковых молекул. Кроме того, добавление этанола осуществляли порционно с интервалами, и количество интервалов зависело от объема этанола, являющегося различным для каждого типа наночастиц. Следовательно, следует сделать вывод, что различия в процедуре синтеза между партиями были слишком велики, чтобы выявить четкие закономерности.

Загрузку гемина оценивали путем измерения поглощения гидролизованых наночастиц при 382 нм. Результаты показывают, что нагрузка геминем достигла 34,7 мкг/мг при самом низком соотношении БСА к гемину и постепенно снижалась при более высоких значениях отношения. Наличие гемина в наночастицах было отчетливо видно невооруженным глазом: чем больше добавляли гемина при синтезе, тем темнее был их цвет (Рисунок 5.2Б). Отчетливый пик с максимумом при 406 нм наблюдался для всех частиц, нагруженных геминем (NP5-NP80), но не для NPC (Рисунок 5.2А). Примечательно, что этот пик поглощения был смещен в красный цвет по отношению к максимуму поглощения чистого гемина (382 нм). Такой сдвиг подразумевает как образование комплекса БСА-Гемин, так и изменение степени окисления железа. Поглощение наночастиц БСА/Гемина при 406 нм было пропорционально начальной концентрации гемина, однако на A_{406} влияет не только гемин, но и рассеяние света частицами, которое выше для крупных наночастиц.

Гель-электрофорез в полиакриламидном геле был использован для дополнительной характеристики структуры наночастиц БСА/Гемин. Недавно мы продемонстрировали, что дисульфидные связи поддерживают целостность стабилизированных нагреванием наночастиц БСА [166]. Наночастицы

обрабатывали бета-меркаптоэтанолом, который способен восстанавливать дисульфидные связи белка, и наносили на гель. Как и ожидалось, в образце NPC появилась отчетливая полоса БСА (Рисунок 5.2В, Г), однако в образцах геминсодержащих наночастиц почти не наблюдалось мономеров БСА. Этот эффект воспроизводился даже в условиях перегрузки гелей образцами. В отсутствие бета-меркаптоэтанола в образцах наночастиц не наблюдалось белковых полос (данные не показаны). Эти результаты демонстрируют, что гемин сам по себе может стабилизировать наночастицы БСА. Несмотря на то, что способность БСА нековалентно связывать гемин хорошо известна, прямое смешивание БСА с протопорфирином-IX не вызывает агрегации белка, поэтому механизм стабилизации остается неясным.

Таблица 5.1 – Свойства наночастиц БСА/гемин

| Образец | Объем | Концентрация, мг/мл | Dh ¹ , среднее±ст. откл. ² | ИП ¹ , среднее±ст. откл. | Дзета-потенциал, мВ | Выход, % ³ | A ₄₀₆ | Гемин, мкг/мг |
|---------|-------|---------------------|--|-------------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------------|
| NP5 | 4.5 | 5.1 | 137±2 | 0.100±0.017 | -18.2 | 14.3 | 0.879 | 34.7 |
| NP10 | 8.4 | 11.7 | 155±3 | 0.084±0.022 | -16.3 | 61.4 | 0.582 | 16.8 |
| NP20 | 8 | 7.5 | 119±4 | 0.080±0.005 | -17.1 | 37.5 | 0.337 | 9.9 |
| NP40 | 7.8 | 8.1 | 111±0 | 0.078±0.004 | -16.7 | 39.5 | 0.247 | 6.1 |
| NP80 | 7.6 | 2.5 | 96±11 | 0.073±0.010 | -15.3 | 11.9 | 0.169 | 6.8 |
| NPC | 7.6 | 5.4 | 124±1 | 0.061±0.010 | -17.3 | 25.7 | 0.237 | 2.0 |

Примечание: ¹ Dh – гидродинамический диаметр, ИП – показатель полидисперсности; ² n=3; ³ процент БСА, преобразованного в наночастицы.

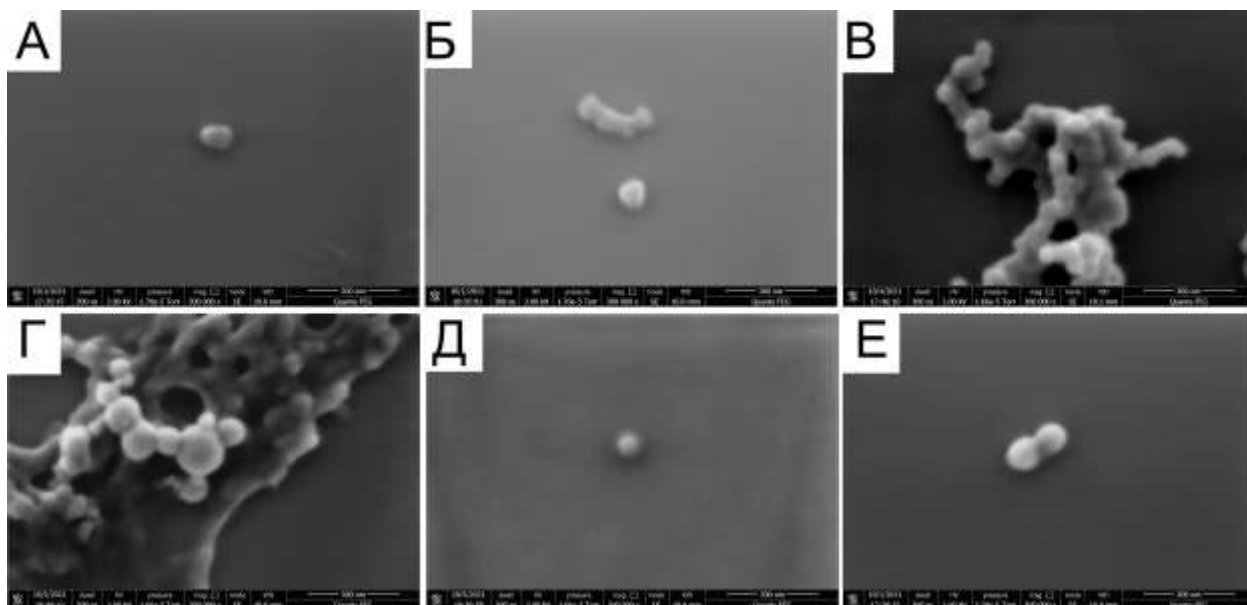


Рисунок 5.3 – СЭМ-изображения наночастиц БСА/гемин: NP5 (А), NP10 (Б), NP20 (В), NP40 (Г), NP80 (Д), NPC (Е). Масштабная линейка 300 нм.

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. Свойства этого рекомбинантного белка были описаны ранее [27]. В нашей лаборатории имеется многолетний успешный опыт применения белка G при конструировании широкого спектра неинструментальных тест-систем качественного и полуколичественного формата с использованием в качестве цветной метки наночастиц коллоидного углерода.

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. Процесс конъюгации сопровождался небольшим увеличением размера наночастиц (на 20-30 нм) и изменением дзета-потенциала. Обработка глутаровым альдегидом делала дзета-потенциал более отрицательным из-за уменьшения количества первичных аминов. Пришивка белка G или БСА, напротив, сдвигала дзета-потенциал в сторону более положительных значений (Рисунок 5.4).

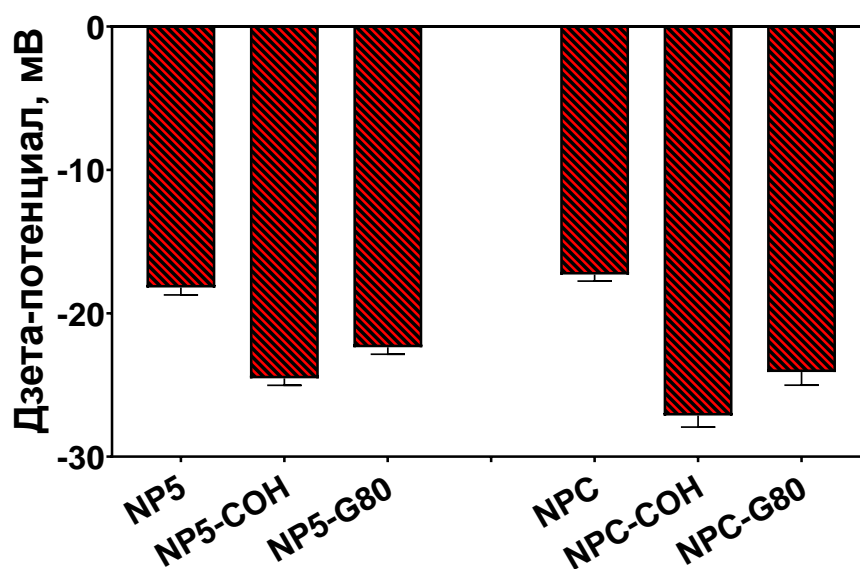


Рисунок 5.4 – Изменение дзета-потенциала наночастиц в процессе функционализации. Индекс «COH» обозначает наночастицы, обработанные глутаровым альдегидом. n=3, среднее ± стандартное отклонение.

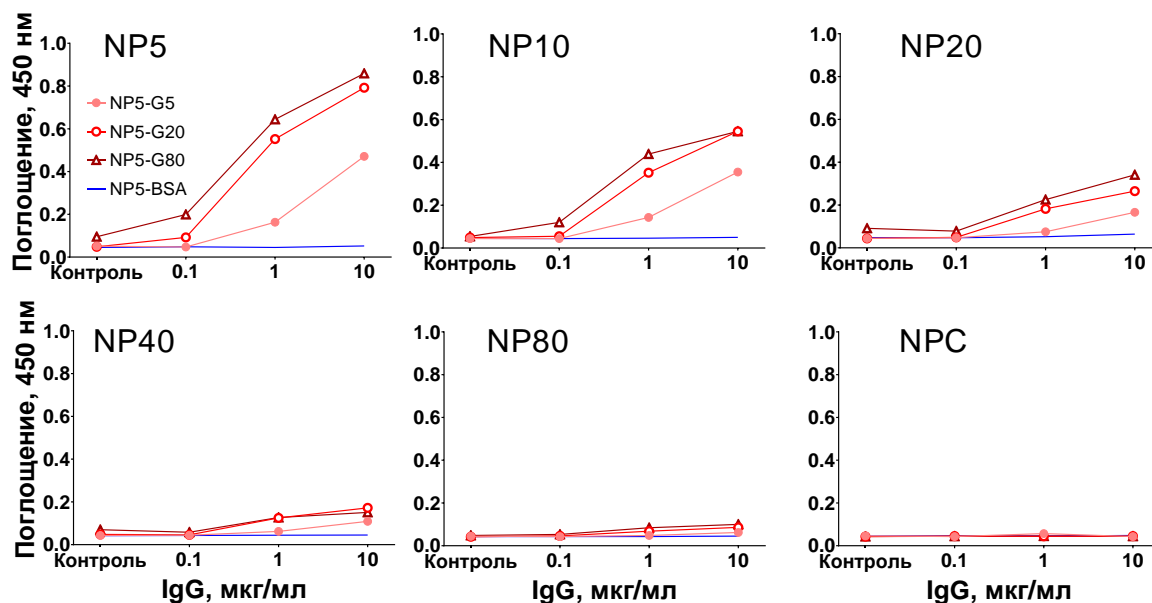


Рисунок 5.5 – Прямое определение IgG человека с помощью различных конъюгатов наночастиц БСА/гемин, конъюгированных с белком G. Субстратный буфер: 29 частей 0,1 М ацетатного буфера, pH 5; 1 часть 0,1 М фосфатно-цитратного буфера, pH 5. n=1.

Способность наночастиц БСА/Гемин, конъюгированных с белком G, связывать IgG проверяли методом ИФА-подобного анализа. Человеческие IgG или БСА адсорбировали 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 5.5). В целом, интенсивность окраски была пропорциональна степени загрузки гемина и соотношению белка G к наночастицам. Более того, изменение цвета в положительных образцах подтверждает наличие пероксидазоподобной активности у нанозимов. Эти результаты подтверждали, количественно оценивая способность наночастиц связывать IgG при помощи IgG с флуоресцентной меткой. Мы протестировали наночастицы, нагруженные (NP5) и ненагруженные (NPC) геминном. Связывающая способность наночастиц положительно коррелировала с исходным соотношением белка G к наночастицам (Рисунок 5.6).

Примечательно, что наночастицы, несущие на своей поверхности БСА вместо белка G, обладали заметно более низким уровнем связывания IgG, что подтверждает специфический характер взаимодействия между наночастицами, несущими белок G, и иммуноглобулинами. Почти двукратная разница в связывающей способности между NP5-G20/G80 и NPC-G20/G80 может быть объяснена меньшим количеством молекул белка G, присоединенных к последнему, поскольку размеры (и, следовательно, удельная площадь) этих наночастиц сопоставимы. Причина этого различия неясна и может быть связана с упомянутыми структурными особенностями наночастиц, нагруженных гемином. В совокупности приведенные выше результаты демонстрируют, что взаимодействие наночастиц БСА/Гемин с IgG опосредовано именно молекулами белка G.

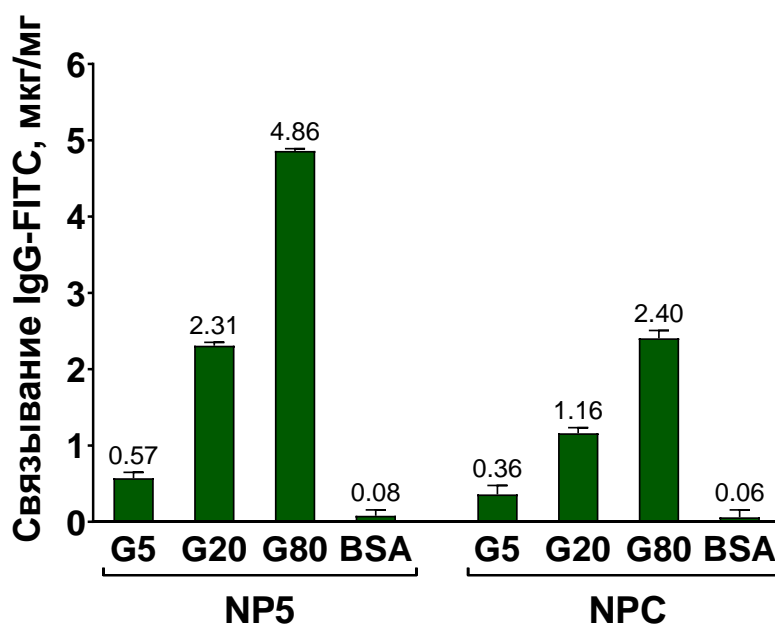


Рисунок 5.6 – IgG-связывающая способность NP5 и NPC, конъюгированных с белком G. n=3, среднее ± стандартное отклонение.

5.2 – Колориметрический иммуноанализ противостолбнячных антител при помощи наночастиц БСА/гемин

Оптимизированные диагностические реагенты были использованы для создания метода количественной детекции человеческих противостолбнячных антител (tIgG). Процесс разработки состоял из нескольких этапов. Сначала подбирали состав раствора хромогенного субстрата, затем оптимизировали концентрацию антигена, тип конъюгата и его концентрацию.

Для оптимизации субстрата использовали прямой анализ IgG. Были протестированы различные буферы с pH в диапазоне 2-10. Мы использовали достаточно высокую концентрацию H₂O₂: 0,03%, что значительно выше, чем в традиционном ИФА. В некоторых буферах наблюдается спонтанное окисление ТМБ в присутствии H₂O₂ [69, 228] (вероятно связанное с присутствием ионов переходных металлов и протеканием реакций Фентона). Поэтому мы измеряли интенсивность окраски субстратов в лунках, в которые не добавляли наночастицы (контроль A450) и сравнивали ее с поглощением IgG-положительных образцов (A450 IgG). Как и ожидалось, каталитическая активность наночастиц БСА/Гемин сильно зависела как от pH, так и от состава субстратного буфера. Самые высокие контрольные значения A450 IgG/контроль A450 наблюдались в буферах на основе лимонной кислоты при pH 4 и 5, тогда как оксалатные буферы были куда менее эффективны. Цитратно-аммониевый буфер с pH 4 давал наибольшее значение A450 IgG/контроль A450, однако наблюдалась существенная разница в поглощении между повторностями. Ацетат, глицин и буферы на основе HEPES индуцировали окисление ТМБ в отсутствие наночастиц, поэтому они не подходят для применения в анализе. При pH 6 и выше активность наночастиц практически не обнаруживалась.

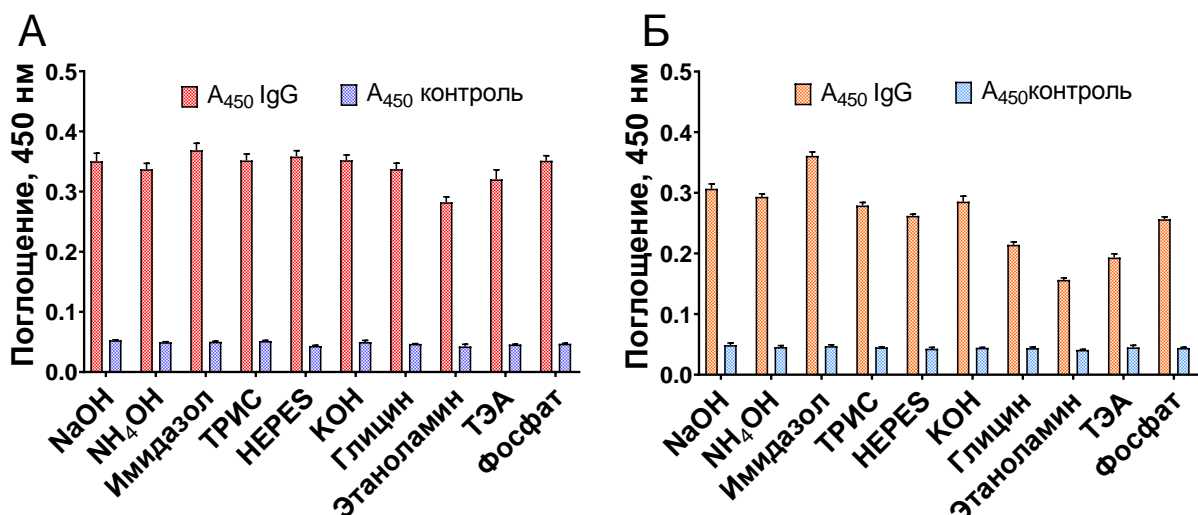


Рисунок 5.7 – Поглощение положительных (10 мкг/мл IgG) и контрольных образцов, полученных с различными буферами на основе цитрата: pH 4 (А) и pH 5 (Б). ТЭА - триэтиламин. n=3, среднее ± стандартное отклонение.

В следующем эксперименте мы протестировали 10 буферов на основе лимонной кислоты с pH 4 и 5. В целом, более высокие значения поглощения были получены при pH 4 (Рисунок 5.7). Интересно, что цитратно-имидазольный буфер был одинаково эффективен как при pH 4, так и при 5 и давал самый высокий уровень сигнала в IgG-положительных образцах, однако цитратно-HEPES буфер обеспечивал самое высокое соотношение A₄₅₀ IgG/ контроль A₄₅₀. Имидазольная группа проксимального гистидина играет существенную роль в каталитической активности пероксидазы хрена. Более того, свободный имидазол резко повышает каталитическую активность мутантов пероксидазы, лишенных проксимального гистидина.

Мы предположили, что влияние неспецифического взаимодействия между конъюгатом и иммуносорбентом на фоновый сигнал иммуноанализа намного выше по сравнению с поглощением чистого субстрата, поэтому для дальнейших экспериментов был выбран имидазольный буфер с pH 4.

Нанозимы обычно имеют относительно низкое сродство к H₂O₂, поэтому для получения адекватного сигнала необходимы высокие концентрации перекиси

[69]. Мы протестировали различные концентрации перекиси водорода в растворе субстрата и показали, что оптимальная концентрация составляет 0,03-0,12% (Рисунок 5.9). Дальнейшее увеличение концентрации H_2O_2 приводило к снижению сигнала, вероятно, из-за окислительного разрушения гемина.

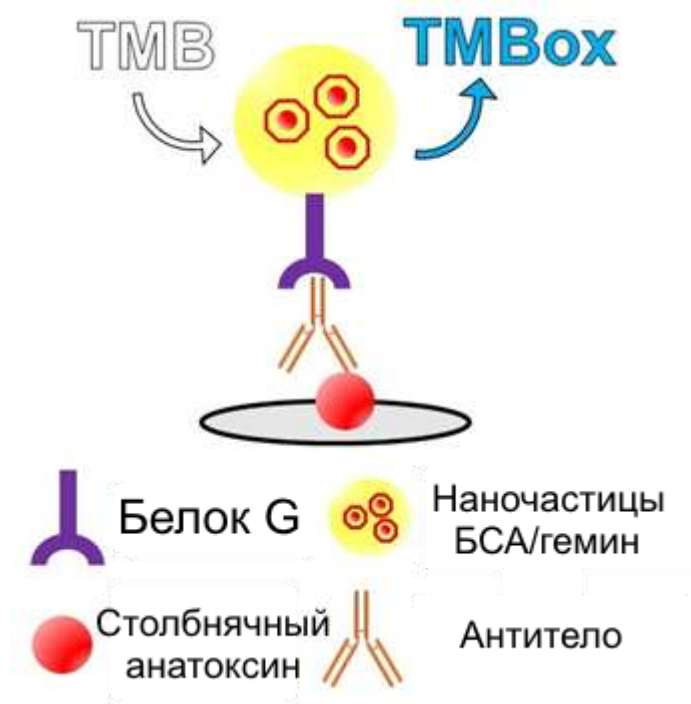


Рисунок 5.8 – Принцип непрямого иммуноанализа антител против столбнячного анатоксина. ТМБох представляет собой окисленную форму ТМБ синего цвета.

После выбора оптимального субстратного раствора был разработан не прямой иммуноанализ tIgG. Непрямой иммуноанализ включал следующие этапы: адсорбция столбнячного 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 (Рисунок 5.8). Прежде всего, мы оптимизировали концентрацию столбнячного анатоксина. Обычно раствор для нанесения покрытия содержит 1-10 мкг/мл антигена [56]. Лунки были покрыты 2, 10 и 50 мкг/мл столбнячного анатоксина, и были получены почти идентичные

кривые доза-реакция (Рисунок 5.9Б). 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 (Рисунок 5.9В, Г). Однако для NP5-G80 (и некоторых других конъюгатов) наблюдалась плохая воспроизводимость между повторностями даже в контрольных лунках (образец без tIgG). Увеличение концентрации казеина не решило эту проблему. В дополнительных экспериментах мы наблюдали развитие окраски в субстрате даже в отсутствие наночастиц, что указывало на то, что нестабильность цитратно-имидазольного буфера была вероятным источником ошибок. По этой причине впоследствии мы использовали более традиционный фосфатно-цитратный буфер с pH 4.

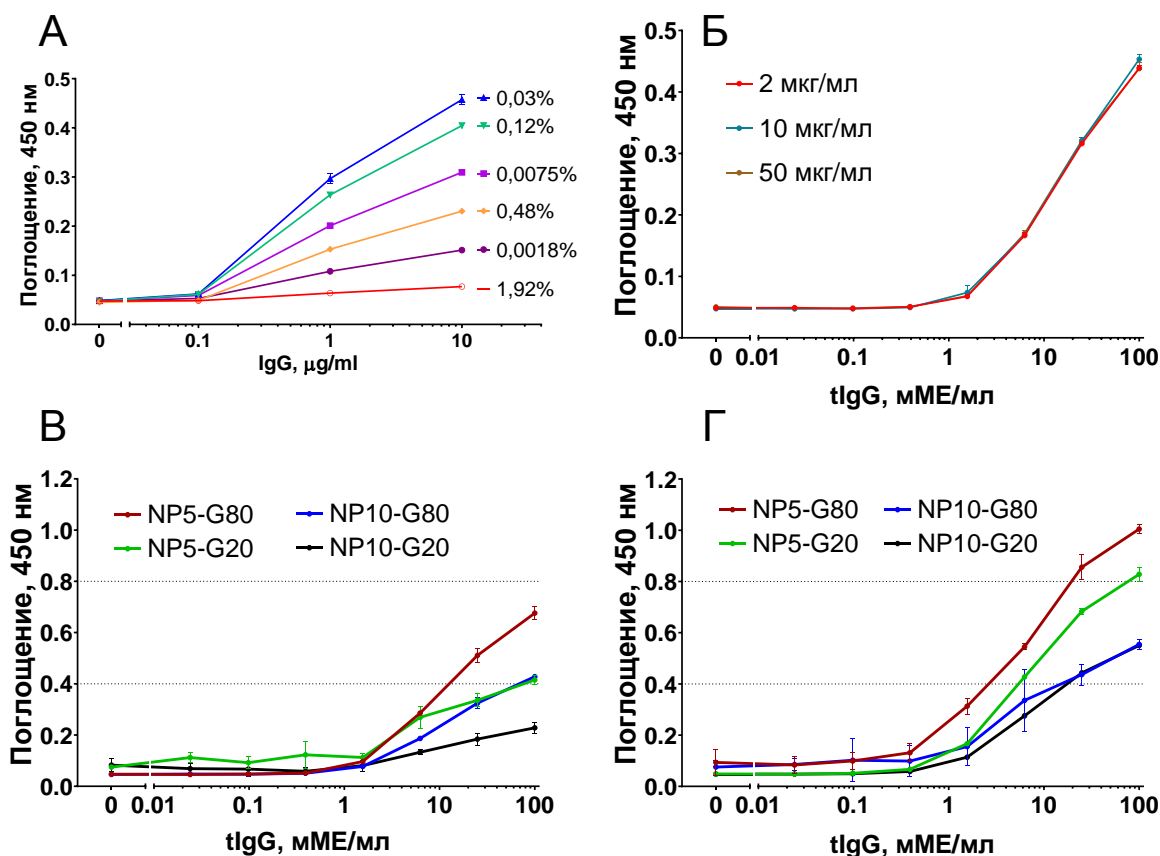


Рисунок 5.9 – Оптимизация параметров иммуноанализа: концентрация перекиси водорода (А); концентрация столбнячного анатоксина (Б); концентрация нанозимов - 0,1 мг/мл (В) и 0,2 мг/мл (Г). Субстратный буфер: 0,1 М цитрат-имидазольный буфер, рН 4. n=3, среднее ± стандартное отклонение.

