

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Шипунова Виктория Олеговна

**Многофункциональные надмолекулярные комплексы
для контролируемого воздействия на клетки *in vitro* и *in vivo***

специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

проф., чл.-корр. РАН, д.б.н.,

Деев Сергей Михайлович

Москва 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ -----	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ -----	10
2.1. <i>Разнообразие и свойства наночастиц для биомедицинских применений</i> -----	10
2.1.1. Разнообразие наночастиц -----	10
2.1.2. Свойства наночастиц для задач терапии и диагностики -----	14
2.2. <i>Применения магнитных наночастиц в биологии и биомедицине</i> -----	18
2.2.1. Применения магнитных наночастиц <i>in vitro</i> -----	18
2.2.1.1. Изучение механических свойств живых клеток-----	18
2.2.1.2. Биосенсоры на основе магнитных частиц -----	20
2.2.1.3. Магнитная сепарация -----	21
2.2.1.4. Магнетофекция -----	22
2.2.1.5. Молекулярный биокомпьютинг -----	23
2.2.2. Применения магнитных наночастиц <i>in vivo</i> -----	25
2.2.2.1. Применение магнитных частиц в качестве контрастирующих агентов для МРТ- диагностики и для детекции сторожевых лимфоузлов -----	25
2.2.2.2. Гипертермия опухолей-----	26
2.2.2.3. Адресная доставка наночастиц -----	27
2.3. <i>Механизмы адресной доставки</i> -----	27
2.3.1. Пассивная адресная доставка-----	27
2.3.2. Активная адресная доставка-----	28
2.3.2.1. Рецептор-опосредованный эндоцитоз -----	31
2.3.2.2. Антитела для адресной доставки наночастиц -----	33
2.4. <i>Методы присоединения направляющих агентов к наночастицам</i> -----	35
2.4.1. Карбодиимидные методы химической конъюгации наночастиц с белками -----	36
2.4.2. Другие методы химической конъюгации наночастиц с белками-----	37
2.4.3. Пептиды, селективно связывающие твёрдую фазу-----	40
2.5. <i>Методы детекции связывания наночастиц с клетками</i> -----	41
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ -----	44
3.1. <i>Оборудование и материалы</i> -----	44
3.2. <i>Буферные растворы</i> -----	46
3.3. <i>Линии эукариотических клеток</i> -----	47
3.4. <i>Лабораторные животные</i> -----	47
3.5. <i>Методы</i> -----	47
3.5.1. Синтез наночастиц оксида железа с карбоксиметилдекстрановой и полиэтилениминовой полимерными оболочками -----	47

3.5.2. Синтез наночастиц ферригидрита, покрытых карбоксиметилдекстрановой полимерной оболочкой-----	48
3.5.3. Синтез золотых наночастиц -----	48
3.5.4. Измерение размера и ζ -потенциала частиц-----	48
3.5.5. Конъюгация белков с флуоресцеинизотиоцианатом-----	48
3.5.6. Конъюгация белков с сукцинатом хлорамфеникола -----	48
3.5.7. Конъюгация бычьего сывороточного альбумина с фолиевой кислотой -----	49
3.5.8. Ковалентная конъюгация наночастиц с белками -----	49
3.5.9. Мечение конъюгатов наночастиц с белками флуоресцеинизотиоцианатом-----	50
3.5.10. Окрашивание наночастиц оксида железа с использованием гексацианоферрата (II) калия-----	50
3.5.11. Условия культивирования эукариотических клеточных линий-----	52
3.5.12. Анализ жизнеспособности клеток -----	52
3.5.13. Иммуноферментный анализ-----	53
3.5.14. Количественный анализ связывания магнитных частиц с клетками-----	53
3.5.15. Лизис эритроцитов -----	53
3.5.16. Проточная цитофлуориметрия -----	54
3.5.17. Флуоресцентная спектроскопия-----	55
3.5.18. Анестезирование животных-----	55
3.5.19. Исследование динамики наночастиц в кровотоке мышей-----	55
3.5.20. Иммунохроматография на тест-полосках -----	56
3.5.21. Конструирование биокомпьютерных структур для WGA-опосредованного мечения клеток <i>in vitro</i> на основе логического анализа входных сигналов-----	56
3.5.22. WGA-опосредованное мечение клеток <i>in vitro</i> на основе логического анализа входных сигналов -----	57
3.5.23. Конструирование биокомпьютерных структур для мечения CD4 ⁺ клеток <i>ex vivo</i> и <i>in vivo</i> на основе логического анализа входных сигналов -----	58
3.5.24. Мечение CD4 ⁺ клеток крови <i>ex vivo</i> и <i>in vivo</i> на основе логического анализа входных сигналов -----	59
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ -----	60
4.1. МРQ-цитометрия: метод количественной детекции взаимодействия наночастиц с клетками и оценки уровня экспрессии поверхностных антигенов клеток -----	60
4.1.1. Синтез, физико-химическая характеристика и конъюгация магнитных наночастиц с белками -----	60
4.1.2. Количественный анализ взаимодействия наночастиц с клетками на основе технологии МРQ -----	63
4.1.3. Детекция HER2/neu-гиперэкспрессирующих клеток в составе сложной смеси-----	67
4.1.4. Неселективное мечение клеток наночастицами с полиэтилениминовой полимерной оболочкой -----	67
4.1.5. Корреляция метода МРQ-цитометрии с методами оптической микроскопии, проточной цитометрии и флуоресцентной спектроскопии -----	70
4.2. Создание конъюгатов и надмолекулярных конструкций на основе наночастиц магнетита, мини-антител и белкового модуля “барназа:барстар” для селективного мечения клеток-----	74

4.3. Адресная доставка наночастиц к клеткам-мишеням на основе специфического взаимодействия наночастиц, модифицированных лектинами, с гликозилированными белками на поверхности клеток -----	78
4.3.1. Исследование взаимодействия “лектин–гликопротеин” в составе наночастиц различной природы -----	78
4.3.2. Конструкции на основе магнитных частиц и лектинов для специфического мечения клеток -----	82
4.4. Контролируемое мечение клеток <i>in vitro</i> на основе биокомпьютерного анализа входных сигналов-----	86
4.4.1. Принципы конструирования биокомпьютерных структур на основе наночастиц -----	86
4.4.2. WGA-опосредованное мечение клеток <i>in vitro</i> на основе логического анализа входных сигналов -----	89
4.5. Контролируемое мечение клеток <i>in vivo</i> на основе биокомпьютерного анализа входных сигналов-----	92
4.5.1. Характеристика биокомпьютерных структур -----	93
4.5.2. <i>Ex vivo</i> доставка к CD4+ клеткам крови ФИТЦ-меченых биокомпьютерных структур -----	96
4.5.3. РЭС-блокада для доставки биокомпьютерных структур-----	99
4.5.4. Динамики циркуляции в кровотоке биокомпьютерных структур-----	100
4.5.5. <i>In vivo</i> доставка к CD4+ клеткам крови ФИТЦ-меченых биокомпьютерных структур -----	102
5. ВЫВОДЫ -----	104
6. БЛАГОДАРНОСТИ -----	105
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ-----	106
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ -----	108
<i>Приложение 1</i> -----	120

1. ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день нанобиотехнология открывают широкие возможности для поиска новых подходов к решению актуальных проблем диагностики и терапии тяжёлых заболеваний, а также для развития персонализированной медицины. Особое внимание в качестве новых и уникальных терапевтических и диагностических агентов привлекают к себе наночастицы и структуры на их основе, обладающие принципиально иными физико-химическими свойствами по сравнению с макро- и микрообъектами, а также биомолекулами. Ожидается, что успехи нанобиотехнологии могут значительно улучшить качество жизни пациентов, страдающих от ряда серьёзных заболеваний, таких как раковые, сердечнососудистые, аутоиммунные и другие [Grobmyer et al. 2011; Farokhzad and Langer 2009; McAteer et al. 2007; Torchilin 2006a; Gupta and Gupta 2005]. Более 50 лекарственных препаратов на основе наночастиц уже допущено для терапевтических целей и успешно используется в современной медицине [Wais et al. 2016; Sainz et al. 2015; Irache et al. 2011].

В чём же состоит уникальность наноструктур как агентов для биологии и медицины? С уменьшением размеров массивных объектов возрастает отношение их поверхности к объёму и, как следствие, увеличивается доля поверхностных атомов, приводя к возрастанию химической активности вещества и, зачастую, к приобретению им принципиально новых свойств.

Важным свойством наночастиц является возможность модификации их поверхности различными биомолекулами, такими как, например, антитела, пептиды, аптамеры, различные зонды, обеспечивающими биологическую активность, а также, возможность “нагрузки” наночастиц токсичным агентом и доставки его только к определённому типу клеток (адресной доставки) [de Jong 2008; Durazo and Kompella 2012]. Такое свойство делает возможным реализацию концепции “магической пули”, сформулированную основоположником химиотерапии, лауреатом Нобелевской премии по физиологии и медицине 1908 года, Паулем Эрлихом. Под “магической пулей” понимается идеальный терапевтический агент, который способен селективно поражать очаг болезни, не задевая здоровые ткани и не имея при этом побочных эффектов.

Использование наночастиц как платформы для такой магической пули в качестве “переносчиков” лекарственного препарата позволяет снизить системную интоксикацию организма по сравнению с использованием веществ в молекулярной форме, защитить препарат от деградации, изменить его фармакокинетические параметры и/или улучшить внутриклеточное проникновение, что ведет к увеличению терапевтического индекса [de Jong 2008; Irache et al. 2011].

Однако для большинства заболеваний, как правило, неизвестны такие абсолютно специфичные маркёры, которые могут точно идентифицировать заболевание и быть мишенью для адресной доставки препарата. Часто требуется анализировать гораздо бóльший массив биохимической информации для точной идентификации мишени. В качестве такой информации выступают, например, растворимые соединения в биологических жидкостях, антигены на поверхности клеток, или внутриклеточные вещества. Соответственно, возникает необходимость разработки автономных систем, способных анализировать набор биохимических параметров и производить необходимое заблаговременно запрограммированное действие на основе данного анализа (например, высвобождать токсин, связываться с чётко определённой клеточной популяцией или проявлять ферментативную активность). Одним из подходов к созданию таких систем является разработка биороботов на основе наночастиц и биомолекул, способных осуществлять элементарные логические функции на основе анализа молекулярного микроокружения и выполнять заранее заданные действия на основе проведённых вычислений.

Интерес исследователей к наночастицам также связан с возможным их использованием в качестве тераностических агентов, т.е. структур, выполняющих функции одновременной диагностики и терапии заболевания в случае его наличия. Важным и необходимым качеством при конструировании такого агента является его многофункциональность, воплощающая в себе терапевтические и диагностические функции. Наночастицы, обладающие целым рядом уникальных свойств, по сравнению с веществами в молекулярной форме, дополненные также биокомпьютерными возможностями, представляются как новые уникальные средства тераностики, нацеленные на решение актуальных проблем биомедицины. При этом для создания удачных тераностических агентов на основе наночастиц необходимы не только поиск новых подходов к их дизайну, но и разработка простых и, в то же время, высокочувствительных методов количественной детекции наночастиц как для *in vitro*, так и для *in vivo* применений.

В настоящее время в качестве платформы для конструирования тераностических агентов используют наночастицы различной природы: квантовые точки, липосомы, нанофосфóры и другие. Особое место среди них принадлежит магнитным наночастицам (МНЧ), которые в силу своей уникальной физической природы сами по себе являются многофункциональными структурами. МНЧ, оснащенные направляющими и/или терапевтическими агентами, локализованные в конкретной области организма под воздействием внешнего магнитного поля являются удобными объектами для реализации активной адресной доставки, выполняя тем самым терапевтические функции, а количественная детекция внешним индукционным зондом позволяет использовать их для диагностических целей. Более того, возможность индукционного нагрева МНЧ внешним магнитным полем может использоваться для терапии

раковых заболеваний (гипертермии ткани за счёт процессов намагничивания и броуновской и неелевской релаксации МНЧ). Таким образом, МНЧ представляются не только как перспективная платформа для создания тераностических агентов, но и в силу своей физической природы делают возможным их детекцию без включения дополнительных меток в свой состав.

Целью работы являлась разработка и всестороннее исследование многофункциональных комплексов на основе наночастиц, предназначенных для селективного взаимодействия с клетками-мишенями и контролируемого воздействия на них.

Для достижения данной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) Разработать новый высокочувствительный метод количественной детекции наночастиц, взаимодействующих с эукариотическими клетками-мишенями.
- 2) Разработать конструкции, состоящие из наночастиц магнетита и полноразмерных антител либо рекомбинантных мини-антител, для селективного мечения клеток и количественного анализа экспрессии мембранного рецептора HER2/neu.
- 3) Разработать эффективную систему мечения клеток магнитными частицами на основе специфичного взаимодействия наночастиц, модифицированных лектинами, с гликозилированными белками на поверхности эукариотических клеток.
- 4) Разработать и охарактеризовать биокomпьютерные комплексы на основе наночастиц, способные выполнять логические вычисления под воздействием низкомолекулярных соединений как входных сигналов.
- 5) Исследовать возможности эффективного и высоко селективного мечения клеток *in vitro* биокomпьютерными комплексами с лектинами в качестве направляющих агентов.
- 6) Исследовать динамики циркуляции биокomпьютерных комплексов в организме млекопитающего и возможность реализации унарных и бинарных логических операций *in vivo* под воздействием растворимых низкомолекулярных соединений, циркулирующих в крови.

Научная новизна

Впервые предложен высокочувствительный метод детекции наночастиц, связавшихся с клетками эукариот, на основе регистрации нелинейных магнетиков на комбинаторных частотах. Впервые получены конъюгаты магнитных наночастиц с анти-HER2/neu антителами, не уступающие по специфичности взаимодействия с опухолевыми клетками индивидуальных антител. Впервые проведено комплексное исследование взаимодействия ряда лектинов с гликопротеинами в составе наночастиц различной природы. Впервые получены и охарактеризованы биокomпьютерные комплексы на основе наночастиц и белкового интерфейса,

подвергающегося дезинтеграции под воздействием молекулярных входных сигналов и позволяющего реализовать полный набор булевых функций, и показано селективное мечение клеток *in vitro* данными биокomпьютерными комплексами. Впервые исследованы динамики циркуляции биокomпьютерных комплексов в кровотоке млекопитающего. Впервые на примере полученных биокomпьютерных комплексов показана возможность выполнения унарных и бинарных логических операций *ex vivo* в цельной крови и *in vivo* в организме млекопитающего под воздействием растворимых низкомолекулярных соединений, циркулирующих в крови.

Практическая значимость

Разработанный метод МРQ-цитометрии для количественной детекции наночастиц представляет собой новый высокочувствительный метод, применимый для широкого спектра фундаментальных исследований в области нанобиотехнологии. Разработанный метод может быть также использован для диагностики различных мембраноассоциированных маркёров заболеваний и служить альтернативой некоторым методам *in vitro* и *ex vivo* диагностики в случаях, когда использование дорогого и непортативного оборудования невозможно, например, в полевых условиях или в развивающихся странах.

Комплексные данные об эффективном взаимодействии лектинов с гликопротеинами в составе наночастиц различной природы могут быть использованы при создании платформы для самосборки наночастиц с целью конструирования тераностических агентов с заранее заданным набором функций.

Разработанный подход к конструированию биокomпьютерных структур на основе наночастиц и белкового интерфейса позволяет анализировать одновременно несколько параметров биохимической информации и проводить логические операции *in vivo* в организме млекопитающих под воздействием растворимых низкомолекулярных соединений, циркулирующих в крови. Одновременная мультипараметрическая обработка биохимических сигналов может быть использована для увеличения специфичности адресной доставки лекарств и, как следствие, для уменьшения системной токсичности. Ранее применимость биокomпьютинга *in vivo* была показана на примере систем на основе ДНК только в организме насекомого (ввиду низкой нуклеазной активности по отношению к ДНК), и оставалось неясно, могут ли биокomпьютерные структуры быть использованы *in vivo* в других живых организмах. Показанная в работе возможность проведения логических операций *in vivo* непосредственно в организме млекопитающих открывает большие возможности для создания нового поколения лекарств, работающих по принципу “магической пули”, и развития тераностики в целом.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: 17th International Conference “Laser Optics” (Санкт-Петербург, 2016); XXVIII, XXVII, XXV Зимние молодёжные научные школы “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии” (Москва, 2016, 2015, 2013); 58-я научная конференция Московского Физико-Технического Института (Москва-Долгопрудный-Жуковский, 2015); IEEE Nano-2015 (Рим, 2015); 19-я и 17 я Международные Пущинские школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пущино, 2015, 2013); 10th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (Дрезден, 2014); X конференция “Нанотехнологии в онкологии” (Москва, 2012); IV Nanotechnology International Forum RusNanoTech (Москва, 2011).

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данном обзоре литературы описаны разнообразие и основные преимущества наночастиц как новых агентов для терапии и диагностики заболеваний, рассмотрены методы конструирования МНЧ в качестве терапевтических агентов и пути их доставки к клеткам-мишеням, а также описаны различные применения МНЧ *in vitro* и *in vivo*.

2.1. Разнообразие и свойства наночастиц для биомедицинских применений

Наноматериалы – материалы, размер которых хотя бы по одному измерению не превышает 100 нм. Поведение структур в этом размерном диапазоне не может быть описано только лишь в терминах классической либо только квантовой механики. Область нанотехнологий использует уникальные свойства материалов, проявляющиеся у веществ между молекулярными (0.1 нм) и объёмными (сотни нанометров) масштабами. Высокая поверхностная энергия, вследствие преобладания атомов, расположенных на поверхности частицы, и квантовые размерные эффекты формируют уникальные химические, физические и оптические свойства, не наблюдаемые в материалах в других масштабах длин. Отмеченные свойства наночастиц не так давно начали применяться для решения проблем в биомедицинских исследованиях, включая диагностику и терапию различного рода заболеваний, таких как рак, инсульт, атеросклероз и ряд других.

2.1.1. Разнообразие наночастиц

На данный момент активно исследуются различные типы наночастиц: полимерные, золотые, серебряные, магнитные, квантовые точки, мицеллы, липосомы, мезопористые SiO₂ частицы, фуллерены, наночастицы фосфата кальция, гидрогелевые наночастицы, двуслойные гидроксидные наночастицы и другие [Zhang et al. 2016; Escudero et al. 2016; Generalova et al. 2013; Thanh and Green 2010; Hamidi et al. 2008; Faraji and Wipf 2009]. Ниже дано краткое описание основных видов наночастиц, вызывающих особое внимание исследователей в качестве агентов для биомедицины.

Квантовые точки (КТ) – флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы с размером ядра 1-12 нм, синтезированные из элементов II и VI групп (например, ZnS, CdSe или CdTe), реже III и V групп (InP) или IV и VI групп (PbS, PbSe, PbTe) периодической системы Д.И. Менделеева. От традиционных флуорофоров, таких как органические красители и флуоресцентные белки, их отличает широкая полоса поглощения, значительный стоксов сдвиг,

узкий спектр излучения и высокий квантовый выход (до 80%), а также высокая фотостабильность (рис. 1).

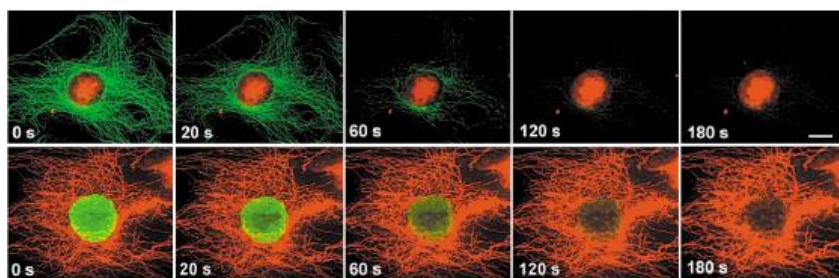


Рис. 1. Сравнение фотостабильности КТ и флуорофора Alexa 488. Верхняя строка – ядра клеток окрашены КТ, актиновые филаменты – флуорофором, нижняя строка – ядра окрашены флуорофором, актиновые филаменты – КТ [Wu et al. 2003].

КТ являются перспективными флуоресцентными метками для различных биомедицинских задач, таких как, например, визуализация раковых клеток, экспрессирующих определённые онкомаркеры, окрашивание тканей и их срезов и наблюдение в реальном времени за клетками и другими биологическими объектами [Michalet et al. 2005; Alivisatos 2004]. А благодаря выраженной зависимости длины волны излучения от размеров частицы появляется возможность многоцветного мечения и одновременной идентификации различных биологических объектов [Resch-Genger et al. 2008].

Однако следует отметить, что токсичность КТ значительно ограничивает спектр их применений *in vivo* в терапевтических целях. Гораздо более многообещающим воспринимается применение КТ для картирования сторожевых лимфоузлов, поскольку в данном случае производится местная инъекция препарата с последующим удалением лимфатического центра, пораженного метастазами [Mérian et al. 2012].

Два основных класса везикул – **липосомы и полимерные везикулы** вследствие наличия замкнутой мембранной оболочки имеют полости для ковалентной и нековалентной инкапсуляции как гидрофильных, так и гидрофобных агентов. Таким образом, липосомы и везикулы способны служить биосовместимыми носителями молекулярных лекарственных препаратов (которые могут сильно отличаться по своим физико-химическим свойствам), повышая терапевтический индекс и обеспечивая постепенное высвобождение препарата либо в межклеточное пространство, либо непосредственно в клетки [Silindir et al. 2012; Discher and Eisenberg 2002]. На данный момент препараты в липосомальной форме уже допущены к применению для лечения саркомы Капоши (DaunoXome®), рака молочной железы (Myocet®), рака яичников (Doxil®) и других заболеваний; также проходит клинические испытания ряд липосомальных препаратов, нацеленных на определённые маркёры клеточной поверхности для направленной доставки препарата (иммунолипосомы) [Lytton-Jean et al. 2015].

Применение различных *белковых и полимерных биodeградируемых наночастиц*, наряду с липосомами, позволяет использовать их для визуализации и адресной доставки. Одна из их главных отличительных особенностей – это биосовместимость, что уменьшает системную интоксикацию организма [Yang et al. 2009]. Наиболее активно для синтеза полимерных наночастиц используются гидрофобные полимеры – полилактат (PLA) и сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) благодаря их биосовместимости, биodeградируемости и тому, что они одобрены FDA (Food & Drug Administration, США) для терапевтических применений. Также для создания амфифильных блок-сополимеров широко применяются гидрофильные полимеры ПЭГ и полиэтиленоксид (ПЭО) [Cheng et al. 2007].

Среди частиц на основе полимеров наиболее активно разрабатываются мицеллы, дендримеры, конъюгаты полимеров с терапевтическим агентом и некоторые другие.

Полимерные мицеллы состоят из амфифильных блок-сополимеров, содержащих гидрофобные и гидрофильные участки. Их отличительной химической особенностью является термодинамическое разделение фаз в водном растворе и формирование супрамолекулярных структур ядро/оболочка. Эта уникальная архитектура позволяет использовать гидрофобное ядро мицелл в качестве нано-депо для терапевтических или контрастирующих агентов и их оболочку как биоспецифическую поверхность для покрытия адресными элементами для активной доставки к клеткам [Guthi et al. 2010]. На данный момент существуют препараты в мицеллярной форме, допущенные для терапевтических применений (например, Genexol-PM – PEG-PLA мицеллы, нагруженные паклитакселом для лечения рака молочной железы и рака лёгких), а также ряд препаратов проходит клинические испытания [Lytton-Jean et al. 2015].

Полимерные дендримеры представляют собой сверхразветвлённые наноструктуры, которые могут иметь контролируемый размер за счёт регулирования слоев полимеризации. По мере полимеризации небольшая плоская молекула трансформируется в сферическую разветвленную наноструктуру с полостями, в которые могут быть встроены терапевтические и/или контрастирующие агенты [Hu et al. 2013; Fréchet 2002].

Особый интерес для диагностики и терапии заболеваний представляют *серебряные и золотые наночастицы* (как сферические, так и наностержни), поскольку они обладают свойством локализованного поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР). Это свойство позволяет использовать такие наночастицы как в качестве оптических меток для визуализации клеточных структур, так и для нагрева их светом для уничтожения раковых клеток (т.е. для гипертермии опухолей) [Popovtzer et al. 2008; Lukianova-Nleb 2011; Huang et al. 2007]. Кроме того, наночастицы серебра обладают высокой антибактериальной [Pal et al. 2007], антивирусной [Lara et al. 2010] и противоопухолевой активностью [Sriram et al. 2010].

Микро- и нанопузырьки – сферические полости, наполненные газом (обычно C_3F_8 , C_4F_{10} и SF_6) и обычно < 10 мкм. Оболочка, содержащая газ, может состоять из денатурированного альбумина, фосфолипидов или различных полимеров и может быть определённым образом модифицирована нацеливающей молекулой. Микропузырьки используются как контрастирующий агент для визуализации воспаления, внутрисосудистых тромбов и опухолей [Janib et al. 2010].

Углеродные нанотрубки – цилиндрические трубки, состоящие исключительно из углерода; могут быть либо одностеночными, либо многостеночными (для обеспечения большей стабильности). Функционализированные нанотрубки, например, конъюгированные с цисплатином и EGF (эпидермальным фактором роста) были использованы как нацеливающий агент на клетки, гиперэкспрессирующие EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) как селективный киллер раковых клеток [Janib et al. 2010]. Также исследуются конъюгаты оксида графена с фолиевой кислотой и фотосенсибилизаторами для фотодинамической терапии [Guthi et al. 2010].

Магнитные наночастицы в силу своей уникальной физической природы обладают широким спектром возможностей для создания терапевтических и диагностических агентов нового поколения.

Существует размер (например, 128 нм для Fe_3O_4 частиц [Leslie-Pelecky and Rieke 1996]), при котором магнитные материалы переходят из мультидоменного в однодоменное состояние и становятся равномерно намагничены по всему объёму, проявляя суперпарамагнитные свойства даже при температуре ниже точек Кюри или Нееля (точки фазового перехода второго рода, которые связаны с изменением свойств симметрии вещества – например, магнитной). При том, что ферромагнетики в отсутствие внешнего магнитного поля обладают спонтанной намагниченностью, суммарная намагниченность суперпарамагнетиков равна нулю. Это свойство позволяет использовать магнитные поля для манипуляции магнитными частицами извне без проблем агрегации в отсутствие внешнего поля, т.е. МНЧ ведут себя независимо и их магнитные моменты не взаимодействуют.

Воздействие внешнего магнитного поля позволяет локализовать частицы в конкретной области организма, частицы могут быть точно количественно детектированы за счёт сигнала внешней магнитной индукции, а также путём оснащения их поверхностью нацеливающими молекулами, могут быть использованы для адресной доставки лекарственных препаратов. Более того, МНЧ можно индукционно нагревать внешним переменным магнитным полем, что используется для гипертермии опухолей [Pankhurst et al. 2003].

2.1.2. Свойства наночастиц для задач терапии и диагностики

Исходя из вышеописанных физико-химических свойств, присущих наночастицам различной природы, рассмотрим основные преимущества наночастиц как агентов для терапии и диагностики заболеваний.

Увеличенная площадь поверхности. Одним из важнейших свойств наночастиц является их размер, который делает их соразмеряемыми с биологическими объектами (здесь имеются в виду, в первую очередь, клетки и их органеллы), являющимися потенциальными мишенями для доставки определённых веществ. Такая соразмерность реализует тесное взаимодействие между наночастицей и её мишенью, порой обеспечивая при этом бóльшую эффективность такого взаимодействия по сравнению с использованием вещества в молекулярной форме. Также важную роль в таком взаимодействии играет большое отношение площади к объёму наночастицы и развитая поверхность, что позволяет иммобилизовать на поверхности частицы различные направляющие молекулы и другие соединения.

Возможность реализации направленной доставки соединений. Системы доставки лекарств на основе наночастиц позволяют доставлять препарат только к определённому типу клеток с патологиями без воздействия на близлежащие здоровые ткани, а внешние воздействия, такие как свет, ультразвук или магнитное поле позволяют избирательно уничтожать такие клетки. Такое свойство наночастицам придает возможность иммобилизации на их поверхности различных направляющих агентов, например, антитела [Montenegro et al. 2013; Wu et al. 2003], трансферрин [Ulbrich et al. 2009; Sahoo et al. 2004], фолиевую кислоту [Leamon and Reddy 2004], аптамеры [Farokhzad et al. 2006], различные пептиды [Torchilin 2008] и другие соединения. Реализованная таким образом доставка терапевтического препарата значительно снижает системную токсичность и увеличивает терапевтический индекс препарата.

Защита терапевтических соединений от деградации. В некоторых случаях необходимо длительное воздействие препарата для достижения лучшего терапевтического эффекта, что зачастую невозможно из-за деградации или быстрого выведения соединения защитными системами организма. В ряде случаев наночастицы, являясь носителями препарата, защищают его от деградации и обеспечивают его длительное, постепенное и контролируемое высвобождение [Cohen et al. 2000, Mesiha et al. 2005].

Увеличение времени циркуляции соединений в кровотоке. Для внутривенно введённых частиц, достаточно длительное время циркуляции в кровотоке является необходимым условием для адресной доставки препарата либо его постепенного высвобождения. Однако наночастицы, будучи введёнными в организм, воспринимаются его иммунной системой как инородные объекты, которые надо обезвредить или уничтожить. Клетки мононуклеарной фагоцитирующей системы эффективно удаляют чужеродные объекты, которые они в состоянии опознать

посредством процесса опсонизации. Однако покрытие поверхности наночастиц гидрофильными полимерными оболочками может защитить их от преждевременного удаления из организма. Это происходит за счёт формирования вокруг наночастицы “гидратной шубы”, которая отталкивает от себя белки плазмы, в том числе и опсонины. Широкое применение для этой цели получил синтетический полимер полиэтиленгликоль (ПЭГ) [Kang et al. 2009]. Кроме того, на успешность избегания иммунного ответа существенное влияние оказывают размер и форма наночастиц [Tao et al. 2011; Owens and Peppas 2006]. Показано, что оптимальные размеры ПЭГилированных частиц лежат в диапазоне ниже 100 нм (для сферических частиц). Слишком маленькие частицы быстро удаляются из организма через почки, а те, которые крупнее 250 нм, слишком заметны для фагоцитов [Alexis et al. 2008]. Однако существует “ПЭГ-дилема”, заключающаяся в том, что придание “невидимости” наночастицам приводит к тому, что ослабевает их взаимодействие с целевыми клетками, таким образом препятствуя эффективной адресной доставке [Hatakeyama et al. 2013]. Данную проблему решают разработкой агентов с трансформируемой архитектурой, например – Нама и соавторы разработали липосомальные наночастицы с меняющимся поверхностным зарядом. При pH 7.4 частицы заряжены отрицательно, однако поверхностный заряд их меняется на положительный при pH < 6.5 (что часто наблюдается в месте локализации опухоли) [Nama et al. 2015]. Также для увеличения времени циркуляции в кровотоке наночастицы покрывают пептидами-производными кластера дифференцировки CD47 как “маркёра своего” [Rodriguez et al. 2013], оболочками эритроцитов или тромбоцитов [Hu et al. 2015; Ding et al. 2015; Hu et al. 2011].

Доставка малорастворимых соединений. Большое количество потенциальных лекарственных препаратов плохо растворимы в воде, что приводит к снижению активности вещества при введении в организм, а вспомогательные вещества при введении такого препарата могут вызывать существенные побочные эффекты. Одним из таких примеров служит паклитаксел – широко применяемый в клинической практике противораковый препарат. Паклитаксел представляет собой трудно растворимое вещество и требует сложной композиции для проведения внутривенного вливания, поэтому поставляется в 50% полиоксиэтилированном касторовом масле (Кремофор EL) – растворителе, вызывающем нежелательные реакции гиперчувствительности. Однако инкапсуляция подобных гидрофобных плохо растворимых в воде веществ в полимерные частицы с гидрофобным ядром и гидрофильной оболочкой (например, в мицеллы) позволяет решить эту проблему [Lee et al. 2013; Lipinski et al. 2001].

Возможность доставки лекарств во внутриклеточное пространство. Гидрофобные наноразмерные носители лекарственных препаратов способны достаточно легко проникать через клеточные мембраны, что в ряде случаев уменьшает токсичность препарата и усиливает

эффективность его действия [Hoffman et al. 2002]. Распространёнными методами интернализации наночастиц в клетки являются диффузия препарата через клеточную мембрану по градиенту концентраций и рецептор-опосредованный эндоцитоз, а также некоторые другие [Torchilin 2006b]. В ряде работ было продемонстрировано, что преимущественно интернализуются в клетки частицы размером около или менее 100 нм. В частности, было показано, что полимерные наночастицы размером 100 нм поглощались в 2.5 и 6 раз эффективнее, чем 1 и 10 мкм частицы, соответственно в клеточной линии Caco-2 [Desai et al. 1997]. Подобные результаты были получены и в других работах, на других клеточных линиях. Также на примере квантовых точек была продемонстрирована общая зависимость путей интернализации наночастиц от их размера [Kelf et al. 2010] (**рис. 2**).