Практическая применимость наноконъюгатов БСА/Гемин для измерения аналита в реальных образцах была подтверждена обнаружением tIgGs 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 с добавлением 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 5.10). Воспроизводимость была значительно улучшена по сравнению с экспериментами по оптимизации, однако значения оптической плотности были ниже по причине использования как неоптимального конъюгата (NP5-G20), так и субстрата. 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 все же 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.

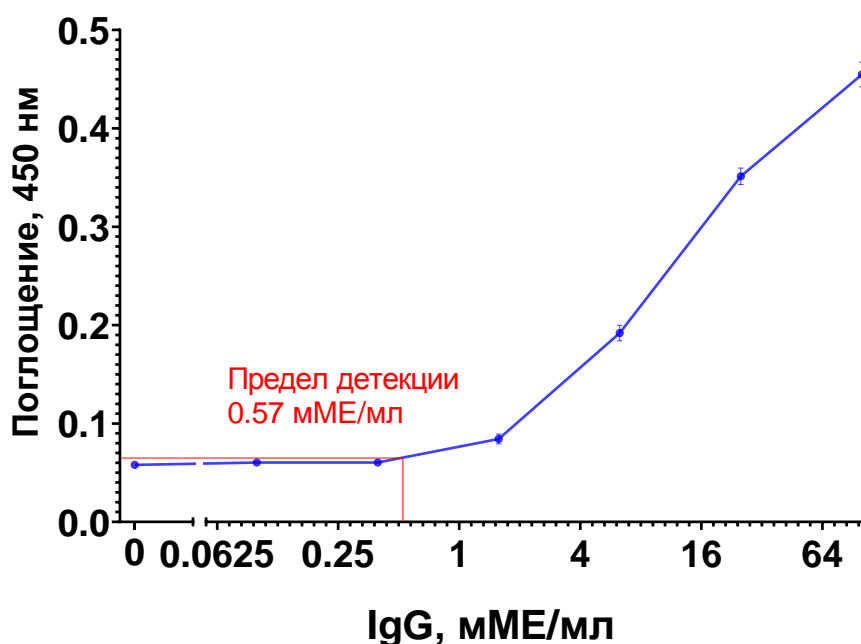


Рисунок 5.10 – Кривая доза-реакция анализа tIgG в 5% кроличьей сыворотке. Конъюгат: NP5-G20; субстратный буфер: 0,1 М фосфат-цитратный буфер, pH 4. n=3, среднее \pm стандартное отклонение.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ,
ИЗЛОЖЕННЫМ В 3 ГЛАВЕ**

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК

Минобрнауки РФ и индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus:

1. Khramtsov P. 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.
2. Khramtsov P. 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.
3. Khramtsov P. 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. – P. e202103892.

ГЛАВА 6 – ДИАГНОСТИКУМЫ НА ОСНОВЕ НАНОЗИМОВ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В АЛЬБУМИНОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

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 [106, 140]. Физико-химическая стабильность, низкая стоимость и регулируемые свойства делают их многообещающей альтернативой пероксидазе хрена (ПХ), щелочной фосфатазе, β -галактозидазе, которые используются в качестве меток в колориметрических иммуноанализах [216]. 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 [247]. В настоящее время колориметрические

иммуноанализы являются одним из ключевых аналитических инструментов в медицине, контроле качества пищевых продуктов и биотехнологии [60, 371]. Несмотря на недостаточную технологическую зрелость нанозимов [60], они являются перспективной альтернативой ферментам в области биосенсорики [93, 103].

Наиболее привлекательными свойствами нанозимов по сравнению с ферментами являются лучшая физико-химическая стабильность, возможность многократного использования и практически неограниченный диапазон способов регулирования каталитических свойств [60]. В настоящее время нанозимы рассматриваются в качестве альтернативы ферментов в различных областях биомедицины, включая терапию [287] и диагностику [204]. 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 [93].

Берлинская лазурь - это синий пигмент с химической формулой, варьирующей от $AFe^{III}[Fe^{II}(CN)_6] \cdot xH_2O$ (где А - К, Na или NH₄) до $Fe^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_3 \cdot xH_2O$ [181]. Наночастицы берлинской лазури проявляют пероксидазоподобную активность и ранее уже использовались в качестве каталитических меток в иммуноанализах, подобных ИФА [81], и в иммунохроматографических тестах [123, 341]. 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 [312], искусственными полимерами, белками и так далее [282]. 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 [190]. 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 применяли десольватацию для покрытия белковой оболочкой нанозимов, таких как наночастицы золота [273], железа [43] и церия [21]. В то же время, для функционализации наночастиц берлинской лазури этот метод ранее не использовался. Берлинская лазурь склонна к гидролизу при щелочном рН [157], который обычно используется для десольватации альбумина [91], 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 [219]. 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 [321, 350, 384]. 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 [146].

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.

6.1 – Получение диагностикумов на основе альбуминовых наночастиц, содержащих берлинскую лазурь

Нанозимы берлинской лазури были синтезированы традиционным методом, основанным на быстром смешивании растворов FeCl_3 и $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Мы использовали относительно концентрированные растворы солей железа и не добавляли стабилизаторов, таких 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.

Десольватацию альбумина обычно проводят в щелочной среде [91]; однако при нейтральном и щелочном рН происходит гидролиз берлинской лазури [157]. В то же время, десольватация при кислом рН (вблизи изоэлектрической точки БСА) способствует образованию крупных наночастиц или даже макроскопических агрегатов [91]. Возможные решения включают десольватацию при рН ниже изоэлектрической точки БСА (например, 2-3) или полное отсутствие регулировки рН. Мы выбрали второй подход из-за его простоты. Водный раствор альбумина имеет рН от 7 до 7,5, что является подходящим для образования наночастиц с желаемым размером 100-200 нм. Несмотря на нейтральное значение

pH, мы не наблюдали гидролиза берлинской лазури, вероятно, из-за очень низкой ионной силы раствора белка.

Первым шагом нашего исследования было определение оптимальной начальной концентрации БСА. Мы стремились выбрать условия синтеза, благоприятствующие получению наночастиц БСА, загруженных нанозимом (БЛ@БСА), с размером, позволяющим осаждать их при достаточно низкой скорости центрифугирования. Farka с соавт., применявшие наночастицы берлинской лазури в иммунологическом анализе, сообщали о трудностях с очисткой наночастиц центрифугированием из-за их малого размера (20-30 нм) [81]. Такие мелкие наночастицы могут быть отделены от молекул белка с помощью гель-хроматографии или ультрафильтрации, однако эти методы довольно дороги и требуют много времени. По этим причинам мы приготовили наночастицы БЛ@БСА размером 100, 160 и 230 нм, изменяя исходную концентрацию БСА [91] (20, 30 и 40 мг/мл соответственно). Самые мелкие наночастицы полностью оседали за 60 мин при 20000 g, в то время как более крупные наночастицы – за 10-20 мин. Для дальнейших экспериментов была выбрана начальная концентрация БСА 30 мг/мл.

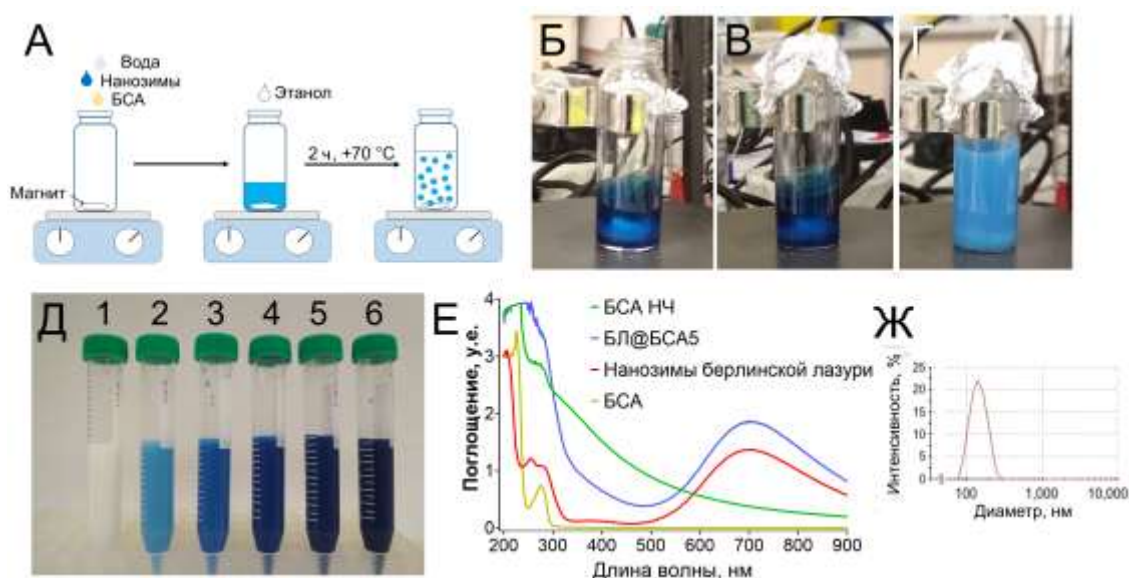
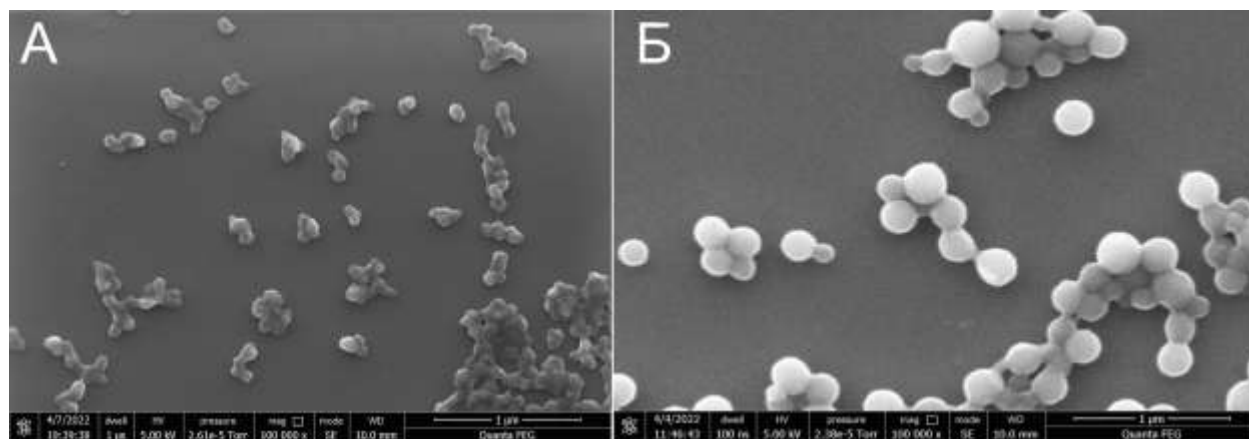


Рисунок 6.1 – А – Схема синтеза наночастиц; Б–Г – разные стадии синтеза БЛ@БСА1: смесь БСА и нанозимов до (Б) и после добавления 1 (В) или 4 (Г) мл этанола; Д – суспензии наночастиц: 1 – БСА НЧ, 2 – БЛ@БСА1, 3 – БЛ@БСА2, 4 – БЛ@БСА3, 5 – БЛ@БСА4, 6 – БЛ@БСА5. (Е) спектры поглощения БСА НЧ, БЛ@БСА5, нанозимов и БСА. (Ж) Взвешенное по интенсивности распределение по размерам БЛ@БСА5.

Следующий этап включал синтез наночастиц БСА, нагруженных различными количествами нанозимов берлинской лазури (Рисунок 6.1А–Г). 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) (таблица 6.1). 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 Рисунок 6.1Ж). Анализ с помощью электронной микроскопии показал, что наночастицы имеют сферическую форму (Рисунок 6.2).



**Рисунок 6.2 – СЭМ-изображения наночастиц БЛ@БСА5 (А) и БСА НЧ (Б).
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 6.2Д). Более того, их спектры поглощения показали широкий пик при 700 нм, что характерно для берлинской лазури (Рисунок 6.2Е).

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. Степень загрузки также зависела от исходного соотношения БСА к берлинской лазури. Наночастицы БЛ@БСА5 содержали 186 мкг нанозимов на 1 мг наночастиц. Дальнейшее увеличение начальной концентрации берлинской лазури имело негативные последствия: наночастицы становились меньше, а выход синтеза снижался. Следовательно, слишком высокие концентрации нанозима препятствуют процессу десольватации.

Таблица 6.1 – Свойства наночастиц

| Тип наночастиц | Диаметр, нм | ИП | Дзета-потенциал, мВ | Степень загрузки, мкг/мг | Эффективность инкапсулирования, % | Выход синтеза, % |
|----------------|-------------|---------------|---------------------|--------------------------|-----------------------------------|------------------|
| БСА НЧ | 234 ± 3 | 0.078 ± 0.006 | -19.1 ± 0.9 | 0.0 | 0.0 | 79.8 |
| БЛ@БСА1 | 237 ± 53 | 0.166 ± 0.073 | -17.8 ± 1.4 | 7.6 | 40.6 | 66.4 |
| БЛ@БСА2 | 169 ± 5 | 0.175 ± 0.007 | -16.8 ± 0.8 | 24.7 | 74.5 | 73.6 |
| БЛ@БСА3 | 123 ± 1 | 0.176 ± 0.008 | -19.2 ± 1.7 | 51.1 | 84.3 | 78.6 |
| БЛ@БСА4 | 131 ± 18 | 0.131 ± 0.090 | -17.9 ± 0.8 | 101.7 | 91.4 | 81.8 |
| БЛ@БСА5 | 140 ± 1 | 0.040 ± 0.026 | -17.8 ± 0.4 | 186.5 | 96.3 | 86.1 |

Примечание: n=3

Воспроизводимость синтеза наночастиц имеет важное значение для его практического применения. Мы синтезировали 3 дополнительные партии

наночастиц БЛ@БСА5, которые были обозначены как БЛ@БСА5-1, БЛ@БСА5-2 и БЛ@БСА5-3. Их свойства обобщены в таблице 6.2. Воспроизводимость от партии к партии была хорошей с точки зрения размера, выхода и содержания нанозима; однако наночастицы БЛ@БСА5, синтезированные ранее в тех же условиях, были почти на 20 нм меньше. Эти различия указывают на то, что воспроизводимость синтеза должна быть улучшена в будущем.

Таблица 6.2 – Свойства трех партий БЛ@БСА5

| Партия наночастиц | Диаметр, нм | ИП | Дзета-потенциал, мВ | Степень загрузки, мкг/мг | Эффективность инкапсулирования, % | Выход синтеза, % |
|-------------------|-------------|---------------|---------------------|--------------------------|-----------------------------------|------------------|
| РВ@БСА5-1 | 168 ± 1 | 0.104 ± 0.007 | -18.2 ± 1.6 | 192 | 99.7 | 86.7 |
| РВ@БСА5-2 | 167 ± 1 | 0.106 ± 0.011 | -21.0 ± 1.0 | 191 | 99.8 | 90.6 |
| РВ@БСА5-3 | 161 ± 1 | 0.178 ± 0.017 | -17.5 ± 0.9 | 187 | 99.6 | 91.1 |

Примечание: n=3

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.

Диагностикумы, представляющие собой наночастицы БЛ@БСА/МКА и БЛ@БСА/Стр, обладают хорошей коллоидной стабильностью при нейтральном рН (Рисунок 6.3), что важно, поскольку иммуноанализы проводятся в физиологических условиях. Агрегация наночастиц наблюдалась при значениях рН, близких к изоэлектрической точке БСА (3,5–5,0), что характерно для альбуминовых наночастиц [355]. Дзета-потенциал наночастиц приближается к нулю в указанном диапазоне рН, что указывает на участие электростатических сил в стабилизации суспензий БЛ@БСА. Однако мы должны подчеркнуть, что размер наночастиц был измерен в буферах с достаточно высокой ионной силой, поэтому другие силы, такие как стерическое отталкивание, также вероятно способствуют стабилизации суспензий наночастиц. Долгосрочную стабильность наночастиц оценивали путем измерения их размера и полидисперсности после нескольких недель хранения. Наночастицы хранили в деионизированной воде без каких-либо стабилизаторов, таких как поверхностно-активные вещества. Мы не наблюдали никаких изменений в размере и полидисперсности при хранении.

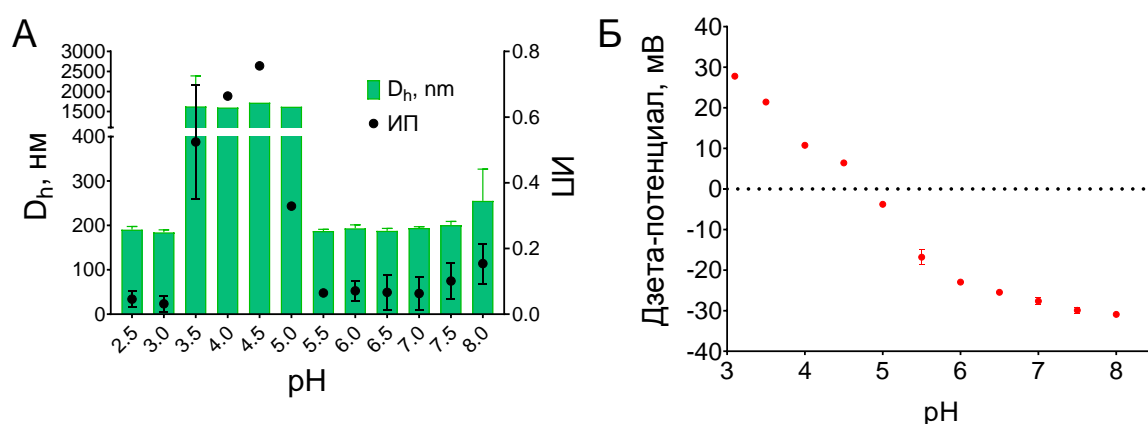


Рисунок 6.3 – Коллоидная стабильность БЛ@БСА5/Стр. А – Средний гидродинамический диаметр (D_h) и индекс полидисперсности (PdI) наночастиц (10 мкг/мл) в буфере Макильвена с различными значениями рН. Б – Дзета-потенциал наночастиц (50 мкг/мл) в 5 мМ цитрат-фосфатном буфере. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение для 3 технических повторностей.

6.2 – Колориметрический иммуноанализ простатспецифического антигена

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 (Рисунок 6.4). 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.

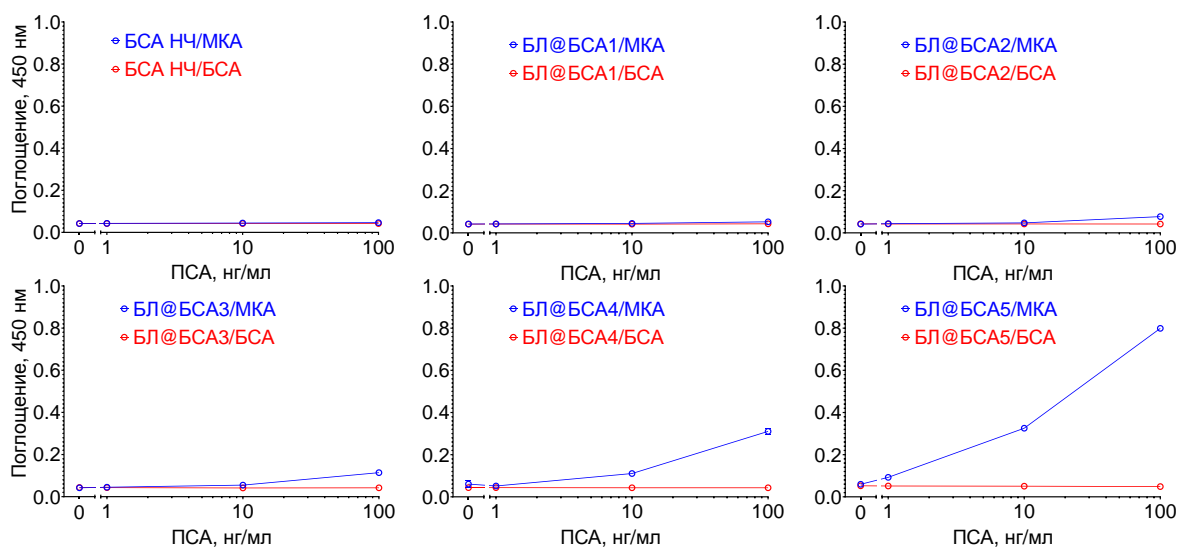


Рисунок 6.4 – Калибровочные кривые в анализе ПСА, полученные для различных наночастиц БЛ@БСА, конъюгированных с БСА или МКА против ПСА. Концентрация наночастиц – 0,1 мг/мл. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение для 3 технических повторностей.

Столбики погрешностей очень малы и скрыты точками данных.

Наночастицы, содержащие нанозимы, давали довольно слабый сигнал с точки зрения величины поглощения по сравнению с обычным ИФА. Более высокая интенсивность сигнала может как повысить надежность измерения поглощения при более низких значениях поглощения, так и повысить чувствительность иммуноанализа. Поэтому следующим шагом нашей работы была оптимизация состава субстрата.

Каталитическая активность нанозимов зависит от условий окружающей среды, включая состав [69, 139] и pH буферного раствора, а также концентрацию некоторых электролитов [306] и субстратов (ТМБ и H_2O_2) [275].

В первую очередь, мы оценили зависимость каталитической активности БЛ@БСА от pH. Как мы показали ранее, агрегация БЛ@БСА происходит при кислом pH, что затрудняет прямое измерение их каталитической активности в растворе. По этой причине мы использовали быстрый и простой прямой анализ биотинилированного БСА (Би-БСА). В этом эксперименте использовались конъюгированные со стрептавидином наночастицы БЛ@БСА5 (БЛ@БСА5/Стр). Планшеты покрывали Би-БСА, блокировали, обрабатывали БЛ@БСА 5/Стр и заполняли растворами субстрата.

Оптимальный pH определяли с использованием ТМБ, разведенного в цитрат-фосфатном буфере (буфер Макильвена), который позволяет охватить широкий диапазон значений pH. Самый высокий сигнал был достигнут при pH 4, тогда как при pH 3 и 5 величина поглощения была почти в три раза ниже (Рисунок 6.5А). Этот результат не совпадает с ранее опубликованными данными о влиянии pH на активность берлинской лазури. В частности, в некоторых публикациях утверждалось что наночастицы берлинской лазури активны в более широком диапазоне pH, включая физиологические значения [176, 354]. Различия в условиях синтеза наночастиц, вероятно, могут объяснить эти расхождения. Кроме того, метод измерения каталитической активности также мог повлиять на результаты: в обеих упомянутых работах пероксидазоподобную активность измеряли путем прямого добавления нанозимов в раствор субстрата.

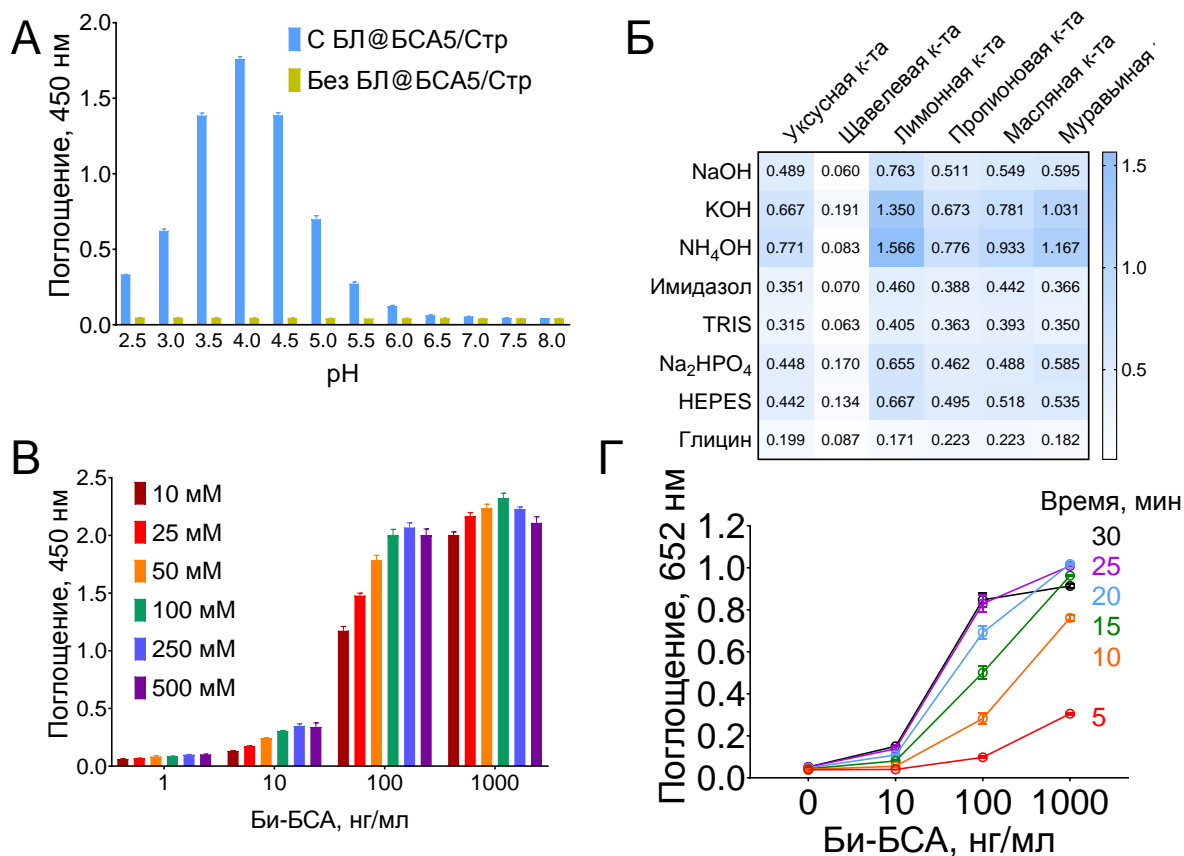


Рисунок 6.5 – А – зависимость сигнала от pH субстратного буфера. Образцы «Без РВ@BSA5/Str» показывают интенсивность сигнала в лунках, заполненных блокирующим буфером вместо конъюгата (контроль спонтанного развития окраски субстратом). Субстрат: 0,1 М цитратный/0,2 М фосфатный буфер, ТМБ — 1 мг/мл, H₂O₂ — 0,3%. n = 4, среднее значение ± стандартное отклонение. Б – Влияние состава буферного раствора (pH 4) на интенсивность окрашивания, дано среднее значение для 2 образцов; В – влияние молярности буфера на сигнал, n = 3, среднее значение ± стандартное отклонение; Г – калибровочные кривые, полученные в разные периоды времени после добавления субстрата (H₂O₂ – 0,3%), n = 3, среднее значение ± стандартное отклонение.