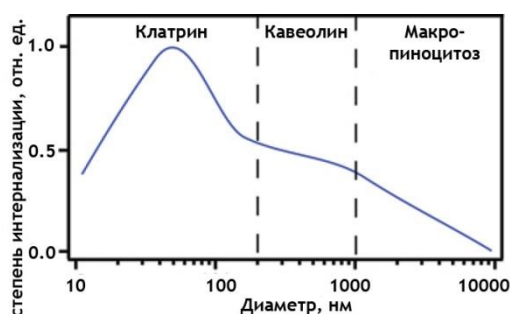


Рис. 2. Общий вид зависимости путей интернализации (клатрин-зависимый, кавеолин-зависимый эндоцитоз и макропиноцитоз) квантовых точек в зависимости от их размера, полученный на основе результатов для разных клеточных линий и типов квантовых точек. Адаптировано из [Kelf et al. 2010].

Возможность преодоления защитных барьеров организма. Чрезвычайно малые размеры наночастиц облегчают их проникновение через различные биологические барьеры с целью доставки лекарств. Пероральный прием препарата является наиболее предпочтительным для пациента, однако во многих случаях это невозможно из-за деградации вещества в желудочно-кишечном тракте и низкой проницаемости кишечного барьера. Полимерные наночастицы могут не только защитить инкапсулированное вещество от деградации и увеличить время пребывания препарата в желудочно-кишечном тракте, но и повысить эффективность их проникновения через слизистую оболочку [Desai et al. 1996]. В этих целях был создан ряд наночастиц с инкапсулированными гепарином, инсулином, пептидами и паклитакселом [Feng 2004; Jiao 2002; Takeuchi et al. 2001].

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) также является значительным препятствием для доставки лекарств. Он формируется плотными контактами между эндотелиальными клетками капилляров и защищает центральную нервную систему от возможных вредоносных веществ в крови. Таким образом, преодоление ГЭБ является существенной проблемой для лечения тяжёлых заболеваний головного мозга, таких как опухоли или рассеянный склероз. Однако в

ряде работ было продемонстрировано успешное проникновение наночастиц с терапевтической нагрузкой через ГЭБ – например, магнитных наночастиц для лечения рассеянного склероза (**рис. 3**) [McAteer et al. 2007] и полимерных наночастиц для терапии глиобластомы [Xin et al. 2012].

Такую способность проникновения через ГЭБ наночастицы приобретают, вероятно, благодаря процессу трансцитоза через клетки эндотелия, не воздействуя при этом на плотные контакты (**рис. 4**) [Kreuter 2013].

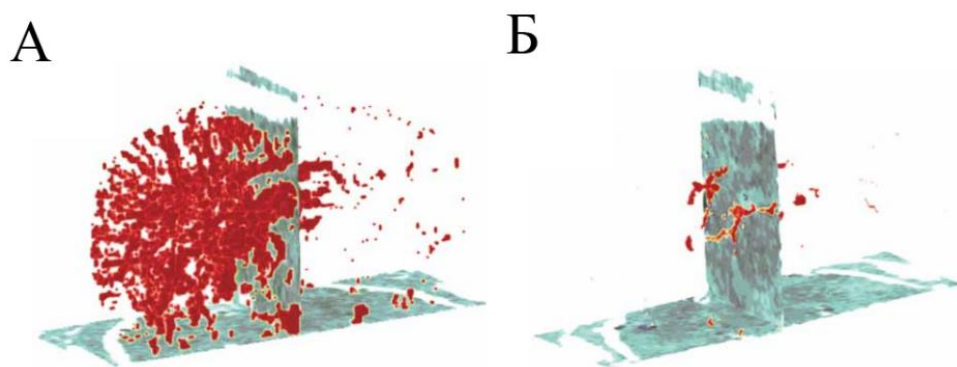


Рис. 3. Объемная прижизненная визуализация методом МРТ экспрессии VCAM-1 (молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 типа, которая экспрессируется в сосудистом эпителии при ряде воспалительных процессов и является одним из средств привлечения лейкоцитов из крови в ткань). **А)** Стимуляция воздействием $\text{IL-1}\beta$ в левом полушарии мозга мыши с помощью магнитных наночастиц, конъюгированных с анти-VCAM-1 антителом. **Б)** Предварительное воздействие анти-VCAM-1 антител ингибировало накопление МНЧ в мозге мыши [McAteer et al. 2007].

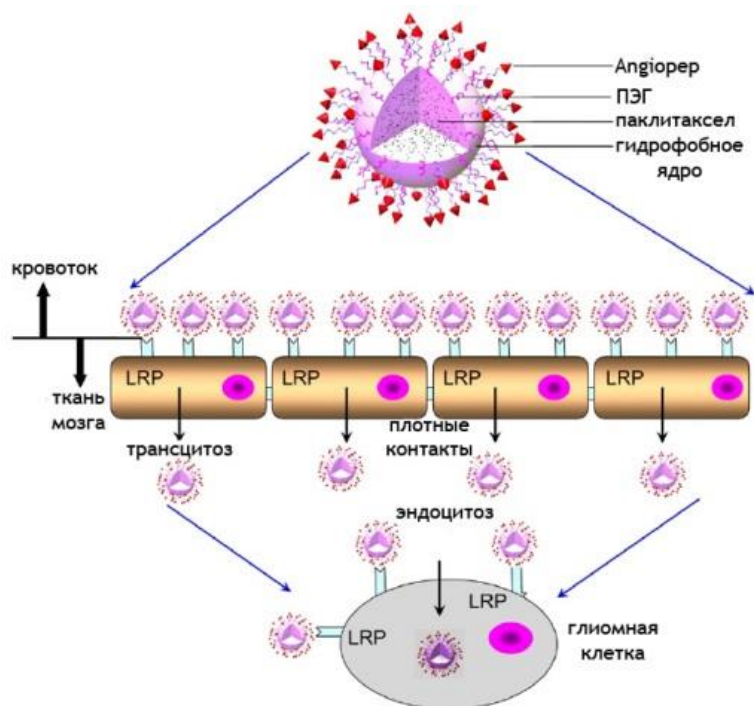


Рис. 4. Схема доставки полимерных наночастиц, оснащенных паклитакселом, конъюгированных с пептидом Angioper с помощью LRP (receptor related protein)-опосредованного эндоцитоза. Адаптировано из [Kreuter 2013].

2.2. Применения магнитных наночастиц в биологии и биомедицине

В настоящее время синтезирован широкий спектр магнитных наночастиц: на основе металлов Co, Fe, Ni, оксидов железа, ферритов $MgFe_2O_4$, $CoFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$, $LiFe_5O_8$, а также $CoPt$, $FePt$, $MnAl$, $SmCo_5$, $Fe_{14}Nd_2B$. Оксидные частицы обладают более слабыми магнитными свойствами, чем наночастицы на основе металлов, однако устойчивы к окислению. В настоящее время наиболее широкое применение в биомедицине получили частицы оксида железа, что обусловлено их низкой токсичностью и стабильностью магнитных характеристик. Существует несколько стратегий синтеза наночастиц: механические (диспергирование), физические (применение высокоэнергетических воздействий), химические (синтез или разложение) и физико-химические методы. Используют также наночастицы магнетита биогенного происхождения, формирующиеся магнитотактическими бактериями [Araujo et al. 2015].

Благодаря уникальному набору свойств МНЧ используются в различных фундаментальных исследованиях, а также для биомедицинских применений как *in vitro*, так и *in vivo*, некоторые из которых подробно описаны ниже.

2.2.1. Применения магнитных наночастиц *in vitro*

2.2.1.1. Изучение механических свойств живых клеток

Одним из самых ранних применений магнитных частиц (МЧ) (использовались 16 мкм никельные частицы) было исследование механических свойств цитоплазмы клетки. Прослеживалось смещение частиц внутри цитоплазмы в зависимости от приложенного магнитного поля для измерения вязкости цитоплазмы [Seifriz 1924]. Позднее был предложен ряд аналогичных подходов с использованием меньших по размеру суперпарамагнитных частиц для изучения механических свойств клетки.

Например, de Vries и коллеги разработали “магнитный пинцет” для изучения свойств хроматина клетки (рис. 5). Была произведена микроинъекция 0.5 мкм МЧ в ядро клетки HeLa и движение частицы внутри клетки прослеживали с помощью оптического микроскопа. Результаты показали, что хроматин в клетке – достаточно жесткая структура с модулем Юнга $2.5 \cdot 10^2$ Па.

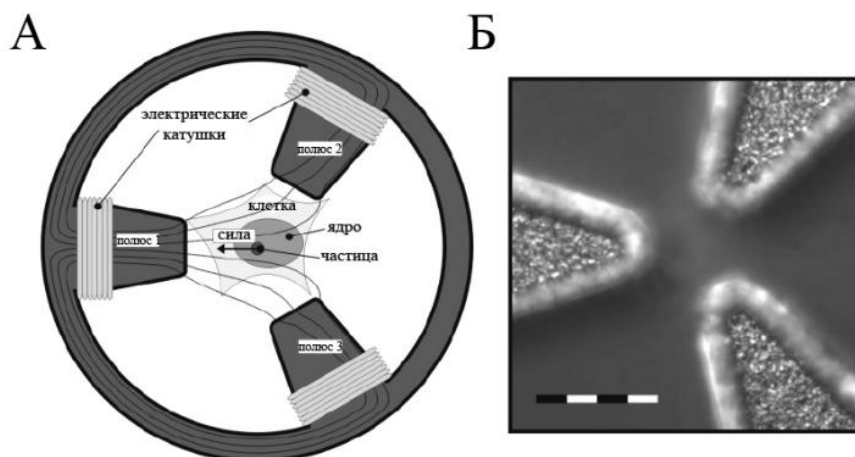


Рис. 5. Изучение свойств хроматина клетки с помощью магнитного пинцета. **А)** Схема эксперимента. Магнитные полюса (толщиной 6 мкм) создают силу, действующую на парамагнитную частицу в ядре клетки линии HeLa. Электрические катушки позволяют контролировать амплитуду и направление силы. **Б)** Оптическое изображение данной конструкции (шкала 20 мкм). Адаптировано из [de Vries, Anthony H B et al. 2007].

Также для изучения реакции клеток на механическое воздействие была создана подложка с выступами в виде столбиков, некоторые из которых содержали магнитные наностержни из кобальта. Воздействие внешнего магнитного поля отклоняло такой столбик, позволяя тем самым изучать ответ клеток на механическое воздействие, а именно – натяжение. Известно, что клетки прикрепляются к субстрату небольшими дискретными участками клеточной поверхности; эти участки адгезии называют фокальными контактами. Было продемонстрировано, что в результате механической стимуляции возрастает площадь фокальной адгезии, означая тем самым, что клетки реагируют на силу натяжения (**рис. 6**) [Vitol et al. 2012; Sniadecki et al. 2007].

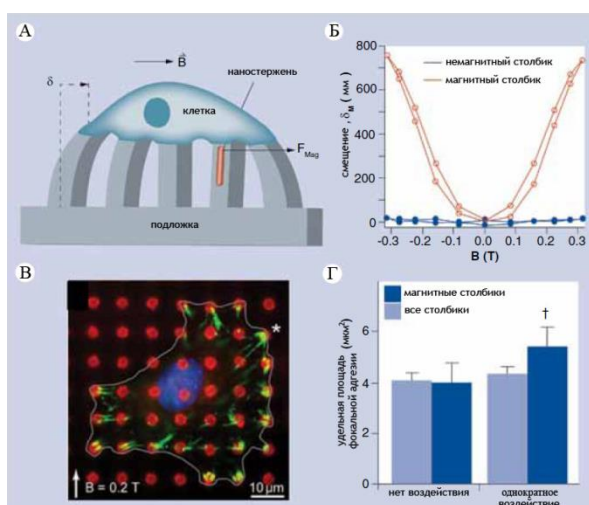


Рис. 6. Влияние на клеточную адгезию механического воздействия. **А)** Силы, действующие на одиночную клетку. **Б)** Смещение магнитных и немагнитных столбиков под воздействием магнитного поля – B , Тесла. **В)** Флуоресцентное изображение фокальных контактов. Звёздочкой обозначен столбик, содержащий магнитный стержень. **Г)** Площадь фокальных контактов до и после воздействия магнитного поля. Адаптировано из [Vitol et al. 2012; Sniadecki et al. 2007].

2.2.1.2. Биосенсоры на основе магнитных частиц

Многообещающая область применения магнитных частиц – создание высокочувствительных биосенсоров [Hsing et al. 2007; Janssen et al. 2008; Tan et al. 2004]. Для достижения специфичности связывания с детектируемыми объектами МНЧ конъюгируют с моно- и поликлональными антителами, создавая таким образом системы для обнаружения широкого класса патогенов [Gu et al. 2006; Morisada et al. 2002]. Также существует удобный и чрезвычайно чувствительный метод обнаружения и очистки ДНК (мРНЧ) в биологических образцах, основанный на способности нуклеиновых кислот к гибридизации. Поверхность МНЧ модифицируют определённой олигонуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности, которую необходимо обнаружить. На основе этого метода был разработан подход, позволяющий проводить SNP-анализ (выявление последовательностей, отличающихся по одному нуклеотиду). Данный метод был успешно применён в буферных растворах и образцах лизата раковых клеток, содержащих различные белки и случайные последовательности ДНК с очень высокой чувствительностью – обнаружение материала при фемтомолярных концентрациях. А полученный таким образом материал может быть использован в дальнейшем для постановки ПЦР в режиме реального времени (**рис. 7**) [Zhao et al. 2003b].

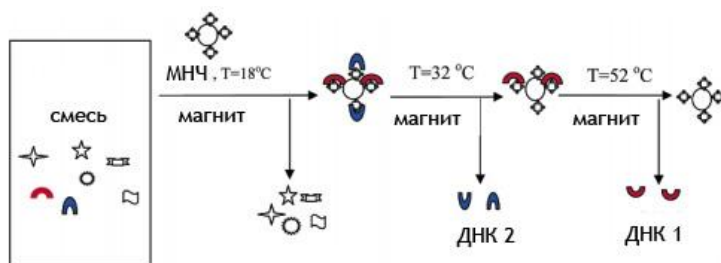


Рис. 7. Схема эксперимента по выделению двух образцов ДНК (ДНК 1 и ДНК 2), основанному на разнице их температур плавления. Адаптировано из [Zhao et al. 2003b].

На основе магнитных наночастиц созданы высокочувствительные биосенсоры, позволяющие исследовать межмолекулярные взаимодействия (белок-белковые, ДНК-ДНК и ферментативные), используя измерения времени магнитной релаксации и магнитный резонанс [Perez et al. 2002], также разработан метод исследования каталитической активности протеаз на основе суперпарамагнитных НЧ [Zhao et al. 2003a].

Также существует высокочувствительный метод детекции нелинейных магнитных материалов на комбинаторных частотах, позволяющий детектировать магнитные материалы как *in vitro*, так и неинвазивно *in vivo* при комнатной температуре в режиме реального времени. При детекции вклад диа- и парамагнетиков (вода, пластик, стекло, ткани и другие материалы,

окружающие детектируемые метки в больших количествах) в основной сигнал равен нулю, а предел обнаружения составляет несколько нанogramм Fe_3O_4 в 100 мкл объема, что совпадает с уровнем чувствительности МНЧ, синтезированных на основе изотопов ^{59}Fe по γ -излучению [Nikitin et al. 2009; Nikitin et al. 2008]. На основе данного метода был разработан магнитный иммуноанализ (МИА) и проведена высокочувствительная детекция токсинов в цельном молоке без предварительной пробоподготовки (**рис. 8**) на примере стафилококкового энтеротоксина А и токсина синдрома токсического шока с пределом детекции 4 пг/мл и 10 пг/мл, соответственно [Orlov et al. 2013].

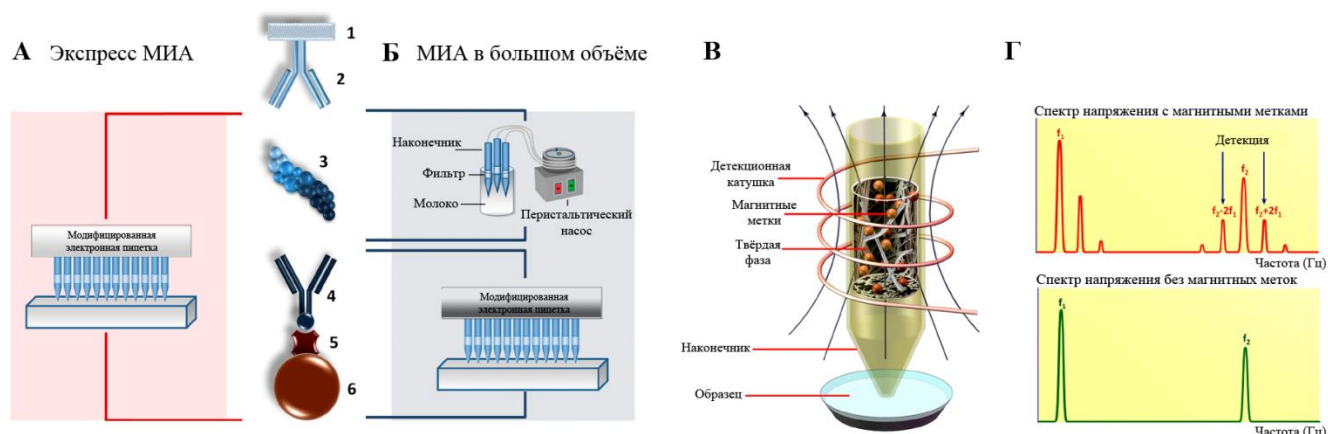


Рис. 8. МИА на 3D фильтрах. 1 – поверхность 3D фильтра (твёрдая фаза), 2 – антитело, 3 – антиген, 4 – биотинилированное антитело, 5 – стрептавидин, 6 – МНЧ. А) Экспресс МИА. Б) МИА в большом объёме. В), Г) Детекция МНЧ по их нелинейному отклику на комбинаторных частотах в объёме 3D твёрдой фазы (фильтра), помещённой внутрь наконечника пипетки. Адаптировано из [Orlov et al. 2013].

2.2.1.3. Магнитная сепарация

В фундаментальных и прикладных исследованиях часто необходимо отделить определённые биологические объекты от их окружения (например, для того, чтобы сконцентрировать образец для дальнейшего анализа или другого использования). Одним из способов достижения этой цели является магнитная сепарация – наличие магнитных свойств обеспечивает лёгкость детекции, выделения и концентрирования интересующих биообъектов.

Как правило, это двухстадийный процесс. Первый шаг – мечение требуемого биологического материала (возможно благодаря химической модификации поверхности магнитной наночастицы биосовместимыми молекулами – декстраном, поливиниловым спиртом, фосфолипидами, специфическое связывание с поверхностью клетки может быть произведено с помощью антител или других биологических макромолекул – гормонов или фолиевой кислоты). Второй шаг – отделение этих меченых структур с использованием магнитного сепаратора на жидкостной основе.

Магнитные свойства наночастиц лежат в основе создания методов выделения и очистки нуклеиновых кислот и белков, также метод магнитной сепарации нашел применение в подготовке образцов для MALDI масс-спектрометрии [Jeng et al. 2007].

Магнитные наночастицы, оснащённые антителами, используются для обнаружения раковых клеток в периферической крови, что позволяет оценивать эффективность химиотерапии, а также выделять клетки методом магнитной сепарации [ZIGEUNER et al. 2003; Kularatne et al. 2002]. МНЧ также используют для цитологических исследований, например, создан высокочувствительный метод цитометрического анализа образцов цельной крови, в основе которого – связывание клеток с ферромагнитными НЧ, конъюгированными с антителами и их последующее выстраивание вдоль ферромагнитных полосок микрометрового масштаба на подложке [Tibbe et al. 1999].

2.2.1.4. Магнетофекция

Одно из достаточно новых применений МНЧ – их использование в генной доставке. Невирусные векторы, такие как комплексы плазмидной ДНК с катионными липидами или полимерами, известные как липоплексы и полиплексы, рассматриваются как привлекательная альтернатива системам доставки генетического материала, использующим вирусы. В отличие от вирусов, использование липоплексов не связано с опасностью появления нежелательных иммунных реакций или мутаций, но их эффективность часто недостаточна для терапевтических целей и требует более высокого уровня трансфекции, чем тот, который удалось достичь в настоящее время [Tarahovsky 2009]. Исходя из необходимости повышения эффективности трансфекции, был разработан физический метод доставки нуклеиновых кислот в клетку – магнетофекция [Plank et al. 2003; Plank and Rosenecker 2009]. Независимо от типа вектора, контакт вектора с клеткой является первым шагом на пути к успешной трансфекции, что зачастую ограничивается его диффузией в культуральной среде, а это очень медленный процесс. Более того, при длительном пребывании в среде некоторые типы векторов инактивируются, а большая их концентрация может оказаться токсичной для клеток.

Одним из способов увеличения эффективности данного процесса является воздействие магнитного поля на липоплексы или полиплексы, которые ассоциированы (например, за счёт электростатического взаимодействия, либо системы биотин:стрептавидин, либо антиген:антитело) с магнитными наночастицами. После того, как векторы каким-либо образом связаны с МНЧ, они добавляются в культуральную среду и подвергаются воздействию постоянного магнитного поля в течение нескольких минут. Таким образом преодолеваются ограничения по диффузии и снижается требуемая эффективная концентрация вектора, что способствует повышению эффективности трансфекции/трансдукции. Сравнительная

эффективность магнетофекции в сравнении с классическим методом представлена на **рис. 9** [Mykhaylyk et al. 2007].

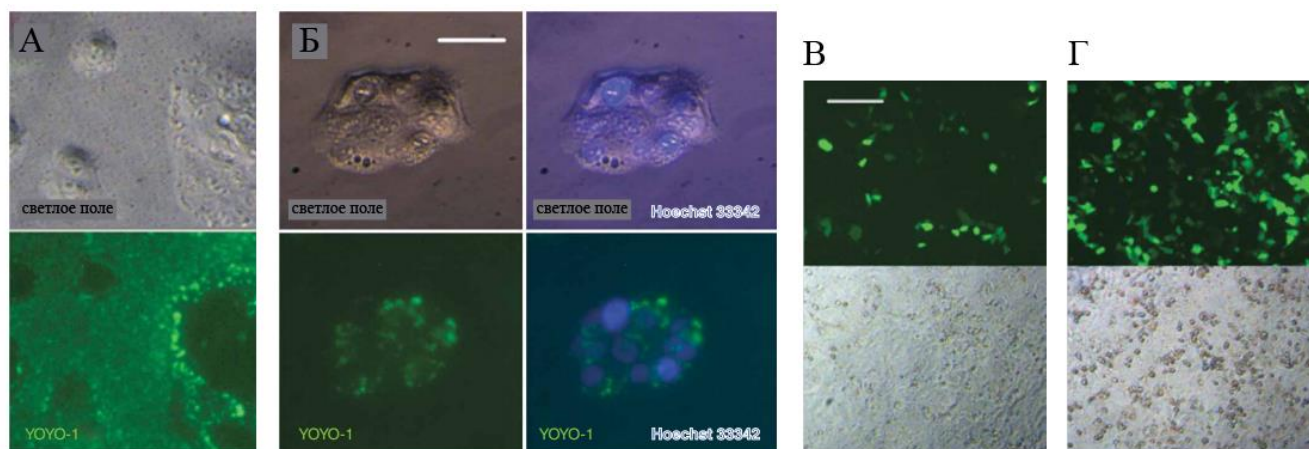


Рис. 9. Экспрессия GFP и ассоциация эпителиальных клеток лёгкого H441 с трансфекционными комплексами. H441 клетки были инкубированы 30 минут на магнитном планшете с трансфекционным комплексом PEI-Mag2/Metafectene-Pro/pBLuc/YOYO-1 при концентрации ДНК 250 нг/25000 клеток/0.33 см²; массовое отношение Fe/ДНК 0.5, 4 мл Metafectene-Pro/1 мг ДНК и наблюдались через (А) 30 мин и (Б) 3 часа во флуоресцентный микроскоп. H441 клетки были инкубированы 30 минут с (В) Metafectene-Pro/pBeGFP дуплексами или (Г) PEI-Mag2/Metafectene-Pro/pBeGFP триплексами на магнитном планшете и исследовались через 24 часа после трансфекции методом флуоресцентной микроскопии. Шкала 50 нм (А, Б) и 200 нм (В, Г). Как контрастирующий краситель для ядра был использован Hoechst 33342. Адаптировано из [Mykhaylyk et al. 2007].

2.2.1.5. Молекулярный биокомпьютинг

Среди широкого разнообразия органических и неорганических наноструктурированных материалов, особое место принадлежит такому классу соединений, как “умные” материалы (“*smart materials*”), которые способны изменять свои свойства и поведение (например, высвободить низкомолекулярные соединения или активировать ферментативную активность) под воздействием внешних импульсов. В качестве таких импульсов могут выступать, например, изменение температуры, pH, воздействие светом, магнитными полями или ультразвуком [Mura et al. 2013; Song and Yang 2015]. Отдельным классом “умных” материалов являются системы, выполняющие логические операции под воздействием внешних стимулов и принимающие решения на основании проведённого логического анализа.

Необходимость новых подходов к компьютерным вычислениям и обработке информации (как цифровой, так и биохимической) породила создание и развитие двух принципиально разных направлений: квантовых компьютеров и молекулярного биокомпьютинга [Katz 2012; Miyamoto et al. 2013; Venenson 2012]. Был продемонстрирован ряд подходов к созданию биокомпьютерных систем (биороботов) на основе биомолекул, наночастиц и даже и живых организмов (**рис. 10**), имитирующих булевы логические операции и выполняющих базовые арифметические действия. Такие системы могут анализировать

различные биохимические сигналы согласно заранее заданной функции и генерировать бинарный ответ в формате “ДА”/”НЕТ” (или, “0”/”1”) без использования электроники. Впервые возможность выполнения логических функций была продемонстрирована с использованием молекул ДНК для решения задачи коми-вожжёра [Adleman 1994]. Позже был создан ряд систем на основе ДНК/РНК [Ezziane 2006; Stojanovic et al. 2014], олигопептидов [Ashkenasy et al. 2011], белков [Unger and Moulton 2006] / ферментов [Katz and Privman 2010], наночастиц [Motornov et al. 2008; Freeman et al. 2009; Liu and Lu 2006; Maltzahn et al. 2007] и на основе бактериальных клеток [Arugula et al. 2012]. Одним из очевидных преимуществ биоконьютерных систем является их способность к интеграции в сложные биологические каскады, имитирующих многоступенчатую обработку информации в электронике. Такие многоступенчатые каскады продемонстрировали возможность выполнения простых арифметических операций [Benenson 2011; Stojanovic and Stefanovic 2003; Baron et al. 2006], реализации игр [Stojanovic and Stefanovic 2003; Pei et al. 2010] и принятия многовариантных логических решений [Qian et al. 2011]. До настоящего времени только системы на основе ДНК/РНК позволяли реализовать полную систему булевых функций для двух входных сигналов (см. Приложение 1).

Однако сложность обработки получаемой такими системами биохимической информации препятствует (по крайней мере, на сегодняшний день) их успешному конкурированию с традиционными или квантовыми компьютерами [Privman and Katz 2015; Pischel et al. 2013]. Тем не менее, активно развиваются другие направления в области биоконьютинга, а именно создание биосенсоров нового поколения и разработка средств тераностики [Mailloux and Katz 2014].

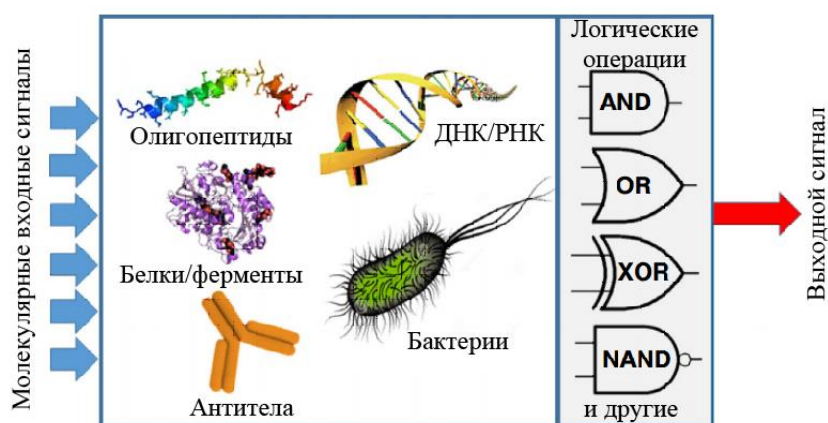


Рис. 10. Инструменты для конструирования вычислительных биоконьютерных комплексов. Адаптировано из [Katz 2015].

Ряд заболеваний характеризуется изменением количества низкомолекулярных соединений в крови и других биологических жидкостях, рецепторов, экспрессируемых на поверхности клеток или внутриклеточных соединений. Однако исключительно редко возможна

полная идентификация заболевания лишь по одному биохимическому параметру. Автономные биороботы, анализирующие набор вышеописанной биохимической информации, и принимающие решение на основании анализа (например, связывание с клеткой, высвобождение токсина, индукция апоптоза) являются перспективными средствами тераностики. Более того, использование наночастиц, обладающих рядом уникальных свойств, недоступных для молекул, и дополненных биокомпьютерными возможностями, представляют огромный потенциал для создания тераностических средств нового поколения. В частности, были разработаны нанороботы на основе ДНК-бочки, нагруженной либо несколькими Fab-фрагментами антител, либо 5 нм золотыми частицами, которые доставлялись к клеткам на основе выполнения логической функции “И”, т.е. тогда и только тогда, когда присутствовало одновременно два входных сигнала [Douglas et al. 2012].

Однако при том, что использование нанороботов на основе наночастиц и биомолекул выглядит многообещающим для задач биомедицины, для применения таких систем *in vivo* предстоит решить ещё ряд важных задач. В частности, ранее была продемонстрирована доставка биороботов *in vivo* к клеткам гемолимфы в организме насекомого – таракана *Blaberus discoidalis* [Amir et al. 2014], однако, по словам авторов, данная модель *in vivo* была использована ввиду низкой системной нуклеазной активности и хорошей химической совместимости со структурами ДНК. Использование биокомпьютерных комплексов для молекулярных вычислений в более сложном организме, а именно млекопитающем, требует разработки совместимых с кровью и другими биологическими жидкостями систем.

2.2.2. Применения магнитных наночастиц *in vivo*

2.2.2.1. Применение магнитных частиц в качестве контрастирующих агентов для МРТ-диагностики и для детекции сторожевых лимфоузлов

МНЧ – достаточно новый класс контрастирующих агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ). Первоначально МНЧ были использованы для МРТ диагностики печени (Feridex I.V.®) и желудочно-кишечного тракта (Gastromark ®), однако дальнейшие исследования показали, что маленькие суперпарамагнитные наночастицы способны эффективно накапливаться в сторожевых лимфоузлах – лимфатических центрах, куда с первой очередь осуществляется отток лимфы из опухолевой ткани и которые наиболее подвержены поражению метастазами.

Sinerem® (Combidex® в США) – суперпарамагнитные МНЧ, разработанные для детекции и характеристики лимфоузлов, поражённых метастазами при МРТ-анализе у пациентов с раком органов таза. Однако данный препарат был снят с производства в 2007 году

в связи с недостаточной достоверностью данных об эффективности препарата на III стадии клинических испытаний. Тем не менее, разработки новых методов обнаружения сторожевых лимфоузлов при терапии раковых заболеваний на основе МНЧ продолжают развиваться, поскольку методы, применяемые сейчас для идентификации сторожевых лимфоузлов – лимфосцинтиграфия (радиоактивные препараты “Наноцис”, “Лимфоцис”), хромолимфография (препараты, содержащие довольно токсичный краситель синего цвета “Лимфазурин”, “Патент-блю”) обладают рядом серьёзных недостатков. Недостатки связаны с токсичностью и невозможностью количественной оценки окраски в случае применения красителя. МНЧ обладают существенным преимуществом в том, что они могут дать точный количественный сигнал и обладают значительно меньшей токсичностью (хотя вопрос о токсичности и выведение МНЧ из организма на сегодняшний день остается открытым, очевидно их преимущество перед радиоактивными препаратами и веществами, вызывающими острую токсичность).

Следует отметить, что данные проблемы стимулируют развитие новых подходов в данной области не только с использованием МНЧ, но и, например, с использованием квантовых точек [Soltész et al. 2005].

2.2.2.2. Гипертермия опухолей

Одно из важнейших возможных применений магнитных частиц – локальная управляемая гипертермия опухолей. Эта процедура заключается в следующем: МНЧ должны быть доставлены к раковым клеткам, и затем, посредством воздействия внешнего переменного магнитного поля достаточной интенсивности и частоты эти частицы нагреваются за счёт механизмов релаксации, тем самым нагревая раковые клетки. Здесь для воздействия на раковые клетки используется их повышенная чувствительность к температуре – если она будет поддерживается выше определённого порога (41-47 °С) в течение приблизительно получаса и более, то клетка разрушается.