В дальнейших экспериментах была проведена оптимизация состава субстратного буфера. Буферы готовили из шести кислот (уксусной, щавелевой, лимонной, масляной, пропионовой и муравьиной) и восьми оснований (KOH,

NaOH, NH_4OH , имидазола, ТРИС, HEPES, Na_2HPO_4 и глицина). Самопроизвольное окрашивание, которое может быть вызвано следами переходных металлов (например, железа), было предотвращено добавлением раствора цитрата натрия (рН 4) до 1 мМ во все тестируемые буферы. Самый высокий сигнал был получен при использовании 0,1 М цитрат-аммониевого буфера (Рисунок 6.5Б). В образцах без наночастиц не наблюдалось изменения цвета, что подтверждает, что наблюдаемый сигнал был вызван наночастицами, а не спонтанным окислением субстратов. Примечательно, что интенсивность окраски в значительной степени зависит от состава буфера; например, была обнаружена более чем двукратная разница между обычно используемым цитратно-фосфатным буфером и цитрат-аммониевым буфером. Повторное тестирование буферов, которые давали самые высокие значения поглощения, дало тот же результат: цитрат-аммониевый и цитрат-калиевый буферы показали наилучшие результаты.

Затем была оптимизирована молярность цитрат-аммониевого буфера. Увеличение молярности буфера с 10 до 100 мМ обеспечивало значительный рост поглощения; большие концентрации не оказывали особого эффекта (Рисунок 6.5В). Важно отметить, что усиление цветового сигнала не сопровождалось увеличением вариабельности, поэтому оптимизация буфера теоретически может повысить предел детекции иммуноанализа.

Наконец, мы исследовали зависимость между концентрацией H_2O_2 и динамикой изменения окрашивания. Нанозимы обладают более низким сродством к H_2O_2 [69], чем пероксидаза хрена, поэтому в анализах на основе нанозимов обычно используются более высокие концентрации H_2O_2 . В ходе предыдущих экспериментов концентрация перекиси водорода в растворе субстрата составляла 0,3%. Мы тестировали субстраты, содержащие от 0,018% до 2,4% H_2O_2 . Поглощение при 652 нм (максимум поглощения частично окисленного ТМБ) измеряли в течение 60 мин с интервалом в 5 мин. В целом, более высокие концентрации перекиси приводили к более быстрому росту поглощения. Концентрации H_2O_2 0,15–0,3% обеспечивают как высокий, так и стабильный

сигнал. Важно, что даже в оптимизированных условиях нанозимы реагируют медленнее, чем пероксидаза хрена. Максимальный сигнал достигался через 25-30 мин инкубации (Рисунок 6.5Г).

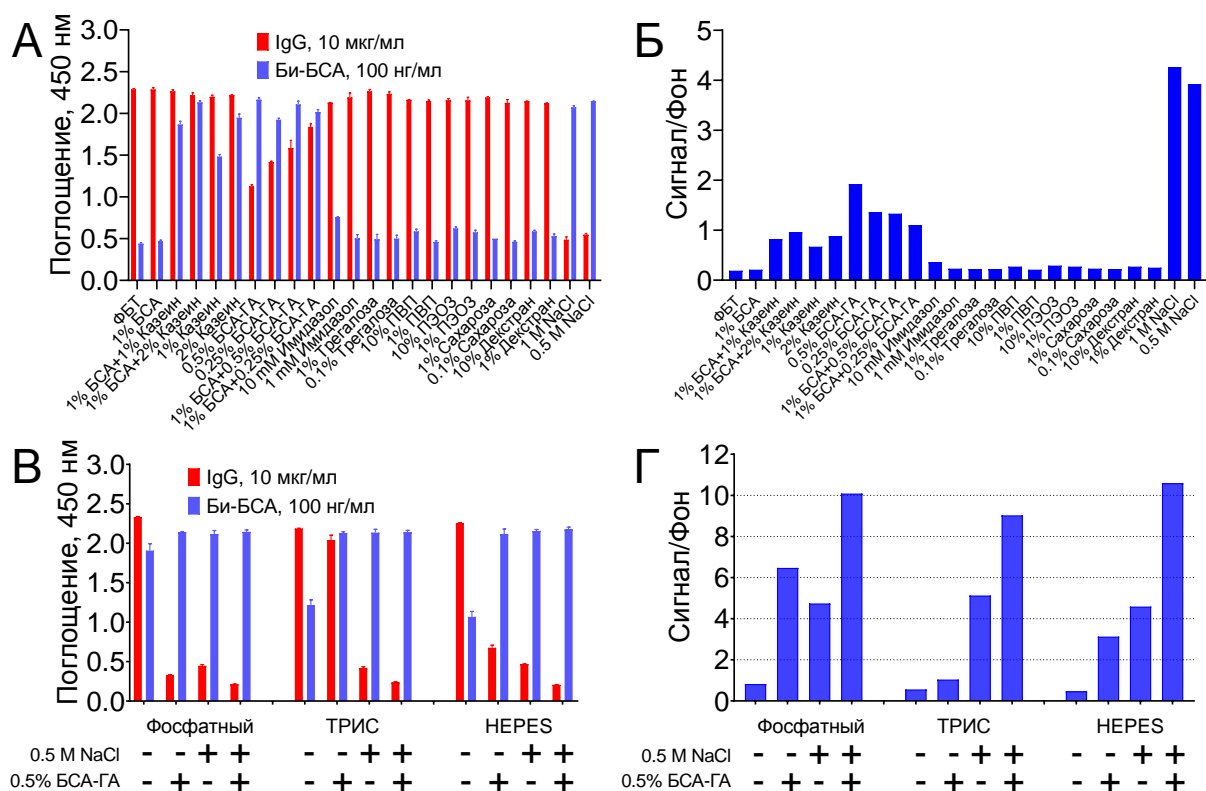


Рисунок 6.6 – оптимизация блокирующего реагента для иммуноанализа при помощи конъюгата БЛ@БСА5/Стр. Неспецифическое взаимодействие с IgG и специфическое взаимодействие с Би-БСА, адсорбированными на подложку. А, Б – скрининг блокирующих реагентов. В, Г – оптимизация наиболее эффективных блокирующих добавок. 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.

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 (Рисунок 6.6). 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.

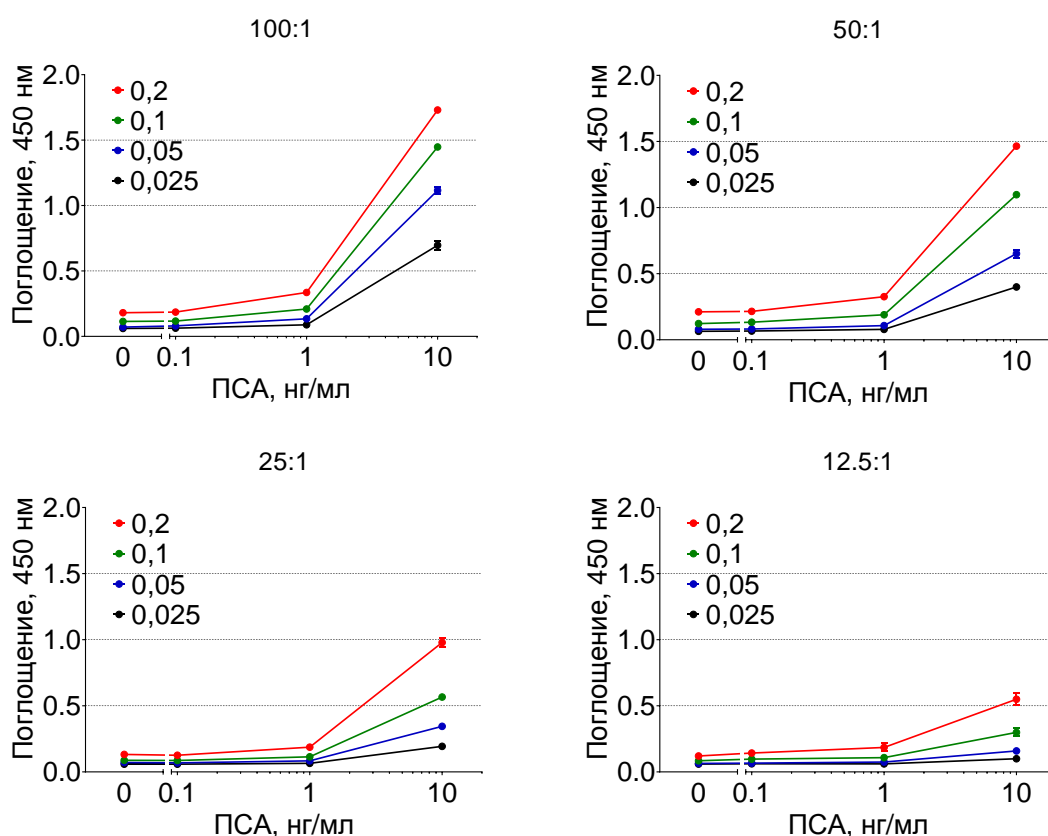


Рисунок 6.7 – оптимизация иммуноанализа ПСА: соотношения МКА к БЛ@БСА5 (соотношение указано над графиками в мкг/мг) и концентрации конъюгатов БЛ@БСА5/МКА. n = 3, среднее значение ± стандартное отклонение.

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 6.7), мы выбрали оптимальные условия анализа: концентрация БЛ@БСА/МКА-0.1 мг/мл; соотношение МКА к БЛ@БСА — 100 мкг на 1 мг.

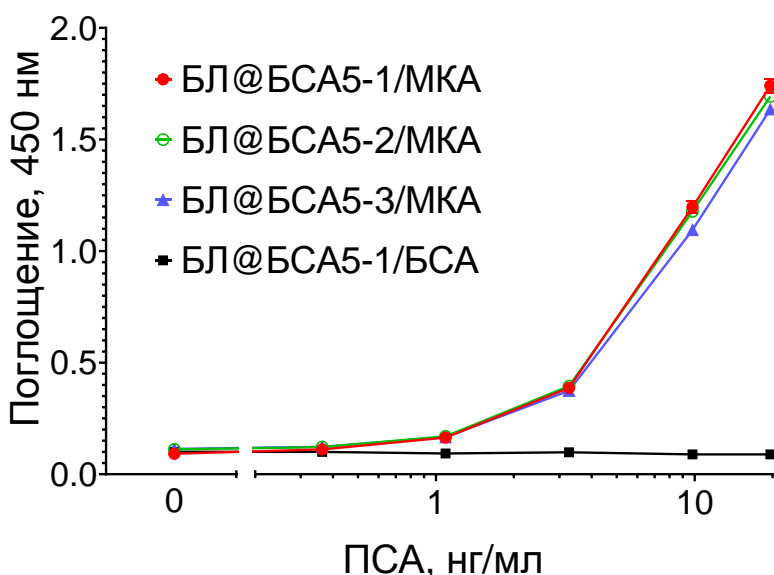


Рисунок 6.8 – Калибровочной кривая для анализов ПСА, сделанных при помощи трех партий наночастиц БЛ@БСА5, конъюгированных с БСА или антителами против ПСА. $n = 3$, среднее значение \pm стандартное отклонение.

Столбики погрешностей очень малы и скрыты точками данных.

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 6.8). Нижние пределы обнаружения ПСА составляли 0,064, 0,390 и 0,659 нг/мл. Как можно

видеть, 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 приходим 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) [71], что свидетельствует об эффективности разработанных диагностических реагентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В ГЛАВЕ 6

Публикации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus,

1. Khramtsov P. 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.
2. Khramtsov P. 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. – P. 29.

ГЛАВА 7 – ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ «ИСКУССТВЕННАЯ ПЕРОКСИДАЗА», МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЖЕЛАТИНОМ

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.

В 2018 году научной группой доктора Аркадия Карякина был разработан способ получения наночастиц берлинской лазури с повышенной пероксидазоподобной активностью, обозначенных как «искусственная пероксидаза» [176]. 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 FeCl_3 и $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ [81, 341] или сольвотермическим методом из $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ [221]. «Искусственная пероксидаза» обладает почти в десять раз более высокой каталитической активностью в пересчете на K_{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 внутрь наночастицы. Наночастицы «искусственная пероксидаза» ранее применяли при разработке ряда высокочувствительных тест-систем [178, 308, 401]. 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 [176], 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 [282, 390]). Наиболее популярным из них является смешивание 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 [311]. Другие методы включают гидротермальное разложение единственного прекурсора (например, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) [399] или восстановление $\text{FeCl}_3/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ с помощью H_2O_2 [218]. 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 FeCl_3 к $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (оба раствора содержали H_2O_2) [218]. Обработка ультразвуком позволяет дополнительно уменьшить размер наночастиц до 5 нм [84]. 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 [309]. Использование полимеров в качестве покрывающих агентов является еще

одним вариантом регулирования размера наночастиц берлинской лазури [132, 310, 343].

Поскольку нам, к большому сожалению, 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.

7.1 – Разработка и оптимизация дианостикумов на основе наночастиц берлинской лазури, покрытых желатином

Способ получения наночастиц «искусственная пероксидаза» с улучшенной каталитической активностью, предложенный в работе [176], основан на добавлении восстановителя (H_2O_2) к смеси $FeCl_3$ и $K_3[Fe(CN)_6]$. Согласно этой статье, размер наночастиц можно регулировать в относительно широком диапазоне, от десятков нанометров до 300-400 нм, изменяя соотношение между концентрациями солей и перекиси водорода. К сожалению, предсказать размер наночастиц по 3D-графику, представленному в статье, непросто. Воспроизведение оригинального метода является довольно сложной задачей еще и потому, что условия синтеза, имеющие ключевое значение для получения частиц желаемого размера (прежде всего, способ перемешивания и режим ультразвуковой обработки), описаны недостаточно подробно. Поскольку условия перемешивания и продолжительность синтеза не были указаны, мы синтезировали наночастицы в условиях интенсивного перемешивания при фиксированной скорости (1000 об/мин). Концентрация солей железа составляла от 1,56 до 25 мМ, тогда как концентрацию H_2O_2 варьировали от 2,75 до 176 мМ. В отличие от оригинальной статьи, синтез проводили без добавления HCl и KCl .

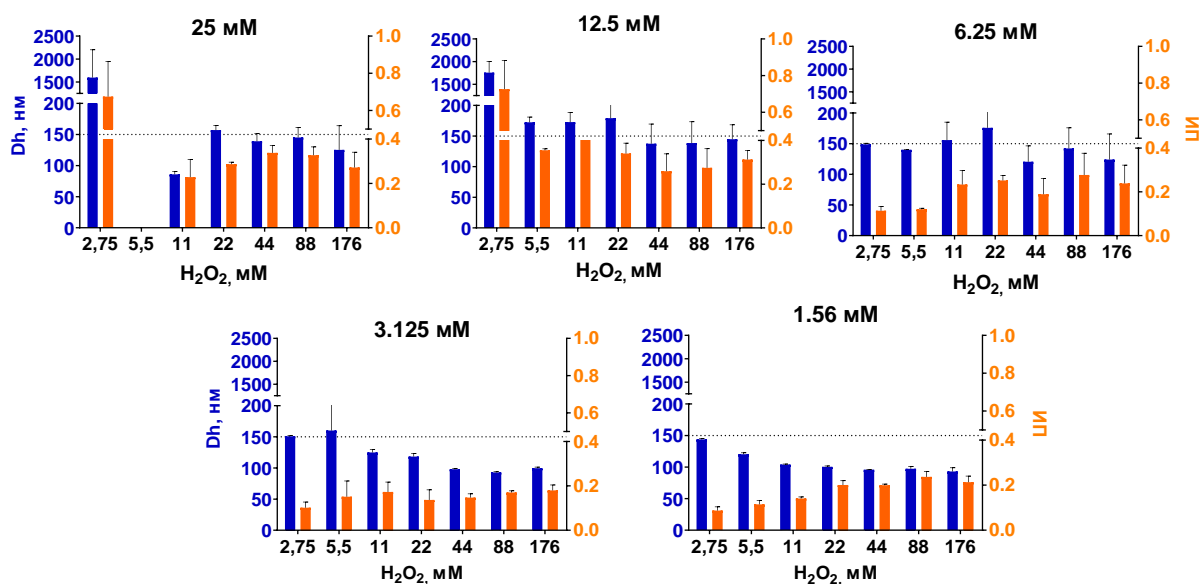


Рисунок 7.1 – Размер и полидисперсность наночастиц берлинской лазури, полученных при различных концентрациях FeCl₃/K₃[Fe(CN)₆] (показаны на гистограммах) и H₂O₂. Dh - гидродинамический диаметр (синие столбцы), ИП - индекс полидисперсности (оранжевые столбцы). Пунктирная линия на длине волны 150 нм предназначена для облегчения визуального сравнения образцов. Отсутствие полосы означает скопление наночастиц. n=3, среднее ± стандартное отклонение

В целом, более крупные наночастицы образовывались при увеличении концентрации FeCl₃/K₃[Fe(CN)₆] (Рисунок 7.1). Однако их рост был ограниченным размерами 150-170 нм (ожидаемый диаметр составлял 200-300 нм и более). Важно отметить, что полидисперсность также была относительно высокой (выше общепринятого порога 0,2 [58]) при концентрациях FeCl₃/K₃[Fe(CN)₆], превышающих 6,25 мМ, несмотря на то, что все наночастицы после синтеза интенсивно обрабатывали ультразвуком и центрифугировали на низкой скорости для удаления агрегатов. Высокая полидисперсность нежелательна, поскольку она отрицательно влияет на воспроизводимость результатов применения наночастиц и затрудняет контроль процесса их дальнейшей функционализации.

Примечательно, что после длительной обработки ультразвуком после синтеза диаметр наночастиц постепенно уменьшался до постоянного значения, что указывает на важность оптимизации этого аспекта синтеза.

В целом, мы не смогли манипулировать размером наночастиц берлинской лазури в желаемом диапазоне, изменяя соотношение между солями железа и H_2O_2 . Нами не было достигнуто даже двукратное увеличение размера наночастиц. Более того, полидисперсность более крупных наночастиц была слишком высока. Мы признаем, что не полностью следовали первоначальному протоколу, поскольку HCl и KCl не были добавлены в ходе синтеза. Тем не менее, полученные результаты демонстрируют неуниверсальный характер метода контроля размеров, предложенного в оригинальной статье. Более того, далее мы показали, что, несмотря на то, что и HCl , и KCl могут влиять на размер и выход наночастиц, они не являются необходимыми для получения «искусственной пероксидазы» с высокой каталитической активностью.

Мы предполагаем, что размер наночастиц в большей степени зависит от условий перемешивания и постсинтетической обработки (скорость центрифугирования, продолжительность и интенсивность обработки ультразвуком и т.д.), а не от концентрации солей железа. Эти результаты побудили нас изучить влияние различных факторов, включая pH, температуру, ионную силу и добавление низкомолекулярных лигандов, на размер и полидисперсность нанозимов "искусственной пероксидазы".

Изменение параметров синтеза, таких как температура [373, 400], pH [242, 378], присутствие хелатирующего агента [47, 82, 211], соотношение реагентов [352], добавление органического растворителя [281, 347], позволяет манипулировать размером наночастиц берлинской лазури, полученных традиционным или гидротермальным способом. Мы определили влияние большинства из этих факторов на диаметр и выход нанозимов «искусственная пероксидаза» (Рисунок 7.2).

При повышении температуры с +30 до +60 °C средний диаметр наночастиц увеличивался со 103 до 152 нм (Рисунок 7.2А). Поглощение при 700 нм было на

15% выше для наночастиц берлинской лазури, синтезированных при +30 °С (Рисунок 7.2Г). Увеличение поглощения можно объяснить, как более высоким выходом, так и меньшим средним диаметром [101] полученных наночастиц. Укрупнение наночастиц при более высоких температурах является типичной ситуацией, когда концентрация реагента достаточна как для образования зародышей новых наночастиц, так и для роста частиц, которые сформировались ранее [214].

Добавление лимонной и щавелевой кислот уменьшало как исходную концентрацию, так и скорость образования наночастиц берлинской лазури [280]. Это объясняется взаимодействием молекул кислоты с ионами железа, что затрудняет их реакцию с гексацианоферратом [47]. Уменьшение числа зародышей и замедление роста приводят к получению более крупных наночастиц, однако за счет более низкого выхода (Рисунок 7.2Д, Е). Увеличение концентрации лимонной или щавелевой кислоты приводило к постепенному увеличению диаметра наночастиц (Рисунок 7.2Б, В). Добавление кислот вызвало лишь незначительное изменение рН, поэтому мы предполагаем, что увеличение размера не было вызвано снижением рН. Примечательно, что слишком высокая концентрация карбоновых кислот дает противоположный эффект: наночастицы становятся меньше, а их выход уменьшается. Точка перехода близка к эквимолярной концентрации. Полученные результаты согласуются с предыдущими публикациями [169, 312]. Напротив, Ја с соавт. наблюдали, что незначительный рост наночастиц берлинской лазури сопровождался добавлением чрезмерного количества щавелевой кислоты [151]. Вероятно, причиной такого результата является большее время реакции [82]. Лимонная кислота позволяет регулировать размер наночастиц в более широком диапазоне по сравнению с щавелевой кислотой. Это можно объяснить тем, что она имеет большее сродство к ионам железа (III).

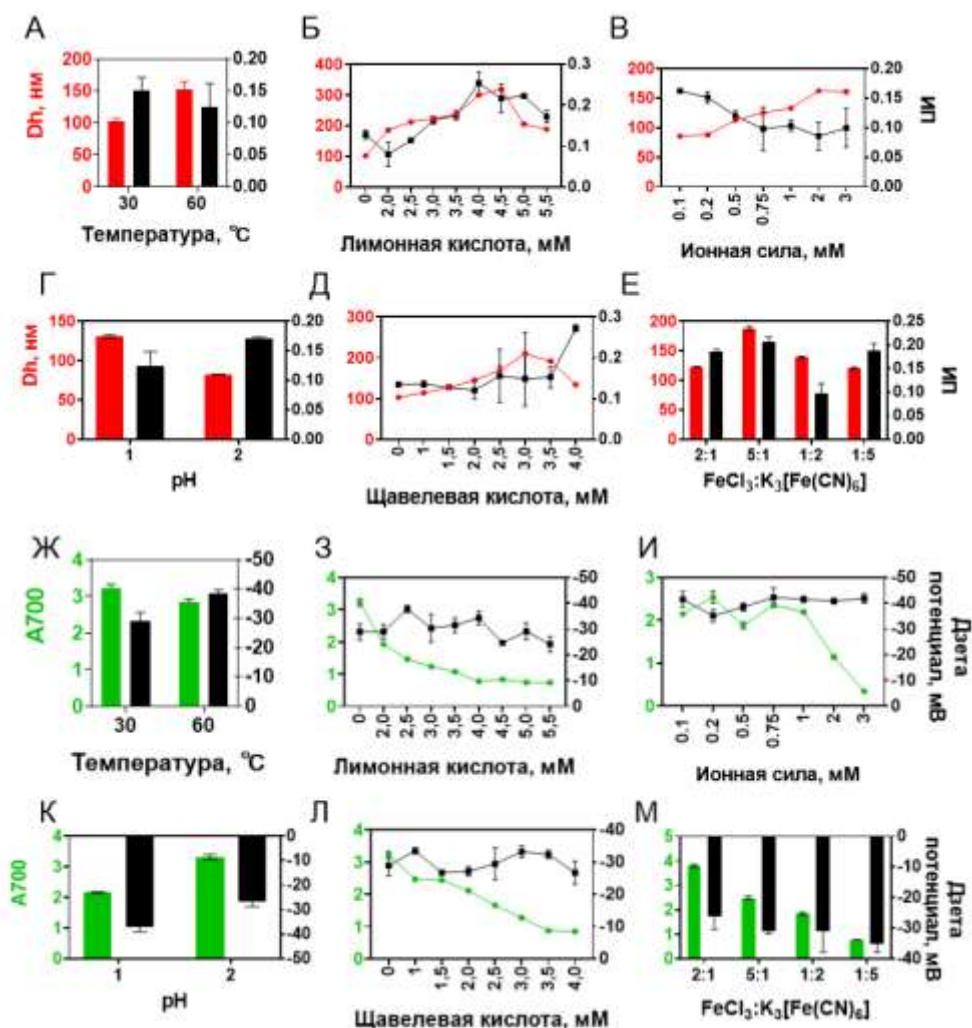


Рисунок 7.2 – Влияние различных факторов: (А, Ж) температура, (Б, З) концентрация лимонной кислоты, (Д, Л) концентрация щавелевой кислоты, (В, И) ионная сила, (Г, К) рН, (Е, М) молярные отношения FeCl₃ и K₃[Fe(CN)₆] на размер (Dh), полидисперсность (ИП), выход (A700) и дзета-потенциал нанозимов «искусственная пероксидаза». n=3, среднее ± стандартное отклонение

рН реакционной смеси составлял 2,8-2,9 и не изменялся в течение 150 мин синтеза в стандартных условиях (3,125 мМ FeCl₃ и K₃[Fe(CN)₆], 22 мМ H₂O₂, +30°C). Образование частиц не наблюдалось, если рН реакционной смеси доводили до 4. Снижение рН до 2 практически не повлияло на размер и выход наночастиц (сравните Рисунок 7.2А и Рисунок 7.23), тогда как при рН 1 образовывались более крупные наночастицы (130 против 82 нм).