Эффективность магнитного нацеливания для гипертермии (а также защиту близлежащей здоровой ткани) можно повысить за счёт конъюгации наночастиц (или поверхности магнитолипосом) с высоко специфичными молекулами. Например, проведены успешные эксперименты гипертермии карциномы *in vitro* и *in vivo* магнитолипосомами, несущими на поверхности Fab-фрагменты антител [Ito et al. 2005].

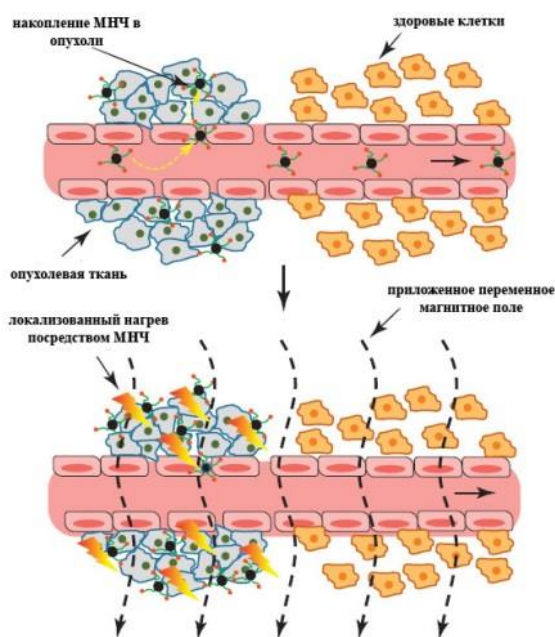


Рис. 11. Принцип магнитной гипертермии основан на преимущественном накоплении МНЧ в опухолевой ткани по сравнению с нормальными тканями. МНЧ подвергаются воздействию переменного магнитного поля, что заставляет их поглощать энергию, высвобождая её в виде тепла в процессе релаксации. Было показано, что опухолевые ткани обладают повышенной чувствительностью к температуре в диапазоне 41-47 °С. Адаптировано из [Cole et al. 2011].

2.2.2.3. Адресная доставка наночастиц

Один из главных недостатков химиотерапии – относительная неспецифичность: лекарственный препарат вводится внутривенно, вызывая системную интоксикацию организма, причем препарат требуется вводить в довольно больших количествах. На сегодняшний день большой интерес представляет использование магнитных наночастиц как агентов для адресной доставки лекарственных препаратов: ввод наноагентов в кровотоки и их фокусировка при помощи градиента магнитного поля в необходимых органах или тканях организма. Этим преследуются следующие цели: уменьшение системного распределения цитотоксического лекарства в организме и, как следствие, побочных эффектов для организма в целом и сильное снижение количества вводимого препарата пациенту.

2.3. Механизмы адресной доставки

2.3.1. Пассивная адресная доставка

Благодаря своему размеру, МНЧ могут накапливаться во многих опухолевых тканях за счёт эффекта повышенной проницаемости сосудов в месте опухоли. Эндотелиальные клетки нормальных тканей плотно упакованы и являются существенным барьером для проникновения

МНЧ. Данные различия в проницаемости сосудов обеспечивают селективность доставки МНЧ (рис. 12А).

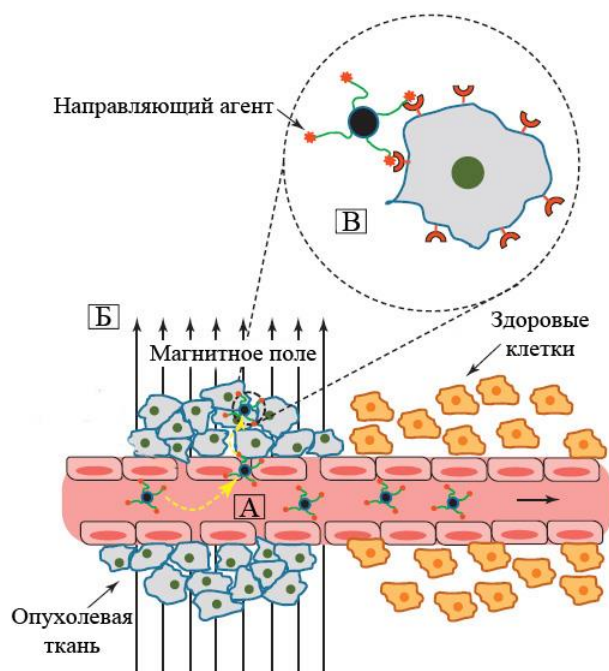


Рис. 12. Возможные механизмы направленной доставки частиц к клеткам-мишеням. **А)** Пассивная доставка. Эффект повышенной проницаемости сосудов. **Б)** Активная доставка – лиганды к структурам, специфически представленным на плазматической мембране раковых клеток, могут быть использованы для усиления накопления МНЧ в опухолевой ткани, а также могут усилить интернализацию МНЧ посредством эндоцитоза. **В)** Магнитная фокусировка МНЧ. Необходимо отметить, что каждая из форм адресной доставки, представленная на схеме, может использоваться совместно с другими в зависимости от конкретной разрабатываемой стратегии. Адаптировано из [Cole et al. 2011].

2.3.2. Активная адресная доставка

Одновременно с механизмом пассивного проникновения магнитных наночастиц в опухоль, может быть достигнуто активное накопление частиц посредством взаимодействия частиц, модифицированных нацеливающими элементами. Данные элементы специфически связываются со структурами, гиперэкспрессируемыми или специфически представленными на плазматической мембране клеток.

Обычно магнитная составляющая наноагента (как правило, магнетит Fe_3O_4 или маггемит $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) покрыта биосовместимым полимером (ПВА, декстран, ПЭГ и др.), или, например, таким неорганическим покрытием, как SiO_2 . Оболочка также может быть модифицирована присоединением функциональных групп, биотина, (стрепт)авидина, карбодимидов и других молекул. Как схематически представлено на **рис. 13**, эти молекулы используются для того, чтобы присоединить цитотоксическое вещество, визуализирующий агент или, например, антитело для последующей доставки этого комплекса к клеткам организма.

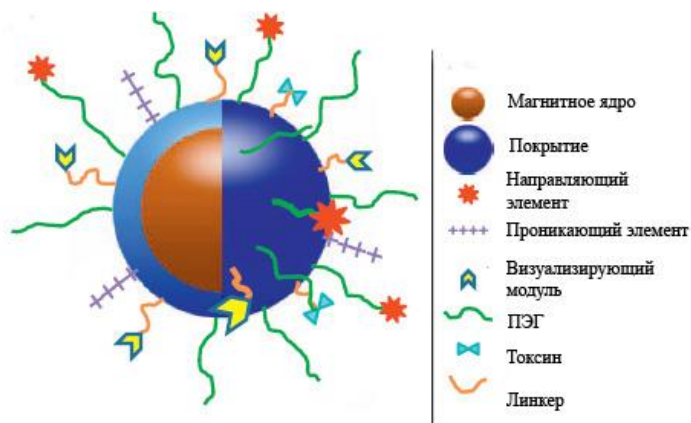


Рис. 13. Схема МНЧ типа “ядро-оболочка” с поверхностью, модифицированной различными элементами. Адаптировано из [Cole et al. 2011].

Как правило, большое количество идентичных лигандов присоединяется к поверхности частицы для усиления мультивалентного связывания с клеткой-мишенью (**рис. 12Б**).

В магнитоуправляемой адресной доставке (направление, получившее название *Magnetic Drug Targeting* – MDT) цитотоксическое лекарство прикрепляется к биосовместимому магнитному наноагенту. Комплекс лекарство/носитель вкалывается пациенту в систему кровообращения. Когда частицы входят в кровоток, включается высокоградиентное магнитное поле для того, чтобы сконцентрировать эти комплексы у цели (**рис. 12В**). Когда система лекарство/носитель доставлена к цели, лекарство высвобождается, воздействуя на целевые клетки. Для увеличения эффективности доставки разрабатывают импланты из нержавеющей ферритной стали, фокусирующие МНЧ эффективнее, чем внешние источники магнитных полей [Lueshen et al. 2015], а также используют комбинацию внешних источников магнитного поля и имплантов в виде ферромагнитных микростержней [Hounkumnuard and Natenapit 2013].

Так, например, MDT позволила достичь полной ремиссии при инъекции наночастиц оксида железа с химиотерапевтическим препаратом – митоксантроном в кровоток кролика и внешней фокусировкой магнитным полем, при этом накопление митоксантрона в опухоли увеличилось с 0.7% до 57.2% по сравнению с введением вещества в молекулярной форме [Tietze et al. 2013].

Также на основе магнитных свойств материалов разрабатывают системы визуализации целого организма, например, технология MPI (Magnetic Particle Imaging) [Borgert et al. 2013; Gleich and Weizenecker 2005].

Таким образом, МНЧ могут одновременно использоваться для визуализации клеточных структур и для адресной доставки к ним лекарственных препаратов. Комплексное воздействие на организм, одновременно объединяющее в себе диагностические и терапевтические задачи в

биомедицине носит название “тераностика” (или “терагностика”, *theranostics*: греч. *thera(peia)* – забота, уход, лечение и (*diag*)*nostiko* – способный распознавать).

Сам термин “тераностика” имеет 2 определения. Одно, более широкое, означает использование персонифицированной медицины на основе предварительной диагностики. Второе, более узкое определение, означает объединение диагностического и терапевтического агента на одной платформе [Janib et al. 2010]. Таким образом, тераностические наночастицы являются многофункциональными структурами благодаря сочетанию диагностических и терапевтических свойств.

Часто стоит задача доставки соединения к внутриклеточным структурам, при этом последовательность нескольких мембранных слоев является существенным препятствием для такой доставки. Во время этого процесса соединение теряет свою функциональность из-за неэффективного проникновения через биологические мембраны. Степень проникновения через мембрану прямо связана с полярностью молекулы; неполярные или липофильные молекулы легче преодолевают этот барьер, в основном за счёт диффузии. Тем не менее, ситуация, связанная с доставкой лекарственного препарата, намного сложнее, так как множество других клеточных процессов прямо воздействуют на внутриклеточную концентрацию и эффективность терапевтического агента. Различная эффективность эндоцитоза, внутриклеточного передвижения, высвобождения терапевтического агента в цитоплазму, распространение и перемещение его к требуемой цели и высвобождение его в ядро и другие органеллы сильно меняет реальную активность терапевтического агента.

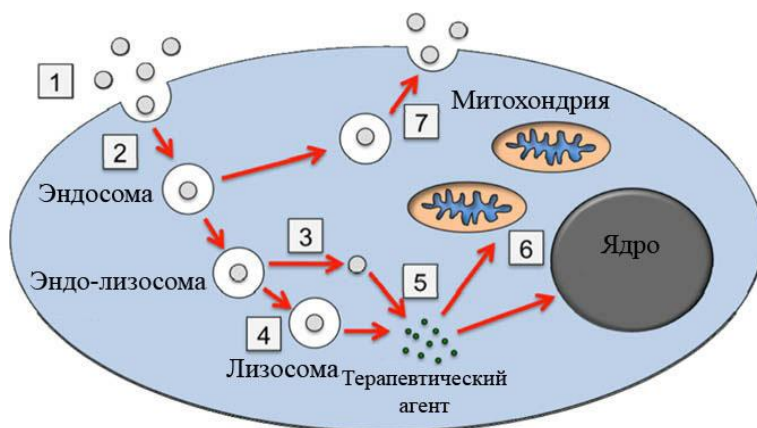


Рис. 14. Этапы, детализирующие цитозольную доставку терапевтического агента посредством наночастиц как носителей. (1) Ассоциация наночастиц с клеткой, (2) интернализация наночастиц посредством эндоцитоза, (3) эндосомальное высвобождение наночастиц или (4) липосомальная деградация наночастиц, (5) свободное распространение терапевтического агента в цитоплазму, (6) цитоплазматический транспорт терапевтического агента к целевой органелле, (7) экзоцитоз наночастиц. Адаптировано из [Faraji and Wipf 2009].

Наночастицы могут позволить избежать такой “растраты” путём экранирования соединения от биологического окружения путём эндоцитоза и последующего высвобождения

соединения. Эндоцитоз заключается в процессе захвата и поглощения внешнего материала клеточной мембраной и включает в себя три подтипа: фагоцитоз, пиноцитоз и рецептор-опосредованный эндоцитоз. Фагоцитоз – процесс поглощения объектов размером до 10 мкм, осуществляется клетками ретикулоэндотелиальной системы, нейтрофилами и дендритными клетками. Пиноцитоз осуществляется практически всеми типами эукариотических клеток, обычно это поглощение субмикронных объектов и веществ. Более крупные частицы поглощаются преимущественно фагоцитами, в то время как мелкие – практически всеми типами клеток. Эта отличительная особенность наночастиц может быть использована для адресной доставки широкого спектра терапевтических агентов к различным типам клеток [Faraji and Wipf 2009].

2.3.2.1. Рецептор-опосредованный эндоцитоз

Рецептор-опосредованный эндоцитоз открывает широкие возможности для высокоспецифичной адресной доставки. Клеточная мембрана покрыта множеством рецепторов, которые посредством внеклеточного связывания со специфичным лигандом (или наночастицами, которые модифицированы данным лигандом) передаёт сигнал внутрь клеточного пространства. Этот сигнал может служить началом запуска множества биохимических реакций, также может привести к интернализации лиганда (и наночастиц) посредством эндоцитоза. Различие в экспрессии рецепторов между клеточными типами может использоваться для активной адресной доставки.

Одна из ключевых ролей в регулировании метаболических путей в клетке принадлежит протеинкиназам (подкласс ферментов фосфотрансфераз). Протеинкиназы модифицируют другие белки путём фосфорилирования остатков аминокислот, имеющих гидроксильные группы (серин, треонин и тирозин) или гетероциклический атом азота гистидина.

Протеинкиназы могут быть классифицированы по типу специфичных аминокислот на тирозиновые, серин/треониновые и гистидин-специфичные, а также киназы двойной специфичности (специфичные к остаткам серина, треонина и тирозина).

Тирозинкиназные рецепторы, которые включают в себя тирозинкиназу, активируют множество сигнальных путей, приводящих к клеточной пролиферации, дифференцировке и метаболическим изменениям в клетке [Schlessinger and Ullrich 1992]. Более того, повышение активности тирозинкиназ является признаком большого числа раковых, а также других пролиферативных заболеваний [Blume-Jensen and Hunter 2001].

У многоклеточных животных главная роль в передаче пролиферативного сигнала в клетку принадлежит тирозинкиназам, образующим одно из самых больших и разнообразных

мультисемейств. У человека известно 58 тирозинкиназ, которые разделяются на 20 подсемейств (рис. 15) [Lemmon and Schlessinger 2010].

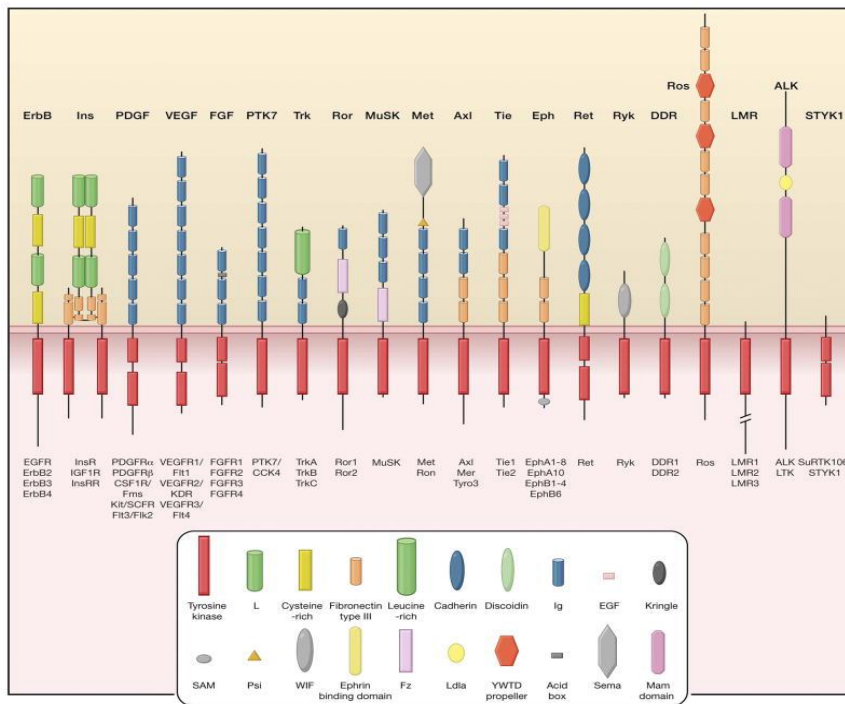


Рис. 15. 20 подсемейств тирозинкиназных рецепторов человека [Lemmon and Schlessinger 2010].

Тирозинкиназные рецепторы содержат консервативный каталитический домен и уникальный субдоменный мотив, по наличию которого эти белки и относят к тирозинкиназам. Семейство тирозинкиназных рецепторов EGFR состоит из четырёх рецепторных молекул, которые играют важную роль в дифференцировке клеток, пролиферации и апоптозе и включает рецепторы эпидермального фактора роста ErbB1 (HER1, ERBB), ErbB2 (HER2, HER2/neu), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4). В норме гены членов EGFR семейства на умеренном уровне экспрессируются во многих тканях организма. Отличительной особенностью всех рецепторных тирозинкиназ является их трансмембранная локализация и необходимость активации (лигандом и формированием гомо/гетеродимеров рецепторов) для киназной активности и запуска сигнальных путей. После активации N-концевого внеклеточного домена рецепторы претерпевают конформационные изменения, активируя С-концевой цитоплазматический домен, который приобретает способность как к аутофосфорилированию, так и к фосфорилированию других клеточных белков. Члены семейства рецепторов EGFR формируют гомо- и гетеродимеры при активации, при этом рецептор HER2/neu является наиболее предпочтительным партнёром для формирования гетеродимеров. Ген *HER2/neu* играет важную роль в развитии злокачественных опухолей. Он амплифицируется и/или гиперэкспрессируется на белковом уровне в примерно 30% карцином молочной железы человека и во многих других

типах злокачественных человеческих опухолей [Yu and Hung 2000] и его диагностика имеет важное клиническое значение.

2.3.2.2. Антитела для адресной доставки наночастиц

Среди нацеливающих агентов для адресной доставки наночастиц (таких как аптамеры, фолиевая кислота, трансферрин, лектины, CPP (англ. *cell penetrating peptides*) и другие пептиды) моноклональные антитела и иммуноконъюгаты на их основе занимают особенное место. Терапия раковых заболеваний, основанная на антителах, вошла в практику 15 лет назад и на сегодняшний день является одной из успешных стратегий для лечения пациентов со злокачественными и солидными опухолями [Scott et al. 2012]. Механизмы уничтожения раковых клеток посредством антител схематически представлены на **рис. 16**: непосредственное действие антитела (через блокировку рецептора или активность агониста, индукцию апоптоза, доставку лекарственного или цитотоксического агента), механизмы, опосредованные иммунной системой (комплемент-зависимая клеточная токсичность (CDC), антитело-зависимая клеточная токсичность (ADCC) и регуляция функций Т-клеток) и специфические эффекты, оказываемые на сосудистую сеть опухоли и строму.

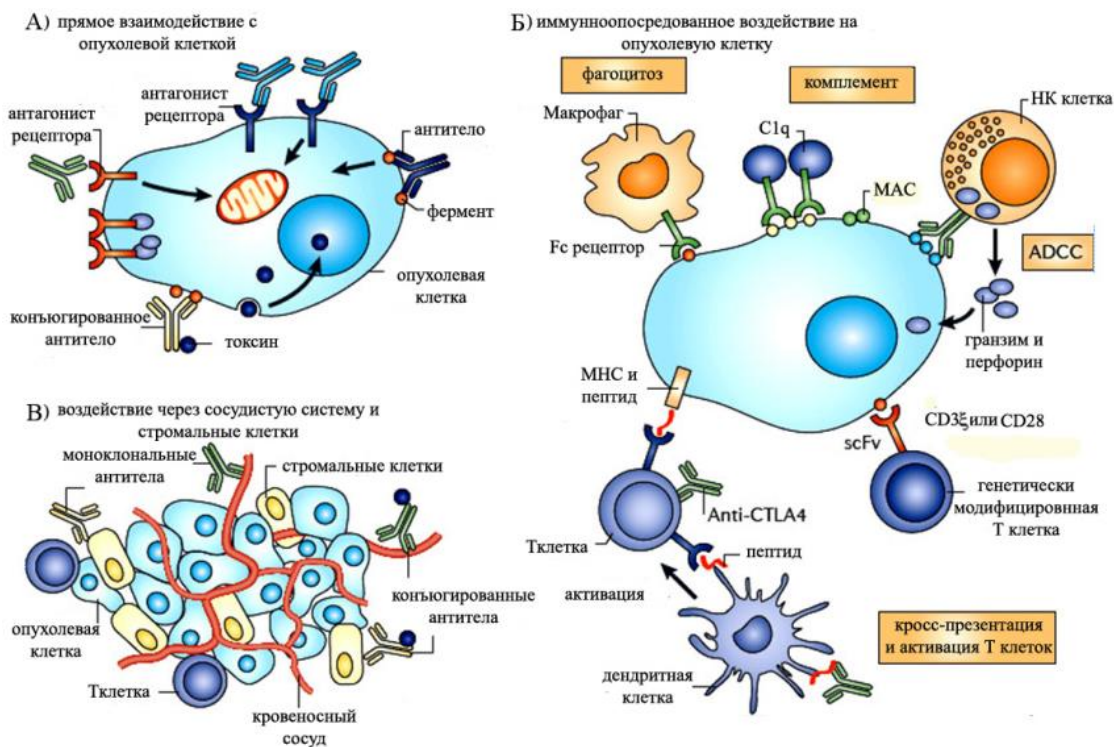


Рис. 16. Механизмы терапии раковых клеток антителами. А) Антитела связываются с поверхностными рецепторами опухолевых клеток в качестве агониста, приводя к апоптозу, или антагониста, препятствуя димеризации рецептора, киназной активности и приводя к снижению пролиферации и апоптозу. Также антитела могут быть связаны с ферментами, токсинами, малыми интерферирующими РНК или радиоизотопами. Б) Механизмы, опосредованные иммунной системой – индукция фагоцитоза, активация комплемента, ADCC, модуляция активности Т-клеток. В) Специфические эффекты, оказываемые на сосудистую сеть опухоли и строму. Адаптировано из [Scott et al. 2012].

Все эти подходы уже применяются в клинике. Наиболее успешными из них являются снижение уровня клеточной сигнализации к пролиферации (Цетуксимаб, Трастузумаб), стимуляция эффекторных функций через ADCC (например, Ритуксимаб) и иммунная модуляция активности Т-клеток (например, Ипилимумаб). И хотя большинство антител, используемых в клинике на сегодняшний день – это полноразмерные молекулы иммуноглобулина G, разрабатывается множество подходов конструирования антител и доставки конъюгированных с ними цитотоксических агентов – уменьшение иммуногенности и оптимизация фармакокинетических свойств, создание мини-антител и иммуноконъюгатов на их основе, биспецифических антител, антител с измененным константным доменом и другие подходы. Высокая изменчивость раковых клеток и проблема их резистентности к терапии вызывает необходимость комплексного лечения и применения сразу нескольких препаратов с разным механизмом действия [Деев and Лебеденко 2009; Deyev et al. 2003].

Молекула иммуноглобулина содержит переменные домены, ответственные за взаимодействие с антигеном, и константные домены, которые несут эффекторные функции (взаимодействие с клеточными рецепторами, системой комплемента и т.д.) У большинства млекопитающих, включая человека, антигенсвязывающий сайт переменных доменов состоит из шести гиперпеременных CDR-участков, определяющих комплементарность к антигену и специфичность связывания, по три CDR-участка в V_L и V_H доменах. Благодаря разнообразию V-доменов, их комбинаторике, а также соматическому мутагенезу возникает набор антител, обладающих высокой аффинностью и специфичностью к соответствующим антигенам. Мышиные антитела иммуногены для пациентов, особенно при их повторном применении. “Гуманизация” может быть достигнута в результате конструирования “химерных” антител человека и мыши путём замещения мышиных константных доменов на соответствующие домены человека, либо путём замещения фрагментов каркаса переменных доменов мыши на соответствующие участки иммуноглобулина человека. Такая замена заметно снижает иммуногенность и позволяет получать антитела с высокой аффинностью и специфичностью.

Получение человеческих моноклональных АТ возможно благодаря разработке технологии трансгеноза. В результате усилий ряда исследовательских групп были получены химерные мыши, которые содержали в геноме фрагменты хромосом 2, 22 и 14 человека, несущие локусы генов легких (каппа и лямбда) и тяжелых цепей иммуноглобулина. Разрушение собственных локусов Ig позволило получить линии животных, экспрессирующих только человеческие антитела с высокой аффинностью и специфичностью. После иммунизации животных соответствующим антигеном получали мышиные гибридомы, продуцирующие человеческие моноАТ.

Константные Fc-фрагменты антител выполняют эффекторные и цитотоксические функции, взаимодействуя с системой комплемента, а также с рецепторами на поверхности клеток иммунной системы. Наличие Fc-фрагмента повышает индекс полужизни антител до 10 дней и более. В ряде случаев указанные функции нежелательны для оптимального времени циркуляции антител в кровотоке и требуется удаление Fc-фрагмента, что возможно выполнить, применяя протеолитическое отщепление Fab-фрагмента от Fc-фрагмента, либо удаление первого генно-инженерным путём на уровне соответствующих фрагментов генов. Создание минимальных по размерам антител, сохраняющих антигенсвязывающие функции, является одним из генеральных направлений инженерии в данной области. Наименьшие по размерам антитела (scFv) состоят из переменных доменов легких и тяжелых цепей, связанных гибким пептидным линкером $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$, устойчивым к действию протеаз. Под контролем соответствующего промотора такие белки способны со значительным выходом синтезироваться в прокариотических клетках, в частности, *Escherichia coli*, что создает условия для создания масштабного биотехнологического процесса их получения [Deyev and Polianovski 2008].

2.4. Методы присоединения направляющих агентов к наночастицам

Для обеспечения строгой селективности адресной доставки наночастиц, их поверхность часто модифицируют различными биомолекулами, которые специфично связывают мишень. В качестве таких молекул выступают различные антитела, пептиды, аптамеры, трансферрин, фолиевая кислота и ряд других.

Существует несколько общих подходов к поверхностной модификации наночастиц. Один из способов состоит в том, что молекулы присоединяют путём нековалентной обратимой адсорбции на поверхности наночастиц. При том, что этот подход концептуально довольно прост, нет гарантии того, что лиганд останется связанным с поверхностью частицы в процессе доставки и не потеряет своей активности [Srinivasan and Huang 2008].

Также для модификации наночастиц и включения в их состав функционально активных компонентов используют различные процессы самосборки и самоорганизации предварительно полученных составляющих [Boal et al. 2000; Aghayeva et al. 2013].

Один из наиболее распространённых способов присоединения биомолекул к поверхности наночастиц – ковалентное присоединение (химическая реакция). Такой метод может быть осуществлен посредством применения кроссшивающих реагентов (кросслинкеров), которые выбираются в зависимости от того, какие функциональные группы экспонированы на поверхности наночастиц. Для конъюгации могут быть использованы различные гомобифункциональные и гетеробифункциональные (в том числе, так называемые “zero-length” кросслинкеры – со спейсером нулевой длины). В **табл. 1** представлено разнообразие

кроссшивающих реагентов для конъюгации соединений с различными функциональными группами [Hermanson 2008].

Табл. 1. Кросслинкеры для конъюгации биомолекул с различными функциональными группами.

	-SH	-COOH	-NH ₂
-NH ₂	<p>AMAS эфир N-(α-малеимидоацетокси)сукцинимид;</p> <p>BMPS эфир N-(β-малеимидопропилокси)сукцинимид;</p> <p>[Sulfo-]EMCS эфир N-(ϵ-малеимидокапроилокси)[сульфо]сукцинимид;</p> <p>GMBS [Sulfo-GMBS] эфир N-(γ-малеимидобутирилокси)[сульфо]сукцинимид;</p> <p>LC-SMCC сукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат);</p> <p>[Sulfo-]LC-SPDP [сульфо]сукцинимидил 6-(3'-[2-пиридилдитио] пропионамидо) гексаноат;</p> <p>[Sulfo-]MBS эфир m-малеимидобензоил-N-гидрокси[сульфо]сукцинимид;</p> <p>SBAP сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионат;</p> <p>[Sulfo-]SIAB [сульфо]N-сукцинимидил (4-йодоацетил)аминобензоат;</p> <p>SMCC сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат;</p> <p>Sulfo-SMCC сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат;</p> <p>SMPB сукцинимидил 4-(n-малеимидофенил)бутират;</p> <p>SMPH сукцинимидил-6-(β-малеимидопропионамидо) гексаноат;</p> <p>SMPT 4-сукцинимидилоксикарбонил-α-(метил-α-(2-пиридилдитио) толуол;</p> <p>SPDP N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат;</p> <p>Sulfo-KMUS эфир N-(к-малеимидоундеканоилокси)сульфосукцинимид;</p> <p>Sulfo-LC-SMPT сульфосукцинимидил-6-(α-метил-α-[2-пиридилдитио]-толуамидо) гексаноат</p>	<p>DCC N,N-дициклогексилкарбодимид;</p> <p>EDC 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорид;</p> <p>CMC 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) карбодимид;</p> <p>DIC диизопропилкарбодимид;</p> <p>CDI N,N'-карбонилдимидазол</p>	<p>BS²G-d₀ бис-(сульфосукцинимидил)глутарат-d₀;</p> <p>BS²G-d₄ бис(сульфосукцинимидил)2,2,4,4-глутарат-d₄;</p> <p>BS³ бис(сульфосукцинимидил) суберат;</p> <p>BS³-d₀ бис(сульфосукцинимидил) суберат-d₀;</p> <p>BS³-d₄ бис(сульфосукцинимидил)2,2,7,7-суберат-d₄;</p> <p>BSOCOES бис(2-[сукцинимидоксикарбонилокси]этилсульфон);</p> <p>DFDNB 1,5-дифлуоро-2,4-динитробензол;</p> <p>DMA диметил адипимидат дигиродхорид;</p> <p>DMP диметил пимелимидат дигиродхорид;</p> <p>DMS диметил суберимидат дигиродхорид;</p> <p>DSG дисукцинимидил глутарат;</p> <p>DSP дитиобис(сукцинимидилпропионат);</p> <p>DSS дисукцинимидил суберат;</p> <p>DST дисукцинимидил тартарат;</p> <p>DTBP диметил 3,3'-дитиобиспропионимидат дигиродхорид;</p> <p>DTSSP (Sulfo-DSP) 3,3'-дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат);</p> <p>[Sulfo-]EGS этиленгликоль бис([сульфо]сукцинимидилсукцинат)</p>
-SH	<p>BMB 1,4-бис-малеимидобутан;</p> <p>BMH 1,6-бис-малеимидогексан;</p> <p>BMOE 1,2-бис-малеимидоэтан;</p> <p>BM(PEG)₂ 1,8-бис-малеимидодиэтиленгликоль;</p> <p>BM(PEG)₃ 1,11-бис-малеимидотриэтиленгликоль;</p> <p>DPDPB 1,4-ди-(3'-[2'-пиридилдитио]пропионамидо) бутан;</p> <p>DTME дитиобис-малеимидоэтан;</p> <p>Sulfo-SMPB сульфосукцинимидил-4-(n-малеимидофенил) бутират</p>	<p>MPBH 4-(4-N-малеимидофенил)масляная кислота;</p> <p>M₂C₂H 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксил-гидразид;</p> <p>PDPH 3-(2-пиридилдитио)пропионил гидразид;</p> <p>VMPH N-(β-малеимидопропионовая кислота)гидразид;</p>	

2.4.1. Карбодимидные методы химической конъюгации наночастиц с белками

Одним из наиболее популярных методов конъюгации наночастиц с карбоксильными группами, экспонированными на поверхности частиц, с белковыми молекулами является использование 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимида (EDC) в качестве кросслинкера с нулевым спейсером, который активирует карбоксильные группы, делая возможным

связывание их с аминокеттами белка. EDC водорастворим, что позволяет добавлять его прямо в реакционную смесь без использования органических растворителей. Побочные продукты реакции (рис. 17) также водорастворимы. Таким образом, избыток реагента и побочных продуктов легко удаляется промыванием водой. Однако в реакции конъюгации с использованием EDC существует опасность гидролиза – т.е. если целевая аминокетта не успеет атаковать карбоксильную группу до гидролиза активированного интермедиата, конъюгация не произойдет (это особенно важно в работе с белками – когда белок находится в небольшой концентрации по отношению к воде). С этой целью в реакционную смесь добавляется N-гидроксиульфосукцинимид (сульфо-NHS), который увеличивает стабильность активного интермедиата и растворимость в воде побочных продуктов реакции.

Таким образом, EDC/сульфо-NHS реакция обладает рядом достоинств:

- реагент и побочные продукты водорастворимы
- возможность работы без органических растворителей
- образование стабильной амидной связи.

Схема реакции конъюгации с помощью EDC/sulfo-NHS представлена ниже (рис. 17).

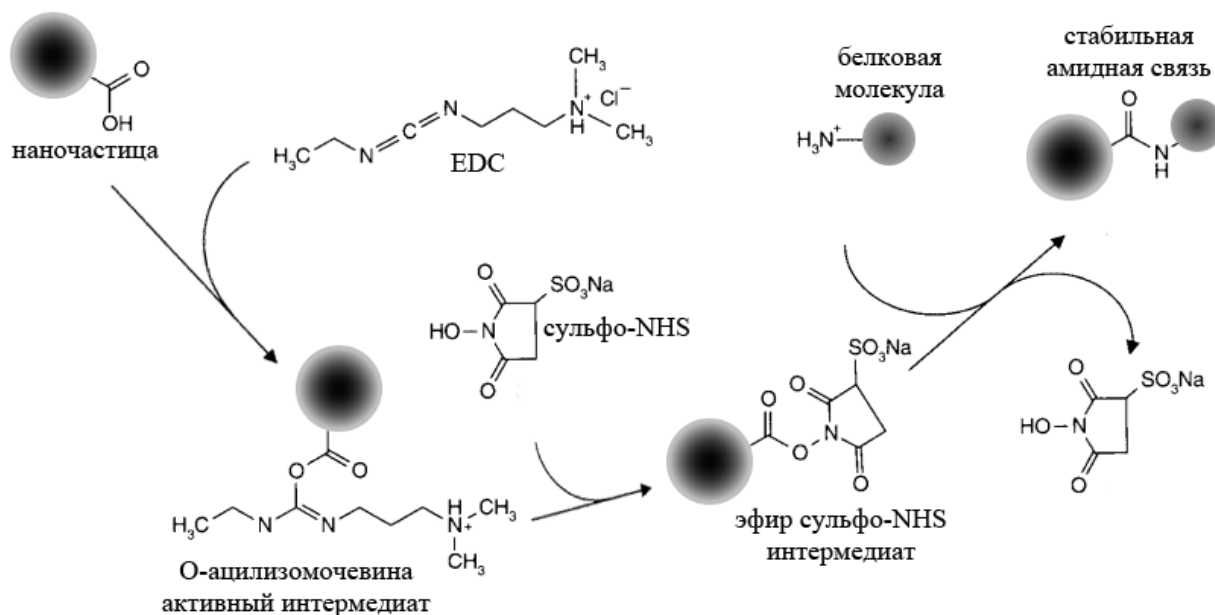


Рис. 17. Схема конъюгации наночастиц с белком карбодииимидным методом с помощью EDC/сульфо-NHS. Адаптировано из [Hermanson 2008].

2.4.2. Другие методы химической конъюгации наночастиц с белками

CDI. Часто в качестве альтернативы карбодииимидному методу конъюгации используют CDI (N,N'-карбонилдиимидазол) – кросслинкер с нулевым спейсером, позволяющий ковалентно связывать частицы с $-NH_2$ и $-COOH$ (либо с $-OH$, формируя при этом связь длиной в 1 атом углерода) группами. Данный кросслинкер водонерастворим, однако это является

преимуществом в отношении препятствия гидролизу реагентов, когда реакция идёт в водном растворе.

Образование оснований Шиффа. Альдегиды и кетоны могут реагировать с первичными и вторичными аминами с образованием оснований Шиффа. Эта связь лабильна и в водном растворе достаточно быстро подвергается гидролизу. Восстановительное аминирование (или алкилирование) может быть использовано для конъюгирования альдегид- или кетонсодержащих молекул с аминосодержащими молекулами. Восстановительной реакции способствует использование таких реагентов, как цианборгидрид натрия.

Гомобифункциональные кросслинкеры – NHS эфиры. Существует целый ряд NHS эфиров, используемых в качестве кроссшивающих реагентов для соединения частиц с доступными для конъюгации $-NH_2$ группами, например *DSP*, *DSS*, *BS³*, *DST*, *BSOCOES*, *DSG* (табл. 1). NHS- или сульфо-NHS- содержащие кросслинкеры реагируют с нуклеофилами, высвобождая NHS или сульфо-NHS уходящую группу и образуя ацилированный продукт. Реакция таких эфиров также возможна с $-OH$ или $-SH$ группами, однако образующиеся при этом конъюгаты нестабильны, т.к. тиоэфирные и эфирные связи гидролизуются в водном окружении. При взаимодействии с первичными и вторичными аминами образуются относительно стабильные амидные и имидные связи. В белковых молекулах NHS эфиры реагируют преимущественно с α -аминогруппой на N-конце белка и ϵ -аминогруппой лизина. Многие NHS эфиры нерастворимы в водных буферах. Большинство протоколов включает в себя растворение кросслинкера в высокой концентрации в органическом растворителе, а затем берётся аликвота для добавления в реакционную смесь – водный буфер. Однако их сульфо-аналоги, как правило, обладают большей растворимостью. NHS реакции в водных растворах наряду с образованием амидной связи имеют высокий потенциальный риск гидролиза. Для того, чтобы максимизировать эффективность модификации аминов и минимизировать эффект гидролиза, как правило, поддерживают высокую концентрацию белка (или иной целевой молекулы).

Гомобифункциональные имидоэфиры. Среди наиболее используемых и коммерчески доступных следует выделить следующие имидоэфиры: *DMA*, *DMP*, *DTBP*. α -аминогруппы и ϵ -аминогруппы белков могут связываться за счёт имидоэфиров при pH 7-10 (наиболее оптимально pH 8-9). Отличительной особенностью этих типов реакций является сохранение заряда протонированного белка – продукт этой реакции (амидин) имеет положительный заряд при физиологическом pH. Таким образом, имидоэфиры сохраняют зарядное окружение молекулы, возможно, тем самым, сохраняя её активность и другие свойства. Имидоэфиры хорошо растворяются в воде, образовавшаяся амидная связь довольно стабильна при кислых pH, при щелочных pH подвержена гидролизу и разрушению.

Гомобифункциональные кросслинкеры для связывания –SH групп. Кроссшивающие реагенты, которые соединяют биомолекулы с –SH группами подразделяются по 2 группы: формирующие постоянную связь с –SH группами (как правило, довольно стабильную тиоэфирную связь) – например *BMH* – бисмалеимидогексан и формирующие дисульфидные связи, например *DPDPB* 1,4-ди-(3'-[2'-пиридилдитио]пропионамидо)бутан. Свойства этих реагентов очень сильно зависят от длины спейсера и от их химической природы.

Существует, однако, и ряд других гомобифункциональных реагентов, такие как например, гомобифункциональные фотореакционноспособные кросслинкеры, связывающие –NH₂ группы и другие.

Гетеробифункциональные кросслинкеры для связывания –NH₂ и –SH функциональных групп. Вероятно, это наиболее популярные гетеробифункциональные реагенты. Как видно из **табл. 1**, их существует большое количество. *SPDP* – один из наиболее популярных кроссшивающих реагентов для –NH₂ с –SH групп (или водорастворимый аналог сульфидо-*SPDP*).

***SMCC* (сукцинимидил-4-(*N*-малеимидометил)циклогексано-1-карбоксилат).** *SMCC* – ещё один широко используемый гетеробифункциональный кросслинкер с двумя реакционноспособными группами: NHS-эфиром и малеимидом. Малеимидный остаток *SMCC* специфично реагирует с тиольными группами в диапазоне pH 6.5 – 7.5. При pH 7 скорость реакции малеимидов с сульфгидрильными группами в 1000 раз быстрее, чем с аминами. *SMCC* не растворим в воде и перед добавлением к модифицируемым реагентам должен быть растворён в органическом растворителе (например, в диметилформамиде). Его достоинства заключаются в том, что NHS-эфир быстро реагирует с молекулой, содержащей первичный амин, малеимид быстро реагирует с цистеинами белков, циклогексановый спейсер добавляет дополнительную стабильность малеимиду, который стабилен 64 часа в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7 при 4 °C.

Гетеробифункциональные кросслинкеры для связывания –COOH и –SH функциональных групп. Относительно новый ряд гетеробифункциональных кросслинкеров – позволяющие связывать биомолекулы с –COOH и –SH группами. В определённых случаях, конъюгация через эти группы может опосредовать реакцию связывания вдали от активных центров биомолекул или их специфичных сайтов связывания, что, может служить для сохранения активности молекулы. Это кросслинкеры, содержащие на одном конце малеимидную группу для связывания с –COOH группой, а на другом конце – гидразидную группу для связывания с –SH группой.

Гетеробифункциональные фотоактивируемые кросслинкеры. Особый интерес представляют так называемые фотоактивируемые кросслинкеры, у которых на одном конце

расположена функциональная группа, специфично связывающая, например $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ или $-\text{COOH}$ группами, а на другом конце – фотоактивируемая группа, которая должна быть возбуждена световым импульсом определённой длины волны для инициации связывания.

Трифункциональные кроссликеры. Существует относительно небольшой, но довольно важный класс кросслинкеров для биоконъюгации – трифункциональные кроссликеры, например: сульфосукцинимидил-2-(6-(биотинамидо)-2-(*n*-азидобензамидо) гексаноамидо)этил-1,3-дителиопропионат (*сульфо-SBED*), метанэтиосульфонатазидотетрафлуоро-биотин (*MTS-ATF-биотин*) или трис-(гидроксиэтил)фосфин (*THP*), которые позволяют ковалентно связывать сразу три реакционно способные группы.

Клик-химия. Одно из достаточно новых направлений химической конъюгации – клик-химия [Kolb et al. 2001]. Реакции, относящиеся к клик-химии (также, биортогональные реакции), имеют исключительно высокий выход, региоселективны и протекают в широком спектре условий, в том числе, в физиологических. Одна из наиболее часто используемых клик-реакций – азид-алкиновое циклоприсоединение с использованием меди (I) в качестве катализатора [Rostovtsev et al. 2002; Tornøe et al. 2002]. Поскольку азидные и алкиновые группы, как правило, не представлены в белковых молекулах, введение данных групп в конъюгируемые компоненты и использование данной реакции позволяет осуществлять полный контроль над селективностью и эффективностью конъюгации.

2.4.3. Пептиды, селективно связывающие твёрдую фазу

Также существуют подходы к поверхностной модификации нано- и микрочастиц с сохранением ориентированности и активности присоединяемых молекул, например, на основе специфичных взаимодействий пептидов, связывающих твёрдую фазу (такую, как например, поверхность частиц). Известно, что существуют пептиды, которые способны селективно связывать широкий ряд неорганических материалов, например, металлов, полупроводников, полимеров и минералов [Sarıkaya et al. 2003; Seker and Demir 2011] и опосредовать поверхностную модификацию частиц белками [Sengupta et al. 2008] без нарушения их функций. Так, например, существуют пептиды, связывающие цеолиты и SiO_2 поверхности [Sunna et al. 2013; Care et al. 2014]. Существуют наночастицы с SiO_2 покрытием, которые являются инертными, биосовместимыми и обладают низкой токсичностью, и на сегодняшний день подробно разработаны протоколы их получения для достижения требуемых характеристик (размер, зета-потенциал, пористость, флуоресценция, магнетизм и другие параметры), таким образом представляя универсальную платформу для конструирования агента для терапии.

Более того, поскольку пептиды могут быть генно-инженерно слиты с другими белками, это открывает широкие возможности к прямой модификации наночастиц без вовлечения дополнительных шагов на пути модификации, например, химической конъюгации.

Так, например, было продемонстрировано селективное мечение и уничтожение раковых клеток апконвертирующими нанофосфорами, модифицированными антителами посредством белка G, слитого с SiO₂-связывающим пептидом, иммобилизованным на поверхности SiO₂-покрытых частиц [Liang et al. 2016].

2.5. Методы детекции связывания наночастиц с клетками

Количественное исследование взаимодействия нанобъектов с живыми клетками крайне важно как для различных фундаментальных исследований, так и для биомедицинских задач. В частности, эффективное накопление НЧ в определённых тканях и клетках является необходимым для широкого ряда применений, таких, как гипертермия, усиление контраста в МРТ, визуализация и мониторинг определённых клеток либо для задач тераностики. Более того, точное определение дозы при изучении взаимодействия НЧ с клетками необходимо с точки зрения фармакологии и токсикологии – для безопасного применения наномасштабных материалов. Развитие методов для идентификации и количественного анализа НЧ является необходимым как для оценки эффективности НЧ для означенных выше задач, так и для оценки потенциального риска их использования и их токсичности.

Обычно взаимодействие “НЧ-клетка” исследуется введением различных меток в НЧ – например, флуоресцентных или радиоактивных. Как правило, использование флуоресцентного мечения является не строго количественным, а скорее качественным методом, а использование радиоактивности требует серьёзных мер предосторожности в работе.

Одними из наиболее распространенных подходов к подсчёту различных типов НЧ в клетках и тканях являются различные методы микроскопии. Методы оптической микроскопии, такие, как например, спиннинг-диск конфокальная микроскопия [Treuel et al. 2014] и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия [Costa et al. 2013; Schweiger et al. 2012] позволяют исследовать взаимодействие клеток с квантовыми точками либо другими флуоресцентно мечеными НЧ. Метод рентгенофлуоресцентной микроскопии позволяет не только визуализировать клетки, но также даёт сведения об элементном составе образца, что используется для определения наличия и количества в нём НЧ [James et al. 2013]. Также применяются методы электронной микроскопии, например сканирующей (СЭМ) [Wang et al. 2012] или трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) для детального исследования мест локализации НЧ [Rouse et al. 2006] или комбинация оптической темнопольной микроскопии с ТЭМ [Rosman et al. 2012].

Означенные методы микроскопии позволяют визуализировать НЧ в клетках и исследовать их внутриклеточную локализацию, однако такие методы являются скорее полуколичественными и/или требуют сложной и времязатратной обработки полученной 2D или 3D графической информации, что не всегда приемлемо для рутинных исследований.

Среди методов, используемых для определения взаимодействия НЧ с клетками, совместно с микроскопией, следует выделить магнетофорез, основанный на измерении скорости магнитно модифицированных клеток под воздействием магнитного поля, для измерения количества магнитных НЧ, связавшихся с клетками [Wilhelm et al. 2002; Fayol et al. 2013]. Однако данный метод требует анализа большого числа индивидуальных клеток для определения среднего количества НЧ на клетку, что делает его применение затруднительным для анализа большого числа образцов. Также имеются ограничения, связанные с седиментацией клеток во время эксперимента: когда с клеткой связано менее чем 0.1 пг МНЧ, под воздействием магнитного поля она не успевает пройти необходимого для детекции расстояние, прежде чем седиментирует [Wilhelm et al. 2002].

Также для исследования взаимодействия НЧ с клетками широко используется метод проточной цитофлуориметрии – для исследования как флуоресцентных или флуоресцентно меченых [Rosman et al. 2012; Schweiger et al. 2012; Lesniak et al. 2013], так и немодифицированных НЧ благодаря изменению уровня бокового светорассеяния клеток при взаимодействии с НЧ [Smith and Giorgio 2009]. Однако измерения интенсивности флуоресценции клеток с целью оценки абсолютного количества НЧ сопряжены с трудностями калибровки, что часто приводит к тому, что содержание НЧ оценивается относительно, а не абсолютно.

Помимо методов микроскопии и проточной цитофлуориметрии, широко используются точные аналитические методы, как например спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) [Giustini et al. 2012; Girard et al. 2012] или атомно-эмиссионная или оптическая эмиссионная спектроскопия (АЭС/ОЭС) [Ma and Gu 2007; Freese et al. 2012a; Girard et al. 2012], которые позволяют исследовать взаимодействие металлических НЧ с клетками с высокой чувствительностью и низким пределом детекции (до нескольких нг/г). Однако данные методы требуют сложной пробоподготовки (длительное растворение в кислоте) и разрушения образца клеток, а также подсчёт абсолютного содержания НЧ в образце требует строгой калибровки по количеству атомов в НЧ. Более того, необходимое оборудование дорогостоящее и требует регулярного технического обслуживания.

Другие методы, такие как спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области спектра (UV/VIS) [Rad et al. 2007; Chithrani et al. 2006] и флуоресцентная спектроскопия [Gaumet et al. 2009] позволяют количественно детектировать наличие НЧ в образце по поглощению в

определённой области спектра. Однако, согласно [Rad et al. 2007], минимальная детектируемая концентрация суперпарамагнитных наночастиц оксида железа благодаря формированию комплекса Fe^{2+} с Феррозином с характерным поглощением на 562 нм составляет 3 мкг/мл, что не всегда достаточно в случае, когда количество образца клеток ограничено или исследуется низкое содержание НЧ. Флуоресцентная спектроскопия требует введения флуоресцентных меток в НЧ (например, 3,3-дикотадецилоксакарбо-цианин перхлорат в случае [Freese et al. 2012b]), которые подвержены фотовыгоранию, а также необходимо учитывать аутофлуоресценцию образцов.

Для измерения количества магнитных НЧ используют измерения магнитной восприимчивости образца клеток с НЧ, например методом магнитно-резонансной спектроскопии [Girard et al. 2012], а также был разработан настольный измеритель магнитной восприимчивости [Ström et al. 2004]. Среди методов ЯМР для оценки содержания МНЧ в образце необходимо выделить метод ЯМР релаксометрии [Lee et al. 2008; Girard et al. 2012], оценивающий концентрацию МНЧ согласно изменению времени релаксации протонов в образце, однако данные измерения зависят от пространственного распределения частиц в образце. Из-за изменения процессов броуновской и неелевской релаксации для связанных и интернализированных в клетки НЧ невозможно проводить калибровку для сложного образца для измерения абсолютного содержания НЧ [Oswald et al. 1997]. Наряду с методами ЯМР разрабатываются методы на основе ферромагнитного резонанса (ФМР) [Oswald et al. 1997; Wilhelm et al. 2002] с чувствительностью, достигающей 2.5 нг Fe, однако, как и ЯМР методы, они требуют использования дорогостоящего непортативного оборудования и их использование затруднительно для быстрого анализа большого числа образцов. Более того, продолжают разрабатываться новые методы [Giustini et al. 2012; Wang et al. 2012] для исследования взаимодействия наночастиц с клетками эукариот, что демонстрирует недостаточность существующих подходов для оперативной и удобной оценки данного взаимодействия.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Оборудование и материалы

В работе использовали следующее оборудование:

инвертированные флуоресцентные микроскопы Axiovert 200 (Carl Zeiss) и Leica DMI 6000B (Leica Microsystems); проточные цитофлуориметры FACS Calibur и Accuri C6 (Becton Dickinson); анализаторы наночастиц Zetasizer Nano ZS и NanoSight NS300 (Malvern Instruments); планшетные анализаторы StatFax-2100 (Awareness Technology) и Infinite M1000 Pro (Tecan); настольные центрифуги 5415D и 5430R (Eppendorf); центрифуга с бакет-ротором BR4i Multifunction (Thermo Electron Corporation); центрифуга-вортекс CM-70M-09 (Elmi); термостат водяной 4 MEGV (Julabo); термостат твердотельный Thermostat Plus (Eppendorf); сухожаровой шкаф 2В-151 (Одесский завод медицинского оборудования); CO₂-инкубатор MCO-175 (Sanyo); ламинарный бокс для работы с эукариотическими клетками класс II (NuAire); вортекс MS1 minishaker (IKA); мультивортекс V-32 (Biosan); ротатор Intelli Mixer RM-1L (Elmi); магнитная мешалка с подогревом C-Mag HS7 (IKA); весы лабораторные ARA520 и AR 0640 (Ohaus); ультразвуковая баня RK 31H (Bandelin Sonorex); холодильники специальные и бытовые, поддерживающие температуру +4 °C, -20 °C, -80 °C, -135 °C, -150 °C; система очистки воды MilliQ (Merck); автоматический счётчик клеток Countess (Invitrogen); оборудование Центра коллективного пользования уникальным оборудованием в области нанотехнологий МФТИ (ЦКП МФТИ).

Также использовали:

обессоливающие колонки NAP-5 (GE Healthcare) и Zeba Spin Desalting Columns 7 MWCO (Pierce); камеры Горяева (МиниМед); магнитный штатив MagneSphere Technology Magnetic Separation Stand (Promega); нитроцеллюлозные мембраны для иммунохроматографии UniSart CN 140 Membrane (Sartorius); фильтры с размером пор 0.22 и 0.45 мкм (Millipore); автоматические пипетки (Gilson, Eppendorf); наконечники для автоматических пипеток (Greiner Bio-One, Gilson, Plastibrand); пластиковые пробирки на 0.2, 0.6, 1.5, 2, 5, 10, 15 и 50 мл (Corning, Ахуген, Greiner Bio-One); пробирки для проточного цитофлуориметра (BD); криопробирки (Corning); планшеты для ИФА, пластиковые культуральные флаконы и планшеты (Corning); парафилм (Sigma).

В работе использовали следующие реактивы отечественного производства (категории “хч” и “осч”):

азид натрия, азотная кислота, аммиак, борная кислота, гексацианоферрат (II) калия, гидрокарбонат натрия, гидроксид натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат калия, карбонат натрия, лимонная кислота, морфолиноэтансульфоновая кислота – **MES**, серная кислота, соляная кислота, тетраборат натрия, хлорид аммония, хлорид калия, хлорид натрия, цитрат натрия (ЛабТех, Реахим и ХимМед); L-глутамин, 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид – **МТТ**, диметилсульфоксид – **ДМСО**, пенициллин-стрептомицин, раствор Версена (Панэко); D-манноза – **Man**, D-галактоза – **Gal**, D-ксилоза – **Xyl**, хлорамфеникол – **ХАФ** (Диаэм); перекись водорода (Йодные технологии и маркетинг); натриевая соль хлорамфеникола сукцината – **сХАФ**, гепарин натрия (Синтез); Рометар (Ветлек).

В работе использовали следующие реактивы зарубежного производства:

гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида – **EDC**, дигидрат фолиевой кислоты, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты – **ЭДТА** (Fluka); трис(гидроксиметил)аминометан – **Tris** (Merck); полиэтиленимин 25 кДа (Alfa Aesar); обезжиренное сухое молоко (AppliChem); гексацианоферрат калия, диметилсульфоксид Hybri-Max – **ДМСО**, золотохлористоводородная кислота, натриевая соль карбоксиметилдекстрана – **СМД**, натриевая соль N-гидроксисульфосукцинимиды – **сульфо-NHS**, орто-фенилендиамина гидрохлорид – **ОФД**, параформальдегид, Твин-20, флуоресцеинизотиоционат – **ФИТЦ**, хлорид железа (II) ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), хлорид железа (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), этаноламин, N-гидроксисулцинимид – **NHS** (Sigma); 4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота – **HEPES** (Promega); среда McCoy's 5A, среда PRMI-1640, фетальная бычья сыворотка – **FBS** (HyClone); N-ацетил-D-глюкозамин – **GlcNAc** (N-acetyl-D-glucosamine), N-ацетил-D-галактозамин – **GalNAc** (ABCR); набор для определения концентрации белков BCA protein assay (Pierce); Золетил (Virbac).

В работе использовали следующие белки:

4D5scFv, барстар, 4D5scFv-барназа-4D5scFv, 4D5scFv-mCherry – выделенные в лаборатории и любезно предоставленные С.В. Лукашем, О.А. Стремовским и К.Е. Мироновой; бычий сывороточный альбумин – **БСА** (Химмед, Диаэм, Merck); лектины: агглютинин зародыша пшеницы, (*Wheat Germ Agglutinin*, **WGA**), конканавалин А (*Concanavalin A*, **ConA**) (Sigma), а также агглютинин из соевых бобов (*Soybean Agglutinin*, **SBA**) и агглютинин чечевицы пищевой (*Lens Culinaris Agglutinin*, **LCA**) (Vector Laboratories); гликопротеины: овальбумин из яичного белка, асиалофетуин сыворотки телёнка, фетуин бычьей сыворотки, бычий трансферрин, бычий лактоферрин, человеческий лактоферрин, овомукоид из яичного белка

(ингибитор трипсина), муцин из свиного желудка (Sigma); козы анти-человеческие IgG (H+L), моноклональные мышинные анти-ФИТЦ IgG – клон 1F8-1E4, поликлональные человеческие IgG, поликлональные крысиные IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена поликлональные кроличьи анти-козы IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch); моноклональные мышинные анти-хлорамфеникол IgG – клон CAPB10, моноклональные мышинные анти-фолиевая кислота IgG – клон FA1 (Гибридома); крысиные анти-мышь CD4 IgG – клон GK1.5 (BioLegend); крысиные анти-мышь CD4 PerCP/Cy5.5 – клон RM4-4 (eBioscience); Трастузумаб (в составе препарата Герцептин, Genetech).

В работе использовали следующие коммерческие магнитные частицы:

магнитные частицы 100 нм fluidMAG-ARA (Chemicell); магнитные частицы 250 нм fluidMAG-ARA (Chemicell); магнитные частицы M1-020/50 227 нм (Estapor).

Для обработки данных и изображений использовали следующее программное обеспечение:

OriginPro 8, AxioVision, Zeiss LSM Image, WinMDI 2.8, Adobe Photoshop CS2, CFlow Plus, FlowJo.

3.2. Буферные растворы

Буферные растворы для ИФА:

Карбонат-бикарбонатный буфер (4 мМ Na₂CO₃, 50 мМ NaHCO₃, pH 9.2)

Цитратный буфер (40 мМ лимонная кислота, 40 мМ Na₂HPO₄·2H₂O, pH 5.0)

Стоп-раствор (0.5 М H₂SO₄)

Буферные растворы для конъюгации:

Буфер MES (0.1 М MES, pH 6.0)

Боратный буфер (0.4 М H₃BO₃, 70 мМ Na₂B₄O₇·10H₂O, pH 8.0)

Буфер PBS (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 4.77 мМ Na₂HPO₄·2H₂O, 1.7 мМ KH₂PO₄, pH 7.4)

Буфер для лизиса эритроцитов:

Лизирующий буфер (150 мМ NH₄Cl, 0.1 мМ Na₂EDTA, 10 мМ NaHCO₃, pH 7.3)

Другие буферные растворы:

Буфер Tris (100 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 7.0)

Буфер HEPES (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 6.5)

3.3. Линии эукариотических клеток

В работе использовали представленные в **табл. 2** линии эукариотических клеток коллекции лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН.

Табл. 2. Линии эукариотических клеток, используемые в работе.

Линия клеток	Организм	Происхождение	Морфология
CHO	<i>Cricetulus griseus</i>	яичник	эпителиоподобная
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	аденокарцинома шейки матки	эпителиоподобная
Jurkat	<i>Homo sapiens</i>	острая Т-клеточная лейкемия	лимфоидная
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	аденокарцинома молочной железы	эпителиоподобная
SK-OV-3	<i>Homo sapiens</i>	аденокарцинома яичника	эпителиоподобная
SK-OV-3-1ip	<i>Homo sapiens</i>	аденокарцинома яичника	эпителиоподобная
SK-BR-3	<i>Homo sapiens</i>	аденокарцинома молочной железы	эпителиоподобная
7.16.4	<i>Mus musculus</i>	слияние В-лимфоцита и клеток миеломы	гибридома

3.4. Лабораторные животные

Самки мышей линии BALB/c весом 18-20 г (*Specific Pathogen Free, SPF*) получали из питомника лабораторных животных г. Пущино и содержали в виварии ИБХ РАН. Все эксперименты были одобрены Институтской Комиссией по Контролю за Содержанием и Использованием Животных.

3.5. Методы

3.5.1. Синтез наночастиц оксида железа с карбоксиметилдекстрановой и полиэтилениминовой полимерными оболочками

Наночастицы оксида железа, синтезировали методом соосаждения (копреципитации) солей железа. 5.9 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 2.15 г $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ смешивали в 100 мл дегазированной воды MilliQ с последующим добавлением 12.5 мл 30% NH_4OH . Раствор нагревали до 85 °С и инкубировали в течение 2 ч. Образовавшуюся суспензию частиц сепарировали магнитно и промывали 2 М HNO_3 для пептизации частиц и трижды MilliQ водой. Далее удаляли агрегаты с помощью магнита, и наночастицы в супернатанте покрывали полимерами. Раствор карбоксиметилдекстрана (CMD) или полиэтиленimina, 25 кДа (PEI) в концентрации 300 г/л добавляли в наночастицы до финальной концентрации 50 г/л и инкубировали в течение 4 ч при 80 °С. Полученные частицы отмывали от свободного полимера трехкратным центрифугированием при 16800g в течение 1-3 ч.

3.5.2. Синтез наночастиц ферригидрита, покрытых карбоксиметилдекстрановой полимерной оболочкой

Наночастицы ферригидрита синтезировали согласно [Nikitin et al. 2014]. Кратко, 8.85 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл дегазированной воды MilliQ осаждали добавлением 12.5 мл 30% NH_4OH и инкубировали в течение 2 ч при 90 °С. Далее проводили пептизацию частиц с использованием 0.6 М HNO_3 в течение 10 минут и промывали от HNO_3 троекратным центрифугированием, после чего частицы покрывали CMD при 80 °С в течение 4 ч с последующим троекратным центрифугированием для отмывки от несвязавшегося полимера.

3.5.3. Синтез золотых наночастиц

Наночастицы золота синтезировали восстановлением золотохлористоводородной кислоты HAuCl_4 цитратом натрия по протоколу стандартного метода синтеза Туркевича [Turkevich et al. 1951].

3.5.4. Измерение размера и ζ -потенциала частиц

Гидродинамический радиус и ζ -потенциал частиц и конъюгатов на их основе определяли с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) при температуре 25 °С.

3.5.5. Конъюгация белков с флуоресцеинизотиоцианатом

Конъюгацию белков с ФИТЦ проводили следующим образом: белок в PBS или боратном буфере быстро смешивали с раствором ФИТЦ в ДМСО с соответствующим молярным избытком ФИТЦ. Реакцию проводили не менее 8 часов при +4 °С в темноте. Избыток несвязавшегося ФИТЦ удаляли с использованием обессоливающих колонок. Детальные условия мечения ФИТЦ для всех белков, использованных в работе, представлены в **табл. 3**.

Конъюгат ФИТЦ-этаноламин (далее обозначен ФЛУО) получали смешиванием 1 мл 34 мМ ФИТЦ в ДМСО с 60 мкл 10% этаноламина (водный раствор, pH доведен до 8.5 с NaOH).

3.5.6. Конъюгация белков с сукцинатом хлорамфеникола

Конъюгаты белков с сукцинатом хлорамфеникола (белок-ХАФ) получали следующим образом. Сукцинат хлорамфеникола натрия (сХАФ) смешивали с EDC и NHS (или сульфо-NHS) в буфере, содержащем 50% ДМСО и 0.05 М MES, pH 6.0 до финальной концентрации сХАФ 50 г/л. Для конъюгации БСА и антител с сХАФ использовали молярное соотношение белок:сХАФ:EDC:NHS = 1:40:80:80, для конъюгации с WGA – белок:сХАФ:EDC:сульфо-NHS = 1:3:2:4. Полученную смесь сХАФ/EDC/NHS (или

сХАФ/EDC/сульфо-NHS) инкубировали в течение 40 мин при +20 °С, затем смесь при необходимости разбавляли буфером, содержащим 50% ДМСО и 0.05 М MES, и добавляли к белку, обеспечивая 10% ДМСО в финальном растворе. Инкубировали 8 ч при комнатной температуре, в случае образования осадка центрифугировали 10 мин 16000g и супернатант очищали от несвязавшегося сХАФ и побочных продуктов реакции на обессоливающих колонках.

Табл. 3. Условия конъюгации белков с ФИТЦ.

Белок	Концентрация и количество белка	Буфер	Концентрация и количество ФИТЦ в ДМСО	Молярный избыток ФИТЦ:белок
Трастузумаб	100 мкл 7 г/л	PBS	10 мкл 3.6 г/л	20x
Поликлональные человеческие IgG	100 мкл 7 г/л	PBS	10 мкл 3.6 г/л	20x
БСА	100 мкл 50 г/л	Боратный буфер	10 мкл 76 г/л	50x
БСА-ФК	100 мкл 5.3 г/л	Боратный буфер & 0.01М MES & 10% ДМСО	3.3 мкл 36 г/л	40x
WGA	100 мкл 2.2 г/л	Боратный буфер	10 мкл 38 г/л	170x
WGA	100 мкл 2.2 г/л	Боратный буфер	10 мкл 1.1 г/л	5x

3.5.7. Конъюгация бычьего сывороточного альбумина с фолиевой кислотой

Конъюгат БСА с фолиевой кислотой (БСА-ФК) получали следующим образом. Фолиевую кислоту (ФК) вместе с EDC и NHS растворяли в буфере, содержащем 50% ДМСО и 0.05 М MES до финальной концентрации ФК, соответствующей 10 г/л с массовым соотношением ФК:EDC:NHS = 10:6.5:4.8. Полученную смесь инкубировали в течение 40 мин при +20 °С, после чего к 100 мкл данной смеси добавляли 400 мкл БСА в концентрации 6.7 г/л в боратном буфере. Инкубировали 8 ч при комнатной температуре и очищали БСА от несвязавшейся ФК и побочных продуктов реакции на обессоливающих колонках.