Ионная сила реакционной смеси во время синтеза в стандартных условиях составляла 37,5 мМ. Увеличение ионной силы привело к росту наночастиц с 86 нм при 0,1 М до 161 нм при 3 М (Рисунок 7.2И). Влияние ионной силы на дзета-потенциал и индекс полидисперсности было незначительным. Заметное снижение выхода наночастиц (A_{700}) наблюдалось при концентрациях KCl выше 1 М (Рисунок 7.2К).

Далее, мы исследовали влияние четырех различных молярных соотношений $FeCl_3$ и $K_3[Fe(CN)_6]$ (5:1, 2:1, 1:5, 1:2) на характеристики наночастиц берлинской лазури (Рисунок 7.2Л, М). Добавление избытка $FeCl_3$ увеличивало размер наночастиц и их полидисперсность, в то время как избыток $K_3[Fe(CN)_6]$ не оказывал существенного влияния.

Взаимосвязи между процессом образования кристаллов и условиями кристаллизации, такими как pH или ионная сила, довольно сложны и зависят от множества параметров, например, типа катионов и анионов [293, 294]. По этой причине мы не можем представить полное объяснение наблюдаемых закономерностей.

Основываясь на полученных результатах, мы решили использовать лимонную и щавелевую кислоты для получения нанозимов «искусственная пероксидаза» диаметром от 100 до 300 нм. Преимуществом добавления карбоновых кислот является возможность получения наночастиц с широким диапазоном размеров и достаточно низкой полидисперсностью.

Пять типов наночастиц были получены с использованием восстановительного способа («искусственная пероксидаза»), а еще три типа наночастиц были синтезированы традиционным способом. Масштабируемость и хорошая воспроизводимость синтеза наночастиц являются обязательными для их внедрения в практику [52, 213]. В связи с этим, для каждого типа наночастиц были синтезированы 3 отдельные партии (только 2 партии были синтезированы для T/dw/rt). Объем реакционной смеси был увеличен в десять раз по сравнению с предыдущими экспериментами: с 25 до 250 мл.

Основываясь на предыдущих результатах, были выбраны четыре типа условий для синтеза наночастиц диаметром от 100 до 300 нм с помощью восстановительного способа. Для контроля диаметра наночастиц использовали лимонную и щавелевую кислоты. Еще один тип наночастиц был получен восстановительным способом с использованием условий (0,1 М KCl и 0,1 М HCl), предложенных в оригинальной статье Комковой с соавт. [177]. Кроме того, с использованием традиционного способа были синтезированы три типа наночастиц берлинской лазури, их размеры варьировали от 60 до 130 нм. Характеристики и обозначения всех типов наночастиц можно найти в таблице 3.

Получение крупных наночастиц традиционным способом является непростой задачей. Наибольший размер наночастиц, которого мы смогли достичь (120-130 нм), был получен очень медленным добавлением $K_4[Fe(CN)_6]$ к раствору $FeCl_3$ (Рисунок 7.3А). Было важно получить столь большие наночастицы, потому что мы были заинтересованы в сравнении наночастиц одинакового размера, полученных с помощью двух разных способов. К сожалению, нам не удалось синтезировать наночастицы «искусственной пероксидазы» размером менее 90 нм, поэтому партии R и T, а также R2C и T/dw/rt были единственными парами наночастиц, обладающих близкими друг к другу размерами.

Электронная микроскопия показала, что наночастицы «искусственная пероксидаза» имеют неправильную форму и представляют собой довольно неупорядоченные агрегаты более мелких наночастиц. Неправильная форма наночастиц делала невозможным точное измерение их диаметра с помощью ПЭМ. В образце RKN наряду с крупными наночастицами также наблюдались мелкие кубические наночастицы. Эти факторы в совокупности объясняют относительно высокую полидисперсность (нет образцов с ИП ниже 0,1) наночастиц «искусственная пероксидаза».

В целом, размер наночастиц «искусственная пероксидаза» был близок к целевому размеру (полученному в идентичных условиях в реакционном объеме 25 мл). Разница между ожидаемым и полученным размером находилась в диапазоне от -9% до +11%. Следовательно, добавление карбоновых кислот

позволяет надлежащим образом контролировать размер наночастиц, полученных с помощью восстановительного способа. Воспроизводимость синтеза наночастиц была проверена путем оценки коэффициента вариации среднего гидродинамического диаметра от партии к партии. Коэффициент вариации составлял от 0,3 до 2,6% для наночастиц «искусственная пероксидаза», что указывает на хорошую воспроизводимость от партии к партии. Для сравнения, коэффициенты вариации, о которых сообщалось для других наночастиц, составляли 2-5% (золотые наночастицы) [267], 10-42% (наночастицы оксида железа, покрытые декстраном) [121], менее 5% (наночастицы из поли(D,1-лактидо-ко-гликолида)) [118].

Самый высокий выход (Рисунок 7.3В) наблюдалось, когда в реакционной среде не было добавок (R). За один синтез было получено приблизительно 200 мг наночастиц. Эти результаты согласуются с данными о поглощении при 700 нм, полученными в описанных выше экспериментах (Рисунок 7.2А, Г). Как лимонная, так и щавелевая кислота снижают итоговую концентрацию наночастиц. В целом, чем больше диаметр наночастиц, тем ниже их выход. Присутствие KCl и HCl (как в оригинальной статье) привело к двукратному снижению выхода по сравнению с образцом R2C, несмотря на то, что размеры наночастиц были почти одинаковыми.

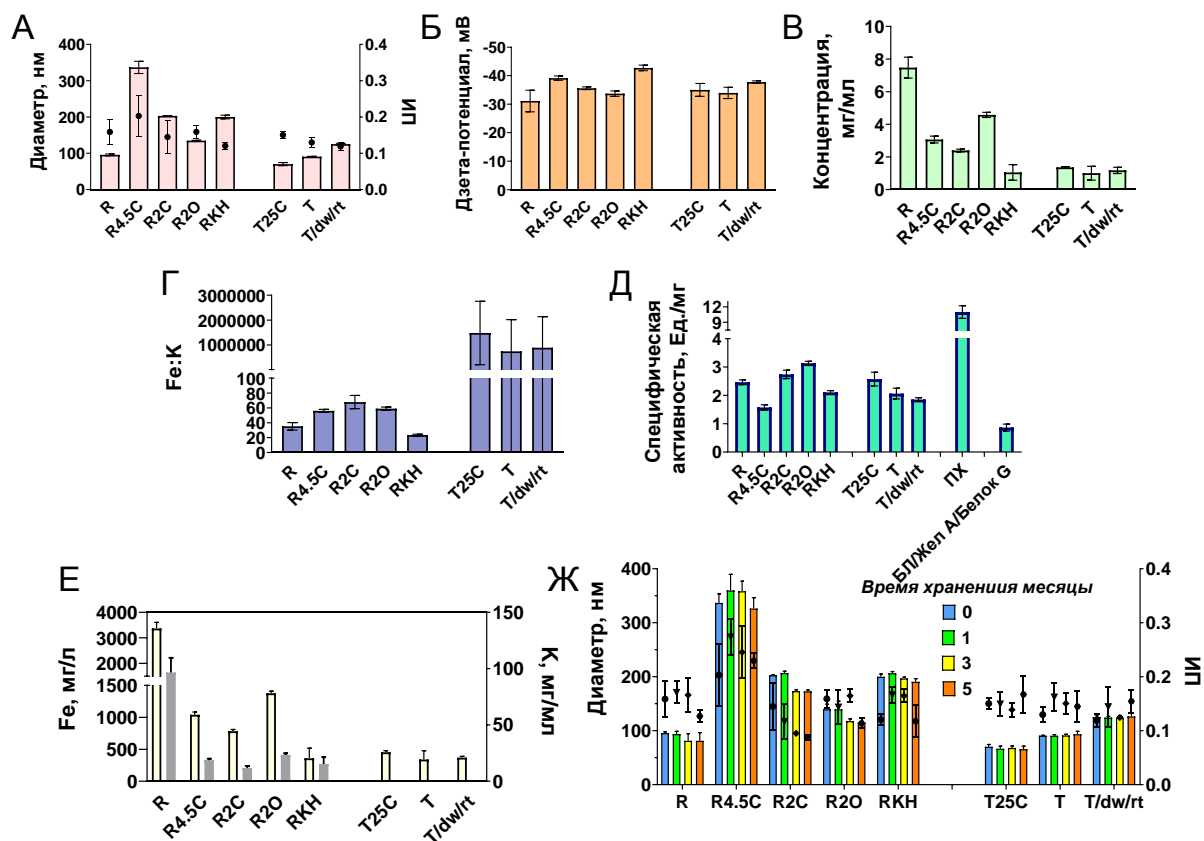


Рисунок 7.3 – Характеристика наночастиц берлинской лазури, синтезированных в 10-кратном масштабе. (А) средний гидродинамический диаметр (Dh; столбцы) и индекс полидисперсности (ИИ); (Б) дзета-потенциал полученных наночастиц; (В) концентрации (сухая масса на единицу объема); (Г) массовое отношение Fe:K; (Д) пероксидазоподобная активность (ПХ – пероксидаза хрена); (Е) концентрация Fe (белые столбцы) и K (серые столбцы); (Ж) размер (Dh; столбцы) и полидисперсность (ИИ) наночастиц после 1, 3 и 5 месяцев хранения при +4 °С. n=3, среднее значение трех отдельных партий ± стандартное отклонение

Концентрацию железа и калия определяли для каждой партии с помощью ИСП-МС. Каталитическую активность наночастиц, синтезированных различными методами, в дальнейшем нормализовали по концентрации железа (см. ниже). В зависимости от концентрации калия можно выделить два типа берлинской лазури: растворимую (содержит ионы калия) и нерастворимую (не содержит ионов калия)

[181]. Нерастворимая берлинская лазурь характеризуется наличием вакансий в узлах кристаллической решетки (на месте $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$), заполненные молекулами воды, которые частично координированы с ионами Fe^{III} . Растворимая берлинская лазурь содержит ионы калия в промежуточных сайтах кубической структуры берлинской лазури. В этом случае количество вакансий зависит от содержания калия [181]. Все наночастицы берлинской лазури, полученные традиционным способом, состояли из нерастворимой берлинской лазури, тогда как нанозимы «искусственная пероксидаза» содержали достаточно большое количество калия. Массовое соотношение Fe:K для них составляло от 17,6 (RKH) до 66,8 (R2C). Наночастицы RKH были более насыщены калием, поскольку они были синтезированы в присутствии 0,1 М KCl. В отличие от работы Doumic с соавт. [67], мы не наблюдали четкой связи между содержанием калия и каталитической активностью нанозимов (Рисунок 7.3Г-Е). Даже если какая-то зависимость существует, в этом исследовании она была скрыта другими факторами, в первую очередь разницей в размерах между наночастицами, полученными в различных условиях.

Наиболее важной особенностью нанозимов «искусственная пероксидаза» является улучшенная пероксидазоподобная активность по сравнению с наночастицами берлинской лазури, синтезированными традиционным способом. Комкова с соавт. [176] рассчитывали каталитическую активность "искусственной пероксидазы", рассматривая одну наночастицу в качестве каталитической единицы. Вопрос измерения каталитической активности нанозимов недавно обсуждался Zandieh и Liu [391, 392]. Они рекомендовали вычислять количество каталитически активных центров, например, поверхностных атомов железа в непористых наночастицах оксида железа, чтобы избежать завышения или недооценки каталитической активности. Однако точное определение количества наночастиц берлинской лазури или поверхностных атомов железа затруднено, поскольку синтезированные наночастицы, несмотря на относительно узкое распределение по размерам, не являются монодисперсными. Кроме того, согласно данным электронной микроскопии, они имеют неправильную форму.

Взаимодействие с субстратом является еще одним фактором, усложняющим количественное определение каталитически активных центров в нанозимах берлинской лазури. Каталитический механизм «искусственной пероксидазы» подразумевает восстановление нанозима до берлинского белого тетраметилбензидином или другим субстратом, за чем следует окисление берлинского белого перекисью водорода [177]. Молекулы субстрата способны проникать внутрь наночастицы, вовлекая внутренние атомы металла в каталитический процесс [176], однако точная оценка доступных металлических центров вряд ли возможна, поскольку зависит от диаметра частиц. Принимая во внимание перечисленные факторы мы выбрали более простой подход: мы рассчитывали каталитическую активность, нормализованную на массу железа (единицы на миллиграмм железа, Ед/мгFe).

Каталитическую активность выражали в единицах удельной активности, т.е. количестве молей субстрата, которые превращаются в продукт одним миллиграммом катализатора за одну минуту. Эта мера активности была выбрана потому, что ее измерение проводится в условиях избытка субстрата, что имитирует условия, наблюдающиеся при проведении колориметрического анализа. Ранее было показано, что нанозимы с повышенной специфической активностью обеспечивали нижний предел обнаружения в колориметрическом иммуноанализе [268]. Процедура определения специфической активности основана на протоколе, предложенном Jiang с соавт. [152], однако состав буфера был предварительно оптимизирован. Пониженная ионная сила реакционного буфера предотвращала агрегацию наночастиц. Концентрация перекиси водорода также была снижена до 100 мМ для достижения лучшей воспроизводимости. В тех же условиях определяли удельную активность пероксидазы хрена. Несомненно, условия эксперимента были неоптимальными для пероксидазы хрена, поскольку при обычном ИФА концентрация перекиси водорода составляет 1-5 мМ. Более высокое содержание H_2O_2 может снизить удельную активность ферментов из-за разрушения гема. Оптимальные условия для нанозимов (состав буфера, ионная сила, рН [332]) также не были оптимизированы, поскольку нашей

основной целью было сравнение нанозимов, синтезированных в разных условиях, а не максимизация их производительности. Вопрос сравнения ферментов и нанозимов является сложным и выходит за рамки данной работы, однако даже в неоптимальных условиях пероксидаза хрена превосходила по активности нанозимы (Рисунок 7.3Д).

Наночастицы берлинской лазури, полученные восстановительным способом («искусственная пероксидаза»), проявляли равную или более высокую каталитическую активность, по сравнению с наночастицами, синтезированными традиционным способом, имеющими аналогичный размер (R против T: $2,46 \pm 0,08$ Ед/мгFe против $2,06 \pm 0,019$ Ед/мгFe, $p = 0,079$, и R2O по сравнению с T/dw/rt: $3,13 \pm 0,07$ Ед/мгFe против $1,85 \pm 0,06$ Ед/мгFe, $p < 0,001$; Рисунок 7.3Г). Более того, каталитическая активность R2C и R2O превышает каталитическую активность T и T/dw/rt, которые имеют гораздо меньшие гидродинамические диаметры. RKN одинаково активен в сравнении T и T /dw/rt, которые почти в два раза меньше. Как правило, наночастицы меньшего размера обладают более высокой каталитической активностью из-за большей удельной площади поверхности [92], однако четкой зависимости между размером, площадью поверхности и пероксидазоподобной активностью нанозимов обнаружено не было. Неожиданно то, что наночастицы с самой высокой каталитической активностью (R2O) имели самую низкую удельную площадь поверхности. Самые крупные наночастицы (R4.5C) обладали самой низкой каталитической активностью, однако самые маленькие (R) не были самыми активными. Наночастицы, синтезированные в присутствии 2 мМ щавелевой кислоты (R2O), показали наилучшие каталитические характеристики.

В целом, наночастицы, синтезированные в присутствии карбоновых кислот, обладали лучшей активностью по сравнению с наночастицами, синтезированными согласно оригинальной методике (RKN). Вероятно, карбоновые кислоты каким-то образом усиливают каталитическую активность наночастиц берлинской лазури. Ранее Feng с соавт. синтезировали наночастицы берлинской лазури с различными размерами и кристалличностью в присутствии

лимонной кислоты путем регулирования режима добавления реагентов [82]. Авторы продемонстрировали, что более аморфные фенгнаночастицы обладают лучшей пероксидазоподобной и каталазоподобной активностью, что также было показано и для других наноматериалов [380]. Однако в работе Feng с соавт. наиболее активные наночастицы были одновременно и самыми маленькими, что не позволяет утверждать с полной уверенностью, связана ли их активность с малыми размерами или структурными дефектами. В нашем исследовании высокоактивные наночастицы, полученные в присутствии карбоновых кислот (R2C и R2O), были больше или близки по размеру по сравнению с наночастицами, синтезированными в отсутствие кислот. В связи с этим мы предположили, что они имеют более аморфную структуру. Это предположение было основано на том, что в предыдущих исследованиях добавление цитрата в процессе синтеза приводило к появлению внутренних и внешних дефектов в наночастицах золота [348] и аналогах берлинской лазури [373, 400]. С другой стороны, лимонная кислота способствовала получению наночастиц берлинской лазури с безупречной кристаллической решеткой [281]. Очевидно, морфология наночастиц берлинской лазури зависит как от концентрации хелатирующего агента, так и от длительности синтеза [82, 296]. Синтез в присутствии перекиси водорода также снижал кристалличность аналогов берлинской лазури [171]. Действительно, результаты дифракции рентгеновского излучения, полученные для синтезированных наночастиц, свидетельствовали в основном об аморфной структуре нанозимов «искусственная пероксидаза». Однако для разных типов «искусственной пероксидазы» не было выявлено существенных различий в кристаллической структуре.

Поверхностный заряд оказывает влияние на каталитическую активность нанозимов, поскольку он обуславливает электростатическое взаимодействие с молекулами субстрата [387]. Дзета-потенциал всех наночастиц берлинской лазури составлял менее -30 мВ (Рисунок 7.3Б), что способствует адсорбции положительно заряженных молекул ТМБ. Мы не наблюдали никакой связи между дзета-потенциалом и удельной активностью нанозимов.

В целом, наши результаты показывают, что нанозимы «искусственная пероксидаза» имеют аморфную структуру, способствующую высокой каталитической активности. Причины, лежащие в основе разницы в каталитической активности между нанозимами "искусственной пероксидазы", синтезированными в различных условиях, и наночастицами, полученными традиционным способом, неясны и требуют более детального изучения.

С практической точки зрения приготовления диагностических реагентов из нанозимов, препараты наночастиц удобно хранить в форме, которая облегчает синтез их конъюгатов с аффинными молекулами. С нашей точки зрения, концентрированные водные суспензии наночастиц берлинской лазури являются наиболее подходящей формой для длительного хранения. Комкова с соавт. [176] предложили хранить «искусственную пероксидазу» в виде порошка или в водном растворе 0,1 М КСl и 0,1 М НСl для предотвращения гидролиза. Последний подход требует предварительного удаления кислоты и соли перед началом функционализации. Это может быть непросто, поскольку для получения наночастиц меньшего размера (менее 100 нм) требуется очень высокая скорость центрифугирования, в то время как другие методы обессоливания, такие как диализ или гель-фильтрация, требуют много времени. Из сухих частиц легко приготовить суспензию с точной концентрацией наночастиц, однако высушивание зачастую влияет на размер наночастиц, в связи с чем может потребоваться дополнительная обработка ультразвуком. В нашей работе наночастицы берлинской лазури мы хранили в деионизированной воде в течение 5 месяцев. Было показано, что размер наночастиц не менялся в течение трех месяцев для всех типов синтезов (Рисунок 7.3Ж). После трех месяцев хранения в некоторых партиях наблюдалась агрегация. Агрегаты удаляли с помощью ультразвуковой обработки наночастиц и низкоскоростного центрифугирования. Тем не менее, эти дополнительные манипуляции требуют много времени, поэтому срок хранения суспензий нанозимов не должен превышать 3 месяцев. Следует отметить, что мы не изучали стабильность высушенных или лиофилизированных наночастиц.

Таким образом, нами был разработан воспроизводимый способ получения наночастиц берлинской лазури, обладающих высокой пероксидазоподобной активностью. Задачей дальнейших исследований была разработка на их основе диагностических реагентов для колориметрического иммуноанализа.

7.2 – Применение наночастиц берлинской лазури, покрытых желатином, в иммуноанализе противостолбнячных антител и ПСА

Мы функционализировали наночастицы «искусственной пероксидазы» белком G, моноклональными антителами против простатспецифического антигена и БСА как путем ковалентного присоединения, так и адсорбции.

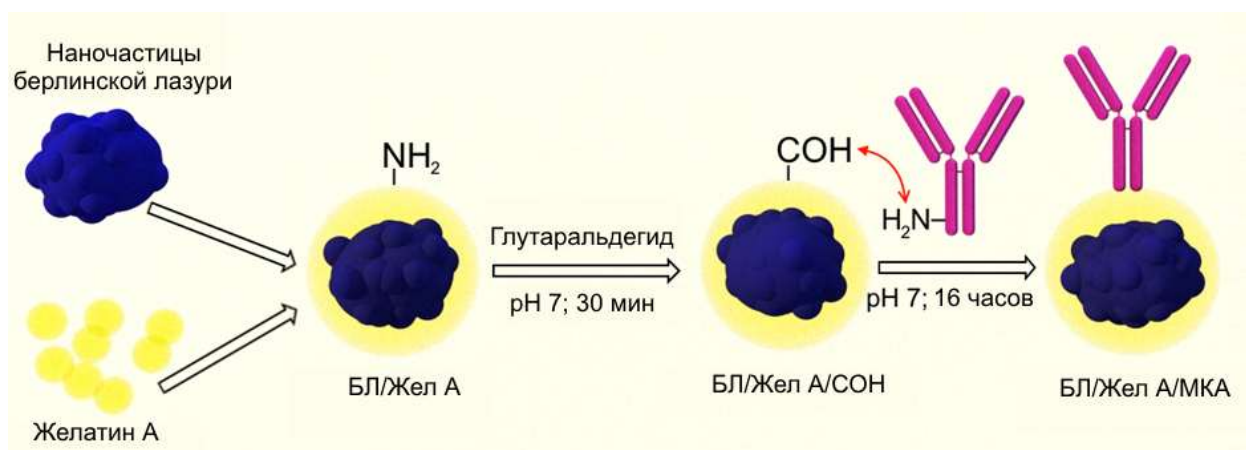


Рисунок 7.4 – Конъюгирование покрытых желатином наночастиц берлинской лазури с моноклональными антителами. Аминогруппы желатина были сшиты глутаровым альдегидом, после чего аминогруппы антител реагировали с карбонильными группами на поверхности наночастиц.

В ходе ковалентной пришивки наночастицы покрывали желатином А, затем желатиновый слой сшивали глутаровым альдегидом. Первичные амины белка G реагировали со свободными альдегидными группами (Рисунок 7.4). Желатиновая оболочка была выбрана по нескольким причинам. Во-первых, желатин обеспечивает хорошую коллоидную стабильность в широком диапазоне значений pH, включая его низкие значения [90], что важно, поскольку гидролиз берлинской

лазури происходит при нейтральном и щелочном рН [157]. 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 [239]. 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).

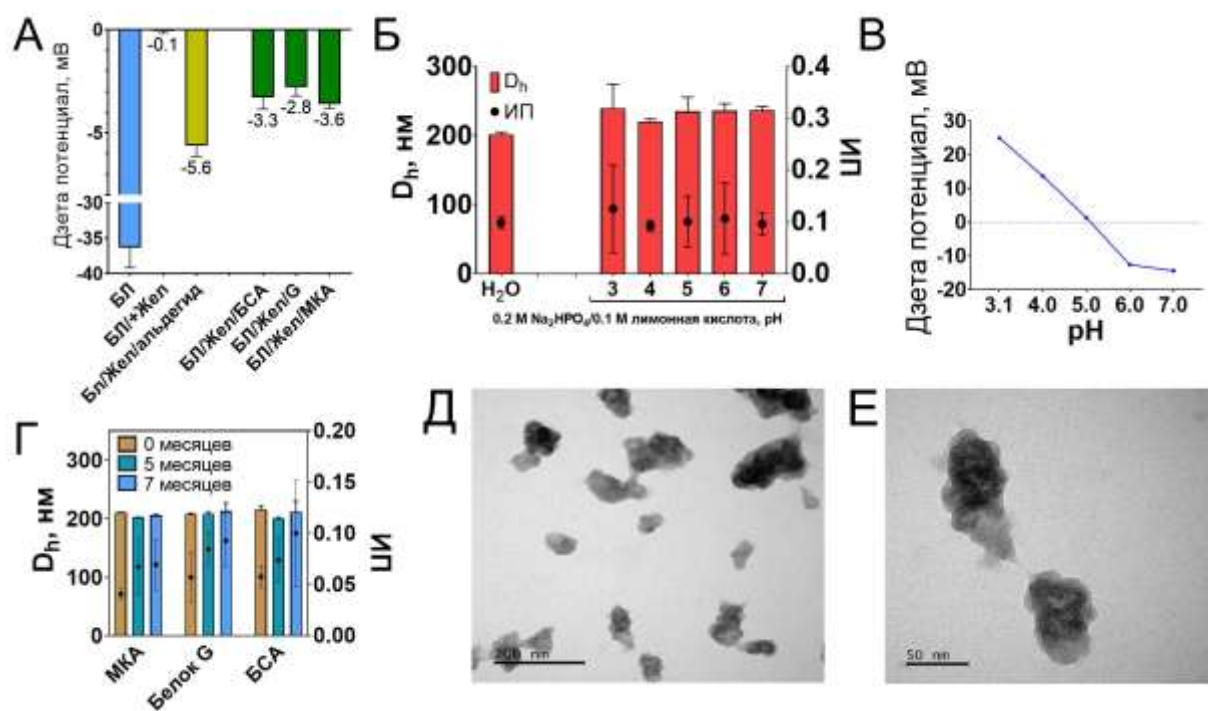


Рисунок 7.5 – А – изменение дзета-потенциала наночастиц в процессе конъюгирования. Б - коллоидная стабильность БЛ/Жел А/белок G в воде и буфере Макильвейна с рН 3-8 (инкубация 60 мин). В - дзета-потенциал БЛ/Жел А/белок G в буфере 5 мМ Na₂HPO₄/лимонная кислота, рН 3,1-7. Г - коллоидная стабильность БЛ/Жел А/МКА, БЛ/Жел А/белок G и БЛ/Жел А/БСА при длительном хранении в воде. (Е, F) - ПЭМ-изображения БЛ/Жел

А/МКА. Линейка: Д - 200 нм, Е - 50 нм. n=3, среднее ± стандартное отклонение

Успешная функционализация была подтверждена измерением коллоидной стабильности, дзета-потенциала и функциональной активности наночастиц. Изменение дзета-потенциала отражает изменение структуры поверхности наночастиц (Рисунок 7.5А). 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 делали 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 (Рисунок 7.5Б). Коллоидная стабильность наночастиц не зависела от величины дзета-потенциала, и, по-видимому, обеспечивалась стерическим отталкиванием или другими силами (Рисунок 7.5В). 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 (Рисунок 7.5Г, Д). 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 [20].