3.5.8. Ковалентная конъюгация наночастиц с белками

Наночастицы, покрытые полимерами с –COOH группами, ковалентно связывали с белковыми молекулами с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (*1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide*, EDC) в качестве сшивающего реагента (кросслинкера). В ходе реакции образуется промежуточный продукт – производное О-ацилизоомочевины, который подвергается нуклеофильной атаке аминогруппы белка, приводя к формированию стабильной амидной связи между аминогруппой и карбоксильной группой на

поверхности частицы. Для увеличения стабильности активного интермедиата и уменьшения вероятности гидролиза EDC использовали совместно с N-гидроксисульфосукцинимидом (*N-hydroxysulfosuccinimide*, сульфо-NHS). Реакцию проводили в два этапа: сначала наночастицы активировали EDC/сульфо-NHS в буфере MES, затем, после удаления избытка кросслинкеров центрифугированием либо с использованием магнитного штатива, добавляли белок в соответствующем буфере. Оптимальное отношение количества белок:наночастицы:EDC/сульфо-NHS подбирали отдельно для каждого типа конъюгата. Детальные условия реакции для всех конъюгатов представлены в **табл. 4**. В ходе реакции для предотвращения агрегации наночастицы периодически обрабатывали на ультразвуковой бане. Реакцию проводили не менее двух часов, после чего избыток непрореагировавшего белка удаляли центрифугированием (для частиц размером <150 нм), либо магнитной сепарацией (для частиц >150 нм). Длительное хранение полученных конъюгатов наночастиц с белками осуществляли в буфере Tris с 1% БСА.

3.5.9. Мечение конъюгатов наночастиц с белками флуоресцеинизотиоционатом

ФИТЦ-меченые конъюгаты наночастиц с Трастузумабом и поликлональными человеческими IgG получали смешиванием 50 мкл конъюгатов в концентрации 3 г/л в боратном буфере с 5 мкл ФИТЦ в концентрации 0.6 г/л в ДМСО. Реакцию проводили 2 ч при комнатной температуре с последующим удалением несвязавшегося ФИТЦ центрифугированием при 12000g в течение 12 мин.

ФИТЦ-меченые конъюгаты магнитных наночастиц с лектинами получали следующим образом. 100 мкг наночастиц ресуспендировали в 100 мкл PBS с 1% БСА и добавляли 5 мкл ФИТЦ в концентрации 61 г/л в ДМСО. Инкубировали 8 часов при комнатной температуре, после чего магнитно сепарировали от избытка ФИТЦ и ресуспендировали в буфере HEPES с 1% БСА.

3.5.10. Окрашивание наночастиц оксида железа с использованием гексацианоферрата (II) калия

Окрашивание ионов железа в составе наночастиц, провзаимодействовавших с клетками, проводили с использованием гексацианоферрата (II) калия (“жёлтой кровяной соли”) с образованием малорастворимого осадка “берлинской лазури” на поверхности клеток:

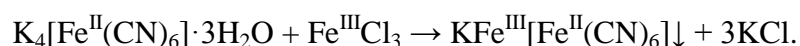


Табл. 4. Условия конъюгации наночастиц с белками (в расчёте на 1 мг исходных частиц).

Обозначение конъюгата	Тип частиц	EDC, мг	Сульфо-NHS, мг	Объем буфера активации, мкл	Белки для конъюгации	Концентрация белков в буфере для конъюгации, г/л	Буфер для конъюгации	Общий объем буфера для конъюгации, мкл
CMD100-Трастузумаб	100 нм МНЧ с CMD оболочкой	30	9	200	Трастузумаб BCA	0.5 1	Боратный буфер	300
CMD100-HumanIgG	100 нм МНЧ с CMD оболочкой	30	9	200	Human IgG BCA	0.5 1	Боратный буфер	300
CMD100-BCA	100 нм МНЧ с CMD оболочкой	30	9	200	BCA	1.5	Боратный буфер	300
ARA100-(WGA-ФИТЦ)	100 нм fluidMAG-ARA	12	2	60	WGA-ФИТЦ BCA	0.75 0.38	0.1 М HEPES, 10 mM CaCl ₂ , pH 6	250
ARA100-(анти-ФИТЦ IgG)	100 нм fluidMAG-ARA	12	2	60	Анти-ФИТЦ IgG BCA	0.6 0.6	Боратный буфер	190
ARA100-(анти-ХАФ IgG)	100 нм fluidMAG-ARA	12	2	60	Анти-ХАФ IgG BCA	0.6 0.6	Боратный буфер	190
ARA100-WGA	100 нм fluidMAG-ARA	12	2	60	WGA BCA	0.75 0.38	0.1 М HEPES, 10 mM CaCl ₂ , pH 6	250
Estapor-(анти-ХАФ IgG&BCA-ФИТЦ-ФК)	Estapor 227 нм	10	3	100	Анти-ХАФ IgG BCA-ФИТЦ-ФК	0.3 1.4	Боратный буфер	100
Estapor-(анти-ХАФ IgG&BCA-ФИТЦ)	Estapor 227 нм	10	3	100	Анти-ХАФ IgG BCA-ФИТЦ	0.3 0.3	Боратный буфер	100
Estapor-(анти-Rat IgG&BCA-ФИТЦ)	Estapor 227 нм	10	3	100	Анти-Rat IgG BCA-ФИТЦ	0.3 0.3	Боратный буфер	100
CMD100-4D5scFv	100 нм МНЧ с CMD оболочкой	30	9	200	4D5scFv	0.5	PBS	100
CMD100-Bs	100 нм МНЧ с CMD оболочкой	30	9	200	Барстар	0.5	PBS	100
CMD100-(4D5scFv-mCherry)	100 нм МНЧ с CMD оболочкой	30	9	200	4D5scFv- mCherry	0.5	PBS	100
ARA250-LCA	250 нм fluidMAG-ARA	20	10	1000	LCA	0.2	0.1 М HEPES, 10 mM CaCl ₂ , pH 6	1000
ARA250-ConA	250 нм fluidMAG-ARA	20	10	1000	ConA BCA	1 5	0.1 М HEPES, 10 mM CaCl ₂ , pH 6	1000
ARA250-WGA	250 нм fluidMAG-ARA	20	10	1000	WGA	0.2	0.1 М HEPES, 10 mM CaCl ₂ , pH 6	1000
ARA250-SBA	250 нм fluidMAG-ARA	20	10	1000	SBA BCA	1 5	0.1 М HEPES, 10 mM CaCl ₂ , pH 6	1000

Клетки, предварительно инкубированные с наночастицами, фиксировали 5% раствором параформальдегида в течение 15 минут при комнатной температуре, трижды промывали PBS.

Непосредственно перед окрашиванием готовили раствор, содержащий 2 части 2% $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ и 1 часть 1% HCl . Данный раствор наносили на исследуемый образец клеток и инкубировали в течение 15 минут до развития окраски, после чего клетки анализировали с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss).

3.5.11. Условия культивирования эукариотических клеточных линий

Клеточные линии SK-BR-3, SK-OV-3, SK-OV-3-1ip, CHO, HeLa, MCF-7 культивировали в среде RPMI-1640, Jurkat и 7.16.4 – в среде McCoy's 5A с добавлением 10% инактивированной нагреванием FBS и 2 mM L-глутамин при +37 °C во влажной атмосфере с 5% CO_2 . Клетки пересеивали 2-3 раза в неделю при достижении 80-90% монослоя. Снятие клеток с поверхности пластика осуществляли раствором Версена, без использования трипсина (для предотвращения ферментативного удаления рецепторов с поверхности клеток). Клеточные линии поддерживали в культуре не более двух месяцев, после чего культуру обновляли из коллекции замороженных клеток.

Длительное хранение клеток осуществляли с использованием ДМСО Hybri-Max (Sigma) в качестве криоконсерванта (в составе 70% RPMI-1640, 20% FBS, 10% ДМСО) в криопробирках при -135 °C или -150 °C. Подсчёт клеток осуществляли с использованием камеры Горяева (МиниМед) или автоматического счётчика клеток Countess (Invitrogen).

3.5.12. Анализ жизнеспособности клеток

Цитотоксичность наночастиц исследовали с помощью МТТ-теста. Клетки рассеивали на 96-луночный планшет в количестве $7.5 \cdot 10^3$ клеток на лунку в 200 мкл RPMI-1640 с 10% FBS. После культивирования клеток при 37 °C в CO_2 -инкубаторе в течение ночи среду удаляли и к клеткам стерильно добавляли бессывороточную среду (отрицательный контроль) и бессывороточную среду, содержащую тестируемые частицы в различных концентрациях в объеме 200 мкл на лунку. Клетки инкубировали 2 ч при комнатной температуре, затем промывали PBS и добавляли RPMI-1640 с 10% FBS и инкубировали 48 часов при 37 °C в CO_2 -инкубаторе. Затем среду стряхивали, клетки промывали 1 раз средой. После этого в лунки вносили по 100 мкл раствора МТТ (0.5 г/л в RPMI-1640), инкубировали 1 ч при 37 °C в атмосфере с 5% CO_2 . По истечении этого времени раствор МТТ удаляли, и к содержимому лунок добавляли по 100 мкл ДМСО, планшет встряхивали до полного растворения кристаллов формазана. Измерение оптической плотности содержимого каждой лунки проводили на планшетном анализаторе StatFax-2100 на длине волны $\lambda = 540$ нм.

3.5.13. Иммуноферментный анализ

Активность конъюгатов наночастиц с Трастузумабом (а именно, способность связываться с HER2/neu рецептором) исследовали в формате твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Внеклеточный домен рецептора HER2/neu (HER2-ECD) сорбировали в 96-луночной планшете для ИФА в карбонат-бикарбонатном буфере в течение ночи при +4 °С. Несвязавшийся антиген дважды отмывали PBS и инкубировали в течение часа в 5% молоке, приготовленном на PBS, при комнатной температуре (для блокировки неспецифически сорбционно-активных центров). После этого в лунки добавляли исследуемые конъюгаты в 3% молоке, приготовленном на PBS, и инкубировали в течение часа, после чего трижды промывали PBS. После этого лунки инкубировали последовательно с козьими античеловеческими антителами (12 мкг/мл) и кроличьими анти-козьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (0.16 мкг/мл). Антитела были растворены в PBS с 1% БСА, обе стадии проводили в течение часа при комнатной температуре, после каждой стадии несвязавшиеся антитела трижды отмывали PBS. Затем лунки инкубировали с 0.04% ОФД и 0.01% раствором пероксида водорода в цитратном буфере. После развития окрашивания реакцию останавливали 0.5 М раствором H₂SO₄ и измеряли оптическое поглощение содержимого лунок на длине волны $\lambda = 450$ нм с использованием планшетного анализатора StatFax-2100.

3.5.14. Количественный анализ связывания магнитных частиц с клетками

Связывание магнитных частиц и структур на их основе с клетками выполняли с использованием оригинальной технологии MPQ (*Magnetic Particle Quantification*) [Nikitin et al. 2007; Nikitin et al. 2009]. Измерения проводили с использованием прототипа магнитного биосенсорного устройства, представленного на **рис. 18**. Суспензию клеток, меченных наночастицами, в объеме 30 мкл помещали в измерительную зону прибора в пластиковой трубке диаметром 3 мм. Возбуждение наночастиц в измерительной катушке детектора проводилось на частотах $f_1 = 87$ кГц и $f_2 = 702$ Гц с амплитудами $H_2 = 64 \pm 6$ Э, $H_1 = 33 \pm 3$ Э соответственно, отклик детектировали на комбинаторной частоте $f_1 + 2f_2$.

3.5.15. Лизис эритроцитов

Для анализа образцов крови мыши методом проточной цитофлуориметрии предварительно лизировали эритроциты следующим образом. К 50 мкл гепаринизированного образца крови добавляли 400 мкл лизирующего буфера и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали при 100g в течение 10 мин при +4 °С.

Процедуру лизиса и центрифугирования повторяли, финально ресуспендируя клетки в 70 мкл PBS 1% БСА.



Рис. 18. Фотография оригинального регистратора нелинейных магнетиков (размеры В x Ш x Г: 18 x 10 x 4 см).

3.5.16. Проточная цитофлуориметрия

1. *Анализ экспрессии HER2/neu на поверхности клеток.* Клетки, снятые с поверхности культурального пластика, дважды промывали PBS, ресуспендировали в 500 мкл 3% обезжиренного молока, приготовленного на PBS, в концентрации 10^6 клеток/мл и охлаждали до +4 °С. Затем добавляли антитела Трастузумаб-ФИТЦ или HumanIgG-ФИТЦ до финальной концентрации 20 мкг/мл и инкубировали 50 мин на ротаторе при +4 °С, после чего клетки трижды промывали 3% обезжиренным молоком, ресуспендировали в 500 мкл PBS с 1% БСА и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson) в канале флуоресценции FL1 (возбуждение 488 нм, эмиссия 530/30 нм). В каждом образце анализировали 10000 клеток. В качестве контроля (аутофлуоресценция клеток) использовали образцы клеток, приготовленные без добавления антител. Полученные данные анализировали с помощью программы WinMDI 2.8.

2. *Анализ связывания биокomпьютерных структур с лимфоцитами.* Предварительно подготовленный образец гепаринизированной крови мыши (50 мкл), подвергшийся лизированию эритроцитов (раздел 3.5.15), ресуспендировали в 70 мкл PBS с 1% БСА и анализировали на проточном цитофлуориметре Accuri C6 (Becton Dickinson) в каналах флуоресценции FL1 (возбуждение 488 нм, эмиссия 533/30 нм) и FL3 (возбуждение 488 нм, эмиссия 670LP нм). В каждом образце анализировали 40000 клеток. Полученные данные анализировали с помощью программ CFlow Plus и FlowJo.

3.5.17. Флуоресцентная спектроскопия

Суспензию клеток рассеивали на 96-луночные планшеты в концентрации $2.5 \cdot 10^4$ клеток/мл и культивировали до достижения монослоя. Затем клетки промывали PBS, фиксировали в течение 2 ч 1% параформальдегидом при комнатной температуре, дважды промывали PBS и окрашивали Трастузумабом-ФИТЦ в концентрации 50 мкг/мл в PBS 1% БСА в течение 40 мин при комнатной температуре. Затем клетки дважды промывали PBS с 1% БСА и измеряли интенсивность флуоресценции планшетным анализатором Infinite M1000 Pro (Tecan) на длинах волн $\lambda = 490$ нм (возбуждение) и $\lambda = 515$ нм (эмиссия) при частоте вспышек 400 Гц с усилением (gain) = 217.

3.5.18. Анестезирование животных

За 10 мин до инъекции наноструктур мышей анестезировали смесью Золетил (80 мг/кг) / Ксилазин (1.6 мг/кг) интраперитонеально.

3.5.19. Исследование динамики наночастиц в кровотоке мышей

Исследование динамики наночастиц в кровотоке мышей проводили с использованием МРQ-регистратора [Nikitin et al. 2008]. После анестезирования, хвост животного помещали в измерительную зону прибора и фиксировали липкой лентой, не нарушая кровотока (**рис. 19**). Затем проводили инъекцию наноструктур в ретроорбитальный синус и записывали их концентрационную динамику в хвосте.

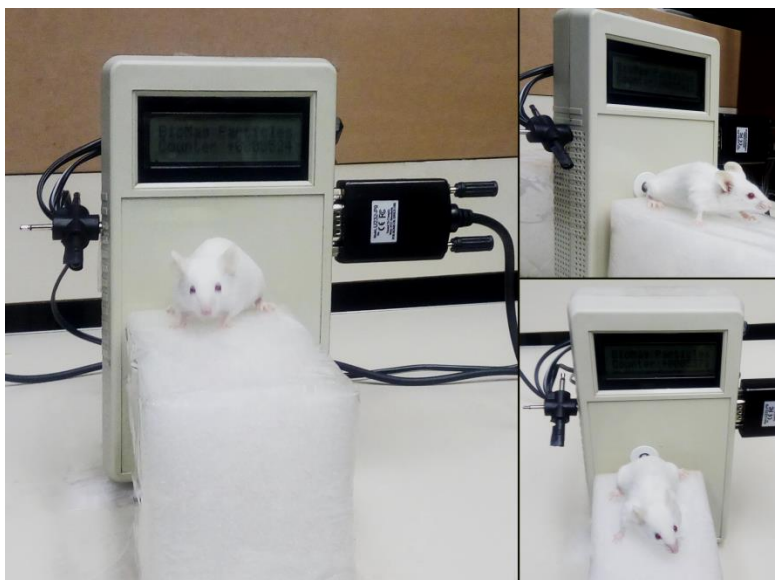


Рис. 19. Схема исследования динамики циркуляции наночастиц в кровотоке мышей с использованием МРQ-регистратора.

3.5.20. Иммунохроматография на тест-полосках

Изучение специфичности конъюгатов наночастиц с различными белками проводили с помощью иммунохроматографии на нитроцеллюлозных тест-полосках. Данный метод позволяет исследовать характеристики специфического взаимодействия двух веществ (компонентов). 1 мкл одного из двух компонентов системы (например, лектины или гликопротеины) в концентрации 1 г/л локально сорбировали на мембране тест-полоски шириной 2 мм, второй компонент (например, модифицированные наночастицы) в растворённом виде вносили в пробирку в 20 мкл Tris с 1% БСА и 0.05% Твин-20. Нижний конец тест-полоски помещали в пробирку, при этом растворенный компонент вместе с растворителем начинал мигрировать вверх по полоске. Когда вся жидкость поглощалась тест-полоской, в пробирку дважды последовательно добавляли 20 мкл Tris с 1% БСА и 0.05% Твин, чтобы все частицы промигрировали по тест-полоске и чтобы отмыть несвязавшиеся частицы в случае наличия таковых. В случае, когда первый и второй компонент специфично взаимодействуют, в области локализации первого компонента происходит связывание наночастиц, что детектируется тем или иным способом (например, спектральной регистрацией или визуально благодаря возникновению цветной полоски, обусловленной особенностями ЛППР, приводящими к соответствующей окраске наночастиц). Кроме того, внесение в пробирку третьего вещества (например, блокирующий связывание моносахарид) позволяет определять, влияет ли оно на комплексообразование в результате взаимодействия первых двух компонентов (путём, например, конкурентного связывания моносахарида с лектином).

3.5.21. Конструирование биокomпьютерных структур для WGA-опосредованного мечения клеток *in vitro* на основе логического анализа входных сигналов

Детальное описание конструирования биокomпьютерных структур, выполняющих логические операции под воздействием молекулярных входных сигналов, приведено в главе “Результаты и обсуждение”. Ниже приведены лишь формальные протоколы создания структур, выполняющих функции ДА (X) – логическое “да” или повторение, НЕТ (X) – логическое “нет” или инверсия, ДА (X) И НЕТ (Y) – логический запрет по второму входному сигналу (Y).

1) *Конструирование структуры, имплементирующей логическую функцию “ДА (ФЛУО)”*

Для получения данной структуры 100 мкг конъюгатов ARA100-(WGA-ФИТЦ) инкубировали с анти-ФИТЦ IgG в концентрации 0.5 г/л в 50 мкл в буфере Tris с 1% БСА 1 ч при комнатной температуре.

Для получения данной структуры использовали конъюгат WGA-ФИТЦ, полученный при добавлении 170х молярного избытка ФИТЦ по отношению к WGA.

2) *Конструирование структуры, имплементирующей логическую функцию “НЕТ (ФЛУО)”*

Для получения данной структуры 100 мкг конъюгатов ARA100-(анти-ФИТЦ IgG) инкубировали с WGA-ФИТЦ в концентрации 100 мкг/мл в буфере Tris с 1% БСА 1 ч при комнатной температуре.

Для получения данной структуры использовали конъюгат WGA-ФИТЦ, полученный при добавлении 5х молярного избытка ФИТЦ по отношению к WGA.

3) *Конструирование структуры, имплементирующей логическую функцию “ДА (ФЛУО) И НЕТ (сХАФ)”*

Для получения данной структуры 100 мкг конъюгатов ARA100-(анти-ХАФ IgG) инкубировали с WGA-ФИТЦ-ХАФ в концентрации 100 мкг/мл в буфере Tris с 1% БСА 40 мин при комнатной температуре. Затем частицы трижды промывали с использованием магнитного штатива, ресуспендировали в 50 мкл анти-ФИТЦ IgG (в концентрации 0.5 г/л в буфере Tris с 1% БСА) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре.

Для получения данной структуры использовали WGA-ФИТЦ-ХАФ, полученный последовательным конъюгированием с 5х избытком ФИТЦ и 3х избытком сХАФ по отношению к WGA.

В качестве логических входных сигналов выступали растворимые соединения, а именно ФИТЦ-этаноламин (\equiv ФЛУО) и сукцинат хлорамфеникола (\equiv сХАФ). В качестве входного сигнала, соответствующего “0”, выступала нулевая концентрация соединения (его отсутствие), в качестве входного сигнала, соответствующего “1”, выступала оптимально высокая концентрация соединения (в данном случае 3 мМ). Инкубацию структур, имплементирующих логические функции, с растворами, содержащими входной сигнал, осуществляли в течение 1 ч при комнатной температуре (подробно условия проведения данной инкубации представлены в табл. 5).

3.5.22. WGA-опосредованное мечение клеток *in vitro* на основе логического анализа входных сигналов

Биокомпьютерные структуры, приготовленные как описано выше (раздел 3.5.21), после инкубации с молекулярными входными сигналами (табл. 5) в течение 1 часа при комнатной температуре добавляли к 2 млн клеток (Jurkat и 7.16.4) в 500 мкл NEPER буфера с 1 % БСА в присутствии и в отсутствии 0.5 М GlcNAc. После 40 минут инкубации, клетки трижды

отмывали от несвязанных структур центрифугированием и количество связанных структур определяли с использованием МРQ-цитометрии.

Табл. 5. Условия инкубация биокомпьютерных структур с молекулярными входными сигналами.

Логические входные сигналы	Химический состав смеси
ФЛУО = 0 сХАФ = 0	6.25 мкл Tris 1% БСА 6 мкг биокомпьютерных структур
ФЛУО = 1 сХАФ = 0	6.25 мкл Tris 1% БСА 6 мкг биокомпьютерных структур 3 мМ ФЛУО
ФЛУО = 0 сХАФ = 1	6.25 мкл Tris 1% БСА 6 мкг биокомпьютерных структур 3 мМ сХАФ
ФЛУО = 1 сХАФ = 1	6.25 мкл Tris 1% БСА 5 мкг биокомпьютерных структур 3 мМ ФЛУО + 3 мМ сХАФ

3.5.23. Конструирование биокомпьютерных структур для мечения CD4+ клеток *ex vivo* и *in vivo* на основе логического анализа входных сигналов

1) Конструирование структуры, имплементирующей логическую функцию “НЕТ (сХАФ)”

Для получения данной структуры 1 мг конъюгатов Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ) инкубировали с анти-CD4 IgG-ХАФ (или Rat IgG-ХАФ для контрольных экспериментов) в концентрации 10 мкг/мл в 300 мкл в PBS с 1% БСА 1 ч при комнатной температуре, периодически обрабатывая на ультразвуковой бане, дважды промывали с использованием магнитного сепаратора и ресуспендировали в 100 мкл PBS с 1% БСА.

2) Конструирование структуры, имплементирующей логическую функцию “ДА (сХАФ)”

Для получения данной структуры 1 мг конъюгатов Estapor-(анти-Rat IgG&БСА-ФИТЦ) инкубировали с анти-CD4 IgG-ХАФ (или Rat IgG-ХАФ для контрольных экспериментов) в концентрации 0.3 мкг/мл в 300 мкл PBS с 1% БСА 1 ч при комнатной температуре. Далее дважды промывали магнитно и инкубировали с анти-ХАФ IgG в концентрации 1 г/л в 100 мкл PBS с 1% БСА 1.5 ч, периодически обрабатывая на ультразвуковой бане.

3) Конструирование структуры, имплементирующей логическую функцию “ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)”

Для получения данной структуры 1 мг конъюгатов Estapor-(анти-ХАФ&БСА-ФИТЦ-ФК) инкубировали с анти-CD4 IgG-ХАФ (или Rat IgG-ХАФ для контрольных экспериментов) в концентрации 100 мкг/мл PBS с 1% БСА 1.5 ч при комнатной температуре. Далее дважды промывали магнитно и инкубировали с анти-ФК IgG в концентрации 1 г/л в 100 мкл PBS 1% БСА 0.5 ч, периодически обрабатывая на ультразвуковой бане.

В качестве логических входных сигналов выступали растворимые соединения, а именно фолиевая кислота (\equiv ФК) и сукцинат хлорамфеникола (\equiv сХАФ). В качестве входного сигнала, соответствующего “0”, выступала нулевая концентрация соединения (отсутствие инъекции), в качестве входного сигнала, соответствующего “1”, выступала оптимально высокая концентрация соединения (инъекция 100 мкл 40 мМ раствора). Инъекцию входных сигналов в кровотоки осуществляли независимо перед инъекцией биокомпьютерных структур.

3.5.24. Мечение CD4+ клеток крови *ex vivo* и *in vivo* на основе логического анализа входных сигналов

1. **Мечение *ex vivo*.** К образцу крови мыши (50 мкл) последовательно добавляли 2.5 мкл 40 мМ раствора молекулярного входного сигнала (сХАФ, ФК или комбинации сХАФ и ФК) и 4 мкг биокомпьютерных структур и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 10 мкл крысиных анти-мышь CD4 IgG-PerCP/Cy5.5 (клон RM4-4) в концентрации 6 мкг/мл и инкубировали 10 минут. Затем образцы подвергали лизису эритроцитов (раздел 3.5.15) и анализировали методом проточной цитофлуориметрии (раздел 3.5.16).

2. **Мечение *in vivo*.** После анестезирования, мышам линии Balb/c проводили инъекцию наночастиц ферригидрита в дозировке 250 мг/кг в левый ретроорбитальный синус. Через 30 минут в правый ретроорбитальный синус вводили 40 мМ раствор молекулярного входного сигнала (сХАФ, ФК или комбинации сХАФ и ФК) и в левый ретроорбитальный синус вводили биокомпьютерные структуры в дозировке 50 мг/кг. Через 8 минут после инъекции осуществляли забор крови в пробирку с гепарином. К образцу крови (50 мкл) добавляли 10 мкл крысиных анти-мышь CD4 IgG-PerCP/Cy5.5 (клон RM4-4) в концентрации 6 мкг/мл и инкубировали 10 минут. Затем образцы подвергали лизису эритроцитов (раздел 3.5.15) и анализировали методом проточной цитофлуориметрии (раздел 3.5.16).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. МРQ-цитометрия: метод количественной детекции взаимодействия наночастиц с клетками и оценки уровня экспрессии поверхностных антигенов клеток

Для разработки нового метода детекции связывания наночастиц с клетками была выбрана модельная система, включающая в себя шесть линий клеток эукариот с различным уровнем экспрессии мембранного рецептора HER2/neu, и специально синтезированные суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, способные специфично связываться с данным рецептором. HER2/neu является членом семейства EGFR (рецепторов эпидермального фактора роста) и гиперэкспрессируется в 20-30% случаев опухолей молочной железы, а также при некоторых других видах злокачественных новообразований [Koeppen et al. 2001]. Гиперэкспрессия HER2/neu часто коррелирует с устойчивостью пациентов к химиотерапии, высоким метастатическим потенциалом опухоли, а также предсказывает высокий риск рецидива болезни и снижение общей выживаемости пациентов. Данный рецептор в меньшем количестве представлен на некоторых типах здоровых клеток человека. Таким образом, точное количественное определение HER2/neu статуса раковых клеток имеет важное клиническое значение, а выбранная клеточная модель является удобной для оценки уровней экспрессии поверхностных клеточных антигенов.

В качестве “нацеливающего” модуля на поверхности наночастиц использовали полноразмерное антитело Трастузумаб (Герцептин®), специфичное к внеклеточному домену HER2/neu и широко применяемое в клинической практике для терапии HER2/neu-положительных опухолей [Harries 2002].

4.1.1. Синтез, физико-химическая характеристика и конъюгация магнитных наночастиц с белками

Наночастицы были синтезированы методом копреципитации солей железа Fe(II) и Fe(III) с последующей стабилизацией карбоксиметилдекстрановой (CMD) полимерной оболочкой. На **рис. 20** представлены микроэлектронные фотографии данных наночастиц (далее обозначенных как CMD100) и картина электронной дифракции. На изображениях высокого разрешения видно, что ядра магнетита представляют собой монокристаллические сферы (**рис. 20Б, 20В**). По результатам обработки картины электронной дифракции наночастицы характеризуются следующими межплоскостными расстояниями: 0.298, 0.253, 0.209, 0.173, 0.163, 0.149, 0.129,

0.478 нм, соответствующими двум кристаллическими модификациями оксида железа: гамма-Fe₂O₃ и магнетит Fe₃O₄.

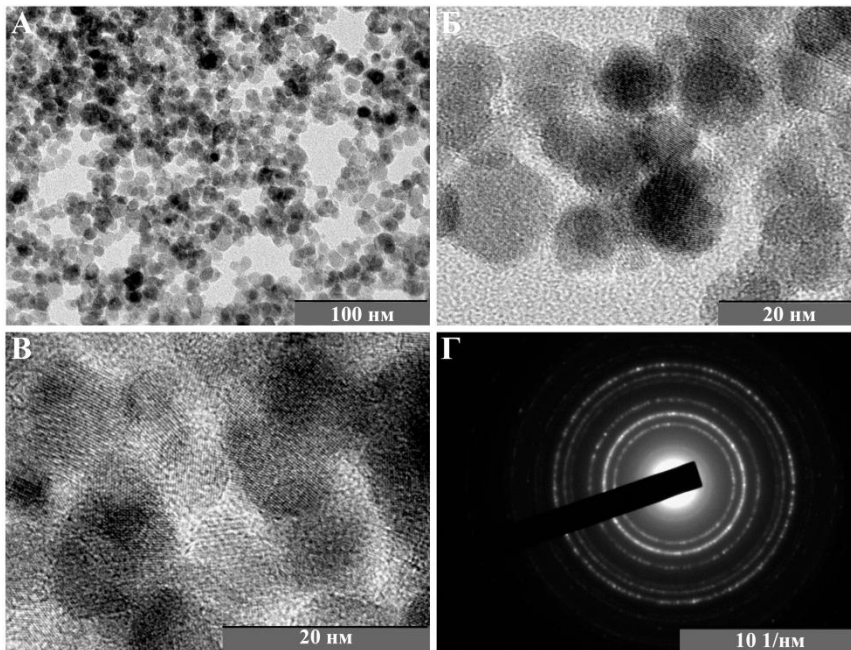


Рис. 20. Трансмиссионная электронная микроскопия наночастиц CMD100. **А)** Характерное изображение наночастиц. **Б, В)** Изображения высокого разрешения монокристаллических наночастиц. Морфологию наночастиц исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (JEOL Ltd.) с ускоряющим напряжением 200 кВ. Ядра магнетита представляют собой монокристаллические сферы размером 10.9 ± 1.9 нм и имеют форму, близкую к сферической. **Г)** Картина электронной дифракции наночастиц CMD100. Кольца соответствуют 0.298, 0.253, 0.209, 0.173, 0.163, 0.149, 0.129, 0.478 нм. Данные электронной дифракции свидетельствуют о двух кристаллических модификациях оксида железа: гамма-Fe₂O₃ и магнетит Fe₃O₄.

Для селективного мечения клеток суперпарамагнитные наночастицы CMD100 конъюгировали с Трастузумабом (далее, CMD100-Трастузумаб) карбодиимидным методом с использованием EDC/сульфо-NHS в качестве кроссшивающих реагентов. Распределение по размерам данных конъюгатов, полученное по данным динамического светорассеяния, представлено на **рис. 21**. Гидродинамический диаметр конъюгатов по данным кумулянтного анализа составил 105 ± 31 нм, ζ -потенциал – -8.9 ± 0.9 мВ. Также для контрольных экспериментов были получены конъюгаты CMD100 с поликлональными человеческими IgG (CMD100-HumanIgG) и с неспецифичным белком – бычьим сывороточным альбумином (CMD100-БСА). Гидродинамические размеры и ζ -потенциалы полученных конъюгатов, а также немодифицированных наночастиц CMD100 представлены в **табл. 6**.

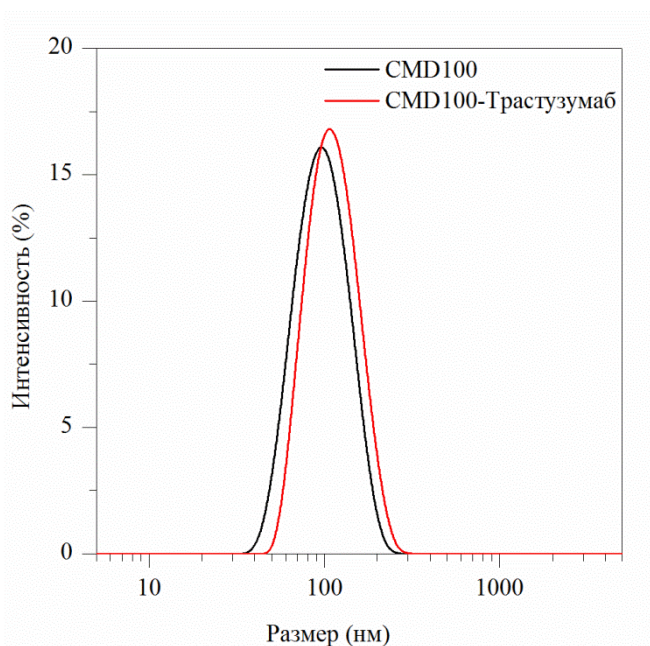


Рис. 21. Распределение по гидродинамическим размерам CMD100 (размер по кумулятивному анализу 91 ± 26 нм) и конъюгатов CMD100-Трастузумаб (105 ± 31 нм), определенное с использованием анализатора Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments).