Как упоминалось ранее, гидролиз берлинской лазури происходит при нейтральном и кислом рН. Снижение А700 наблюдалось, когда РВ/Гель А/Белок хранили в течение 24 ч в различных буферных растворах с рН от 2 до 8. Снижение А700 было более заметным при рН 6-8. В некоторых образцах это можно объяснить агрегацией наночастиц, но в большинстве из них размер

наночастиц изменился незначительно. И наоборот, в деионизированной воде снижение A_{700} не превысило 15% за 7 месяцев. Таким образом, функционализированные нанозимы следует хранить в деионизированной воде и разбавлять в буфере для анализа (например, ТРИС, ГЕПЕС или фосфат) непосредственно перед его постановкой. В этом случае эффект гидролиза будет незначительным.

Помимо ковалентной конъюгации, наночастицы "искусственной пероксидазы" были нековалентно функционализированы белком G и БСА (отрицательный контроль). Для этого наночастицы инкубировали с аффинными молекулами с последующим блокированием незанятых участков избыточным количеством желатина А. Соотношение антител к наночастицам, состав буфера и процедуры промывки были аналогичны ковалентной функционализации. В ходе функционализации наночастицы агрегировали, а в анализе генерировали высокий неспецифический сигнал, поэтому мы признали их непригодными.

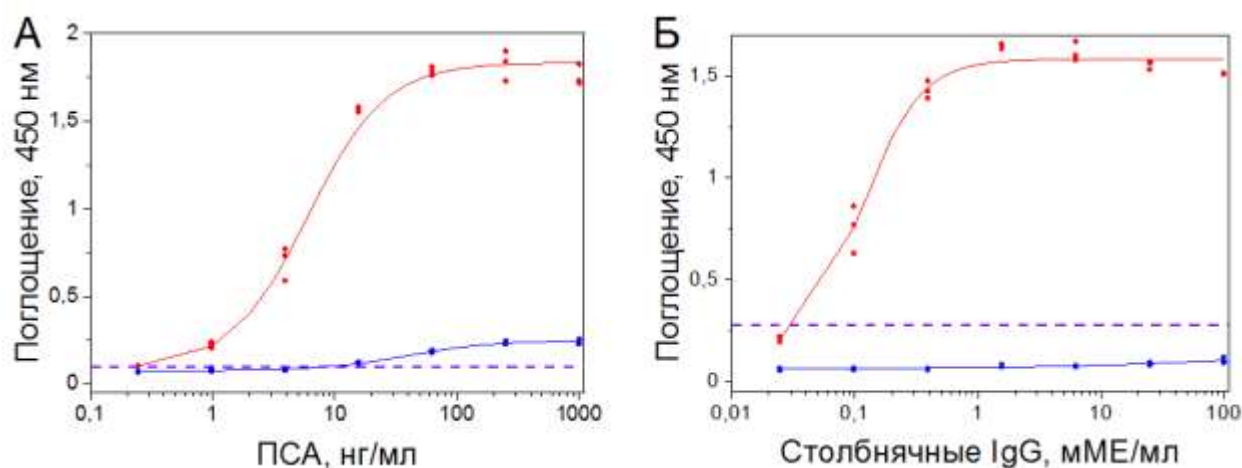


Рисунок 7.6 – Колориметрический анализ ПСА (А) и антистолбнячных IgG (Б). Красные линии - калибровочные кривые ПСА и противостолбнячных IgG. Синие линии - кривые доза-реакция, полученные с использованием контрольного конъюгата БЛ/Жел А/БСА. Фиолетовая пунктирная линия показывает значение оптической плотности равное среднему значению поглощения нулевого калибратора + 3 стандартных отклонения. $n=3$.

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 (Рисунок 7.6). 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 от 0,1–0,2 до более чем 20 нг/мл [71], 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) [385]. 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.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ,
ИЗЛОЖЕННЫМ В 3 ГЛАВЕ**

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в
международных базах данных WoS, Scopus,*

1. Khramtsov, P. 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. – P. 120422.

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

3. Khramtsov P. 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. – P. 1630.

4. Khramtsov P. 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. – P. 29.

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 применения 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 сказанное объясняет столь существенный объем исследований, который был посвящен изучению структурно-морфологических характеристик синтезируемых материалов и оптимизации синтетических процессов, а также детальное описание этого в представленной диссертационной работе.

Разработку диагностических реагентов для твердофазного ЯМР-иммуноанализа мы проводили в сотрудничестве с лабораторией прикладного магнетизма института физики металлов им. М.Н. Михеева УрО РАН. Поскольку примеров твердофазных ЯМР-анализов на момент начала работы не было опубликовано, мы, разумеется, не могли предположить насколько этот анализ будет конкурентным в сравнении с коммерческими аналогами, прежде всего иммуноферментным анализом. В ходе диссертационного исследования нам удалось разработать диагностикумы, представляющие собой магнитные нанокластеры, т.е. наночастицы, распределенные внутри белковой капсулы. Мы обнаружили, что тип белкового покрытия существенно влияет на свойства диагностических реагентов, определяя границы условий их применения. Так, желатиновое покрытие позволяет наночастицам сохранять коллоидную стабильность в широком диапазоне рН и ионной силы. Это является ценным свойством, поскольку позволяет использовать все многообразие способов химической модификации наночастиц моноклональными антителами и другими биомолекулами. Альбуминовое и казеиновое покрытия позволяют наночастицам сохранять стабильность в сыворотке и плазме крови, т.е. делает их подходящими для использования в гомогенных иммуноанализах. Ковалентно сшитые альбуминовые и казеиновые оболочки менее чувствительны к протеолизу, что увеличивает стабильность иммунореагентов к микробной контаминации. Кроме того, эти белковые покрытия позволяли достичь более высокой чувствительности в ЯМР-иммуноанализах, по всей видимости за счет большего количества ковалентно присоединенных распознающих молекул. Наблюдаемые закономерности были подтверждены в ходе исследований, посвященных синтезу альбуминовых и желатиновых наночастиц методом десольватации. Желатиновое покрытие при поперечной сшивке глутаровым альдегидом является более проницаемым для малых молекул (например, красителей). В связи с этим, такое покрытие более эффективно для модификации наночастиц, обладающих каталитической активностью, поскольку обеспечивает лучшую диффузию молекул субстратов к поверхности инкапсулированных нанозимов. В случае

альбумина проницаемость белковой оболочки можно увеличить за счет использования температурной сшивки. Мы установили, что в этом процессе ключевую роль играет образование дисульфидных связей между соседними молекулами белка на поверхности частиц. Образующаяся белковая капсула достаточно стабильна, но в то же время хорошо проницаема для малых молекул. Недостатком такой оболочки является меньшая коллоидная стабильность наночастиц, в частности чувствительность к присутствию высоких концентраций солей, а также чувствительность к присутствию протеолитических ферментов.

Суммированная выше информация о функциональных особенностях белковых оболочек различного типа является одним из ключевых результатов нашего исследования.

Возвращаясь к магнитным диагностикумам, отметим, что мы показали их применимость в твердофазных планшетных ЯМР-иммуноанализах [165] и ЯМР-анализах на нитроцеллюлозных тест-полосках [167]. В связи с этим, мы можем оценить эффективность диагностических реагентов на основе магнитных наночастиц, покрытых белками. Используя их, 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.

Если говорить о наночастицах с белковым покрытием, то ранее в нашей лаборатории уже использовали альбумин для стабилизации наночастиц, предназначенных для использования в иммуноанализе. Более того, стабилизация нанодиагностикумов белками является достаточно обычным подходом. Одной из особенностей нашего исследования стало то, что для стабилизации наночастиц мы использовали метод десольватации. По сути, мы синтезировали белковые наночастицы, внутрь которых в ходе синтеза инкапсулировали репортерные молекулы и наночастицы. Десольватация является широко используемым методом получения экспериментальных терапевтических средств, но в

иммунодиагностике она практически не используется. Мы показали, что инкапсулирование катализаторов внутри белковых молекул является эффективным способом синтеза пероксидазоподобных меток для колориметрического анализа. Даже синтез, проведенный в минимальном масштабе на лабораторном столе дает возможность получить количество диагностикума, достаточное для более чем 10000 отдельных анализов (при рабочей концентрации наночастиц 0,1 мг/мл). Процесс синтеза очень прост, не требует дорогостоящих реагентов и занимает несколько часов.

Отметим, что в ходе выполнения исследования мы достигли еще некоторых технологически значимых результатов. Нами был разработан упрощенный способ синтеза желатиновых наночастиц, который позволяет использовать в качестве прекурсора желатин любого типа, а также инкапсулировать внутри наночастиц репортерные молекулы. Метод основан на одномоментном добавлении плохого растворителя к водному раствору желатина без перемешивания. Преимуществами этого метода синтеза является универсальность, простота, высокие выходы и возможность регулировать размеры наночастиц. В диссертации мы представили результаты синтеза желатиновых наночастиц, нагруженных флуоресцентными комплексами европия, однако помимо этого нами были получены препараты желатиновых наночастиц, содержащих наночастицы берлинской лазури и магнитные наночастицы. Полученные таким образом наноконструкты могут быть использованы в качестве меток в иммуноанализах различного типа. Помимо разработки и оптимизации новых способов синтеза реагентов на основе белковых наночастиц, мы совершенствовали методы контроля их качества. В частности, мы провели сравнительное исследование методов измерения концентраций наночастиц и сформулировали практические рекомендации, позволяющие снизить погрешности этих измерений.

Существенное внимание в нашей работе было уделено созданию каталитических наноразмерных меток для колориметрических иммуноанализов. В настоящее время существенное количество усилий направлено на замену ферментов их искусственными аналогами. Мы синтезировали белковые

наночастицы, содержащие в качестве пероксидазоподобных меток гемин или берлинскую лазурь. Наночастицы были конъюгированы с различными распознающими молекулами: антителами, стрептавидином, белком G стрептококков. Все полученные таким образом реагенты показали потенциальную применимость в иммуноанализе, однако наночастицы берлинской лазури продемонстрировали более впечатляющие результаты. Они обеспечивали более низкие пределы детекции аналитов и более высокие значения оптической плотности. Если проводить сравнение с коммерческими ИФА-наборами, то можно заключить, что диагностикумы на основе берлинской лазури позволяют достичь сравнимых показателей (предел детекции, диапазон измерения). Нанозимы берлинской лазури могут конкурировать с пероксидазой хрена, и даже имеют немалые преимущества в ряде применений, требующих устойчивости к физико-химическим воздействиям, например, при создании иммунохроматографических тестов, где преимуществом нанозимов является их окрашивание в яркий синий цвет и возможность дополнительного каталитического усиления сигнала. Уже сейчас пероксидазоподобные свойства берлинской лазури успешно используются при создании электрохимических сенсоров, в том числе нательных сенсоров, позволяющих осуществлять мониторинг состояния организма человека в реальном времени [178].

Ранее мы уже упоминали, что достижение более низких пределов детекции является одной из задач в исследованиях, посвященных применению нанозимов в иммуноанализе. Есть множество способов решения этой задачи: синтез более каталитически активных нанозимов, регуляция их формы и размеров, применение различных покрытий, допирование и т.д [15]. Мы добавили в этот арсенал еще один способ, а именно оптимизацию субстратного буфера. Мы провели анализ литературы за 2021-2022 гг. и установили, что в подавляющем большинстве работ, посвященных нанозимам для приготовления субстрата используется 0,2 М натрий-ацетатный буфер, pH 4-5. Тестирование различных субстратных растворов показало, что для берлинской лазури такой буфер не является оптимальным, а использование цитрат-аммониевого буфера позволяет увеличивать оптический

сигнал более чем в три раза. Скрининг субстратных буферов является простым и дешевым способом увеличения нижнего предела детекции и достижения более высокого сигнала.

Перспективы дальнейшей разработки темы видятся нам 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, металлсодержащих 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, глutarальдегидом, 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 СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|--------|---|
| Би-БСА | – биотинилированный бычий сывороточный альбумин |
| БСА | – бычий сывороточный альбумин |
| БХК | – бицинхониновая кислота |
| ДМСО | – диметилсульфоксид |
| ДРС | – динамическое светорассеяние |
| ЗФР | – забуференный фосфатами физраствор |
| ЗФРТ | – забуференный фосфатами физраствор с твином-20 |
| ИП | – индекс полидисперсности |
| ИФА | – иммуноферментный анализ |
| ИХА | – иммунохроматография |
| КВ | – коэффициент вариации |
| МЕ | – 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 |

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Губин С. П. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства / С. П. Губин, Ю.А. Кокшаров, Г.Б. Хомутов [и др.] // Успехи химии. – 2005. – №. 6. – С. 539-574.
2. Куликов К.Г. Определение размеров коллоидных частиц при помощи метода динамического рассеяния света / К.Г. Куликов, Т.В. Кошлан // Журнал технической физики – 2015. – № 12. – С. 26-32.
3. Abdellatif, A.A.H. Nano-scale delivery: A comprehensive review of nano-structured devices, preparative techniques, site-specificity designs, biomedical applications, commercial products, and references to safety, cellular uptake, and organ toxicity / A.A.H. Abdellatif, H.A. Mohammed, R.A. Khan [et al.] // Nanotechnology Reviews - 2021. – № 1. – С. 1493-1559.
4. Alcantara, D. Iron oxide nanoparticles as magnetic relaxation switching (MRSw) sensors: Current applications in nanomedicine / D. Alcantara, S. Lopez, M.L Garcia-Martin [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine - 2016. – № 12. – С. 1253-1262.
5. Alipal, J. A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialization / J. Alipal, N.A.S. Mohd Pu'ad, T.C. Lee [et al.] // Materials Today: Proceedings - 2021. – № 42. – С. 240-250.
6. Alqahtani, M.S. Food Protein Based Core-Shell Nanocarriers for Oral Drug Delivery: Effect of Shell Composition on in Vitro and in Vivo Functional Performance of Zein Nanocarriers / M.S. Alqahtani, M.S. Islam, S. Podaralla [et al.] // Mol. Pharm. – 2017. – № 14. – С. 757–769.
7. Altintas, I. Nanobody-albumin nanoparticles (NANAPs) for the delivery of a multikinase inhibitor 17864 to EGFR overexpressing tumor cells / I. Altintas, R. Heukers, R. van der Meel [et al.] // J. Control. Release - 2013. – № 165. – С. 110-118.

8. An, F.-F. Strategies for preparing albumin-based nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery / F.-F. An, X.-H. Zhang // *Theranostics* - 2017. – № 7. – C. 3667-3689.
9. Anders J.C. Using amino acid analysis to determine absorptivity constants: A validation case study using bovine serum albumin / J.C. Anders, B.F. Parten, G.E. Petrie [et al.] // *BioPharm Int.* – 2003. – № 16. – C. 30-37.
10. Arroyo-Maya I. α -Lactalbumin nanoparticles prepared by desolvation and cross-linking: Structure and stability of the assembled protein / I. J. Arroyo-Maya, H. Hernández-Sánchez, E. Jimenez-Cruz [et al.] // *Biophys. Chem.* – 2014. – № 193-194. – C. 27-34.
11. Asghar, S. A facile approach for crosslinker free nano self assembly of protein for anti-tumor drug delivery: Factors' optimization, characterization and in vitro evaluation / S. Asghar, J.M.M. Salmani, W. Hassan [et al.] // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2014. – № 63. – C. 53-62.
12. Ashraf, S. Protein-mediated synthesis, pH-induced reversible aggregation, toxicity and cellular interaction of silver nanoparticles / S. Ashraf, A.Z. Abbasi, C. Pfeiffer [et al.] // *Colloids Surf. B* - 2013. – № 102. – C. 511-518.
13. Bactrian camel serum albumins-based nanocomposite as versatile biocargo for drug delivery, biocatalysis and detection of hydrogen peroxide / X. Yu, Z. Xu, X. Wang [et al.] // *Materials Science and Engineering: C.* – 2020. – №. 109. – C. 110627.
14. Bai, Y. A rapid method for the detection of foodborne pathogens by extraction of a trace amount of DNA from raw milk based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles and polymerase chain reaction. / Y. Bai, M. Song, Y. Cui [et al.] // *Anal. Chim. Acta* - 2013. – № 787. – C. 93-101.
15. Ballesteros, C.A. Recent trends in nanozymes design: from materials and structures to environmental applications / C.A. Ballesteros, L.A. Mercante, A.D. Alvarenga [et al.] // *Materials Chemistry Frontiers* - 2021. – № 5. – C. 7419-7451.
16. Barhoum, A. Review on Natural, Incidental, Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market,

Toxicities, Risks, and Regulations / A. Barhoum, M.L. García-Betancourt, J. Jeevanandam [et al.] // *Nanomaterials* – 2022. – № 12. – C. 177.

17. Belinskaia, D.A. Serum Albumin in Health and Disease: Esterase, Antioxidant, Transporting and Signaling Properties / D.A. Belinskaia, P.A. Voronina, V.I. Shmurak [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences* - 2021. – № 19. – C. 10318.

18. Belliveau, N.M. Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA / N.M. Belliveau, J. Huft, P. Lin [et al.] // *Molecular Therapy. Nucleic Acids* - 2012. – № 8. – C. e37.

19. Bello, A.B. Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: From cell culture to medical applications / A.B. Bello, D. Kim, D. Kim [et al.] // *Tissue Eng. Part B* - 2020. – № 26. – C. 164-180.

20. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? / S. Bhattacharjee // *Journal of Controlled Release* - 2016. – № 235. – C. 337-351.

21. Bhushan, B. Antioxidant nanozyme: A facile synthesis and evaluation of the reactive oxygen species scavenging potential of nanoceria encapsulated albumin nanoparticles / B. Bhushan, P. Gopinath // *J. Mater. Chem. B* - 2015. – № 3. – C. 4843-4852.

22. Bhushan, B. Impact of albumin based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery / B. Bhushan, V. Khanadeev, B. Khlebtsov [et al.] // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2017. – № 246. – C. 13-39.

23. Biehl, P. Synthesis, characterization, and applications of magnetic nanoparticles featuring polyzwitterionic coatings / P. Biehl, M. von der Lüche, S. Dutz [et al.] // *Polymers*. – 2018. – № 1. – C. 91.

24. Bigi, A. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking / A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta [et al.] // *Biomaterials* - 2001. – № 22. – C. 763-768.

25. Bobo, D. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date / D. Bobo, K.J. Robinson, J. Islam [et al.] // *Pharmaceutical research* - 2016. – № 10. – C. 2373-2387.

26. Bodner, J. Evaluation of the CERTUS environmental listeria species detection kit for the detection of listeria species on environmental surfaces: AOAC performance tested method SM 101802 / J. Bodner, M. Toribo, E. Carruthers [et al.] // *Journal of AOAC International* - 2021. – № 3. – C. 833-842.
27. Bormotova, E.A. Expression of New Recombinant IgG-Binding Polypeptides and Analysis of Their Capacity to Bind Human IgG // E.A. Bormotova, T.V. Gupalova // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – № 165. – C. 373-377.
28. Borzova, V.A. Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin / V.A. Borzova, K.A. Markossian, N.A. Chebotareva [et al.] // *PLoS ONE* - 2016. – № 4. – C. e0153495.
29. Bradley, R.L. Moisture and Total Solids Analysis / R.L. Bradley // *Food Analysis. Food Science Texts Series*. – Boston. – 2010. – C. 85-104.
30. Broyard, C. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge / C. Broyard, F. Gaucheron // *Dairy Science and Technology* - 2015. – № 95. – C. 831-862.
31. Bu, T. Dual recognition strategy and magnetic enrichment based lateral flow assay toward *Salmonella enteritidis* detection / T. Bu, X. Yao, L. Huang [et al.] // *Talanta* - 2020. – № 206. – C. 120204.
32. Bujacz A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin / A. Bujacz // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* - 2012. – № 68. – C. 1278-1289.
33. Cai, B. Autofluorescent gelatin nanoparticles as imaging probes to monitor matrix metalloproteinase metabolism of cancer cells / B. Cai, L. Rao, X. Ji [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. A*. – 2016. – № 104. – C. 2854-2860.
34. Canpean, V. Enhanced thermal stability of gelatin coated gold nanorods in water solution / V. Canpean, A.M. Gabudean, S. Astilean // *Colloids Surf. A* - 2013. – № 433. – C. 9-13.

35. Cao, X. Impact of protein-nanoparticle interactions on gastrointestinal fate of ingested nanoparticles: Not just simple protein corona effects / X. Cao, Y. Han, F. Li [et al.] // *NanoImpact* - 2019. – № 13. – C. 37-43.
36. Capomaccio, R. Gold nanoparticles increases UV and thermal stability of human serum albumin / R. Capomaccio, I. Osório, I. Ojea-Jimenez [et al.] // *Biointerphases* - 2016. – № 11. – C. 04B310.
37. Caputo, F. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity / F. Caputo, J. Clogston, L. Calzolari [et al.] // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* - 2019. – № 299. – C. 31-43.
38. Chakraborty, I. Protein-Induced Shape Control of Noble Metal Nanoparticles / I. Chakraborty, W. J. Parak // *Advanced Materials Interfaces* - 2019. – № 1801407.
39. Chanana, M. Physicochemical properties of protein-coated gold nanoparticles in biological fluids and cells before and after proteolytic digestion / M. Chanana, P. Rivera-gil, M.A. Correa-Duarte [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2013. – № 52. – C. 4179-4183.
40. Chang, T.Z. Effects of ovalbumin protein nanoparticle vaccine size and coating on dendritic cell processing / T.Z. Chang, S.S. Stadmiller, E. Staskevicius [et al.] // *Biomater. Sci.* – 2017. – № 5. – C. 223-233.
41. Chang, T.Z. H7 Hemagglutinin nanoparticles retain immunogenicity after >3 months of 25°C storage / T.Z. Chang, L. Deng, B.Z. Wang [et al.] // *PLOS ONE* - 2018. – № 13. – C. e0202300.
42. Chattopadhyay, K. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: Effect of temperature and pH / K. Chattopadhyay, S. Mazumdar // *Biochemistry* - 2000. – № 1. – C. 263-270.
43. Chen, D. The preparation and characterization of folate-conjugated human serum albumin magnetic cisplatin nanoparticles / D. Chen, Q. Tang, W. Xue [et al.] // *J. Biomed. Res.* – 2010. – № 24. – C. 26-32.

44. Chen, K. Photophysical evaluation of mTHPC-loaded HSA nanoparticles as novel PDT delivery systems / K. Chen, M. Wacker, S. Hackbarth [et al.] // *J.Photochem. Photobiol. B.* – 2010. – № 101. – C. 340-347.

45. Chen, X. Tailoring noble metal nanoparticle designs to enable sensitive lateral flow immunoassay / X. Chen, L. Ding, X. Huang [et al.] // *Theranostics* - 2022. – № 12. – C. 574.

46. Chi, L. In situ amplified QCM immunoassay for carcinoembryonic antigen with colorectal cancer using horseradish peroxidase nanospheres and enzymatic biocatalytic precipitation / L. Chi, C. Xu, S. Li [et al.] // *Analyst* - 2020. – № 18. – C. 6111-6118.

47. Chiang, Y.-D. Rational Design and Synthesis of Cyano-Bridged Coordination Polymers with Precise Control of Particle Size from 20 to 500 nm / Y.-D. Chiang, M. Hu, Y. Kamachi [et al.] // *Eur. J. Inorg. Chem.* – 2013. – № 18. – C. 3141-3145.

48. Cho, H. Emerging Albumin-Binding Anticancer Drugs for Tumor-Targeted Drug Delivery: Current Understandings and Clinical Translation / H. Cho, S.I. Jeon, C.H. Ahn [et al.] // *Pharmaceutics* - 2022. – № 14. – C. 728.

49. Clark, C.C. A mechanically robust thixotropic collagen and hyaluronic acid bioink supplemented with gelatin nanoparticles / C.C. Clark, J. Aleman, L. Mutkus [et al.] // *Bioprinting* - 2019. – № 16. – C. e00058.

50. Clogston, J. D. Sizing up the Next Generation of Nanomedicines / J. D. Clogston, V. A. Hackley, A. Prina-Mello [et al.] // *Pharmaceutical research* - 2019. – № 37. – C. 6.

51. Coester, C.J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake / C.J. Coester, K. Langer, H. von Briesen [et al.] // *J Microencapsul.* – 2000. – № 17. – C. 187-193.

52. Colby, A.H. Pilot-scale production of expansile nanoparticles: Practical methods for clinical scale-up / A.H. Colby, R. Liu, R.P. Doyle [et al.] // *J. Controlled Release* - 2021. – № 337. – C. 144-154.