Табл. 6. Гидродинамический диаметр и ζ -потенциал CMD100 и конъюгатов на их основе.

Обозначение частиц	ζ -потенциал, мВ	Диаметр, нм
CMD100	-17.1 ± 0.8	91 ± 26
CMD100-Трастузумаб	-8.9 ± 0.9	105 ± 31
CMD100-HumanIgG	-13.4 ± 0.8	99 ± 28
CMD100-BCA	-16.2 ± 1.2	92 ± 24

Предварительно функциональная активность конъюгатов наночастиц CMD100, а именно, их способность связываться с HER2/neu рецептором, была исследована в бесклеточной системе в формате стандартного иммуноферментного анализа. Конъюгаты CMD100-Трастузумаб инкубировали с 5, 10 и 15 нг очищенного внеклеточного домена рецептора (HER2-ECD), предварительно сорбированного в лунках 96-ти луночного планшета в течение ночи. Связанные с HER2-ECD конъюгаты проявляли последовательно козьими анти-человеческими антителами и кроличьими анти-козьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, как схематично представлено на **рис. 22А**. Зависимость эффективности связывания CMD100-Трастузумаб с HER2-ECD от концентрации частиц и от количества рецептора представлена на **рис. 22Б**. Данная зависимость носит монотонный характер с выходом на насыщение. В качестве контроля специфичности взаимодействия данных конъюгатов с HER2-ECD использовали конъюгаты CMD100 с поликлональными человеческими IgG (CMD100-HumanIgG). Зависимость поглощения на длине волны $\lambda = 450$ нм от концентраций CMD100-Трастузумаб и CMD100-HumanIgG для 5 нг сорбированного HER2-

ECD, представленная на **рис. 23**, демонстрирует высокую специфичность данного взаимодействия.

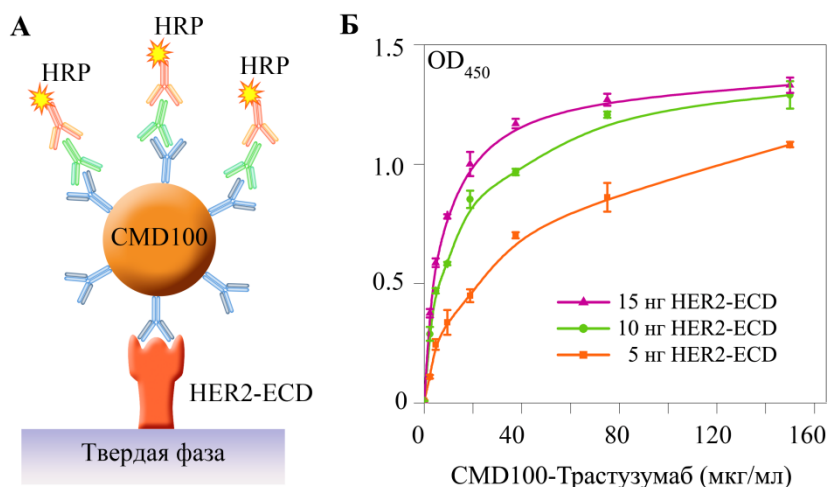


Рис. 22. Исследование функциональной активности конъюгатов CMD100-Трастузумаб. **А)** Схема анализа. CMD100-Трастузумаб инкубировали с сорбированным в течение ночи очищенным внеклеточным доменом HER2/neu рецептора (HER2-ECD) и затем последовательно проявляли козыми анти-человеческими антителами и кроличьими анти-козыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). **Б)** Зависимость поглощения *o*-фенилендиамина – субстрата пероксидазы, измеренная при $\lambda=450$ нм (OD_{450}) от концентрации CMD100-Трастузумаб и от количества HER2-ECD. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

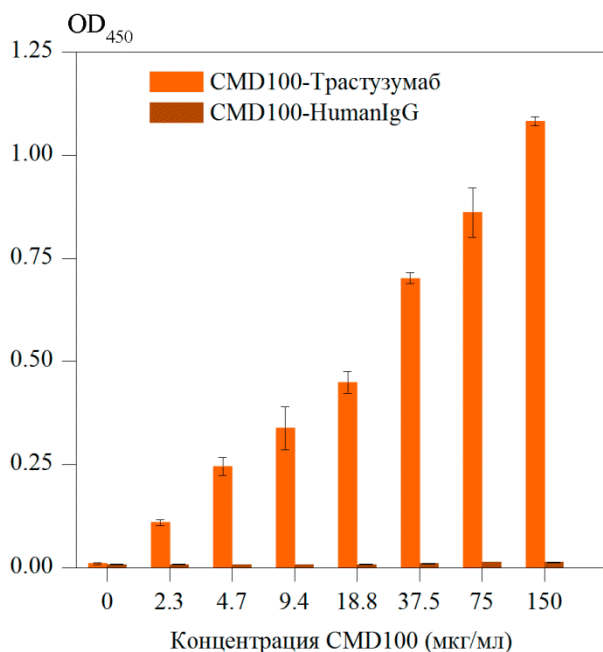


Рис. 23. Зависимость поглощения *o*-фенилендиамина – субстрата пероксидазы, измеренная при $\lambda=450$ нм (OD_{450}) от концентрации CMD100-Трастузумаб и CMD100-HumanIgG при количестве сорбированного HER2-ECD 5 нг. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

4.1.2. Количественный анализ взаимодействия наночастиц с клетками на основе технологии MPQ

Полученные конъюгаты использовали для количественного анализа экспрессии HER2/neu на поверхности клеток. Для этого были выбраны две линии клеток, а именно, линия

SK-OV-3, гиперэкспрессирующая HER2/neu [Shepard et al. 1991], и линия CHO, не экспрессирующая рецепторы семейства EGFR [Ray et al. 2011]. Детекцию количества наночастиц, связавшихся с клетками, проводили с использованием оригинальной MPQ-технологии (*Magnetic Particle Quantification*, [Nikitin et al. 2007]), как схематично представлено на **рис. 24**, данный метод количественной детекции взаимодействия “наночастица-клетка” был назван нами “MPQ-цитометрия” (*MPQ-cytometry*). Фотография соответствующего оригинального регистратора для измерения количества наночастиц представлена на **рис. 18**.

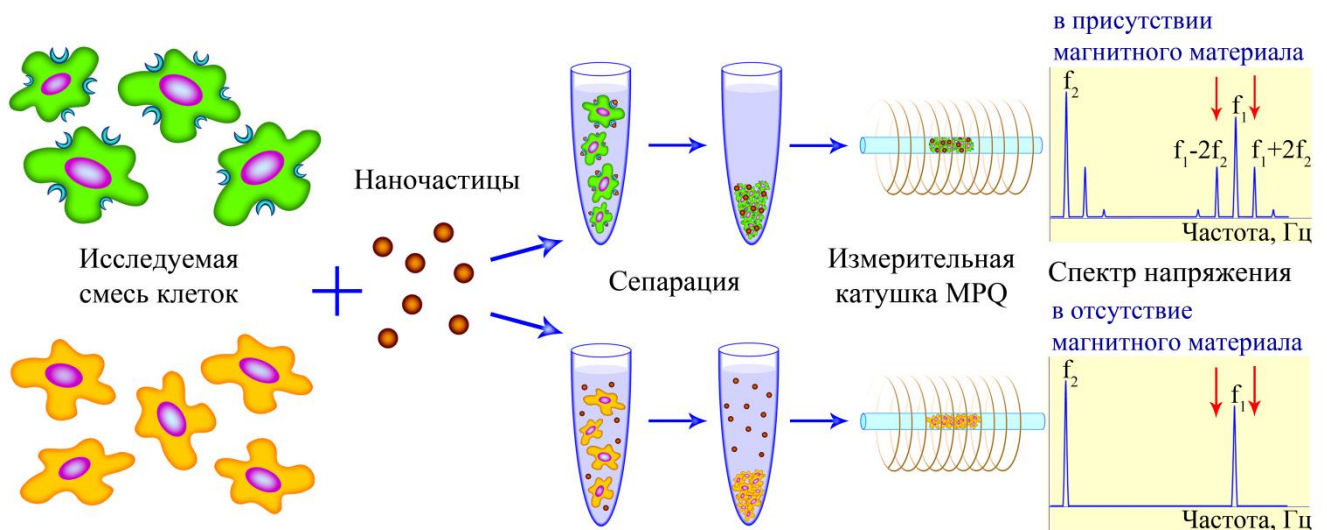


Рис. 24. Схема метода MPQ-цитометрии: мечение клеток и детекция наночастиц, связанных с клетками. Исследуемую смесь клеток инкубируют с суспензией наночастиц, несвязавшиеся частицы сепарируют (например, центрифугированием). Количество связанных с клетками частиц измеряют с помощью технологии MPQ (*Magnetic Particle Quantification*), детектирующей количество нелинейных магнитных материалов на комбинаторных частотах.

$0.5 \cdot 10^3$ клеток SK-OV-3 и CHO, снятых с поверхности культурального пластика, инкубировали с CMD100-Трастузумаб, после чего несвязавшиеся конъюгаты сепарировали центрифугированием. Осадок, содержащий клетки, меченные наночастицами, в 30 мкл PBS помещали в измерительную зону регистратора нелинейных магнитных материалов на комбинаторных частотах. Абсолютный измеренный сигнал CMD100 в образце клеток был разделен на число клеток и далее представлен в фемтограммах на клетку.

Сигнал регистратора был прокалиброван по отношению к реальному массовому содержанию наночастиц CMD100 в образце, калибровочная прямая представлена на **рис. 25**. Предел детекции синтезированных частиц составил 0.33 нг в объеме 30 мкл по 2σ критерию, согласно которому, минимально детектируемое количество CMD100 определяли как значение специфического сигнала, превышающее двойное стандартное отклонение от сигнала буфера без магнитного материала. Для определения молярного предела детекции данного метода была использована технология Nanoparticle Tracking Analysis, NTA (NanoSight NS300, Malvern Instruments). Согласно NTA-анализу наночастиц CMD100, их массовая концентрация 1 г/л

соответствует молярной концентрации $(1.98 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$ М, следовательно, предел детекции составляет $6.5 \cdot 10^{-18}$ моль.

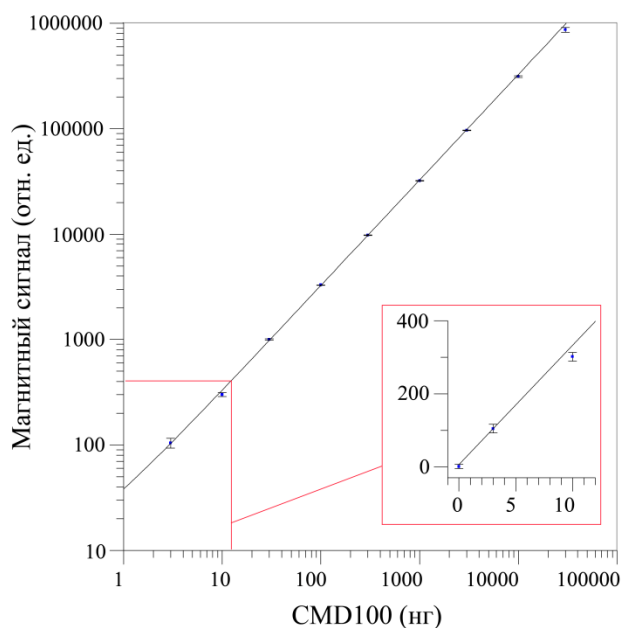
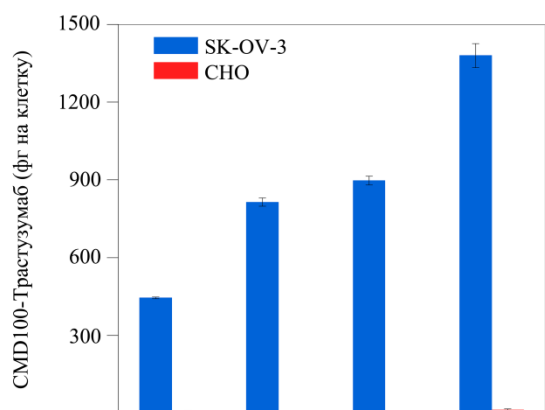


Рис. 25. Калибровочная прямая: зависимость реальных показаний MRQ-регистратора от массового содержания CMD100 в образце в логарифмических шкалах (со вставкой в линейных шкалах в начале координат). Линия тренда с $R^2 = 0.9992$ показана непрерывной черной прямой. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

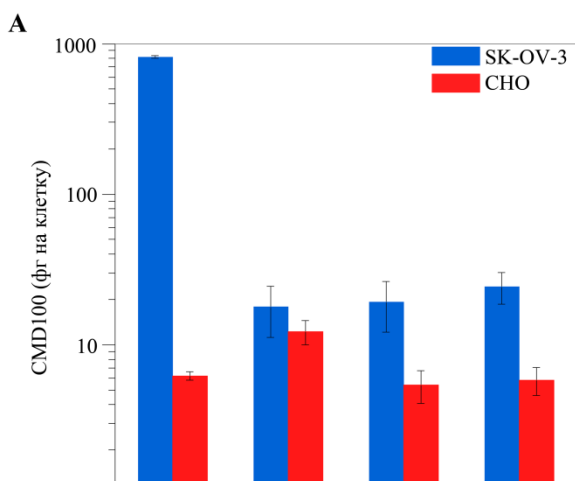
Количество CMD100-Трастузумаб, связанное с клетками, зависело от концентрации конъюгатов с сохранением специфичности взаимодействия в тестируемом диапазоне концентраций (**рис. 26**). Для последующих экспериментов была выбрана концентрация конъюгатов 36 мкг/мл как минимально необходимая для достижения максимальной специфичности при взаимодействии с клетками. Максимальное соотношение CMD100-Трастузумаб, связанных с клетками SK-OV-3 и CHO, оказалось более чем 130, что демонстрирует высокую селективность метода для анализа экспрессии HER2/neu рецептора при его использовании с соответствующими нацеленными частицами.

Отсутствие неспецифического взаимодействия наночастиц с клетками при выбранной концентрации было подтверждено дополнительными отрицательными контролями, включающими исходные наночастицы без Трастузумаба, а также конъюгаты наночастицы с поликлональными человеческими IgG и неспецифичным белком – БСА, связывание которых как с клетками SK-OV-3, так и с CHO было относительно низким (**рис. 27А**).

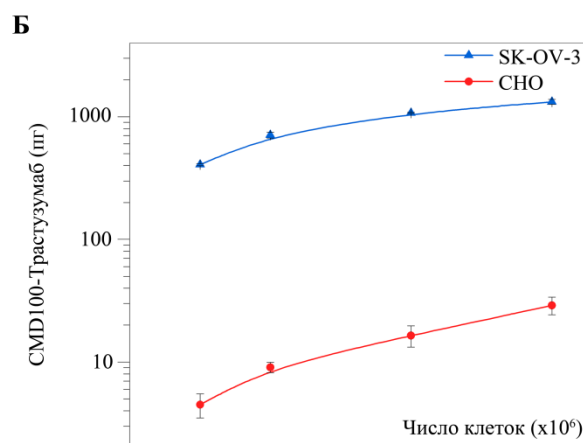


Линия клеток	Концентрация CMD100-Трастузумаб			
	18 мкг/мл	36 мкг/мл	54 мкг/мл	72 мкг/мл
SK-OV-3	445 ± 4	814 ± 16	897 ± 18	1380 ± 50
CHO	7 ± 2	6.2 ± 0.4	6.8 ± 1.9	12 ± 4
Соотношение	63	131	132	115

Рис. 26. Зависимость количества конъюгатов CMD100-Трастузумаб, связанных со SK-OV-3 и CHO клетками, от концентраций конъюгатов, определённая МРQ-цитометрией. Максимально достигнутое соотношение количества CMD100-Трастузумаб, связанных со SK-OV-3 по отношению к CHO, равно 132. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.



Линия клеток	Система контролей специфичности взаимодействия			
	CMD100-Трастузумаб	CMD100-HumanIgG	CMD100-BCA	CMD100
SK-OV-3	814 ± 16	18 ± 7	19 ± 7	24 ± 6
CHO	6.2 ± 0.4	12 ± 2	5.4 ± 1.3	5.8 ± 1.2
Соотношение	131	1.5	3.5	4.1



Линия клеток	Число клеток (x10 ⁶)			
	0.5 × 10 ⁶ клеток	1 × 10 ⁶ клеток	2 × 10 ⁶ клеток	3 × 10 ⁶ клеток
SK-OV-3	407 ± 8	710 ± 40	1073 ± 12	1320 ± 60
CHO	4.5 ± 1.0	9.1 ± 0.9	16 ± 3	29 ± 5
Соотношение	90	78	67	46

Рис. 27. Количественный анализ взаимодействия конъюгатов CMD100-Трастузумаб с клетками методом МРQ-цитометрии. **А)** Система контролей специфичности взаимодействия CMD100-Трастузумаб с HER2/neu рецептором на поверхности клеток. Клетки SK-OV-3 и CHO инкубировали с CMD100-Трастузумаб, CMD100-HumanIgG, CMD100-BCA и CMD100; количество связанных наночастиц с клетками, определённое методом МРQ-цитометрии как описано выше, представлено в пикограммах на клетку в логарифмической шкале. **Б)** Интегральное количество CMD100-Трастузумаб в пикограммах, связанное с клетками SK-OV-3 и CHO, в зависимости от количества клеток в образце при инкубации с частицами. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

Также мы исследовали зависимость количества CMD100-Трастузумаб, связанных с клетками при инкубации от числа клеток. Согласно данным, представленным на **рис. 27Б**, CMD100-Трастузумаб сохраняют специфичность взаимодействия с клетками при увеличении их числа в суспензии, и МРQ-цитометрия может быть использована для подсчёта частиц, связанных с клетками, даже в образцах, содержащих достаточно большое число клеток (здесь до $3 \cdot 10^6$ клеток в образце).

4.1.3. Детекция HER2/neu-гиперэкспрессирующих клеток в составе сложной смеси

Разработанный метод для детекции наночастиц, которые специфично связываются с поверхностью клеток за счёт рецептор-опосредованного взаимодействия, может применяться для детекции доли клеток, экспрессирующих определённый антиген в составе сложной смеси. Мы продемонстрировали эту возможность, смешав в разных пропорциях клетки SK-OV-3 и CHO (с фиксированным общим числом клеток) и проинкубировав данные образцы с конъюгатами CMD100-Трастузумаб, определив количество связанных частиц методом MPQ-цитометрии. Результирующее количество CMD100-Трастузумаб в образцах зависит линейно от доли клеток SK-OV-3 в смеси (рис. 28).

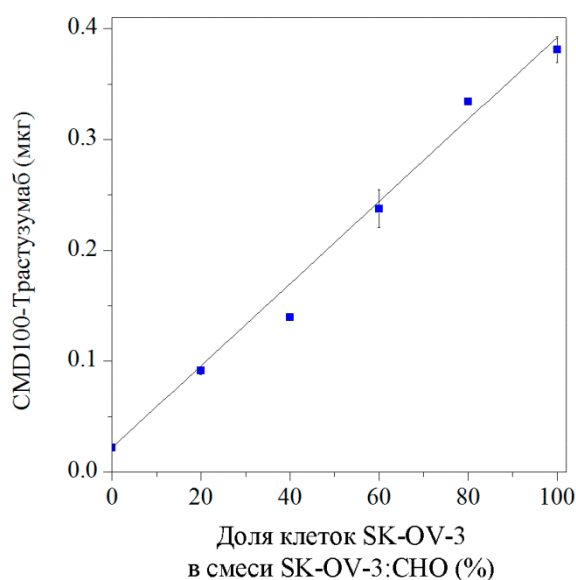


Рис. 28. Количество конъюгатов CMD100-Трастузумаб в образцах, содержащих смесь клеток SK-OV-3 и CHO, в зависимости от доли клеток SK-OV-3 в смеси. HER2/neu-положительные SK-OV-3 и HER2/neu-отрицательные CHO клетки были смешаны в разных соотношениях и инкубированы с конъюгатами CMD100-Трастузумаб. Количество связанных конъюгатов оценивали методом MPQ-цитометрии. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

4.1.4. Неселективное мечение клеток наночастицами с полиэтиленминовой полимерной оболочкой

Помимо наночастиц, селективно взаимодействующих с клетками на основе, например, лиганд-рецепторных взаимодействий, внимание исследователей привлекают наночастицы для неселективного мечения клеток. В этом случае поверхность наночастиц покрывают полисахаридами, различными амфифильными молекулами и другими полимерами; такие покрытия служат как основой для присоединения направляющих молекул, так и сами могут непосредственно взаимодействовать с клеточной поверхностью, например, за счёт электростатического взаимодействия [Wilhelm and Gazeau 2008]. Представляется

перспективным использование таких наночастиц, например, для модификации клеток в регенеративной медицине: для инженерии тканей и клеточной терапии. Доставка клеток, модифицированных МНЧ, в нужную область организма возможна посредством фокусировки внешним магнитным полем. Более того, неинвазивные методы детекции магнитных материалов позволяют проследить распределение таких клеток в организме на протяжении длительного времени [Hoehn et al. 2007; Nikitin et al. 2009; Ito et al. 2004; Cromer Berman, Stacey M et al. 2011]. Такие МНЧ востребованы также в других областях биотехнологии и биомедицины, например в генной доставке. Комплексы плазмидной ДНК с МНЧ, рассматриваемые как удобная альтернатива вирусным векторам, подвергаются воздействию постоянного магнитного поля в течение непродолжительного времени, что способствует их быстрому проникновению в клетки, понижая эффективную концентрацию вектора и повышая эффективность трансфекции [Mukhaulyk et al. 2007]. Для описанных выше задач необходимо создание биосовместимых МНЧ, которые способны эффективно связываться с клеточной поверхностью, не повреждая клетку и сохраняя ее жизнеспособность.

Нами были синтезированы наночастицы оксида железа, стабилизированные 25 кДа полиэтиленгликолем (PEI40) (раздел 3.5.1 главы Материалы и Методы) в качестве перспективных маркёров клеточной поверхности. Электронная микрофотография наночастиц PEI40 представлена на **рис. 29А**. Фазовый состав PEI40 изучали методом микродифракции электронов и методом рентгенодифракционного анализа на рентгеновском порошковом дифрактометре ARL X'TRA (Thermo Fisher Scientific Inc.) с использованием $\text{CuK}\alpha$ -излучения с длиной волны $\lambda = 0.1542$ нм. Установлено, что наиболее вероятная фаза магнитных оксидов железа в данных МНЧ – магнетит Fe_3O_4 с пространственной симметрией Fd3m (PDF карточка JCPDS № 01-071-6336). Гидродинамический радиус частиц составил 37.3 ± 14.9 нм (**рис. 29Б**), ζ -потенциал PEI40 составил 15.9 ± 0.8 мВ: поверхность частиц заряжена положительно, что позволяет сорбировать на их поверхности отрицательно заряженные молекулы (например, ДНК), либо использовать такие МНЧ для мечения поверхности эукариотических клеток, поскольку большинство эукариотических клеток имеют отрицательный поверхностный заряд.

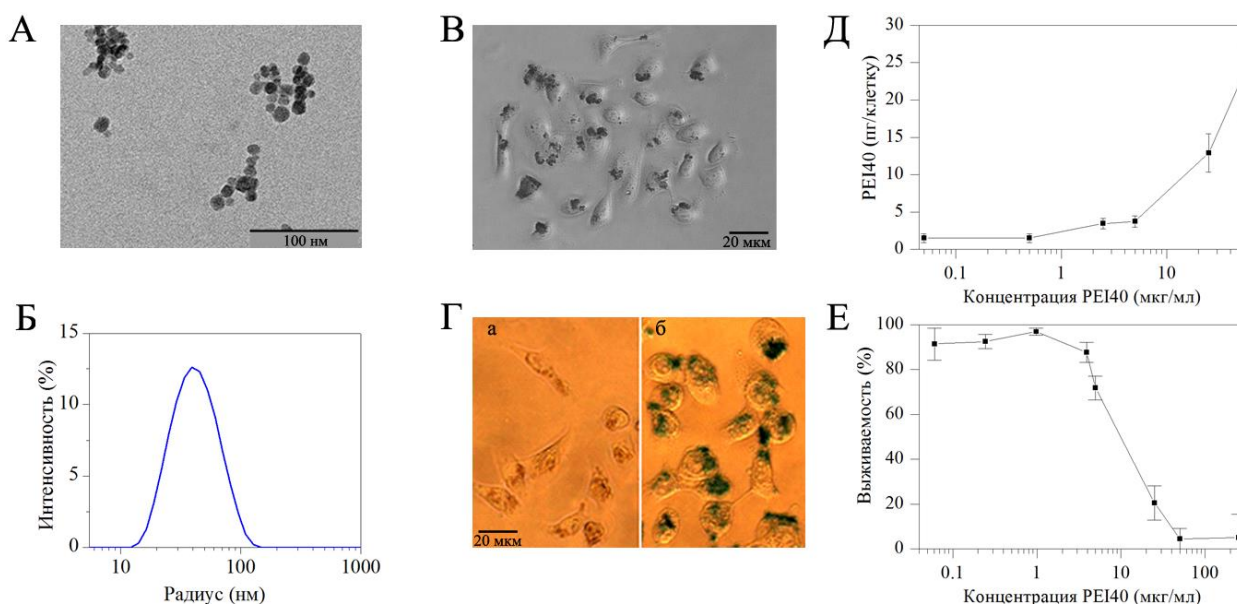


Рис. 29. Наночастицы оксида железа с полиэтиленминовой полимерной оболочкой и их характеристика. **А** Электронная микрофотография наночастиц PEI40, полученная на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100. **Б** Распределение PEI40 по гидродинамическим размерам. **В** Микрофотография клеток SK-OV-3, полученная на микроскопе Axiovert 200 (Carl Zeiss), после инкубации с PEI40. **Г** Микрофотография клеток SK-OV-3, полученная на микроскопе Axiovert 200 (Carl Zeiss), после инкубации с PEI40 с последующим окрашиванием наночастиц гексацианоферратом калия: а) без добавления $K_4[Fe^{II}(CN)_6]$, б) с добавлением $K_4[Fe^{II}(CN)_6]$. **Д** Количество PEI40, связавшихся с клетками, в зависимости от концентрации частиц при инкубации, определённое методом MPQ-цитометрии. **Е** Цитотоксичность наночастиц PEI40.

Было продемонстрировано активное взаимодействие наночастиц PEI40 с клетками SK-OV-3 методом оптической микроскопии (**рис. 29В**) и со специфическим прокрашиванием для визуализации PEI40 (**рис. 29Г**), а также методом MPQ-цитометрии исследовано количество наночастиц, связавшееся с клетками в зависимости от концентрации при инкубации (**рис. 29Д**). Более того, клетки, обработанные PEI40 и снятые с поверхности культурального пластика, проявляли способность к перемещению под действием постоянного магнита. Поскольку имеются данные о том, что полиэтиленмин, хотя и является широко используемым трансфекционным реагентом, обладает цитотоксичностью [Xu et al. 2011], то следовало ожидать, что и PEI40 будут также обладать токсическим эффектом. Токсичность PEI40 исследовали с помощью МТТ-теста (**рис. 29Е**). Было установлено, что IC50 и IC20 наночастиц PEI40 составляют 11 и 3 мкг/мл соответственно. Поскольку для эффективной трансфекции с использованием комплексов плазмидной ДНК, сорбированной на наночастицах с полиэтиленминовой оболочкой, необходима концентрация наночастиц около 5 мкг/мл [Mukhaylyk et al. 2007], то выявленные значения токсичности PEI40 являются вполне приемлемыми. Следует отметить, что при данной концентрации наночастицы PEI40 отчётливо визуализировались с помощью оптической микроскопии на поверхности клеток SK-OV-3.

4.1.5. Корреляция метода МРQ-цитометрии с методами оптической микроскопии, проточной цитометрии и флуоресцентной спектроскопии

С целью верификации разработанного метода МРQ-цитометрии как для количественного анализа наночастиц, связанных с клетками, так и для детекции поверхностных антигенов, мы сравнили его с методами флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и флуоресцентной спектроскопии, широко используемыми в молекулярной и клеточной биологии. Для этого мы выбрали шесть линий клеток различного происхождения: три линии, гиперэкспрессирующие рецептор HER2/neu (SK-OV-3, SK-OV-3-1ip и SK-BR-3), две линии с нормальным уровнем экспрессии HER2/neu (HeLa, MCF-7), и одна линия без экспрессии HER2/neu (CHO). Предварительно экспрессия данного рецептора была подтверждена методом флуоресцентной микроскопии окрашиванием фиксированных клеток анти-HER2/neu антителами, конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом (Трастузумаб-ФИТЦ) (**рис. 30**).

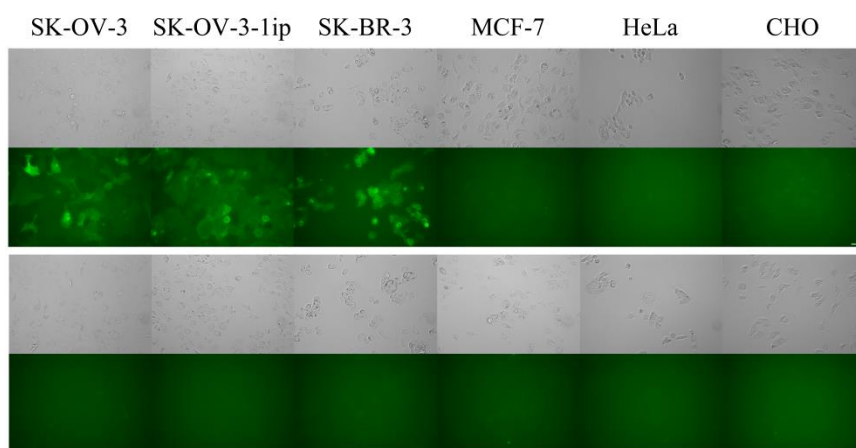


Рис. 30. Специфичная визуализация экспрессии HER2/neu на поверхности клеток. Верхняя панель – изображения клеток, инкубированных с анти-HER2/neu антителами (Трастузумаб-ФИТЦ) в проходящем свете и при возбуждении флуоресценции. Нижняя панель – изображения клеток, инкубированных с контрольными антителами (поликлональными человеческими антителами, конъюгированными с ФИТЦ). Изображения получены на инвертированном флуоресцентном микроскопе Leica DMI6000B. Шкалы – 50 мкм.

Клетки вышеописанных линий инкубировали с наночастицами, конъюгированными с Трастузумабом и мечеными ФИТЦ (CMD100-Трастузумаб-ФИТЦ), а также с немечеными CMD100-Трастузумаб. Взаимодействие данных конъюгатов с клетками анализировали методами флуоресцентной микроскопии (**рис. 31А**) и МРQ-цитометрии (**рис. 31В** – оранжевые столбцы). Соответствующие контрольные эксперименты для клеток, меченных CMD100-HumanIgG-ФИТЦ и CMD100-HumanIgG представлены на **рис. 32**. Как следует из представленных на **рис. 31** данных, интенсивность флуоресценции комплексов клеток с наночастицами, визуализированных методом флуоресцентной микроскопии (**рис. 31А**), коррелирует с количественными данными МРQ-цитометрии (**рис. 31В** – оранжевые столбцы).

Далее, для демонстрации возможностей метода для оценки экспрессии мембраноассоциированных белков, мы сравнили MPQ-цитометрию с двумя количественными методами, а именно, проточной цитометрией и флуоресцентной спектроскопией. Было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание вышеописанных линий клеток как в суспензии – для проточной цитометрии (рис. 31Б, 31В – зелёные столбцы), так и на поверхности культурального 96-ти луночного планшета – для флуоресцентной спектроскопии (рис. 31В – фиолетовые столбцы) антителами Трастузумаб-ФИТЦ и HumanIgG-ФИТЦ. Количество конъюгатов CMD100-Трастузумаб, связанное с клетками (в фемтограммах на клетку) сравнивали с интенсивностью флуоресценции клеток, меченных Трастузумаб-ФИТЦ, оцененное методами проточной цитометрии и флуоресцентной спектроскопии (рис. 31В).