53. Cornell, R.M. The Iron Oxides. / R.M. Cornell, U. Schwertmann - Weinheim: WILEY-VCH. – 2003. – 344 c.
54. Cowger, T.A. Casein-coated Fe₃O₄ nanoparticles with superior r₂ relaxivity for liver-specific magnetic resonance imaging / T.A. Cowger, W. Tang, Z. Zhen [et al.] // *Theranostics*. – 2015. – № 5. – C. 1225-1232.
55. Croguennec, T. Interfacial properties of heat-treated ovalbumin / T. Croguennec, A. Renault, S. Beaufils [et al.] // *J. Colloid Interface Sci.* – 2007. – № 315. – C. 627-636.
56. Crowther, J.R. The ELISA Guidebook / J.R. Crowther. – New York: Humana Press. – 2009. – 415 c.
57. Dadparvar, M. Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability / M. Dadparvar, S. Wagner, S. Wien [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2014. – № 88. – C. 510-517.
58. Danaei, M. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems / M. Danaei, M. Dehghankhold [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2018. – № 10,. – Article 57.
59. Das R.P. Tuning the pharmacokinetics and efficacy of irinotecan (IRI) loaded gelatin nanoparticles through folate conjugation / R.P. Das, S. Chakravarti [et al.] // *Int J Pharm.* – 2020. – № 586. – C. 119522
60. Das, B. Nanozymes in Point-of-Care Diagnosis: An Emerging Futuristic Approach for Biosensing / B. Das, J. L. Franco [et al.] // *Nano-Micro Lett.* – 2021. – № 13. – C. 193.
61. Deng, L. Double-layered protein nanoparticles induce broad protection against divergent influenza A viruses / L. Deng, T. Mohan [et al.] // *Nat. Commun.* – 2018. – № 9. – C. 359.
62. Derkach, S.R. Modified Fish Gelatin as an Alternative to Mammalian Gelatin in Modern Food Technologies / S.R. Derkach, N.G. Voron'ko [et al.] // *Polymers*. – 2020. – № 12. – C. 3051.

63. Diba, M. 3D printed colloidal biomaterials based on photo-reactive gelatin nanoparticles / M. Diba, G.L. Koons [et al.] // *Biomaterials*. – 2021. – № 274. – С. 120871.
64. Dingess, K.A. Monitoring human milk β -casein phosphorylation and o-glycosylation over lactation reveals distinct differences between the proteome and endogenous peptidome / K.A. Dingess, I. Gazi [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – № 22. – Article 8140.
65. Djagny, K.B. Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review / K.B. Djagny, Z. Wang, S. Xu // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2001. – № 41. – С. 481-492.
66. Dong, Q. Rapid detection of Salmonella by low-field NMR biosensor using long-arm functional magnetic nanoprobe / Q. Dong, X. Liang [et al.] // *International Journal of Food Science & Technology*. – 2022. – № 57. – С. 7740-7750.
67. Doumic, L. I. “Soluble” vs. “insoluble” Prussian blue based catalysts: influence on Fenton-type treatment / L. I. Doumic, G. Salierno [et al.] // *RSC Adv.* – 2016. – № 6. – С. 46625-46633.
68. Drozd, M. Interactions of proteins with metal-based nanoparticles from a point of view of analytical chemistry - Challenges and opportunities / M. Drozd, A. Duszczuk [et al.] // *Advances in colloid and interface science*. – 2022. – № 304. – Article 102656.
69. Drozd, M. Pitfalls and capabilities of various hydrogen donors in evaluation of peroxidase-like activity of gold nanoparticles / M. Drozd, M. Pietrzak [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2016. – № 408. – С. 8505–8513.
70. Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials Guidance for Industry 2022 // FDA. – 2022. – С. 1. URL: <https://www.fda.gov/media/157812/download> (дата обращения 26.06.2023)
71. Duffy, M.J. Biomarkers for prostate cancer: Prostate-specific antigen and beyond / M.J. Duffy // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2020. – № 58. – С. 326-339.

72. Elgohary, M.M. Dual-targeted nano-in-nano albumin carriers enhance the efficacy of combined chemo/herbal therapy of lung cancer / M.M. Elgohary, M.W. Helmy [et al.] // *Nanomedicine*. – 2018. – № 13. – C. 2221-2244.
73. Elzoghby, A. O. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems / A. O. Elzoghby, W. M. Samy, N. A. Elgindy // *Journal of controlled release*. – 2012. – № 2. – C. 168-182.
74. Elzoghby, A.O. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems / A.O. Elzoghby, W.S. Abo El-Fotoh, N.A. Elgindy // *J. Control. Release*. – 2011. – № 153. – C. 206-216.
75. Elzoghby, A.O. Hybrid protein-inorganic nanoparticles: From tumor-targeted drug delivery to cancer imaging / A.O. Elzoghby, A.L. Hemasa, M.S. Freag // *J. Control. Release*. – 2016. – № 243. – C. 303-322.
76. Elzoghby, A.O. Novel ionically crosslinked casein nanoparticles for flutamide delivery: formulation, characterization, and in vivo pharmacokinetics / A.O. Elzoghby, M.W. Helmy [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2013. – № 8. – C. 1721-1732.
77. Esposito, E. Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties / E. Esposito, R. Cortesi, C. Nastruzzi // *Biomaterials*. – 1996. – № 17. – C. 2009–2020.
78. Esteban-Pérez, S. Gelatin Nanoparticles-HPMC Hybrid System for Effective Ocular Topical Administration of Antihypertensive Agents / S. Esteban-Pérez, V. Andrés-Guerrero [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2020. – № 12. – C. 306.
79. Fahmi, M.Z. Development of bovine serum albumin-modified hybrid nanoclusters for magnetofluorescence imaging and drug delivery / M.Z. Fahmi, K.-L. Ou [et al.] // *RSC Adv*. – 2014. – № 4. – C. 32762–32772.
80. Farka, Z. Nanoparticle-based immunochemical biosensors and assays: recent advances and challenges / Z. Farka, T. Jurik [et al.] // *Chemical reviews*. – 2017. – № 117, № 15. – C. 9973-10042.
81. Farka, Z. Prussian Blue Nanoparticles as a Catalytic Label in a Sandwich Nanozyme-Linked Immunosorbent Assay / Z. Farka, V. Čunderlová [et al.] // *Anal. Chem*. – 2018. – № 90. – C. 2348-2354.

82. Feng, K. Prussian Blue Nanoparticles Having Various Sizes and Crystallinities for Multienzyme Catalysis and Magnetic Resonance Imaging / K. Feng, J. Zhang [et al.] // *ACS Appl. Nano Mater.* – 2021. – № 4. – C. 5176–5186.
83. Feng, X. Properties of Pickering emulsion stabilized by food-grade gelatin nanoparticles: Influence of the nanoparticles concentration / X. Feng, H. Dai [et al.] // *Colloids Surf. B.* – 2020. – № 196. – C. 111294.
84. Fiorito, P. A. Synthesis, characterization and immobilization of Prussian blue nanoparticles. A potential tool for biosensing devices / P. A. Fiorito, V. R. Gonçalves [et al.] // *Chem. Commun.* – 2005. – № 3. – C. 366–368.
85. Foox, M. Drug delivery from gelatin-based systems / M. Foox, M. Zilberman // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2015. – № 10. – C. 1547-1563.
86. Fu, S. Stimulus-responsive nanoparticle magnetic resonance imaging contrast agents: design considerations and applications / S. Fu, Z. Cai, H. Ai // *Advanced Healthcare Materials.* – 2021. – № 5. – C. 2001091.
87. Fung, F. Food safety in the 21st century / F. Fung, H.-S. Wang, S. Menon // *Biomedical Journal.* – 2018. – № 2. – C. 88-95.
88. Futami, J. Evaluation of irreversible protein thermal inactivation caused by breakage of disulphide bonds using methanethiosulphonate / J. Futami, A. Miyamoto [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – № 7. – C. 12471.
89. Gaihre, B. Effect of different parameters on gelatin adsorption and stability of the colloidal dispersion of gelatin-coated magnetic iron oxide nano-particles / B. Gaihre, D.C. Parajuli [et al.] // *Adsorpt. Sci. Technol.* – 2008. – № 4. – C. 279-290.
90. Gaihre, B. Encapsulation of Fe₃O₄ in gelatin nanoparticles: Effect of different parameters on size and stability of the colloidal dispersion / B. Gaihre, S. Aryal [et al.] // *J. Microencapsulation* - 2008. – № 1. – C. 21-30.
91. Galisteo-González, F. Systematic study on the preparation of BSA nanoparticles / F. Galisteo-González, J. A. Molina-Bolívar // *Colloid. Surface B.* – 2014. – № 123. – C. 286-292.
92. Gao, L. Intrinsic peroxi-dase-like activity of ferromagnetic nanoparticles / L. Gao, J. Zhuang [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* – 2007. – № 2. – C. 577-583.

93. Gao, Y. Metal and Metal Oxide Nanoparticles to Enhance the Performance of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) / Y. Gao, Y. Zhou, R. Chandrawati // *ACS Appl. Nano Mater.* – 2020. – № 3. – C. 1-21.
94. Gao, Z. Platinum-Decorated Gold Nanoparticles with Dual Functionalities for Ultrasensitive Colorimetric in Vitro Diagnostics / Z. Gao, H. Ye [et al.] // *Nano letters* – 2017. – № 9. – C. 5572–5579.
95. Garcia, V. S. A lateral flow immunoassay based on colored latex particles for detection of canine visceral leishmaniasis / V. S. Garcia, S. A. Guerrero [et al.] // *Acta Tropica.* – 2020. – № 212. – C. 105643.
96. García-Álvarez, R. In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape / R. García-Álvarez, M. Hadjidemetriou [et al.] // *Nanoscale.* – 2018. – № 10. – C. 1256-1264.
97. Geh, K. J. Optimisation of one-step desolvation and scale-up of gelatine nanoparticle production / K. J. Geh, M. Hubert, G. Winter // *J. Microencapsulation.* – 2016. – № 33. – C. 595-604.
98. Gerrard, J. A. Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications / J. A. Gerrard // *Trends Food Sci. Technol.* – 2002. – № 13. – C. 391-399.
99. Ghoshdastidar, S. Plate-Adherent Nanosubstrate for Improved ELISA of Small Molecules: A Proof of Concept Study / S. Ghoshdastidar, A. Gangula [et al.] // *Anal. Chem.* – 2020. – № 92. – C. 10952-10956.
100. Gilbert, J. Vapor Barrier Properties and Mechanical Behaviors of Composite Hydroxypropyl Methylcellulose/Zein Nanoparticle Films / J. Gilbert, C. J. Cheng, O. G. Jones // *Food Biophys.* – 2017. – № 13. – C. 25-36.
101. Goh, E. G. Effect of particle size on the UV absorbance of zinc oxide nanoparticles / E. G. Goh, X. Xu, P. G. McCormick // *Scr. Mater.* – 2014. – № 78-79. – C. 49-52.
102. Gomez-Guillen, M.C. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review / M. C. Gomez-Guillen, B. Gimenez [et al.] // *Food Hydrocoll.* – 2011. – № 25. – C. 1813-1827.

103. Gooding, J. J. Can Nanozymes Have an Impact on Sensing? / J. J. Gooding // ACS Sens. – 2019. – № 4. – C. 2213-2214.
104. Goswami, S. Biocompatible nanocarrier fortified with a dipyridinium-based amphiphile for eradication of biofilm / S. Goswami, D. Thiyagarajan [et al.] // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2014. – № 6. – C. 16384-16394.
105. Gou, Y. Bio-inspired protein-based nanoformulations for cancer theranostics / Y. Gou, D. Miao [et al.] // Front. Pharmacol. – 2018. – № 9. – C. 421.
106. Goya, G. F. Next generation of nanozymes: A perspective of the challenges to match biological performance / G. F. Goya, A. Mayoral [et al.] // J. Appl. Phys. – 2021. – № 130. – C. 190903.
107. Gribnau, T. C. J. Particle-labelled immunoassays: A review / T. C. J. Gribnau, J. H. W. Leuvering, H. van Hell // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications – 1986. – № 376. – C. 175-189.
108. Guerrini, L. Surface modifications of nanoparticles for stability in biological fluids / L. Guerrini, R. A. Alvarez-Puebla, N. Pazos-Perez // Materials – 2018. – № 11. - No 1154.
109. Gulati, N.M. Bioinspired Shielding Strategies for Nanoparticle Drug Delivery Applications / N. M. Gulati, P. L. Stewart, N. F. Steinmetz // Mol. Pharm. – 2018. – № 15. – C. 2900-2909.
110. Gulzar, M. Influence of pH on the dry heat-induced denaturation/aggregation of whey proteins / M. Gulzar, S. Bouhallab [et al.] // Food Chem. – 2011. – № 129. – C. 110-116.
111. Guo, J. Nanomaterial labels in lateral flow immunoassays for point-of-care-testing / J. Guo, S. Chen [et al.] // Journal of Materials Science & Technology – 2021. – № 60. – C. 90-104.
112. Guo, X. Advances in redox-responsive drug delivery systems of tumor microenvironment / X. Guo, Y. Cheng [et al.] // J. Nanobiotechnology – 2018. – № 16. – C. 74.
113. Gwon, Y. A Freezing and Thawing Method for Fabrication of Small Gelatin Nanoparticles with Stable Size Distributions for Biomedical Applications / Y.

Gwon, W. Kim [et al.] // *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* – 2022. – № 19. – С. 301-307.

114. Habibi, N. Engineered Ovalbumin Nanoparticles for Cancer Immunotherapy / N. Habibi, S. Christau [et al.] // *Adv. Therap.* – 2020. – № 3. – С. 2000100.

115. Habibi, N. Protein Nanoparticles: Uniting the Power of Proteins with Engineering Design Approaches / N. Habibi, A. Mauser [et al.] // *Advanced Science* – 2022. – № 8. – СТАТЬЯ № 2104012.

116. Hafidz, R.N.R.M. Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin / R. N. R. M. Hafidz, C. M. Yaakob [et al.] // *International Food Research Journal* – 2011. – № 2. – С. 813-817.

117. Hanauer, M. Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size and shape / M. Hanauer, S. Pierrat [et al.] // *Nano Lett.* – 2007. – № 7. – С. 2881–2885.

118. Haque, S. Suggested procedures for the reproducible synthesis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles using the emulsification solvent diffusion platform / S. Haque, B. J. Boyd [et al.] // *Curr. Nanosci.* – 2018. – № 14. – С. 448-453.

119. Hassanin, I.A. Self-assembled non-covalent protein-drug nanoparticles: an emerging delivery platform for anti-cancer drugs / I. A. Hassanin, A. O. Elzoghby // *Expert Opin. Drug Del.* – 2020. – № 17. – С. 1437-1458.

120. Haun, J.B. Magnetic nanoparticle biosensors / J. B. Haun, T.-J. Yoon [et al.] // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* – 2010. – № 2. – С. 291-304.

121. Hauser, A.K. The effects of synthesis method on the physical and chemical properties of dextran coated iron oxide nanoparticles / A. K. Hauser, R. Mathias [et al.] // *Mater. Chem. Phys.* – 2015. – № 160. – С. 177-186.

122. Havea, P. Characterization of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment / P. Havea, H. Singh, L. K. Creamer // *J. Dairy Res.* – 2001. – № 68. – С. 483-497.

123. He, Q. Prussian blue nanoparticles with peroxidase-mimicking properties in a dual immunoassays for glycocholic acid / Q. He, H. Yang [et al.] // *J. Pharm. Biomed.* – 2020. – № 187. – C. 113317.
124. Heckert, R. A. Development of protein A-gold immunoelectron microscopy for detection of bovine coronavirus in calves: Comparison with ELISA and direct immunofluorescence of nasal epithelial cells / R. A. Heckert [et al.] // *Veterinary Microbiology* – 1989. – № 3. – C. 217-231.
125. Heine, W. E. The Importance of α -Lactalbumin in Infant Nutrition / W. E. Heine, P. D. Klein, P. J. Reeds // *J. Nutr.* – 1991. – № 121. – C. 277–283.
126. Heinz, H. Nanoparticle decoration with surfactants: molecular interactions, assembly, and applications / H. Heinz, C. Pramanik [et al.] // *Surface Science Reports* – 2017. – № 1. – C. 1-58.
127. Herrera Estrada, L. P. Protein nanoparticles for therapeutic protein delivery / L. P. Herrera Estrada, J. A. Champion // *Biomater. Sci.* – 2015. – № 3. – C. 787–799.
128. Heukers, R. Targeting hepatocyte growth factor receptor (Met) positive tumor cells using internalizing nanobody-decorated albumin nanoparticles / R. Heukers, I. Altintas [et al.] // *Biomaterials.* – 2014. – № 35. – C. 601–610.
129. Holt, C. Sequence characteristics responsible for protein-protein interactions in the intrinsically disordered regions of caseins, amelogenins, and small heat-shock proteins / C. Holt, J.K. Raynes, J.A. Carver // *Biopolymers* – 2019. – № 9. – C. e23319.
130. Hong, S. Protein-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems / S. Hong, D.W. Choi [et al.] // *Pharmaceutics* – 2020. – № 12. – C. 604.
131. Horne, D.S. Casein structure, self-assembly and gelation / D.S. Horne // *Current Opinion in Colloid and Interface Science* – 2002. – № 5-6. – C. 456-461.
132. Hornok, V. Synthesis and stabilization of Prussian blue nanoparticles and application for sensors / V. Hornok, I. Dékány // *J. Colloid Inter-face Sci.* – 2007. – № 309. – C. 176–182.
133. Hsu, Y.-H. Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper / Y.-H. Hsu // *Analytical Biochemistry* – 1984. – № 1. – C. 221–225.

134. Hu, Z. Nanoparticle size matters in the formation of plasma protein coronas on Fe₃O₄ nanoparticles / Z. Hu, H. Zhang [et al.] // *Colloids Surf. B* – 2014. – № 121. – C. 354–361.

135. Huang Y. Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications / Y. Huang, J. Ren, X. Qu // *Chemical reviews*. – 2019. – №. 6. – C. 4357-4412.

136. Huang, D. Hyaluronic acid coated albumin nanoparticles for targeted peptide delivery to the retina / D. Huang, Y.-S. Chen, I.D. Rupenthal // *Mol. Pharm.* – 2017. – № 14. – C. 533-545.

137. Huang, H. Inorganic nanoparticles in clinical trials and translations / H. Huang, W. Feng [et al.] // *Nano Today* - 2020. – № 35. – C. 100972.

138. Huang, J. Casein-coated iron oxide nanoparticles for high MRI contrast enhancement and efficient cell targeting / J. Huang, L. Wang [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces* - 2013. – № 5. – C. 4632–4639.

139. Huang, P.-J.J. Good's buffers have various affinities to gold nanoparticles regulating fluorescent and colorimetric DNA sensing / P.-J.J. Huang, J. Yang [et al.] // *Chem. Sci.* – 2020. – № 11. – C. 6795–6804.

140. Huang, Y. Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications / Y. Huang, J. Ren, X. Qu // *Chem. Rev.* – 2019. – № 119. – C. 4357-4412.

141. Huang, Y. Rational design of cancer-targeted BSA protein nanoparticles as radiosensitizer to overcome cancer radioresistance / Y. Huang, Y. Luo [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces* - 2014. – № 6. – C. 19217-19228.

142. Huang, Y.-Y. Surface modification of gelatin nanoparticles with polyethylenimine as gene vector / Y.-Y. Huang, W.-T. Kuo [et al.] // *J. Nanomater.* – 2011. – № 2011.

143. Huang, Z. Application and development of superparamagnetic nanoparticles in sample pretreatment and immunochromatographic assay / Z. Huang, S. Hu [et al.] // *Trends Anal. Chem.* – 2019. – № 114. – C. 151-170.

144. Humer, D. Improving the Performance of Horseradish Peroxidase by Site-Directed Mutagenesis / D. Humer, O. Spadiut // *Int J Mol Sci.* – 2019. – № 20. – C. 916.
145. Ikariyama Y. Luminescence immunoassay of human serum albumin with hemin as labeling catalyst / Y. Ikariyama, S., Suzuki, M. Aizawa // *Analytical Chemistry.* – 1982. – №. 7. – C. 1126-1129.
146. Jahanban-Esfahlan, A. A simple improved desolvation method for the rapid preparation of albumin nanoparticles / A. Jahanban-Esfahlan, S. Dastmalchi, S. Davaran // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2016. – № 91. – C. 703-709.
147. Jain, S. Cyclosporin a loaded PLGA nanoparticle: Preparation, optimization, In-Vitro characterization and stability studies / S. Jain, A. Mittal [et al.] // *Curr. Nanosci.* – 2010. – № 6. – C. 422–431.
148. Janjua, T. I. Clinical translation of silica nanoparticles / T. I. Janjua, Y. Cao [et al.] // *Nature Reviews Materials* - 2021. – № 6. – C. 1072-1074.
149. Jansaento, W. Detection of *Campylobacter* DNA using magnetic nanoparticles coupled with PCR and a colorimetric end-point system / W. Jansaento, K. Jangpatarapongsa [et al.] // *Food Sci. Biotechnol.* – 2016. – № 25. – C. 193–198.
150. Jeevanandam, J. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations / J. Jeevanandam, A. Barhoum [et al.] // *Beilstein journal of nanotechnology* - 2018. – № 9. – C. 1050–1074.
151. Jia, Z. Synthesis of Prussian Blue nanocrystals with metal complexes as precursors: Quantitative calculations of species dis-tribution and its effects on particles size / Z. Jia // *Colloids Surf., A* - 2011. – № 389. – C. 144–148.
152. Jiang, B. Standardized assays for determining the catalytic activity and kinetics of peroxidase-like nanozymes / B. Jiang, D. Duan [et al.] // *Nat. Protoc.* – 2018. – № 13. – C. 1506–1520.
153. Jun, J. Y. Preparation of size-controlled bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by a modified desolvation method / J. Y. Jun, H. H. Nguyen [et al.] // *Food Chem.* – 2011. – № 127. – C. 892–1898.

154. Kamal, A.M. Changes in amino acids profile of camel milk protein during the early lactation / A.M. Kamal, O.A. Salama, K.M. El-Saied // *Int. J. Dairy Sci.* – 2007. – № 2. – C. 226–234.

155. Karami, K. BSA nanoparticles as controlled release carriers for isophthalaldoxime palladacycle complex; Synthesis, characterization,: In vitro evaluation, cytotoxicity and release kinetics analysis / K. Karami, N. Jamshidian [et al.] // *New J. Chem.* – 2020. – № 44. – C. 4394-4405.

156. Karpova, E. V. Core–Shell Nanozymes “Artificial Peroxidase”: Stability with Superior Catalytic Properties / E. V. Karpova, E. V. Shcherbacheva [et al.] // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2021. – № 12. – C. 5547–5551.

157. Karyakin, A. A. Advances of Prussian blue and its analogues in (bio)sensors / A. A. Karyakin // *Curr. Opin. Electrochem.* – 2017. – № 5. – C. 92–98.

158. Kasarda, D.D. Thermal degradation of proteins studied by mass spectrometry / D.D. Kasarda, D.R. Black // *Biopolymers.* – 1968. – № 6. – C. 1001-4.

159. Kaul, G. Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery / G. Kaul, M. Amiji // *Pharm. Res.* – 2002. – № 19. – C. 1061–1067.

160. Kelly, H. G. Immunological basis for enhanced immunity of nanoparticle vaccines / H. G. Kelly, S. J. Kent, A. K. Wheatley // *Expert review of vaccines* - 2019. – № 18. – C. 269–280.

161. Khan, S. A. Tuning the size of gelatin nanoparticles produced by nanoprecipitation / S. A. Khan, H. Ali, A. Ihsan, N. Sabir // *Colloid J.* – 2015. – № 77. – C. 672–676.

162. Khan, S.A. Mini-Review: Opportunities and challenges in the techniques used for preparation of gelatin nanoparticles / S.A. Khan // *Pak. J. Pharm. Sci.* – 2020. – № 33. – C. 221–228.

163. Khlebtsov, B. Au-nanocluster-loaded human serum albumin nanoparticles with enhanced cellular uptake for fluorescent imaging / B. Khlebtsov, A. Prilepskii [et al.] // *Journal of Innovative Optical Health Sciences* - 2016. – № 9.. – C. 1650004.

164. Khlebtsov, B. N. Quantifying the numbers of gold nanoparticles in the test zone of lateral flow immunoassay strips / B. N. Khlebtsov, R. S. Tumskiy [et al.] // *ACS Applied Nano Materials* - 2019. – № 2. – C. 5020-5028.
165. Khramtsov, P. Conjugation of carbon coated-iron nanoparticles with biomolecules for NMR-based assay / P. Khramtsov, M. Kropaneva [et al.] // *Colloids Surf. B* - 2019. – № 176. – C. 256–264.
166. Khramtsov, P. 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 [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2021. – № 15. – C. 120422.
167. Khramtsov, P. Nuclear magnetic resonance immunoassay of tetanus antibodies based on the displacement of magnetic nanoparticles / P. Khramtsov, M. Kropaneva [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry* - 2021. – № 413. – C. 1461-1471.
168. Kianfar, E. Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles / E. Kianfar // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2021. – № 19. – C. 159.
169. Kim, T. Photoacoustic Imaging of Human Mesenchymal Stem Cells Labeled with Prussian Blue-Poly(l -lysine) Nanocomplexes / T. Kim, J.E. Lemaster, F.Chen [et al.] // *ACS Nano* - 2017. – № 11. – C. 9022-9032.
170. Kimura, K. Preparation and in vitro analysis of human serum albumin nanoparticles loaded with anthracycline derivatives / K. Kimura, K. Yamasaki [et al.] // *Chem. Pharm. Bull.* – 2018. – № 66. – C. 382-390.
171. Kjeldgaard, S. Strategies for synthesis of Prussian blue analogues / S. Kjeldgaard, I. Dugulan [et al.] // *R. Soc. Open Sci.* – 2021. – № 8. – C. 201779.
172. Klier, J. Immunomodulatory asthma therapy in the equine animal model: A dose-response study and evaluation of a long-term effect / J. Klier, C. Bartl [et al.] // *Immun. Inflamm. Dis.* – 2019. – № 7. – C. 130–149.
173. Koh, I. Magnetic Nanoparticle Sensors / I. Koh, L. Josephson // *Sensors* - 2009. – № 9. – C. 8130-8145.