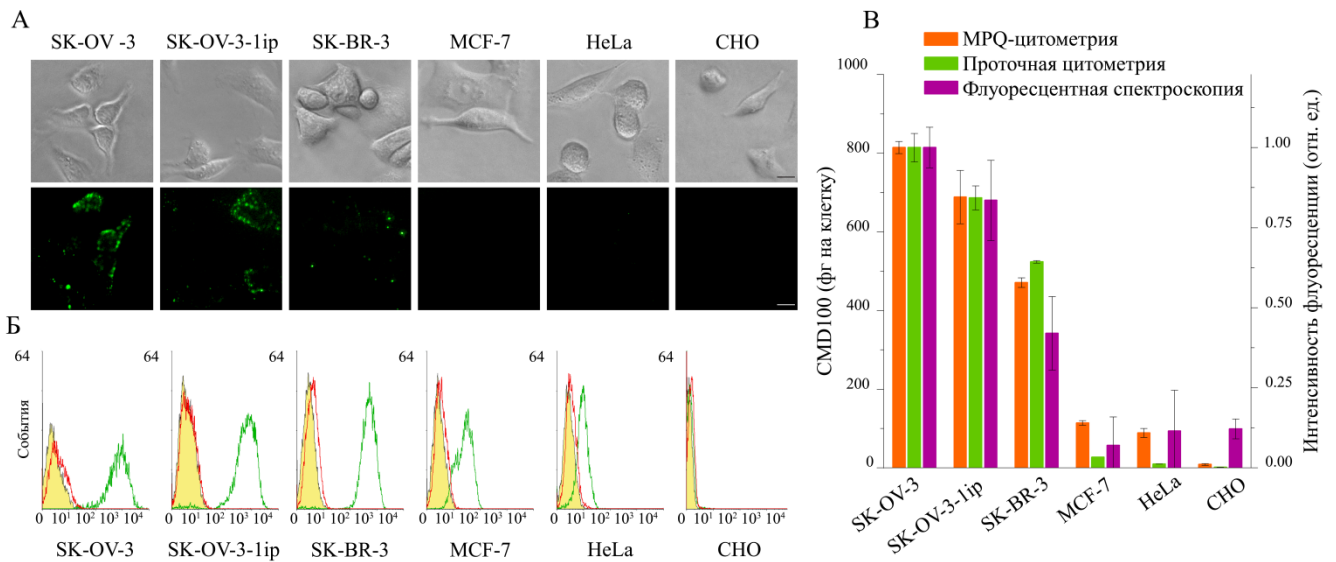


Рис. 31. Исследование экспрессии HER2/neu на поверхности клеток методом MPQ-цитометрии в сравнении с методами флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и флуоресцентной спектроскопии, широко используемыми в молекулярной и клеточной биологии. **А)** Визуализация клеток, инкубированных с CMD100-Трастузумаб-ФИТЦ методом флуоресцентной микроскопии: верхняя панель – проходящий свет, нижняя панель – при возбуждении флуоресценции. Шкалы – 20 мкм. **Б)** Исследование клеток, окрашенных антителами Трастузумаб-ФИТЦ и HumanIgG-ФИТЦ, методом проточной цитометрии: жёлтые заполненные гистограммы – аутофлуоресценция клеток, красные незаполненные гистограммы – HumanIgG-ФИТЦ, зелёные незаполненные гистограммы – Трастузумаб-ФИТЦ. **В)** Сравнение данных, полученных методом MPQ-цитометрии с данными проточной цитометрии и флуоресцентной спектроскопии: оранжевые столбцы – количество CMD100-Трастузумаб в фемтограммах на клетку, измеренное MPQ-цитометрией (левая у-ось), зелёные столбцы – данные проточной цитометрии, а именно, средняя интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Трастузумаб-ФИТЦ, нормализованная на единицу (правая у-ось), фиолетовые столбцы – данные флуоресцентной спектроскопии, а именно, интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Трастузумаб-ФИТЦ с вычетом аутофлуоресценции клеток, нормализованная на единицу (правая у-ось). Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

Из данных, представленных на рис. 31, можно видеть, что данные MPQ-цитометрии находятся в корреляции с качественными данными оптической микроскопии и количественными данными – двух меточных методов, основанных на флуоресценции. Следует отметить, что MPQ-цитометрия проявляет немного более высокую чувствительность при детекции нормального уровня экспрессии HER2/neu (имеются в виду клетки MCF-7 и HeLa) по

сравнению с проточной цитометрией, однако схожий характер проявляется и при использовании флуоресцентной спектроскопии. Таким образом, МРQ-цитометрия представляет собой удобный альтернативный метод для оценки экспрессии поверхностных антигенов клеток.

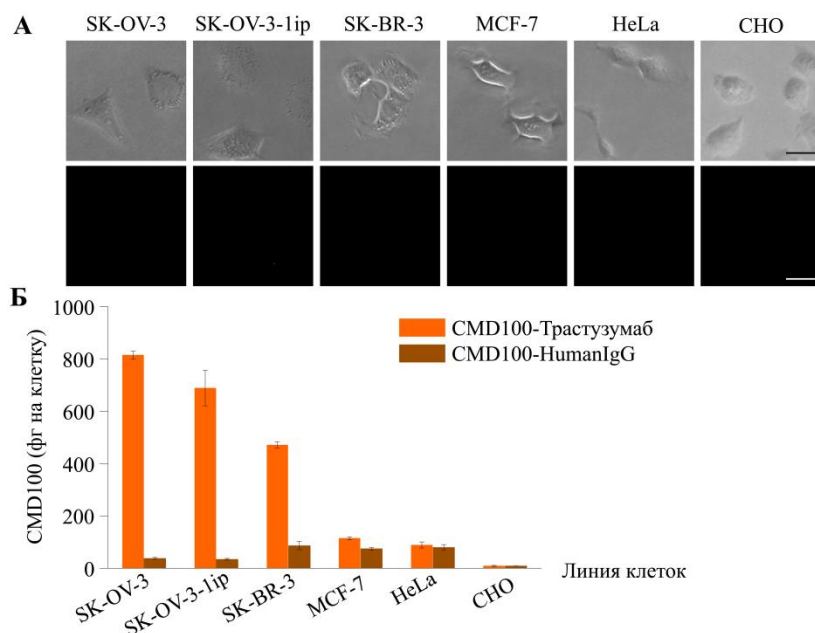


Рис. 32. Контрольные эксперименты по оценке экспрессии HER2/neu различными методами. **А)** Визуализация клеток, инкубированных с CMD100-HumanIgG-ФИТЦ флуоресцентной микроскопией: верхняя панель – проходящий свет, нижняя панель – при возбуждении флуоресценции. Шкалы – 20 мкм. **Б)** Количество CMD100-Трастузумаб и CMD100-HumanIgG (контроль), связанное с клетками, определённое методом МРQ-цитометрии. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

Разработанный метод МРQ-цитометрии представляет собой высокочувствительный способ для количественной характеристики взаимодействия наноструктур с живыми клетками. Разработанный метод нацелен на применение в исследованиях различных процессов взаимодействий между наночастицами и клетками, таких как интернализация и деградация, специфичное и неспецифичное связывание, с целью поиска оптимальных частиц для биомедицинских применений: адресной доставки лекарств, мониторинга клеток, магнитоуправляемой инженерии тканей и других применений. Также благодаря тому факту, что наряду с нано- и микрочастицами, магнитно могут быть мечены и другие биологические объекты, такие как белки [Osterfeld et al. 2008], бактерии [Grossman et al. 2004] и вирусы [Perez et al. 2003], предложенный метод может быть использован и для изучения взаимодействия данных наноразмерных объектов с клетками.

Что касается потенциальных клинических применений МРQ-цитометрии, мы полагаем, что разработанный метод может быть использован для диагностики различных мембрано-ассоциированных маркёров заболеваний. Было показано, что МРQ-цитометрия применима для детекции слабых различий в уровне экспрессии онкомаркера HER2/neu, который обычно экспрессируется на базовом уровне во многих здоровых тканях человека. В клинической

практике, HER2/неu статус обычно определяется полуколичественно иммуногистохимическим методом (по шкале от 0 до 3+, соответствующей выраженности окраски клеточной мембраны). В то время, когда результат 3+ рассматривается как положительный, а 0 или 1+ как отрицательный, пациент с результатом 2+ отправляется на дополнительную, гораздо более дорогостоящую диагностику. Это может быть, например, метод проточной цитометрии, являющийся “золотым стандартом” в клеточной биологии, однако его использование в клинике ограничено из-за дорогостоящего оборудования, необходимости присутствия высококвалифицированного персонала и постоянной технической поддержки.

Разработанный подход к анализу поверхностных антигенов клетки может служить как лёгкая в использовании альтернатива или дополнение к проточной цитофлуориметрии благодаря продемонстрированной в работе корреляции количественных данных по экспрессии HER2/неu, полученных разработанным магнетометрическим методом, так и проточной цитометрией с индивидуальными антителами. Мы полагаем, что МРQ-цитометрия может быть потенциально использована как для *in vitro* диагностики (например, для образца крови или биоптата), так и для *ex vivo* диагностики (постоперативного определения статуса опухоли) в случаях, когда использование дорогого и непортативного оборудования невозможно, например, в полевых условиях или в развивающихся странах.

Мы не видим принципиальных препятствий для расширения использования МРQ-цитометрии для исследования уровней экспрессии других мембраноассоциированных молекул, таких как, например, различные кластеры дифференцировки или молекулы клеточной адгезии.

В отличие от оптических методов, включая те, которые основаны на флуоресценции, на результаты измерений МРQ-цитометрии не влияют оптические свойства образца. Таким образом, метод позволяет детектировать наночастицы, связанные с клетками, даже в оптически непрозрачных средах и вне зависимости от многих факторов, таких, как выгорание или окисление меток, зависимость их свойств от pH или температуры, аутофлуоресценция образцов, модификация наночастиц после интернализации в клетки и ряда других.

Что касается недостатков разработанного метода, необходимо отметить, что, в отличие от метода проточной цитометрии, который позволяет использовать несколько каналов флуоресценции, МРQ-цитометрия на данный момент не позволяет проводить одновременную мультипараметрическую обработку образцов и детекцию внутриклеточных антигенов. Однако, МРQ технология позволяет анализировать большое количество похожих образцов клеток с временным разрешением в 3.5 секунды, а также потенциально возможна мультипараметрическая детекция при использовании наночастиц с различной формой кривых

намагничивания [Lenglet 2009]. Достоинства и недостатки МРQ-цитометрии и проточной цитометрии в сравнении представлены в **табл. 7**.

Табл. 7. Сравнительные характеристики методов проточной цитометрии и МРQ-цитометрии.

Проточная цитометрия	МРQ-цитометрия
– дорогостоящий метод, доступный только в специализированных центрах	+ метод доступен для использования в полевых условиях
– громоздкие приборы, нацеленные на использование только в стационарных условиях, требующие регулярной технической поддержки и работы высококвалифицированного персонала	+ портативные приборы без движущихся частей, не требующие дорогих расходных материалов
– на сигнал в значительной степени влияет аутофлуоресценция клеток, что особенно вызывает проблемы при слабых сигналах флуоресценции	+ на сигнал не влияют линейные диа- и парамагнетики, такие как ткани, кровь, пластик, стекло, таким образом обеспечивая хорошее отношение сигнал/шум
– цветная или непрозрачная среда усложняет анализ	+ детекция даже в оптически непрозрачных средах
– нестабильность меток	+ магнитные характеристики стабильны на протяжении длительного времени
+ мультипараметрическая диагностика в нескольких каналах флуоресценции	± потенциальное расширение технологии на мультипараметрическую диагностику
+ возможность детекции внутриклеточных антигенов	– невозможность детекции внутриклеточных антигенов

4.2. Создание конъюгатов и надмолекулярных конструкций на основе наночастиц магнетита, мини-антител и белкового модуля “барназа:барстар” для селективного мечения клеток

В обзоре литературы было отмечено, что одним из основных преимуществ наночастиц является возможность оснащения их поверхности различными биомолекулами, обеспечивающими биологическую активность частиц, а именно: токсичными и/или визуализирующими модулями, а также направляющими агентами для реализации доставки частиц только к определённого типу клеток (адресной доставки).

Для адресной доставки наночастиц к клеткам-мишеням в качестве направляющих агентов успешно используются полноразмерные антитела, различными способами иммобилизованные на поверхности наночастиц. Однако в некоторых случаях более перспективным представляется использование для этой цели конструкций на основе антигенсвязывающих участков антител, например, мини-антител формата scFv (англ. *single*

chain variable fragments – одноцепочечные Fv-фрагменты) состоящих из вариабельных доменов лёгких и тяжелых цепей иммуноглобулина, связанных гибким пептидным линкером [Bird et al. 1988]. Малый размер (25-30 кДа) и отсутствие константного домена понижают иммуногенность таких молекул (связанную с процессами опсонизации и активации системы комплемента). Следует также отметить лёгкость биотехнологической наработки в прокариотических системах экспрессии, а также возможность создания различных генно-инженерных конструкций на основе таких антител с токсичными или визуализирующими блоками [Deyev and Lebedenko 2008].

Ниже описано получение конструкций на основе наночастиц CMD100 и генно-инженерных рекомбинантных мини-антител 4D5scFv, высоко специфичных к внеклеточному домену рецептора HER2/neu [Deyev et al. 2003; Serebrovskaya et al. 2009].

Первоначально нами были получены надмолекулярные конструкции CMD100 с 4D5scFv (CMD100-4D5scFv). Конъюгаты наночастиц CMD100-4D5scFv неспецифично взаимодействовали с HER2/neu-гиперэкспрессирующими клетками SK-BR-3, в равной степени связываясь с HER2/neu-отрицательными клетками CHO. Вероятно, это связано с тем, что 4D5scFv – небольшой положительно заряженный белок при pH = 7.4 (расчётное значение pI = 8.5) и при конъюгации с ним на поверхности частиц возникают локально положительные заряды, которые стимулируют агрегацию наночастиц с отрицательным поверхностным зарядом. Действительно, после конъюгации ζ -потенциал наночастиц CMD100 возрос с -18.9 ± 0.8 мВ до -12.1 ± 0.7 мВ, также значительно увеличивался их размер, свидетельствуя об агрегации (табл. 8, рис. 33). Проблема специфичности связывания CMD100-4D5scFv с клетками может возникать также вследствие стерических затруднений (из-за небольшого размера мини-антитела) при распознавании антигена на поверхности клеток, либо из-за того, что одна молекула белка может связываться с поверхностью наночастиц при конъюгации посредством нескольких аминокислотных групп. Это может вызывать частичную денатурацию молекулы на поверхности наночастиц, приводя к потере функциональной активности.

Для создания конструкций на основе наночастиц и мини-антител, специфично распознающих онкомаркер HER2/neu на поверхности раковых клеток, нами была использована система молекулярных адапторов барназа:барстар. Барназа (Bn), бактериальная рибонуклеаза *Bacillus amyloliquefaciens*, и ее природный ингибитор барстар (Bs) – небольшие белки (12 и 10 кДа, соответственно), которые характеризуются чрезвычайно быстрой кинетикой взаимодействия ($k_{on} \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$) и высокой аффинностью связывания ($K_a \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$) [Deyev et al. 2003].

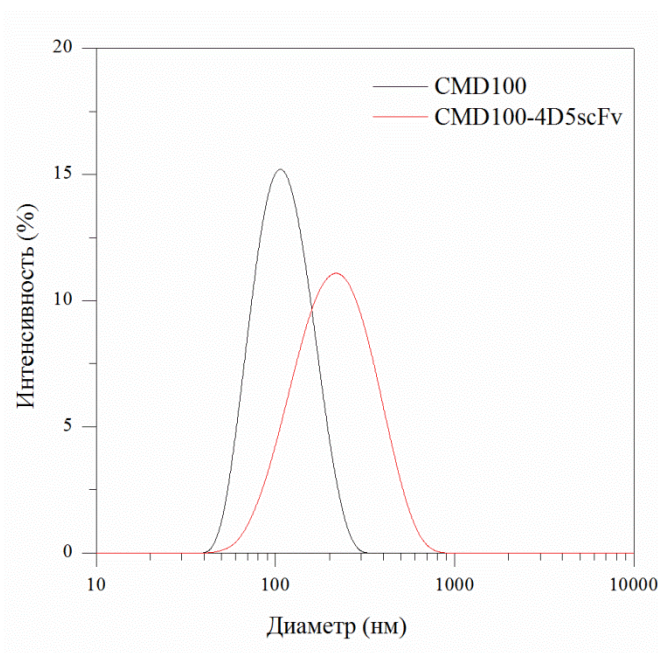


Рис. 33. Распределение по гидродинамическим размерам CMD100 (размер по кумулятному анализу 103 ± 33 нм) и конъюгатов CMD100-4D5scFv (187 ± 82 нм), определённое с использованием анализатора Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments).

Табл. 8. Гидродинамический диаметр и ζ -потенциал CMD100 и конъюгатов на их основе.

Обозначение частиц	ζ -потенциал, мВ	Диаметр, нм
CMD100	-18.9 ± 0.8	103 ± 33
CMD100-4D5scFv	-12.1 ± 0.7	187 ± 82
CMD100-Bs	-18.2 ± 0.5	93 ± 35
(CMD100-Bs):(4D5scFv-Bn-4D5scFv)	-15.2 ± 1.1	93 ± 32
CMD100-(4D5scFv-mCherry)	-15.5 ± 0.3	97 ± 39

Присоединение одного из этих белков к наночастице, а другого – к мини-антителам 4D5scFv, позволяет создавать структуры, специфично распознающие HER2/neu на поверхности клеток. При этом предоставляется возможность двустадийной доставки наночастиц к клеткам и формирование функционально активного комплекса тогда, когда это необходимо [Zdobnova et al. 2012].

Ранее в нашей лаборатории система Bn:Bs была успешно использована для создания ряда генно-инженерных конструкций с флуоресцентными белками [Lebedenko et al. 2007], комплексов с квантовыми точками [Zdobnova et al. 2012], наноалмазами [Sreenivasan et al. 2011], золотыми и магнитными частицами, а также гибридных структур, сочетающих в себе несколько элементов [Nikitin et al. 2010]. Такие конструкции и структуры на основе наночастиц имеют ряд потенциальных применений для диагностики и терапии опухолевых заболеваний.

Для направленной доставки частиц был использован белок слияния 4D5scFv-Bn-4D5scFv, состоящий из двух молекул мини-антитела 4D5scFv и одной молекулы Bn,

компонента системы Vn:Bs. Для присоединения к поверхности наночастиц был выбран Bs, так как в нейтральных условиях этот белок заряжен отрицательно (pI 4.6) и, как следствие, при конъюгации он не должен вызывать агрегацию частиц из-за гашения их поверхностного заряда. Действительно, конъюгаты CMD100-Bs не агрегировали – после конъюгации их размер и ζ -потенциал практически не изменялись (табл. 8). Функциональная активность Bs на поверхности CMD100 была продемонстрирована следующим образом: конъюгаты CMD100-Bs инкубировали с 4D5scFv-Vn-4D5scFv, после чего их ζ -потенциал увеличивался, свидетельствуя о связывании конъюгатов с белком слияния (табл. 8).

Анализ количества конструкций (CMD100-Bs):(4D5scFv-Vn-4D5scFv) (рис. 34А), связавшихся с клетками, проводили с использованием MPQ-цитометрии. Клетки предварительно инкубировали с 4D5scFv-Vn-4D5scFv при +4 °С, затем, после удаления избытка несвязавшегося белка, добавляли конъюгаты CMD100-Bs. Результаты взаимодействия полученных структур с клетками представлены на рис. 34Б. Таким образом, использование модуля Vn:Bs позволило получить коллоидно стабильные конъюгаты магнитных наночастиц с мини-антителами формата scFv, специфично распознающие раковые клетки, гиперэкспрессирующие онкомаркер HER2/neu.

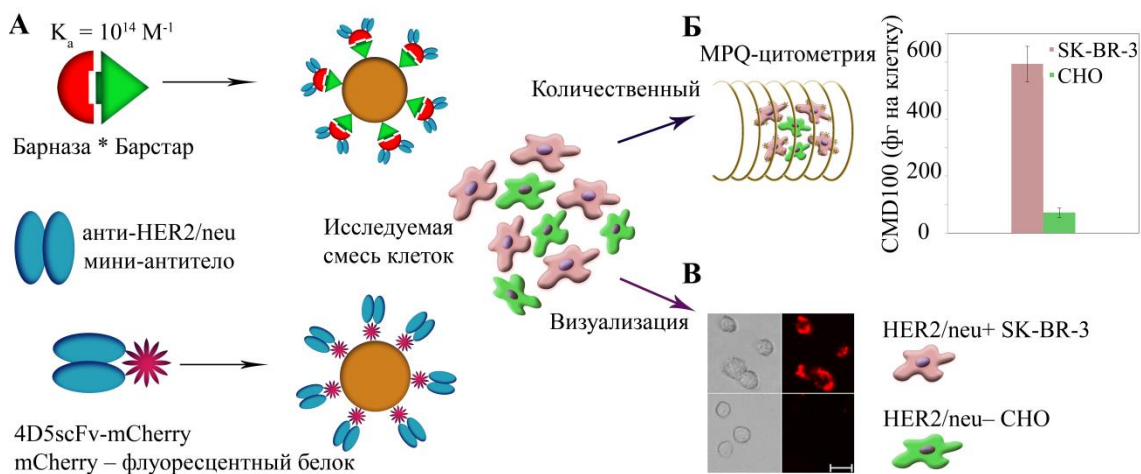


Рис. 34. Селективное мечение клеток конструкциями на основе наночастиц CMD100 и мини-антител. **А)** Схема конструкций. **Б)** MPQ-цитометрия клеток SK-BR-3 и CHO после связывания с суспензией конструкций (CMD100-Bs):(4D5scFv-Vn-4D5scFv). **В)** Специфичная визуализация HER2/neu на поверхности клеток конъюгатами CMD100-(4D5scFv-mCherry) с помощью флуоресцентной микроскопии; левая панель – изображения в проходящем свете; правая панель – при возбуждении флуоресценции. Шкала 20 мкм.

Среди преимуществ мини-антител следует также выделить возможность создания полностью генетически кодируемых конструкций направленного действия для визуализации раковых клеток. А соединение таких конструкций с наночастицами позволяет создавать многофункциональные агенты, которые делают возможным как визуальную, так и

количественную оценку экспрессии определённых антигенов на клеточной поверхности, что может найти применение в диагностике заболеваний.

Нами были созданы коллоидно стабильные конъюгаты CMD100 с белком слияния 4D5scFv-mCherry (**рис. 34А**), размер и ζ -потенциал которых представлены в **табл. 8**. Флуоресцентный белок mCherry – один из наиболее популярных белков из серии mFruits, обладающий оптимальным сочетанием времени созревания, фотостабильности и яркости, а также длины волны испускания флуоресценции [Shaner et al. 2004]. Поскольку mCherry заряжен отрицательно (расчётное значение pI 3.8), мини-антитело 4D5scFv, находясь в составе такого белка слияния, не вызывает агрегации наночастиц при конъюгации, сохраняя при этом свою функциональную активность.

Данные конъюгаты CMD100-(4D5scFv-mCherry) специфично окрашивали поверхность раковых клеток, гиперэкспрессирующих HER2/neu, что было продемонстрировано визуально с использованием флуоресцентной микроскопии (**рис. 34В**).

Таким образом, нами были получены конструкции на основе наночастиц и рекомбинантных мини-антител, селективно распознающих онкомаркёр HER2/neu. Как количественно, так и визуально была продемонстрирована высокая специфичность связывания полученных конструкций с клетками аденокарциномы молочной железы человека. Использование таких нацеленых МНЧ открывает широкие возможности для разработки новых эффективных количественных методов диагностики опухолевых заболеваний.

4.3. Адресная доставка наночастиц к клеткам-мишеням на основе специфического взаимодействия наночастиц, модифицированных лектинами, с гликозилированными белками на поверхности клеток

4.3.1. Исследование взаимодействия “лектин–гликопротеин” в составе наночастиц различной природы

Данная часть работы была направлена на изучение молекулярной пары “лектин–углеводный остаток в составе гликопротеина” как универсальной платформы для сборки наночастиц различной природы и их адресной доставки к клеткам.

Лектины представляют собой белки, обладающие способностью специфично и обратимо связываться с углеводами или их остатками в биополимерах, например, с гликанами, входящими в состав гликопротеинов. Представляется перспективным использование лектинов в качестве направляющего модуля для адресной доставки диагностических и терапевтических

агентов к раковым клеткам, поскольку профиль гликозилирования раковых клеток может отличаться от такового у нормальных клеток [Bies et al. 2004].

Ниже описано комплексное исследование взаимодействия гликопротеинов с рядом лектинов растительного происхождения разной специфичности с использованием наночастиц различной природы, а именно, магнитных и золотых, с целью поиска эффективно взаимодействующих белковых пар для создания новых классов многофункциональных наноагентов, основанных на белок-опосредованной сборке.

В составе пар для исследования взаимодействия использовали следующие лектины разной специфичности к моносахаридам: маннозо- и глюкозоспецифичные – агглютинин чечевицы пищевой (*Lens culinaris* agglutinin, LCA) и конканавалин А (лектин из *Canavalia ensiformis*, ConA); N-ацетилглюкозаминспецифичный – агглютинин зародыша пшеницы (wheat germ agglutinin, WGA); N-ацетилгалактозаминспецифичный – агглютинин из соевых бобов (soybean agglutinin, SBA) и следующие гликопротеины: овальбумин из яичного белка, асиалофетуин сыворотки телёнка, фетуин бычьей сыворотки, бычий трансферрин, бычий лактоферрин, человеческий лактоферрин, овомукоид из яичного белка (ингибитор трипсина) и муцин из свиного желудка.

Данные пары “лектин–гликопротеин” представляются перспективной платформой для самосборки гибридных конструкций на основе наночастиц для различных биомедицинских применений. Нами была исследована специфичность взаимодействия гликопротеинов с магнитными наночастицами, ковалентно связанными с лектинами, а также лектинов с золотыми наночастицами, на которых были электростатически сорбированы гликопротеины.

В качестве магнитных наночастиц использовали наночастицы fluidMAG-ARA 250 нм (Chemicell), состоящие из магнетита, покрытого полимером глюкуроновой кислоты с доступными для конъюгации –COOH группами (далее обозначены как ARA250). Данные магнитные частицы были модифицированы лектинами посредством ковалентного присоединения карбодиимидным методом. Оптимальные условия конъюгации наночастиц ARA250 с лектинами представлены в **табл. 4** (раздел 3.5.8, Материалы и методы). Полученные конъюгаты магнитных частиц были охарактеризованы методами динамического и электрофоретического рассеяния света, результаты представлены в **табл. 9**.

На следующем этапе была исследована проблема универсальности полученных результатов взаимодействий “лектин–гликопротеин” для принципиально других по своим физико-химическим свойствам наночастиц, в качестве которых были выбраны золотые наночастицы (ЗЧ). Эти частицы обладают свойствами локализованного поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР), являясь удобными оптическими маркерами биохимических реакций в разных форматах иммуноанализа, в том числе, в иммунохроматографии.

Модификацию гликопротеинами наночастиц золота, синтезированных восстановлением HAuCl_4 цитратом натрия, проводили путём адсорбции исследуемого белка на поверхности частицы при рН, соответствующем изоэлектрической точке белка [Hermanson 2008]. Оптимальные условия модификации золотых наночастиц гликопротеинами представлены в **табл. 10**. Притом что данный метод не является ковалентной модификацией, как описано выше в случае магнитных частиц, он не требует длительной химической конъюгации и является удобным для экспресс-анализа различных взаимодействий.

Табл. 9. Гидродинамический диаметр и ζ -потенциал наночастиц ARA250 и конъюгатов на их основе.

Обозначение частиц	ζ -потенциал, мВ	Диаметр, нм
ARA250	-12.0 ± 0.6	298 ± 136
ARA250-LCA	-8.5 ± 0.2	330 ± 150
ARA250-ConA	-5.1 ± 0.2	469 ± 256
ARA250-WGA	-10.4 ± 0.5	305 ± 142
ARA250-SBA	-4.2 ± 3.0	320 ± 108

Изучение специфичности связывания наночастиц, модифицированных лектинами (или гликопротеинами), с гликопротеинами (или лектинами, соответственно) проводили с помощью метода иммунохроматографии на нитроцеллюлозных тест-полосках (раздел 3.5.20, Материалы и методы).

Табл. 10. Оптимальные условия электростатической сорбции гликопротеинов на поверхности золотых частиц.

Гликопротеин	Оптимальная концентрация гликопротеина	Оптимальное значение рН суспензии золотых наночастиц для сорбции белка
Овальбумин из яичного белка	12 мкг/мл	4.5
Асиалофетуин сыворотки теленка	3 мкг/мл	5.8
Фетуин бычьей сыворотки	1.5 мкг/мл	3.3
Бычий трансферрин	25 мкг/мл	5.0
Бычий лактоферрин	5 мкг/мл	8.7
Человеческий лактоферрин	25 мкг/мл	8.4
Овомукоид из яичного белка	100 мкг/мл	4.1
Муцин из свиного желудка	5 мкг/мл	3.0

В случае абсолютно специфичного взаимодействия между лектином и гликопротеином и лектином и моносахаридом, и когда иных взаимодействий между компонентами нет, от

эксперимента следовало бы ожидать следующих результатов: если лектин и гликопротеин не взаимодействуют, это взаимодействие не возникает при добавлении в систему моносахарида. Если же лектин и гликопротеин способны к образованию комплекса в отсутствие моносахарида, то при добавлении моносахарида, способного к специфическому взаимодействию с лектином, комплексообразование должно идти менее активно или прекращаться вовсе; добавление же моносахарида, не являющегося группой углеводной специфичности рассматриваемого лектина, не должно влиять на получаемые результаты.

По результатам эксперимента проводилась визуальная детекция результатов. В случае, если между лектином и гликопротеином шли процессы комплексообразования, наночастицы начинали концентрироваться в зоне локализации первого компонента на тест-полоске, что проявлялось в виде локального изменения цвета полоски. При этом в случае, если исходное число наночастиц в растворе было одинаково, сравнение относительной яркости пятен даёт представление об относительной интенсивности комплексообразования.

Был установлен сходный характер взаимодействия в паре “лектин–гликопротеин” как при взаимодействии с гликопротеинами наночастиц ARA250, модифицированных лектинами (**рис. 35**, левая панель), так и при взаимодействии с лектинами золотых частиц, модифицированных гликопротеинами (**рис. 35**, правая панель).

Так, было зарегистрировано специфичное взаимодействие ConA и WGA с овальбумином из яичного белка, содержащим высокоманнозные и гибридные N-гликаны, которое блокировалось лектинспецифичным моносахаридом, а также GlcNAc и GalNAc, соответственно. Взаимодействия с LCA и SBA не было обнаружено. Также было обнаружено взаимодействия SBA с асиалофетуином и WGA с овомукоидом, которые блокировались только лектинспецифичным моносахаридом (GalNAc или GlcNAc). Связывание с другими лектинами отсутствовало. С фетуином связывались LCA и WGA, взаимодействие с последним блокировалось также GalNAc.

Было установлено строго специфичное взаимодействие WGA и SBA с муцином из свиного желудка, с которым также связывался ConA, однако данное взаимодействие блокировалось неспецифичным моносахаридом GlcNAc. С LCA взаимодействие отсутствовало.

WGA, LCA и ConA связывались с бычьим лактоферрином – железосвязывающим белком из семейства трансферринов. Интересно отметить, что с человеческим лактоферрином, в отличие от LCA и ConA, WGA не взаимодействует. С бычьим трансферрином из исследуемой системы лектинов связывался только WGA.

Для наглядности один из результатов описанных взаимодействий представлен на **рис. 35**, а все полученные данные о взаимодействиях “лектин-гликопротеин” объединены в

табл. 11, где самому сильному взаимодействию присвоено значение по условной шкале “3”, а самому слабому “0”.

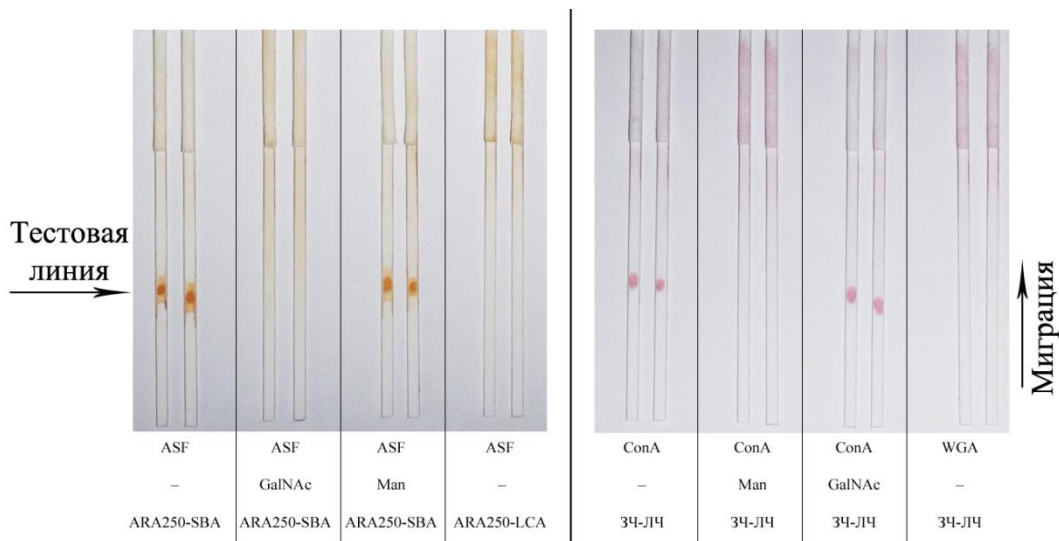


Рис. 35. Исследование взаимодействий лектинов с гликопротеинами методом иммунохроматографии. Левая панель: на тест-полоски нанесён асиалофетуин (ASF), в качестве анализата – наночастицы ARA250, конъюгированные с агглютинином соевых бобов (ARA250-SBA). Слева направо в 2-х повторах расположены по порядку: полоски без блокирующего моносахарида, далее с N-ацетилгалактозой (GalNAc) и с маннозой (Man). Последние две полоски – отсутствие взаимодействия с ASF магнитных наночастиц, конъюгированных с агглютинином LCA. Правая панель: на тест-полоски нанесён конканавалин А (ConA), в качестве анализата – золотые частицы с иммобилизованным лактоферрином человека (ЗЧ-ЛЧ). Слева направо в 2-х повторах расположены по порядку: полоски без блокирующего моносахарида, далее с Man и с GalNAc. Последние две полоски – отсутствие взаимодействия ЗЧ-ЛЧ с нанесённым на тест-полоску агглютинином зародыша пшеницы (WGA).