174. Koh, I. Sensitive NMR sensors detect antibodies to influenza / I. Koh, R. Hong [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2008. – № 47. – C. 4119–4121.
175. Komkova, M. A. Catalytic Pathway of Nanozyme “Artificial Peroxi-dase” with 100- Fold Greater Bimolecular Rate Constants Compared to Those of the Enzyme / M. A. Komkova, O. A. Ibragimova [et al.] // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2021. – № 12. – C. 171–176.
176. Komkova, M. A. Catalytically synthesized Prussian Blue nanoparticles defeating natural enzyme peroxidase / M. A. Komkova, E. E. Karyakina, A. A. Karyakin // *J. Am. Chem. Soc.* – 2018. – № 140. – C. 11302–11307.
177. Komkova, M.A. Flow-electrochemical synthesis of Prussian Blue based nanozyme 'artificial peroxidase' / M. A. Komkova, K. R. Vetoshev [et al.] // *Dalton Trans.* – 2021. – № 50. – C. 11385-11389.
178. Komkova, M.A. Simultaneous monitoring of sweat lactate content and sweat secretion rate by wearable remote biosensors / M. A. Komkova, A. A. Eliseev [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* – 2022. – № 202. – C. 113970.
179. Kommareddy, S. Preparation and Loading of Gelatin Nanoparticles / S. Kommareddy, M. M. Amiji // *Cold Spring Harb. Protoc.* – 2008. – C. pdb.prot4885–pdb.prot4885.
180. Komsthöft, T. Polymer functionalization of inorganic nanoparticles for biomedical applications / T. Komsthöft, G. Bovone [et al.] // *Current Opinion in Chemical Engineering* - 2022. – № 37. – C. 100849.
181. Kraft, A. Some considerations on the structure, composition, and properties of Prussian blue: a contribution to the current discussion / A. Kraft // *Ionics* - 2021. – № 27. – C. 2289–2305.
182. Krainer, F.W. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications / F. W. Krainer, A. Glieder // *Applied Microbiology and Biotechnology* - 2015. – № 99. – C. 1611-1625.
183. Kramer, P.A. Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery / P.A. Kramer // *Journal of Pharmaceutical Sciences* - 1974. – № 63 – C. 1646-1647.

184. Krifors, A. Combining T2Bacteria and T2Candida Panels for Diagnosing Intra-Abdominal Infections: A Prospective Multicenter Study / A. Krifors, M. Ullberg [et al.] // *Journal of Fungi* - 2022. – № 8. – C. 832.

185. Kufleitner, J. Incorporation of obidoxime into human serum albumin nanoparticles: optimisation of preparation parameters for the development of a stable formulation / J. Kufleitner, F. Worek, J. Kreuter // *J. Microencapsul.* – 2010. – № 27. – C. 594-601.

186. Kumar, S. Fabrication of BSA-Green Tea Polyphenols-Chitosan Nanoparticles and Their Role in Radioprotection: A Molecular and Biochemical Approach / S. Kumar, R. Meena, P. Rajamani // *J. Agric. Food Chem.* – 2016. – № 30. – C. 6024-6034.

187. Kupke, D.W. Protein concentration measurements: the dry weight method / D.W. Kupke, T.E. Dorrier // *Method. Enzymol.* – 1978. – № 48. – C. 155-162.

188. Kuznetsova, E. V. The Role of Integrated Approach in the Determination of Nanoparticle Sizes in Dispersions / E. V. Kuznetsova, N. M. Kuznetsov [et al.] // *Colloid Journal* - 2022. – № 84. – C. 704-714.

189. Lambrecht, M.A. Denaturation and covalent network formation of wheat gluten, globular proteins and mixtures thereof in aqueous ethanol and water / M.A. Lambrecht, I. Rombouts, J.A. Delcour // *Food Hydrocoll.* – 2016. – № 57. – C. 122-131.

190. Langer, K. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation / K. Langer, M.G. Anhorn [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2008. – № 347. – C. 109-117.

191. Langer, K. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles / K. Langer, S. Balthasar [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2003. – № 257. – C. 169-180.

192. Laurentius, L.B. Advantages and limitations of nanoparticle labeling for early diagnosis of infection / L.B. Laurentius, N.A. Owens [et al.] // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2016. – № 16. – C. 883-895.

193. Lee, E. J. Studies on the characteristics of drug-loaded gelatin nanoparticles prepared by nanoprecipitation / E. J. Lee, S. A. Khan [et al.] // *Bioprocess Biosyst. Eng.* – 2011. – № 3. – C. 297-307.

194. Lee, H. Ultrasensitive detection of bacteria using Core–Shell nanoparticles and an NMR-Filter system / H. Lee, T. J. Yoon, R. Weissleder // *Angewandte Chemie* - 2009. – № 121. – C. 5767-5770.

195. Lee, J.W. Preparation of non-aggregated fluorescent nanodiamonds (FNDs) by non-covalent coating with a block copolymer and proteins for enhancement of intracellular uptake / J.W. Lee, S. Lee [et al.] // *Molecular BioSystems* - 2013. – № 5. – C. 1004-1011.

196. Lee, M. J. Detection of thioredoxin-1 using ultra-sensitive ELISA with enzyme-encapsulated human serum albumin nanoparticle / M. J. Lee, E. S. Lee [et al.] // *Nano Converg.* – 2019. – № 6. – C. 37.

197. Leo, E. Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: Involvement of the drug in the cross-linking process / E. Leo, M.A. Vandelli [et al.] // *Int J Pharm.* – 1997. – № 155. – C. 75-82.

198. Leskinen, T. Adsorption of Proteins on Colloidal Lignin Particles for Advanced Biomaterials / T. Leskinen, J. Witos [et al.] // *Biomacromolecules* - 2017. – № 8. – C. 2767–2776.

199. Leuvering, J. H. W. Sol Particle Immunoassay (SPIA) / J. H. W. Leuvering, P. J. H. M. Thal [et al.] // *Journal of Immunoassay* - 1980. – № 1. – C. 77–91.

200. Li, F. Affordable and simple method for separating and detecting ovarian cancer circulating tumor cells using BSA coated magnetic nanoprobe modified with folic acid / F. Li, G. Yang [et al.] // *Sens. Actuators B Chem.* – 2018. – № 262. – C. 611–618.

201. Li, F. Enhanced tumor delivery and antitumor response of doxorubicin-loaded albumin nanoparticles formulated based on a schiff base / F. Li, C. Zheng [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2016. – № 11. – C. 3875-3890.

202. Li, F. Preparation and in vitro evaluation of albumin nanoparticles produced by thermal driven self-assembly / F. Li, L. Jiang [et al.] // *J. China Pharm. Univ.* – 2016. – № 47. – C. 303-310.
203. Li, J. Aqueous-phase synthesis of iron oxide nanoparticles and composites for cancer diagnosis and therapy / J. Li, S. Wang, X. Shi, M. Shen // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2017. – № 249. – C. 374-385.
204. Li, S. Nanozyme-Enabled Analytical Chemistry / S. Li, Y. Zhang [et al.] // *Anal. Chem.* – 2022. – № 94. – C. 312–323.
205. Li, X. Human transport protein carrier for controlled photoactivation of antitumor prodrug and real-time intracellular tumor imaging / X. Li, J. Mu [et al.] // *Bioconjug. Chem.* – 2015. – № 26. – C. 955-961.
206. Li, Y. Chitosan-stablized bovine serum albumin nanoparticles having ability to control the release of NELL-1 protein / Y. Li, H. Song [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2018. – № 109. – C. 672-680.
207. Li, Y. Horseradish peroxidase-loaded nanospheres attached to hollow gold nanoparticles as signal enhancers in an ultrasensitive immunoassay for alpha-fetoprotein / Y. Li, R. Yuan, Y. Chai [et al.] // *Microchimica Acta.* – 2014. – № 5-6. – C. 679-685.
208. Liang, L. I. Casein and pectin: Structures, interactions, and applications / L. I. Liang, Y. Luo // *Trends in Food Science & Technology.* – 2020. – № 97. – C. 391-403.
209. Lin, A. Bacteria-Responsive Biomimetic Selenium Nanosystem for Multidrug-Resistant Bacterial Infection Detection and Inhibition / A. Lin, Y. Liu [et al.] // *ACS Nano.* – 2019. – № 13. – C. 13965–13984.
210. Lin, W. Pharmaceutical Research / W. Lin, A. G. A. Coombes [et al.] // 1994. – № 11. – C. 1588–1592.
211. Linares, E. M. Enhancement of the detection limit for lateral flow immunoassays: evaluation and comparison of bioconjugates / E. M. Linares, L. T. Kubota [et al.] // *Journal of immunological methods.* – 2012. – № 375. – C. 264-270.
212. Liu, B. Development and comparison of immunochromatographic strips with three nanomaterial labels: Colloidal gold, nanogold-polyaniline-nanogold

microspheres (GPGs) and colloidal carbon for visual detection of salbutamol / B. Liu, L. Wang [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – № 85. – C. 337-342.

213. Liu, G. Enzyme nanoparticles-based electronic biosensor / G. Liu, Y. Lin [et al.] // *Chemical Communications*. – 2005. – № 27. – C. 3481-3483.

214. Liu, H. Effect of temperature on the size of biosynthesized silver nanoparticle: Deep insight into microscopic kinetics analysis / H. Liu, H. Zhang [et al.] // *Arabian J. Chem*. – 2020. – № 13. – C. 1011-1019.

215. Liu, J. Differentiation of glycated residue numbers on heat-induced structural changes of bovine serum albumin / J. Liu, X. Xing, H. Jing // *J. Sci. Food Agric*. – 2018. – № 98. – C. 2168-2175.

216. Liu, L. Nanomaterials-based colorimetric immunoassays / L. Liu, Y. Hao [et al.] // *Nanomaterials*. – 2019. – № 9. – C. 316.

217. Liu, Q. Mild Enzyme-Induced Gelation Method for Nanoparticle Stabilization: Effect of Transglutaminase and Laccase Cross-Linking / Q. Liu, H. Cui [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2021. – № 4. – C. 1348-1358.

218. Liu, S.-Q. Electrochemical behavior of nanosized Prussian blue self-assembled on Au electrode surface / S.-Q. Liu, J.-J. Xu, H.-Y. Chen // *Electrochem. Commun*. – 2002. – № 4. – C. 421–425.

219. Liu, X. Consideration for the scale-up manufacture of nanotherapeutics—A critical step for technology transfer / X. Liu, H. Meng // *VIEW*. – 2021. – № 2. – Статья № 20200190.

220. Liu, X. Peroxidase-Like Activity of Smart Nanomaterials and Their Advanced Application in Colorimetric Glucose Biosensors / X. Liu, D. Huang [et al.] // *Small*. – 2019. – № 15. – Статья № 1900133.

221. Liu, Z. Prussian blue immunochromatography with portable smartphone-based detection device for zearalenone in cereals / Z. Liu, Q. Hua [et al.] Li // *Food Chem*. – 2022. – № 369. – C. 131008.

222. Lomis, N. Human Serum Albumin Nanoparticles for Use in Cancer Drug Delivery: Process Optimization and In Vitro Characterization / N. Lomis, S. Westfall [et al.] // *Nanomaterials*. – 2016. – № 6. – C. 116.

223. Long, X. Facile and controllable fabrication of protein-only nanoparticles through photo-induced crosslinking of albumin and their application as dox carriers / X. Long, J. Ren [et al.] // *Nanomaterials*. – 2019. – № 9. – С. 797.

224. Lu, L. Rapid, quantitative and ultra-sensitive detection of cancer biomarker by a SERRS-based lateral flow immunoassay using bovine serum albumin coated Au nanorods / L. Lu, J. Yu [et al.] // *RSC advances*. – 2020. – № 10. – С. 271–281.

225. Lu, Z. Paclitaxel-loaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy / Z. Lu, T.-K. Yeh [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – № 10. – С. 7677-7684.

226. Luebbert, C.C. Nanoparticle size and production efficiency are affected by the presence of fatty acids during albumin nanoparticle fabrication / C.C. Luebbert, T.M. Clarke [et al.] // *PLoS ONE*. – 2017. – № 12. – Статъя № e0189814.

227. Luis de Redín, I. Human serum albumin nanoparticles for ocular delivery of bevacizumab / I. Luis de Redín, C. Boiero [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2018. – № 541. – С. 214–223.

228. Luo Y. et al. The peroxidase-mimicking function of acetate and its application in single-enzyme-based glucose test paper / Y. Luo, R. Shen [et al.] // *Talanta*. – 2019. – №. 196. – С. 493-497.

229. Luo, Z.-X. New frontiers in in vitro medical diagnostics by low field T2 magnetic resonance relaxometry / Z.-X. Luo, L. Fox [et al.] // *Trends Anal. Chem.* – 2016. – № 83. – С. 94-102.

230. Ma, X. Biocompatible and Biodegradable Protein Hydrogel with Green and Red Autofluorescence: Preparation, Characterization and in Vivo Biodegradation Tracking and Modeling / X. Ma, X. Sun [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – № 6. – Статъя № 19370.

231. Majorek, K. A. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins / K. A. Majorek, P. J. Porebski [et al.] // *Molecular immunology*. – 2012. – № 3-4. – С. 174–182.

232. Mak, W. C. Lateral-flow technology: From visual to instrumental / W. C. Mak, V. Beni, A. P. Turner // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2016. – № 79. – C. 297-305.
233. Martins, J. T. Protein-Based Structures for Food Applications: From Macro to Nanoscale / J. T. Martins, A. I. Bourbon [et al.]// *Front. Sustain. Food Syst.* – 2018. – № 2. – Статья № 77.
234. Matta, L.L. Emerging nano-biosensing with suspended MNP microbial extraction and EANP labeling / L. L. Matta, E. C. Alocilja // *Biosens. Bioelectron.* – 2018. – № 117. – C. 781–793.
235. Merodio, M. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties / M. Merodio, A. Arnedo [et al.] // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2001. – № 12. – C. 251–259.
236. Merodio, M. Ocular disposition and tolerance of ganciclovir-loaded albumin nanoparticles after intravitreal injection in rats / M. Merodio, J. M. Irache [et al.]// *Biomaterials*. – 2002. – № 23. – C. 1587–1594.
237. Miele, E. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer / E. Miele, G. P. Spinelli [et al.] // *International journal of nanomedicine*. – 2009. – № 4. – C. 99–105.
238. Miernicki, M. Legal and practical challenges in classifying nanomaterials according to regulatory definitions / M. Miernicki, T. Hofmann [et al.] // *Nature nanotechnology*. – 2019. – № 3. – C. 208–216.
239. Migneault, I. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking / I. Migneault, C. Dartiguenave [et al.] // *BioTechniques*. – 2004. – № 37. – C. 790-802.
240. Mikhalev, K.N. Magnetic state and phase composition of carbon-encapsulated Co@C nanoparticles according to ^{59}Co , ^{13}C NMR data and Raman spectroscopy / K. N. Mikhalev, A. Y. Germov [et al.] // *Mater. Res. Express*. – 2018. – № 5. – C. 055033.
241. Mine, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality / Y. Mine // *Trends Food Sci. Tech.* – 1995. – № 6. – C. 225-232."

242. Ming, H. Size- and shape-controlled synthesis of Prussian Blue nanoparticles by a polyvinylpyrrolidone-assisted crystallization process / H. Ming, N. L. K. Torad [et al.] // *CrystEngComm*. – 2012. – № 14. – C. 3387-3396.

243. Mirica, A-C. Latest Trends in Lateral Flow Immunoassay (LFIA) Detection Labels and Conjugation Process / A-C Mirica, D Stan [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2022. – № 10. – C. 922772.

244. Mirshafiee, V. Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake / V. Mirshafiee, R. Kim [et al.] // *Biomaterials*. – 2016. – № 75. – C. 295–304.

245. Mirsky, A.E. The reducing groups of proteins / A. E. Mirsky, M. L. Anson // *J. Gen. Physiol.* – 1936. – № 19. – C. 451-459.

246. Mo, Y. Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene / Y. Mo, M. E. Barnett [et al.] // *Mol. Vis.* – 2007. – № 13. – C. 746–757.

247. Mohamad, A. Recent developments in colorimetric immunoassays using nanozymes and plasmonic nanoparticles / A. Mohamad, H. Teo [et al.] // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2018. – № 39. – C. 50-66.

248. Molina-Bolívar, J.A. How Proteins Stabilize Colloidal Particles by Means of Hydration Forces / J. A. Molina-Bolívar, J. L. Ortega-Vinuesa // *Langmuir*. – 1999. – № 15. – C. 2644–2653.

249. Moore, T.L. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions / T. L. Moore, L. Rodriguez-Lorenzo [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* – 2015. – № 44. – C. 6287–6305.

250. Moriyama, Y. Secondary structural change of bovine serum albumin in thermal denaturation up to 130 °C and protective effect of sodium dodecyl sulfate on the change / Y. Moriyama, E. Watanabe [et al.] // *J. Phys. Chem. B*. – 2008. – № 112. – C. 16585–16589.

251. Nairi, V. Interactions between bovine serum albumin and mesoporous silica nanoparticles functionalized with biopolymers / V. Nairi, S. Medda [et al.] // *Chem. Eng. J.* – 2018. – № 340. – C. 42–50.

252. Namiot, E.D. Nanoparticles in Clinical Trials: Analysis of Clinical Trials, FDA Approvals and Use for COVID-19 Vaccines / E.D. Namiot, A.V. Sokolov [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – № 1. – C. 787.

253. Nanoparticles and Method for the Production. Thereof. / M. Ahlers, C. Coester, K. Zwioerek, J. Zillies // Patent WO2006021367A1. Publication date 18 August 2005.

254. Narayanan, D. Poly-(ethylene glycol) modified gelatin nanoparticles for sustained delivery of the anti-inflammatory drug Ibuprofen-Sodium: An in vitro and in vivo analysis / D. Narayanan, M.G. Geena [et al.] // *Nanomedicine.* – 2013. – № 9. – C. 818–828.

255. Neburkova, J. Coating nanodiamonds with biocompatible shells for applications in biology and medicine / J. Neburkova, J. Vavra, P. Cigler // *Current Opinion in Solid State and Materials Science.* – 2017. – № 1. – C. 43-53.

256. Neelam, Chhillar, A. K., Enzyme nanoparticles and their biosensing applications: A review / Neelam, A. K. Chhillar, J. S. Rana // *Analytical Biochemistry.* – 2019. – № 581. – C. 120.

257. Nepovím, A. Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase / A. Nepovím, R. Podlipná [et al.] // *Chemosphere.* – 2004. – № 8. – C. 1007-1015.

258. Nigam, P. Graphene quantum dots conjugated albumin nanoparticles for targeted drug delivery and imaging of pancreatic cancer / P. Nigam, S. Waghmode [et al.] // *J. Mater. Chem. B.* – 2014. – № 21. – C. 3190–3195.

259. Ninan, G. Physical, Mechanical, and Barrier Properties of Carp and Mammalian Skin Gelatin Films / G. Ninan, J. Joseph, Z. Abubacker // *J. Food Sci.* – 2010. – № 75. – C. E620–E626.

260. Noble, J.E. Quantitation of protein / J.E. Noble, M.J. Bailey // *Method. Enzymol.* – 2009. – № 463. – C. 73-95.

261. Nomngongo, P.N. Determination of selected heavy metals using amperometric horseradish peroxidase (HRP) inhibition biosensor / P.N. Nomngongo, J.C. Ngila [et al.] // *Analytical Letters.* – 2011. – № 11. – C. 2031-2046.

262. Ofokansi, K. Matrix-loaded biodegradable gelatin nanoparticles as new approach to improve drug loading and delivery / K. Ofokansi, G. Winter [et al.] // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2010. – № 1. – C. 1-9.

263. Ortiz de Montellano, P.R. Mechanism-Based Inactivation of Horseradish Peroxidase by Sodium Azide. Formation of meso-Azidoporphyrin IX / P.R. Ortiz de Montellano, S.K. David [et al.] // *Biochemistry.* – 1988. – № 15. – C. 5470-5476.

264. Pace, C.N. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein / C.N. Pace, F. Vajdos [et al.] // *Protein Sci.* – 1995. – № 11. – C. 2411-2423.

265. Pan, H. Anti-CD19 mAb-conjugated human serum albumin nanoparticles effectively deliver doxorubicin to B-lymphoblastic leukemia cells / H. Pan, S. Li [et al.] // *Pharmazie.* – 2020. – № 75. – C. 318-323.

266. Pan, J. Targeting and imaging cancer cells by Folate-decorated, quantum dots (QDs) - loaded nanoparticles of biodegradable polymers / J. Pan, S.-S. Feng // *Biomaterials.* – 2009. – № 30. – № 6. – C. 1176-1183.

267. Panariello, L. Highly reproducible, high-yield flow synthesis of gold nanoparticles based on a rational reactor design exploiting the reduction of passivated Au(III) / L. Panariello, S. Damilos [et al.] // *React. Chem. Eng.* – 2020. – № 5. – C. 663-676.

268. Panferov, V.G. Urchin peroxidase-mimicking Au@Pt nanoparticles as a label in lateral flow immunoassay: impact of nanoparticle composition on detection limit of *Clavibacter michiganensis* / V.G. Panferov, I.V. Safenkova [et al.] // *Microchim. Acta.* – 2020. – № 187. – C. 268.

269. Parasaram, V. Targeted drug delivery to emphysematous lungs: Inhibition of MMPs by doxycycline loaded nanoparticles / V. Parasaram, N. Nosoudi [et al.] // *Pulm. Pharmacol. Ther.* – 2016. – № 39. – C. 64-73.

270. Park, J.C. Surface Design of Eu-Doped Iron Oxide Nanoparticles for Tuning the Magnetic Relaxivity / J.C. Park, G.T. Lee [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces* - 2018. – № 10. – C. 25080-25089.

271. Peña, I. Thermally Denatured BSA, a Surrogate Additive to Replace BSA in Buffers for High-Throughput Screening / I. Peña, J. M. Domínguez // *J. Biomol. Screen.* – 2010. – № 15. – С. 1281-1286.

272. Peng, Q. Preformed albumin corona, a protective coating for nanoparticles based drug delivery system / Q. Peng, S. Zhang [et al.] // *Biomaterials* - 2013. – № 34. – С. 8521-8530.

273. Peralta, D.V. Encapsulating gold nanomaterials into size-controlled human serum albumin nanoparticles for cancer therapy platforms / D.V. Peralta, J. He [et al.] // *J. Microencapsul.* – 2014. – № 31. – С. 824-831.

274. Pfeiffer, C. Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: the (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles / C. Pfeiffer, C. Rehbock [et al.] // *Journal of the Royal Society, Interface* - 2014. – № 96. – С. 20130931.

275. Pham, X.-H. Sensitive Colorimetric Detection of Prostate Specific Antigen Using a Peroxidase-Mimicking Anti-PSA Antibody Coated Au Nanoparticle / X.-H. Pham, E. Hahm [et al.] // *Biochip J.* – 2020. – № 14. – С. 158-168.

276. Piestansky, J. Determination of immunogenic proteins in biopharmaceuticals by UHPLC-MS amino acid analysis / J. Piestansky, J. Galba [et al.] // *BMC Chemistry* - 2019. – № 13. – Статья № 2019.

277. Pitkowski, A. Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate / A. Pitkowski, D. Durand, T. Nicolai // *J. Colloid Interface Sci.* – 2008. – № 326. – С. 96-102.

278. Porras, J. C. Comparative study of gold and carbon nanoparticles in nucleic acid lateral flow assay / J. C. Porras, M. Bernuz [et al.] // *Nanomaterials* - 2021. – № 3. – С. 741.

279. Pustulka, S. M. Protein Nanoparticle Charge and Hydrophobicity Govern Protein Corona and Macrophage Uptake / S. M. Pustulka, K. Ling, S. L. Pish, J. A. Champion // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2020. – № 12. – С. 48284-48295.

280. Qin, M. Highly Crystallized Prussian Blue with Enhanced Kinetics for Highly Efficient Sodium Storage / M. Qin, W. Ren [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interf.* – 2021. – № 13. – C. 3999-4007.
281. Qin, Z. Achieving Ultrasmall Prussian Blue Nanoparticles as High-Performance Biomedical Agents with Multifunctions / Z. Qin, B. Chen [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interf.* – 2020. – № 51. – C. 57382-57390.
282. Qin, Z. Progress in Applications of Prussian Blue Nanoparticles in Biomedicine / Z. Qin, Y. Li, N. Gu // *Adv. Healthcare Mater.* – 2018. – № 7. – C. 1800347.
283. Raev, M.B. Investigation into size distribution of carbon nanoparticles covalently functionalized with proteins / M.B. Raev, P.V. Khramtsov, M.S. Bochkova // *Nanotechnol Russia* - 2015. – № 10. – C. 140-148.
284. Rayev, M. Carbon–protein covalent conjugates in non-instrumental immunodiagnostic systems / M. Rayev, K. Shmagel // *Journal of immunological methods* - 2008. – № 1. – C. 9-15.
285. Razo, S. C. Comparative study of four coloured nanoparticle labels in lateral flow immunoassay / S. C. Razo, A. I. Elovenkova [et al.] // *Nanomaterials* - 2021. – № 12. – C. 3277.
286. Razo, S. C. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles / S. C. Razo, V. G. Panferov [et al.] // *Analytica chimica acta* - 2018. – № 1007. – C. 50-60.
287. Ren, X. Nanozymes-recent development and biomedical applications / X. Ren, D. Chen [et al.] // *J. Nanobiotechnol.* – 2022. – № 20. – C. 92.
288. Riesz, P. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications / P. Riesz, T. Kondo // *Free Radic. Biol. Med.* – 1992. – № 13. – C. 247-270.
289. Robertson, J. D. Purification of Nanoparticles by Size and Shape / J. D. Robertson, L. Rizzello [et al.] // *Scientific reports* - 2016. – № 6. – C. 27494.
290. Roca, A.G. Effect of nanoparticle and aggregate size on the relaxometric properties of MR contrast agents based on high quality magnetite nanoparticles / A.G.

Roca, S. Veintemillas-Verdaguer [et al.] // *J. Phys. Chem. B* - 2009. – № 21. – C. 7033-7039.

291. Rocha-Santos, T.A.P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles / T.A.P. Rocha-Santos // *Trends Anal. Chem.* – 2014. – № 62. – C. 28-36.

292. Rombouts, I. Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation / I. Rombouts, B. Lagrain [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – № 5. – C. 12210.

293. Ruiz-Agudo, E. Specific effects of background electrolytes on the kinetics of step propagation during calcite growth / E. Ruiz-Agudo, C.V. Putnis [et al.] // *Geochim. Cosmochim. Acta* - 2011. – № 14. – C. 3803-3814.

294. Ruiz-Agudo, E. The role of background electrolytes on the kinetics and mechanism of calcite dissolution / E. Ruiz-Agudo, M. Kowacz [et al.] // *Geochim. Cosmochim. Acta* - 2010. – № 5. – C. 1256-1267.

295. Saha, D. Method for Homogeneous Spotting of Antibodies on Membranes: Application to the Sensitive Detection of Ochratoxin A / D. Saha, D. Acharya, T.K. Dhar // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – № 5. – C. 847-854.

296. Samain, L. Relationship between the Synthesis of Prussian Blue Pigments, Their Color, Physical Properties, and Their Behavior in Paint Layers / L. Samain, F. Grandjean [et al.] // *J. Phys. Chem. C* - 2013. – № 19. – C. 9693-9712.

297. Sánchez-Arreguin, A. Generation of BSA-capsaicin Nanoparticles and Their Hormesis Effect on the *Rhodotorula mucilaginosa* Yeast / A. Carriles Sánchez-Arreguin, N. Ochoa-Alejo [et al.] // *Molecules*. – 2019. – № 15. – C. 2800.

298. Sánchez-Segura, L. Development of bovine serum albumin–capsaicin nanoparticles for biotechnological applications / L. Sánchez-Segura, N. Ochoa-Alejo [et al.] // *Appl. Nanosci.* – 2018. – № 8. – C. 1877-1886.

299. Sangeetha, J. The interaction, stability and response to an external stimulus of iron oxide nanoparticle-casein nanocomplexes / J. Sangeetha, J. Philip // *Colloids Surf. A*. - 2012. – № 406. – C. 52-60.

300. Santoro, M. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering / M. Santoro, A.M. Tataru, A.G. Mikos // *J Control Release*. – 2014. – № 190. – C. 210-218.
301. Schubert, J. Coating matters: Review on colloidal stability of nanoparticles with biocompatible coatings in biological media, living cells and organisms / J. Schubert, M. Chanana // *Curr. Med. Chem.* – 2018. – № 25. – C. 4553-4586.
302. Sena-Torralba, A. Toward Next Generation Lateral Flow Assays: Integration of Nanomaterials / A. Sena-Torralba, R. Álvarez-Diduk [et al.] // *Chemical Reviews* – 2022. – № 18. – C. 14881-14910.
303. Shamarekh, K. S. Towards the production of monodisperse gelatin nanoparticles by modified one step desolvation technique / K.S. Shamarekh, H.A. Gad [et al.] // *J. Pharm. Invest.* – 2020. – № 50. – C. 189-200.
304. Shamsutdinova, N. Tuning magnetic relaxation properties of “hard cores” in core-shell colloids by modification of “soft shell” / N. Shamsutdinova, R. Zairov [et al.] // *Colloids Surf. B* - 2018. – № 162. – C. 52-59.
305. Shan, X. Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation / X. Shan, X. Gong [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B* - 2022. – № 7. – C. 3028-3048.
306. Shan, Z. Chloride accelerated Fenton chemistry for the ultrasensitive and selective colorimetric detection of copper / Z. Shan, M. Lu [et al.] // *Chem. Commun.* – 2016. – № 52. – C. 2087-2090.
307. Shao, H. Magnetic nanoparticles and microneedles for diagnostic applications / H. Shao, C. Min [et al.] // *Theranostics*. – 2012. – № 2. – C. 55-65.
308. Shavokshina, V. A. Improved Electroactivity of Redox Probes onto Electropolymerized Azidomethyl-PEDOT: Enabling Click Chemistry for Advanced (Bio)Sensors / V.A. Shavokshina, M.A. Komkova [et al.] // *ACS Appl. Polym. Mater.* – 2021. – № 3. – C. 1518-1524.
309. Shiba, F. Size Control of Monodisperse Prussian Blue Nanoparticles by Enforced-Nucleation and Additional-Growth Procedures in a Citrate Reduction System / F. Shiba, M. Nito [et al.] // *Part. Sci. Technol.* – 2015. – № 33. – C. 671-676.

310. Shiba, F. Synthesis of uniform Prussian blue nanoparticles by a polyol process using a polyethylene glycol aqueous solution / F. Shiba, U. Mameuda [et al.] // RSC Adv. – 2019. – № 9. – C. 34589-34594.

311. Shokouhimehr, M. Biocompatible Prussian blue nanoparticles: Preparation, stability, cytotoxicity, and potential use as an MRI contrast agent / M. Shokouhimehr, E.S. Soehnlen [et al.]// Inorg. Chem. Commun. – 2010. – № 1. – C. 58-61.

312. Shokouhimehr, M. Dual purpose Prussian blue nanoparticles for cellular imaging and drug delivery: A new generation of T1-weighted MRI contrast and small molecule delivery agents / M. Shokouhimehr, E.S. Soehnlen [et al.] // J. Mater. Chem. – 2010. – № 20. – C. 5251-5259.

313. Silva, C.J.S.M. Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde / C.J.S.M. Silva, F. Sousa [et al.]// Food Technol. Biotechnol. – 2004. – № 1. – C. 51-56.

314. Simpson, R.J. Stabilization of proteins for storage / R.J. Simpson // Cold Spring Harb. Protoc. – 2010. – № 5. – C. 79.

315. Sing, K. The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials / K. Sing // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2001. – № 187. – C. 3-9.

316. Sivera, M. Silver nanoparticles modified by gelatin with extraordinary pH stability and long-term antibacterial activity / M. Sivera, L. Kvitek [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – № 9. – C. e103675.

317. Sloan-Dennison, S. Towards quantitative point of care detection using SERS lateral flow immunoassays / S. Sloan-Dennison, E. O'Connor [et al.] // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2022. – № 16. – C. 4541–4549.

318. Song, S.-H. Functional Microparticle R&D for IVD and Cell Therapeutic Technology: Large-Scale Commercialized Products / S.-H. Song, J.H. Lee [et al.] // Biochip Journal. – 2019. – № 1. – C. 95-104.

319. Sozer, S. C. A simple desolvation method for production of cationic albumin nanoparticles with improved drug loading and cell uptake / S. C. Sozer, A. Egesoy [et al.]// J. Drug Deliv. Sci. Technol. – 2020. – № 101931. – C. 1-8.

320. Sozer, S. C. A simple desolvation method for production of cationic albumin nanoparticles with improved drug loading and cell uptake / S. C. Sozer, M. Egesoy [et al.] // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2020. – № 101931. – C. 1-8.

321. Spada, A. The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery / A. Spada, B. Emami [et al.] // *Mol. Pharm.* – 2021. – № 5. – C. 1862–1894.

322. Spadiut, O. Production and purification of the multifunctional enzyme horseradish peroxidase / Spadiut O, Herwig C. // *Pharm Bioprocess.* – 2013. – № 1. – C. 283–295.

323. Spicer, C.D. Peptide and protein nanoparticle conjugates: Versatile platforms for biomedical applications / C.D. Spicer, C. Jumeaux [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* – 2018. – № 10. – C. 3574-3620.

324. Stamey, T.A. Identity of PSA purified from seminal fluid by different methods: Comparison by amino acid analysis and assigned extinction coefficients / T.A. Stamey, R. Teplow [et al.] // *The Prostate.* – 1995. – № 27 – C. 198-203.

325. Stein, W.H. Amino acid composition of beta-lactoglobulin and bovine serum albumin / W.H. Stein, S. Moore // *J. Biol. Chem.* – 1949. – № 178. – C. 79–91.

326. Stevenson, A.T. Filtration initiated selective homogeneity (FISH) desolvation: A new method to prepare gelatin nanoparticles with high physicochemical consistency / A.T. Stevenson, S.A. Lewis, A.R. Whittington // *Food Hydrocoll.* – 2018. – № 84. – C. 337–342.

327. Strozyk, M.S. Protein/polymer-based dual-responsive gold nanoparticles with pH-dependent thermal sensitivity / M.S. Strozyk, M. Chanana [et al.] // *Adv. Funct. Mater.* – 2012. – № 7. – C. 1436–1444.

328. Suarasan, S. Gelatin-nanogold bioconjugates as effective plasmonic platforms for SERS detection and tagging / S. Suarasan, A. Focsan [et al.] // *Colloids Surf. B.* – 2013. – № 103. – C. 475–481.

329. Sudheesh, M.S. Nanoparticle-based immunopotentiality via tetanus toxoid-loaded gelatin and aminated gelatin nanoparticles / M.S. Sudheesh, S.P. Vyas, D.V. Kohli, // *Drug Deliv.* – 2011. – № 18. – C. 320–330.

330. Sun, A.-L. Cross-linkage urease nanoparticles: a high-efficiency signal-generation tag for portable pH meter-based electrochemical immunoassay of lipocalin-2 protein diagnostics / A.-L. Sun, Q.-A., Qi, L.-J. Zhi, // *Microchimica Acta*. – 2020. – № 9. – C. 485.
331. Sun, H. Crosslinked polymer nanocapsules for therapeutic, diagnostic, and theranostic applications / Sun, H., Erdman [et al.] // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2020. – № 12. – C. e1653.
332. Sun, J. Optimizing Colorimetric Assay Based on V2O5 Nanozymes for Sensitive Detection of H2O2 and Glucose / Sun, J., Li, C. [et al.] // *Sensors*. – 2016. – № 16. – C. 584.
333. Sun, S. Roles of alcohol desolvating agents on the size control of bovine serum albumin nanoparticles in drug delivery system / Sun, S., Xiao, Q.-R. [et al.] // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2018. – № 47. – C. 193–199.
334. Suresh, D. Engineering biomolecular systems: Controlling the self-assembly of gelatin to form ultra-small bioactive nanomaterials / Suresh, D., Suresh, A., Kannan, R. // *Bioactive Materials*. – 2022. – № 18. – C. 321-336.
335. Syedmoradi, L. Point of care testing: The impact of nanotechnology / Syedmoradi, L., Daneshpour, M. [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* – 2017. – № 87. – C. 373-387.
336. Tan, H. Gelatin Particle-Stabilized High Internal Phase Emulsions as Nutraceutical Containers / Tan, H., Sun, G. [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2014. – № 6. – C. 13977–13984.
337. Tan, H. Hierarchical Porous Protein Scaffold Templated from High Internal Phase Emulsion Costabilized by Gelatin and Gelatin Nanoparticles / Tan, H., Tu, Z. [et al.] // *Langmuir*. – 2018. – № 34. – C. 4820–4829.
338. Tarhini, M. Protein-Based Nanoparticle Preparation via Nanoprecipitation Method / Tarhini, M., Benlyamani, I. [et al.] // *Materials*. – 2018. – № 3. – C. 394.
339. Tazhbayev, Y. Hydroxyurea-loaded albumin nanoparticles: Preparation, characterization, and in vitro studies / Tazhbayev, Y., Mukashev, O. [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2019. – № 11 – C. 410.

340. Tian, B. Ferromagnetic Resonance Biosensor for Homogeneous and Volumetric Detection of DNA / Tian, B., Liao, X. [et al.] // ACS Sens. – 2018. – № 3. – C. 1093–1101.
341. Tian, M. A sensitive lateral flow immunochromatographic strip with prussian blue nanoparticles mediated signal generation and cascade amplification / Tian, M., Xie, W. [et al.] // Sens. Actuators, B. – 2020. – № 309. – C. 127728.
342. Tyllianakis, P. E. Direct Colorimetric Determination of Solid-Supported Functional Groups and Ligands Using Bicinchoninic Acid / Tyllianakis, P. E., Kakabakos, S. E. [et al.] // Anal. Biochem. – 1994. – № 219– C. 335–340.
343. Uemura, T. Prussian Blue Nanoparticles Protected by Poly(vinylpyrrolidone) / Uemura, T., Kitagawa, S. // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – № 125– C. 7814–7815.
344. van Amerongen, A. Colloidal carbon particles as a new label for rapid immunochemical test methods: quantitative computer image analysis of results / van Amerongen, A., Wichers, J. H. [et al.] // Journal of biotechnology. – 1993. – № 30 – C. 185–195.
345. Van Der Lee, R. Classification of intrinsically disordered regions and proteins / Van Der Lee, R., Buljan [et al.] // Chemical Reviews. – 2014. – № 13. – C. 6589-6631.
346. Varca, G. H. C. Radio-synthesized protein-based nanoparticles for biomedical purposes / G. H. C. Varca, C. C. Ferraz, [et al.] // Radiat. Phys. Chem. – 2014. – № 94. – C. 181–185.
347. Vo, V. A new route for obtaining Prussian blue nanoparticles / V. Vo, M. N. Van, [et al.] // Mater. Chem. Phys. – 2008. – № 107. – C. 6–8.
348. Volkert, A. A. Implications of citrate concentration during the seeded growth synthesis of gold nanoparticles / A. A. Volkert, V. Subramaniam, A. J. Haes, // Chem. Commun. – 2011. – № 47. – C. 478–480.
349. Von Storp, B. Albumin nanoparticles with predictable size by desolvation procedure / B. Von Storp, A. Engel [et al.] // J. Microencapsul. – 2012. – № 29. – C. 138–146.

350. Wacker, M. A toolbox for the upscaling of ethanolic human serum albumin (HSA) desolvation / M. Wacker, A. Zensi, [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2011. – № 414. – C. 225–232.
351. Wang, D. Rapid lateral flow immunoassay for the fluorescence detection of SARS-CoV-2 RNA / D. Wang, S. He [et al.] // *Nature Biomedical Engineering.* – 2020. – № 12. – C. 1150-1158.
352. Wang, H. Tuning Particle Size of Prussian Blue by a Dual Anion Source Method / H. Wang, Q. Zhu [et al.] // *Cryst. Growth Des.* – 2018. – № 18. – C. 5780–5789.
353. Wang, L. Nanoclusters self-assembled from conformation-stabilized influenza M2e as broadly cross-protective influenza vaccines / L. Wang, A. Hess [et al.] // *Nanomedicine.* – 2014. – № 10. – C. 473-482.
354. Wang, S. Hollow Prussian Blue nanocubes as peroxidase mimetic and enzyme carriers for colorimetric determination of ethanol / S. Wang, H. Yan [et al.] // *Microchim. Acta.* – 2019. – № 186. – C. 738.
355. Wang, W. Human serum albumin (HSA) nanoparticles stabilized with intermolecular disulfide bonds / W. Wang, Y. Huang [et al.] // *Chem. Commun.* – 2013. – № 49. – C. 2234-2236.
356. Wang, X. Surface engineered antifouling optomagnetic SPIONs for bimodal targeted imaging of pancreatic cancer cells / X. Wang, X. Xing [et al.] // *Int. J. Nanomed.* – 2014. – № 9. – C. 1601–1615.
357. Wang, Y. Double-Layered M2e-NA Protein Nanoparticle Immunization Induces Broad Cross-Protection against Different Influenza Viruses in Mice / Y. Wang, L. Deng [et al.] // *Adv. Healthc. Mater.* – 2020. – № 9. – C. 1901176.
358. Wang, Y. Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay / Y. Wang, H. Xu [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2009. – № 29. – C. 714–718.
359. Wang, Y. Synthesis and characterization of CdTe quantum dots embedded gelatin nanoparticles via a two-step desolvation method / Y. Wang, H. Chen [et al.] // *Materials letters.* – 2008. – № 19. – C. 3382-3384.

360. Wang, Y. Universal influenza vaccines: from viruses to nanoparticles / Y. Wang, L. Deng [et al.] // *Expert Rev. Vaccines*. – 2018. – № 17. – C. 967-976.
361. Wang, Z. Self-assembled Biodegradable Nanoparticles and Polysaccharides as Biomimetic ECM Nanostructures for the Synergistic effect of RGD and BMP-2 on Bone Formation / Z. Wang, L. Dong [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – № 6. – C. 25090.
362. Wang, Z. Structure and activity of nanozymes: Inspirations for de novo design of nanozymes / Z. Wang, R. Zhang, X. Yan [et al.] // *Mater. Today*. – 2021. – № 41. – C. 81-119.
363. Wei, T. Bovine serum albumin encapsulation of near infrared fluorescent nano-probe with low nonspecificity and cytotoxicity for imaging of HER2-positive breast cancer cells / T. Wei, H. Xing, H. Wang [et al.] // *Talanta*. – 2020. – № 210. – C. 120625.
364. Wei, X. Multifunctional Gelatin Nanoparticle Integrated Microchip for Enhanced Capture, Release, and Analysis of Circulating Tumor Cells / X. Wei // *Part. Part. Syst. Charact.* – 2019. – № 36. – C. 1900076.
365. Weidemaier, K. Real-time pathogen monitoring during enrichment: A novel nanotechnology-based approach to food safety testing / K. Weidemaier, E. Carruthers, A. Curry [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2015. – № 198. – C. 19-27.
366. WHO. Tetanus vaccines: WHO position paper—February 2017 / WHO. // *Relev. Epidemiol. Hebd.* – 2017. – № 92. – C. 53–76.
367. Wiogo, H.T.R. Insight into serum protein interactions with functionalized magnetic nanoparticles in biological media / H.T.R. Wiogo, M. Lim, V. Bulmus [et al.] // *Langmuir*. – 2012. – № 28. – C. 4346–4356.
368. Won, Y.-W. Recombinant human gelatin nanoparticles as a protein drug carrier / Y.-W. Won, Y.-H. Kim // *J. Control. Release*. – 2008. – № 127. – C. 154–161.
369. Woods, A. B. In vivo biocompatibility, clearance, and biodistribution of albumin vehicles for pulmonary drug delivery / A. Woods, A. Patel, D. Spina [et al.] // *J. Control. Release*. – 2015. – № 210. – № 1. – C. 1-9.

370. Wu Y. Defect engineering in nanozymes / Y. Wu, W. Xu, L. Jiao [et al.] // *Materials Today*. – 2022. – №. 52. – C. 327-347.
371. Wu, L. Nanozyme Applications: A Glimpse of Insight in Food Safety / L. Wu, S. Zhou, G. Wang [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2021. – № 9. – C. 727886.
372. Wu, T. Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs / T. Wu, M. Tang // *J. Appl. Toxicol.* – 2018. – № 1. – C. 25-40.
373. Wu, X. Highly Crystallized $\text{Na}_2\text{CoFe}(\text{CN})_6$ with Suppressed Lattice Defects as Superior Cathode Material for Sodium-Ion Batteries / X. Wu, C. Wu, C. Wei [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interf.* – 2016. – № 8. – C. 5393–5399.
374. Wu, X. Sonochemical Synthesis of Prussian Blue Nanocubes from a Single-Source Precursor / X. Wu, M. Cao, C. Hu [et al.] // *Cryst. Growth Des.* – 2006. – № 6. – C. 26–28.
375. Xianyu, Y. Magnetic particles-enabled biosensors for point-of-care testing / Y. Xianyu, Q. Wang, Y. Chen // *Trends Anal. Chem.* – 2018. – № 106. – C. 213-224.
376. Xu, J. Rendering protein-based particles transiently insoluble for therapeutic applications / J. Xu, J. Wang, J.C. Luft [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – № 134. – C. 8774-8777.
377. Xu, L. Multifunctional Gelatin-Nanoparticle-Modified Chip for Enhanced Capture and Non-Destructive Release of Circulating Tumor Cells / L. Xu, T. Ma, K. Zhang [et al.] // *Micromachines*. – 2022. – № 13. – C. 395.
378. Xu, Y. Large-scale synthesis of monodisperse Prussian blue nanoparticles for cancer theranostics via an "in situ modification" strategy / Y. Xu, Y. Zhang, X. Cai [et al.] // *Int. J. Nanomed.* – 2018. – № 14. – C. 271–288.
379. Yaman, Y.T. Development of clay-protein based composite nanoparticles modified single-used sensor platform for electrochemical cytosensing application / Y.T., Yaman, O., Akbal, S. Abaci // *Biosens. Bioelectron.* – 2019. – № 132. – C. 230-237.

380. Yan, H. Amorphous RuTe₂ nanorods as efficient peroxidase mimics for colorimetric immunoassay / H. Yan, Y. Y. Chen, L. Jiao [et al.] // *Sens. Actuators, B.* – 2021. – № 341. – C. 130007.

381. Yang, Q. Self-Assembled Fluorescent Bovine Serum Albumin Nanoprobes for Ratiometric pH Measurement inside Living Cells / Q. Yang, Z. Ye, M. Zhong [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2016. – № 8. – C. 9629–9634.

382. Yannas, I.V. Cross-linking of gelatine by dehydration / I.V. Yannas, A.V. Tobolsky // *Nature.* – 1967. – № 510. – C. 509-510.

383. Yasmin, R. Gelatin nanoparticles: A potential candidate for medical applications / R. Yasmin, M. Shah, S.A. Khan [et al.] // *Nanotechnol. Rev.* – 2017. – № 6. – C. 191–207.

384. Yedomon, B. Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles by desolvation using a membrane contactor: A new tool for large scale production / B. Yedomon, H. Fessi, C. Charcosset // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2013. – № 2. – C. 398–405.

385. Yen, L. M. Tetanus / L. M. Yen, C. L. Thwaites // *Lancet.* – 2019. – № 10181. – C. 1657–1668.

386. You, S. PCSK9 Hapten Multicopy Displayed onto Carrier Protein Nanoparticle: An Antiatherosclerosis Vaccine / S. You, X. Guo, X. Xue [et al.] // *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2019. – № 8. – C. 4263-4271.

387. Yu, F. The artificial peroxidase activity of magnetic iron oxide nanoparticles and its application to glucose detection / F. Yu, Y. Huang, A.J. Cole [et al.] // *Biomaterials.* – 2009. – № 24. – C. 4716–4722.

388. Yu, Z. Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear / Z. Yu, M. Yu, Z. Zhang [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2014. – № 1. – C. 343.

389. Zacharioudakis, I.M. T2 Magnetic Resonance Assay: Overview of Available Data and Clinical Implications / I.M. Zacharioudakis, F.N. Zervou, E. Mylonakis // *J. Fungi.* – 2018. – № 2. – C. 45.

390. Zakaria, M. B. Recent advances in Prussian blue and Prussian blue analogues: synthesis and thermal treatments / M. B. Zakaria, T. Chikyow // *Coord. Chem. Rev.* – 2017. – № 352. – C. 328–345.
391. Zandieh M. Nanozyme Catalytic Turnover and Self-Limited Reactions / M. Zandieh, J. Liu // *ACS Nano.* – 2021. – № 15. – C. 15645.
392. Zandieh, M. Nanozymes: Definition, Activity, and Mechanisms / M. Zandieh, J. Liu // *Advanced Materials.* – 2023. – № 2211041.
393. Zare, I. Protein-protected metal nanoclusters as diagnostic and therapeutic platforms for biomedical applications / I. Zare, D.M. Chevrier // *Mater. Today.* – 2021. – C. 159–193.
394. Zhang Y. Bovine serum albumin nanoparticles with fluorogenic near-IR-emitting squaraine dyes / Y. Zhang, X. Yue, B. Kim [et al.] // *ACS applied materials & interfaces.* – 2013. – №. 17. – C. 8710-8717.
395. Zhang, B. Effective reduction of nonspecific binding by surface engineering of quantum dots with bovine serum albumin for cell-targeted imaging / B. Zhang // *Langmuir* - 2012. – № 45. – C. 16605-16613.
396. Zhang, W. Surface impact on nanoparticle-based magnetic resonance imaging contrast agents / W. Zhang // *Theranostics* - 2018. – № 8. – C. 2521-2548.
397. Zhang, X. Multiplex lateral flow immunoassays based on amorphous carbon nanoparticles for detecting three fusarium mycotoxins in maize / X. Zhang // *Journal of agricultural and food chemistry* - 2017. – № 65. – C. 8063-8071.
398. Zhang, Y. Recent Advances on Magnetic Relaxation Switching Assay-Based Nanosensors / Y. Zhang // *Bioconjugate Chem.* – 2017. – № 28. – C. 869-879.
399. Zheng, X.-J. Growth of Prussian Blue Microcubes under a Hydrothermal Condition: Possible Nonclassical Crystallization by a Mesoscale Self-Assembly / X.-J. Zheng // *J. Phys. Chem. C* - 2007. – № 12. – C. 4499-4502.
400. Zhou, A. Size-, Water-, and Defect-Regulated Potassium Manganese Hexacyanoferrate with Superior Cycling Stability and Rate Capability for Low-Cost Sodium-Ion Batteries / A. Zhou, Z. Xu, J. Song [et al.] // *Small* - 2019. – № 15. – C. 1902420.

401. Zhou, Q. Cascaded Nanozyme System with High Reaction Selectivity by Substrate Screening and Channeling in a Microfluidic Device / Q. Zhou, H. Yang, X. Chen [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2021. – № 61. – C. e202112453.

402. Zhou, Z. Structure-Relaxivity Relationships of Magnetic Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging / Z. Zhou, L. Yang, J. Gao [et al.] // *Adv. Mater.* – 2019. – № 31. – C. 1804567.

403. Zhu, J. Preparation and characterization of a novel albumin nanosphere-encapsulated hemoglobin-based oxygen carrier / J. Zhu, Y. Li [et al.] // *Int. J. Nanomed.* – 2018. – № 13. – C. 5523–5536.

404. Zhu, M. A highly sensitive dual-color lateral flow immunoassay for brucellosis using one-step synthesized latex microspheres / M. Zhu, Y. Jia, L. Peng [et al.] // *Analytical Methods* - 2019. – № 11. – C. 2937-2942.

405. Zhu, Q. A novel amperometric immunosensor constructed with gold-platinum nanoparticles and horseradish peroxidase nanoparticles as well as nickel hexacyanoferrates nanoparticles / Q. Zhu, R. Yuan, Y. Chai [et al.] // *Analyst* - 2013. – № 138. – C. 620-626.

406. Zong, S. Super blinking and biocompatible nanoprobe based on dye doped BSA nanoparticles for super resolution imaging / S. Zong, F. Pan, R. Zhang [et al.] // *Nanotechnology* - 2019. – № 30. – C. 065701.

407. Zwiorek, K. Delivery by Cationic Gelatin Nanoparticles Strongly Increases the Immunostimulatory Effects of CpG Oligonucleotides / K. Zwiorek, C. Bourquin, J. Battiani [et al.] // *Pharm. Res.* – 2007. – № 25. – C. 551-562.