4.3.2. Конструкции на основе магнитных частиц и лектинов для специфического мечения клеток

Было проведено исследование возможности специфического мечения клеток эукариот полученными магнитными частицами, на поверхности которых иммобилизованы лектины. Исследование эффективности связывания полученных конъюгатов наночастиц с клетками проводили разработанным методом МРQ-цитометрии. При этом предполагалось, что специфичное взаимодействие лектина с углеводными остатками на клеточной поверхности (например, с входящими в состав экспонированных гликопротеинов гликанами) позволит различать клетки, поскольку вследствие различий в гликопрофилях число связавшихся с клеткой частиц, а значит, и сигналы МРQ-регистратора, будут отличаться для разных типов клеток.

Табл. 11. Специфичность взаимодействия лектинов с гликопротеинами, определённая методом иммунохроматографии на тест-полосках.

Гликопротеин	Блокирующий моносахарид	Лектин			
		Агглютинин чечевицы пищевой (LCA)	Конканавалин А (ConA)	Агглютинин зародыша пшеницы (WGA)	Агглютинин соевых бобов (SBA)
Овальбумин из яичного белка		0	1	2	0
	Man	0	0	2	
	GlcNAc		0	0	
	GalNAc		1	0	0
Асиалофетуин сыворотки теленка		0	0	0	2
	Man	0	0		1
	GlcNAc			0	1
	GalNAc				0
Фетуин бычьей сыворотки		1	0	2	0
	Man	0	0	2	
	GlcNAc			0	
	GalNAc			0	0
Бычий трансферрин		0	0	1	0
	Man	0	1	0	
	GlcNAc			0	
	GalNAc			0	0
Бычий лактоферрин		2	3	3	0
	Man	0	0	3	
	GlcNAc	0	3	0	
	GalNAc	1	3	3	0
Человеческий лактоферрин		1	3	0	0
	Man	0	1		
	GlcNAc	0	3	0	
	GalNAc	1	3		0
Овомукоид из яичного белка		0	0	2	0
	Man	0	0	2	
	GlcNAc			0	
	GalNAc			1	0
Муцин из свиного желудка		0	2	3	2
	Man	0	0	3	2
	GlcNAc		0	0	2
	GalNAc		2	3	0

Исследовали взаимодействие полученных конъюгатов магнитных наночастиц с лектинами с клетками Т-лимфобластной лейкемии Jurkat. Клетки, предварительно промытые от культуральной среды, в количестве 1 млн инкубировали с 10 мкг конъюгатов в 400 мкл 0.1 М HEPES, 150 mM NaCl с 1% БСА на ротаторе в течение 20 минут при +4 °C с последующей троекратной отмывкой от несвязавшихся частиц 400 мкл 100 mM HEPES, 150 mM NaCl с 1% БСА центрифугированием при 100 g. В качестве контроля специфичности взаимодействия использовали блокировку моносахаридом, специфичным лектину, в концентрации 200 mM во время инкубации. На **рис. 36** представлены результаты связывания конъюгатов наночастиц ARA250 с опухолевыми клетками (данные представлены в фемтограммах наночастиц на клетку). Поскольку для всех видов конъюгатов удалось получить значимую разницу в основном и контрольном эксперименте, мы предположили, что данные конъюгаты могут быть

использованы для различения клеточных линий с различным профилем гликозилирования поверхностных белков. Это предположение подтвердили мечением двух линий клеток – Jurkat и 7.16.4 наночастицами ARA250, конъюгированными с лектинами (**рис. 37**). Действительно, количество конъюгатов ARA250-WGA, связавшихся с линией Jurkat, превышало таковое для линии 7.16.4 в 3.91 ± 0.14 раза.

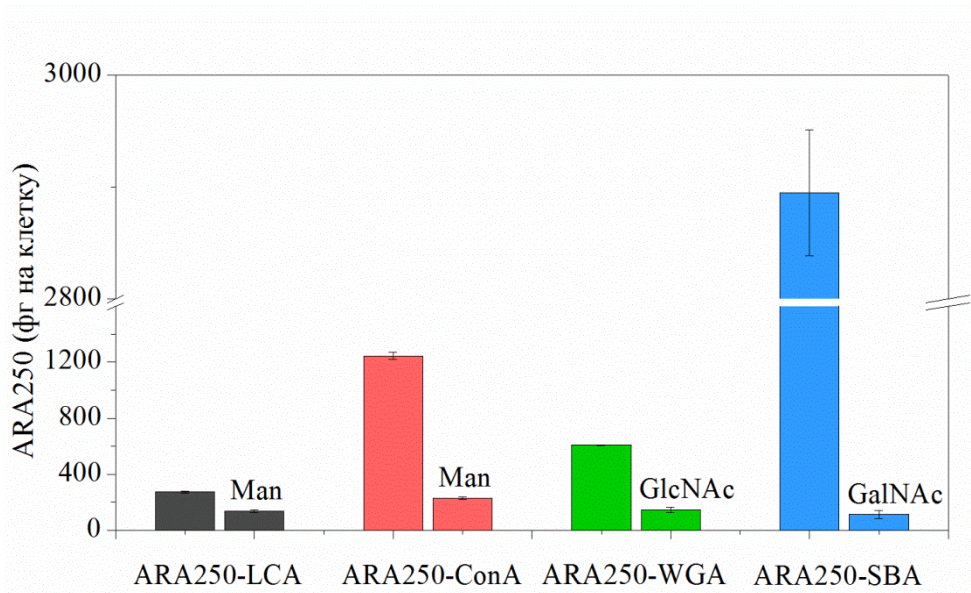


Рис. 36. Взаимодействие конъюгатов ARA250 с четырьмя лектинами различной специфичности с клетками Jurkat в отсутствие и в присутствии блокирующего моносахарида. Представлено количество ARA250, связавшееся с клетками, в фемтограммах на клетку. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

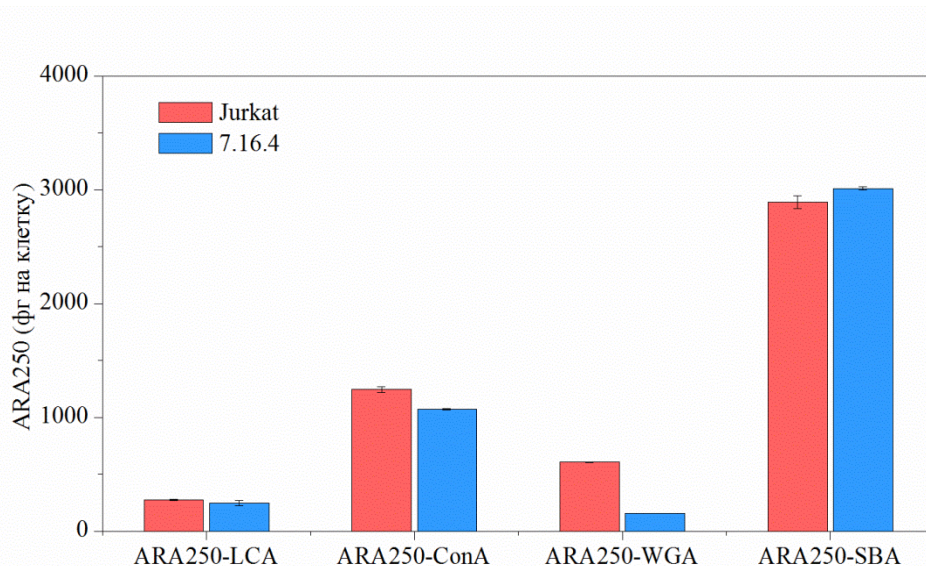


Рис. 37. Взаимодействие конъюгатов ARA250 с лектинами с двумя клеточными линиями Jurkat и 7.16.4. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

Более того, было продемонстрировано, что полученные конъюгаты могут быть использованы и для специфичной визуализации клеток на примере двух типов конъюгатов

ARA250 с лектинами разной специфичности. Конъюгаты ARA250-WGA и ARA250-SBA были флуоресцентно мечены ФИТЦ, после чего исследовали их взаимодействие с клетками Jurkat, так же, как описано выше (в отсутствие и присутствии блокирующего моносахарида) и анализировали методом флуоресцентной микроскопии (на инвертированном флуоресцентном микроскопе при 400x увеличении при одинаковых настройках выдержки и яркости для всех образцов) (рис. 38).

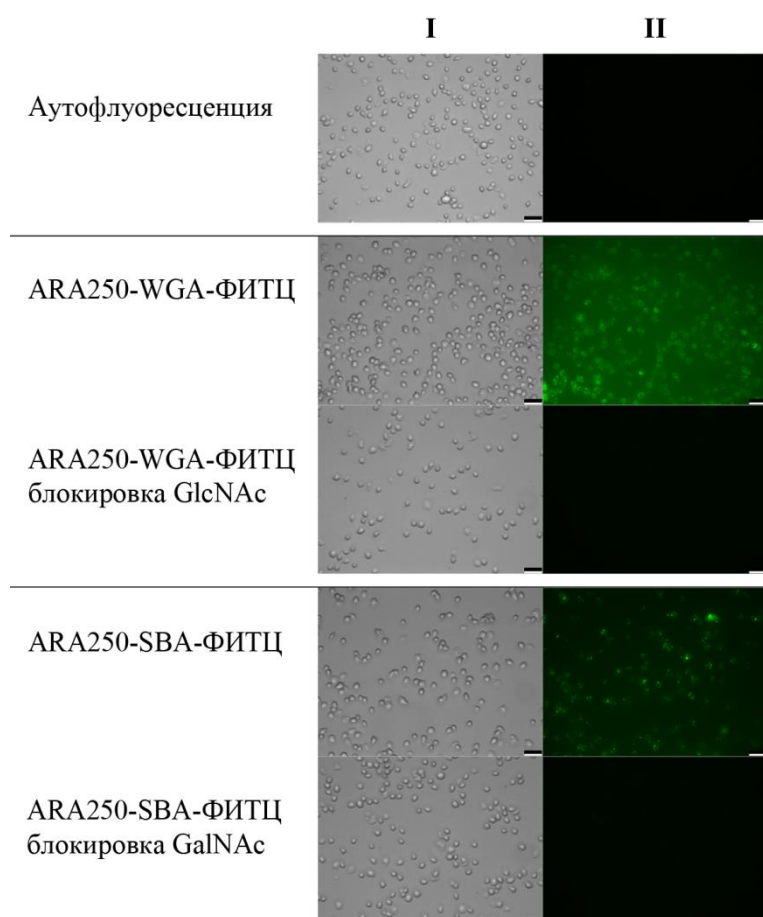


Рис. 38. Визуализация клеток линии Jurkat флуоресцентными магнитными частицами, конъюгированными с WGA (ARA250-WGA-ФИТЦ) и с SBA (ARA250-SBA-ФИТЦ) в отсутствие и в присутствии блокирующего моносахарида в концентрации 200 мМ. I – изображения в видимом свете; II – при возбуждении флуоресценции (возбуждение 475/40 нм, фильтр эмиссии 530/50). Шкалы 20 мкм.

Выше было упомянуто, что лектины способны специфично и обратимо связывать остатки сахаров в гликопротеинах. Далее было продемонстрировано, что обратимость данного взаимодействия лектинов сохраняется и в составе их конъюгатов с магнитными частицами. На **рис. 39** представлено удаление конъюгатов ARA250 с лектинами с поверхности клеток после их предварительной отмывки от несвязавшихся частиц специфичным лектину моносахаридом на примере двух типов конъюгатов. Клетки инкубировали с конъюгатами наночастиц ARA250 с лектинами как в отсутствие, так и в присутствии блокирующего связывание моносахарида. В один из образцов без моносахарида после отмывки от несвязавшихся частиц добавляли

элюирующий моносахарид до финальной концентрации 200 мМ и после инкубации с ним образец отмывали от отсоединившихся от клеток конъюгатов. Остальные образцы подвергались таким же отмывкам для исключения возможности влияния потери частиц на результаты количественных измерений.

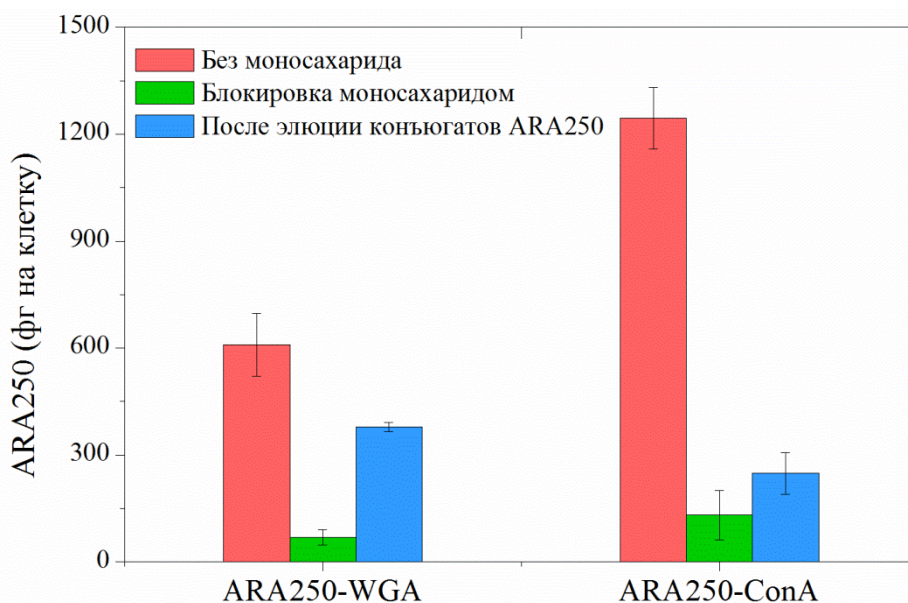


Рис. 39. Обратимость связывания наночастиц ARA250, конъюгированных с лектинами, с поверхностью клеток Jurkat. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

4.4. Контролируемое мечение клеток *in vitro* на основе биокомпьютерного анализа входных сигналов

4.4.1. Принципы конструирования биокомпьютерных структур на основе наночастиц

Основоположник химиотерапии, лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1908 года, Пауль Эрлих ввёл на сегодняшний день широко известное понятие “магической пули” – идеального терапевтического агента, способного селективно поражать только очаг болезни, не задевая здоровые ткани. Развитие технологии получения моноклональных антител [Köhler and Milstein 1975] позволило сильно развить эту концепцию для адресной доставки лекарственных препаратов к определённым рецепторам клеток. Однако для большинства заболеваний неизвестны абсолютно специфичные маркёры, которые со 100% эффективностью могут идентифицировать заболевание, а также служить мишенью для лекарственного воздействия. Часто требуется анализировать большой массив биохимической информации для точной идентификации мишени. При этом анализу подвергаются такие вещества, как растворимые маркёры, антигены на поверхности клеток, а также

внутриклеточные вещества. Соответственно, возникает необходимость разработки автономных систем, способных анализировать набор биохимических параметров и, в идеале, производить необходимое заблаговременно запрограммированное действие на основе данного анализа (например, высвободить токсин или связываться с чётко определённой нездоровой клеткой). Одним из подходов к созданию таких систем является разработка биороботов на основе биомолекул, способных осуществлять элементарные логические функции и выполнять заранее заданные действия на основе вычислений.

В последние два десятилетия был разработан ряд систем, которые выполняют вычисления с использованием биомолекул (ДНК/РНК [Mao et al. 2000; Stojanovic and Stefanovic 2003; Adleman 1994], белков [Katz and Privman 2010], пептидов [Ashkenasy and Ghadiri 2004] и низкомолекулярных соединений [Silva and Uchiyama 2007]), а также систем, включающих в себя наночастицы [Angelos et al. 2009; Motornov et al. 2008; Maltzahn et al. 2007]. Ранее было показано, что только системы на основе ДНК/РНК могут выполнять полный набор булевых функций (система булевых функций называется функционально полной, если можно построить их суперпозицию, тождественную любой заранее заданной функции). Данные системы, основанные на ДНК/РНК, были применены как для решения математических задач (решение алгебраических задач [Qian and Winfree 2011] или, например, игры в “крестики-нолики” [Stojanovic and Stefanovic 2003]), так и для биомедицинских приложений (для анализа клеток по их поверхностным маркерам [Rudchenko et al. 2013; You et al. 2014]).

Наночастицы, обладающие развитой поверхностью для связывания и возможностью приборной детекции, дополненные биокомпьютерными возможностями, представляются как новые уникальные средства тераностики, нацеленные на решение актуальных проблем биомедицины.

В нашей лаборатории был предложен новый подход к созданию биокомпьютерных комплексов на основе практически любых типов наночастиц [Nikitin et al. 2014].

На **рис. 40** представлены принципы конструирования биокомпьютерных комплексов на основе наночастиц. Возможность выполнения логических операций функционально встроена в специальный интерфейс (на **рис. 40** – два замка, соединённых между собой), который может самособираться на наночастицах (или микрочастицах) практически любого типа (на **рис. 40** – коровая частица) и подвергается дезинтеграции под воздействием молекулярного входного сигнала.

Действие, которое осуществляет коровая частица как результат выполнения логической функции, выполняется рецептором-медиатором взаимодействия, который опосредует взаимодействие коровой частицы с чётко определённой мишенью (лигандом рецептора-медиатора взаимодействия). В качестве такого рецептора может выступать, например,

нацеливающее антитело для адресной доставки к клеткам или токсин для индукции апоптоза клеток.

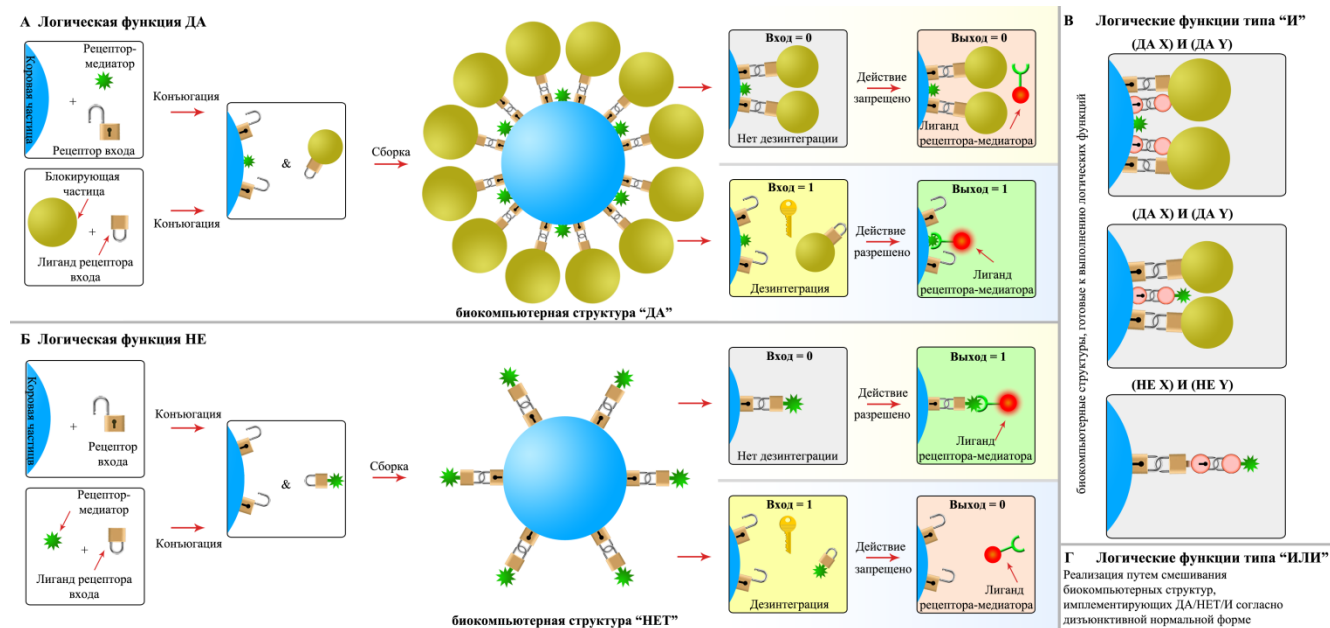


Рис. 40. Принципы конструирования биокomпьютерных структур на основе наночастиц, имплементирующих логические функции "ДА"/"НЕТ"/"И"/"ИЛИ". **А)** Сборка и действие биокomпьютерной структуры "ДА". **Б)** Сборка и действие биокomпьютерной структуры "НЕТ". **В)** Конструирование трёх различных биокomпьютерных структур типа "И" с операндами "ДА" и "НЕТ". **Г)** Функции типа "ИЛИ" реализуются путём смешивания структур "ДА", "НЕТ", "И" согласно дизъюнктивной нормальной форме.

Рассмотрим подробно реализацию функций "ДА" и "НЕТ" (унарных функций) с одним молекулярным входом. При реализации функции "ДА" рецептор входа и рецептор-медиатор взаимодействия колокализированы на поверхности корковой частицы (рис. 40А). В процессе сборки биокomпьютерной структуры "ДА" рецептор-медиатор взаимодействия стерически блокируется от взаимодействия со своим лигандом посредством блокирующей частицы (молекулярного входа нет, вход = 0; взаимодействия нет, выход = 0). Блокирующие частицы нековалентно присоединены к корковой частице посредством связи "рецептор входа – лиганд рецептора входа". Когда в смеси появляется молекулярный вход (вход = 1), инициирующий разрыв данной связи, структура подвергается дезинтеграции, делая рецептор-медиатор взаимодействия доступным для связи со своим лигандом, разрешая таким образом взаимодействие (выход = 1).

При реализации функции "НЕТ" на базовой частице иммобилизован только рецептор входа, который собирается с лигандом рецептора входа, конъюгированным с рецептором-медиатором взаимодействия (рис. 40Б). При появлении молекулярного входного сигнала, рецептор-медиатор взаимодействия отсоединяется от корковой частицы и частица не взаимодействует с мишенью (вход = 1, выход = 0). Соответственно, корковая частица может

связываться с лигандом рецептора-медиатора взаимодействия, только если входа нет (вход = 0, выход = 1).

Функции двух операндов (бинарные функции) с двумя входными сигналами реализуются следующим образом. На основе операндов “ДА” и “НЕТ” могут быть сконструированы три принципиально различных бинарных функции типа “И”: (ДА X) И (ДА Y) \equiv И, (ДА X) И (НЕТ Y) \equiv ЗАПРЕТ по Y (отрицание импликации по Y), (НЕТ X) И (НЕТ Y) \equiv ИЛИ-НЕ. Данные функции имплементируются посредством комбинации соответствующих операндов “ДА”/”НЕТ” на поверхности коровой частицы (**рис. 40В**).

Согласно дизъюнктивной нормальной форме (нормальной форме булевой логики, согласно которой булева формула имеет вид дизъюнкции конъюнкций литералов), произвольная функция может быть представлена как функция “ИЛИ” с “ДА”/”НЕТ”/”И” операндами. Такие функции реализуются путём смешивания биокomпьютерных структур, имплементирующие соответствующие функции вида “ДА”/”НЕТ”/”И”, каждая из которых внесёт свой вклад в финальное действие (**рис. 40Г**).

4.4.2. WGA-опосредованное мечение клеток *in vitro* на основе логического анализа входных сигналов

В качестве демонстрации применимости разработанного подхода к созданию универсальных биокomпьютерных структур для потенциальных биомедицинских задач, наряду с различными форматами иммуноанализа [Nikitin et al. 2014], была продемонстрирована адресная доставка таких структур к клеткам эукариот на основе логического анализа молекулярных входных сигналов. Выше было отмечено, что растворимые соединения в организме являются важными биохимическими данными для автономных тераностических агентов, поскольку организм использует кровь и другие биологические жидкости для передачи биохимической информации между клетками. Распознавание такой информации может позволить таким агентам идентифицировать определённые заболевания (например, диабет) и процессы (например, воспаление или ангиогенез), а возможность использовать рецептор-медиатор взаимодействия для специфичного связывания с определёнными клетками как действие, соответствующее выходу логической функции, может быть использована для селективного уничтожения патогенных клеток.

Для нацеливания на клетки были выбраны наночастицы fluidMAG-ARA 100 нм (ARA100) в качестве коровых частиц, а в качестве модельного рецептора-медиатора взаимодействия использовали лектин WGA, который специфично связывает остатки N-ацетил-D-глюкозамина и сиаловой кислоты. В качестве входных сигналов выступали

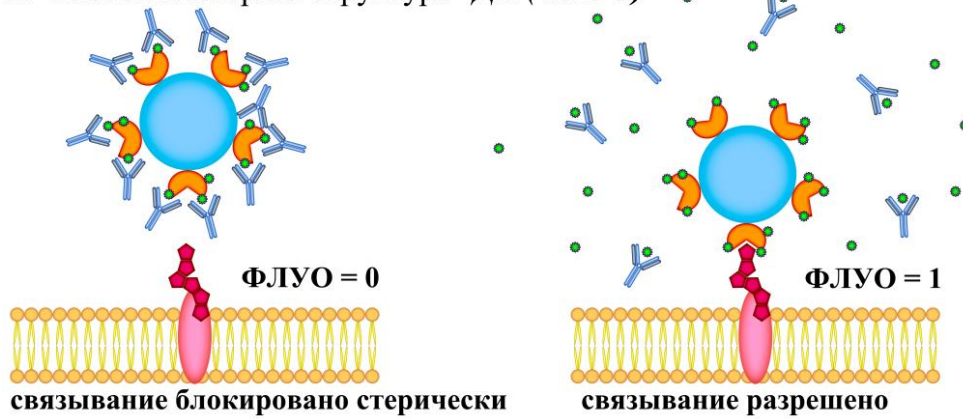
низкомолекулярные соединения: сукцинат хлорамфеникола (сХАФ) и флуоресцеин-этанолламин (ФЛУО). Интерфейсом, который подвергался дезинтеграции, под воздействием входных сигналов, служили взаимодействия “антиген:антитело”, а именно анти-ФИТЦ IgG:ФИТЦ/ФЛУО и анти-ХАФ IgG:сХАФ. Конструирование данных структур схематично представлено на **рис. 41** и подробно описано в главе Материалы и Методы (раздел 3.5.21). В качестве блокирующих компонентов, стерически препятствующих взаимодействию коровых частиц с мишенью, выступали молекулы IgG, размер которых ($\approx 7-14$ нм) достаточен для стерической блокировки взаимодействия лектина WGA, иммобилизованного на коровой частице, с остатками полисахаридов на клеточной мембране.

Как было показано в предыдущей главе, данный лектин может быть использован для адресной доставки наночастиц к Т-клеткам Jurkat. В качестве доказательства концепции, была реализована доставка наночастиц к клеткам на основе выполнения двух унарных операций: “ДА (ФЛУО)” и “НЕТ (ФЛУО)” и одной бинарной операции “ДА (ФЛУО) И НЕТ (сХАФ)”. Таблицы истинности для данных функций приведены в Приложении 1. Биокomпьютерные структуры инкубировали с молекулярными входными сигналами и затем инкубировали с суспензией клеток. Количество связанных с клетками структур определяли методом МРQ-цитометрии.

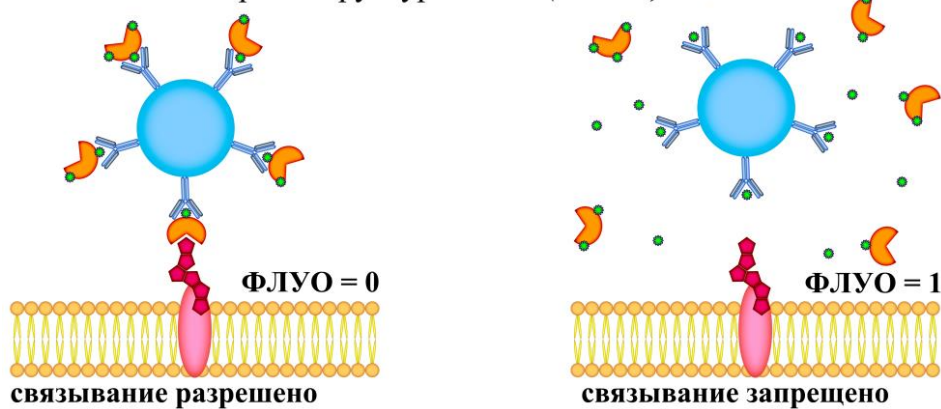
Специфичность адресной доставки подтверждали тестированием взаимодействия биокomпьютерных структур в тех же условиях с клетками линии Jurkat в присутствии блокирующего моносахарида, а также линии 7.16.4. Выше (раздел 4.3.2) было показано, что клетки данной линии гораздо слабее взаимодействуют с конъюгатами наночастиц с лектином WGA по сравнению с клеточной линией Jurkat.

Как видно из данных, представленных на **рис. 42**, дезинтеграция комплексов, вызванная наличием молекулярных входов (сХАФ и ФЛУО), действует как результат биокomпьютерных операций только на клетки Jurkat и практически не влияет на неспецифичное связывание с линией 7.16.4 и на связывание с линией Jurkat в присутствии блокирующего моносахарида GlcNAc.

А Биокomпьютерная структура “ДА (ФЛУО)”



Б Биокomпьютерная структура “НЕТ (ФЛУО)”



В Биокomпьютерная структура “ДА (ФЛУО) И НЕТ (сХАФ)”

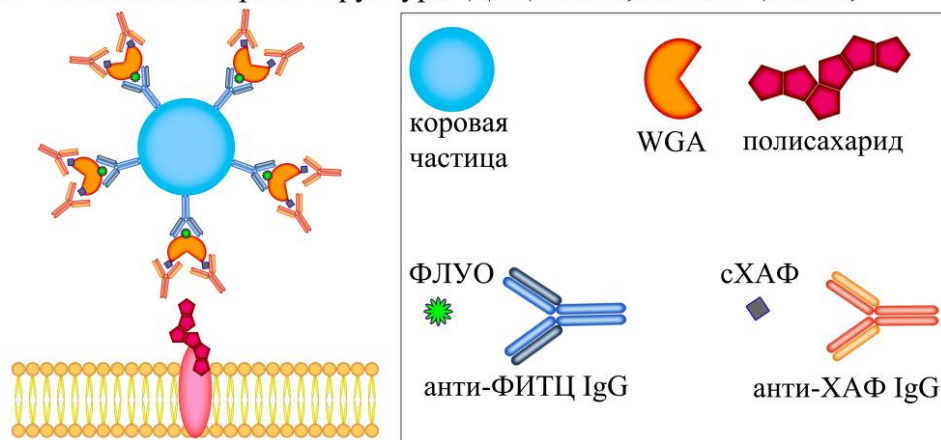


Рис. 41. Конструирование биокomпьютерных структур “ДА (ФЛУО)”, “НЕТ (ФЛУО)” и “ДА (ФЛУО) И НЕТ (сХАФ)”. **А)** При отсутствии входа (ФЛУО = 0) связывание коровой частицы с поверхностью клетки заблокировано стерически анти-ФИТЦ антителами. При наличии входа (ФЛУО = 1) происходит дезинтеграция ФЛУО:анти-ФИТЦ IgG интерфейса, и связывание коровой частицы с полисахаридами на поверхности клеток разрешено. **Б)** При ФЛУО = 1 связывание коровой частицы с полисахаридами на поверхности клеток разрешено, при ФЛУО = 0 происходит дезинтеграция ФЛУО:анти-ФИТЦ IgG интерфейса и связывание коровой частицы с полисахаридами на поверхности клеток невозможно. **В)** Бинарная операция “ДА (ФЛУО) И НЕТ (сХАФ)” представляет собой суперпозицию унарных операций – ДА и НЕТ. Связывание коровой частицы с клеткой возможно только при наличии входа сХАФ = 1, разрушающего сХАФ:анти-ХАФ IgG интерфейс. Отсутствие входов (сХАФ = 0, ФЛУО = 0) запрещает связывание стерически, наличие ФЛУО (ФЛУО = 1) помимо сХАФ дезинтегрирует ФЛУО:анти-ФИТЦ IgG интерфейс и запрещает WGA-опосредованное связывание коровой частицы с полисахаридами на поверхности клеток.

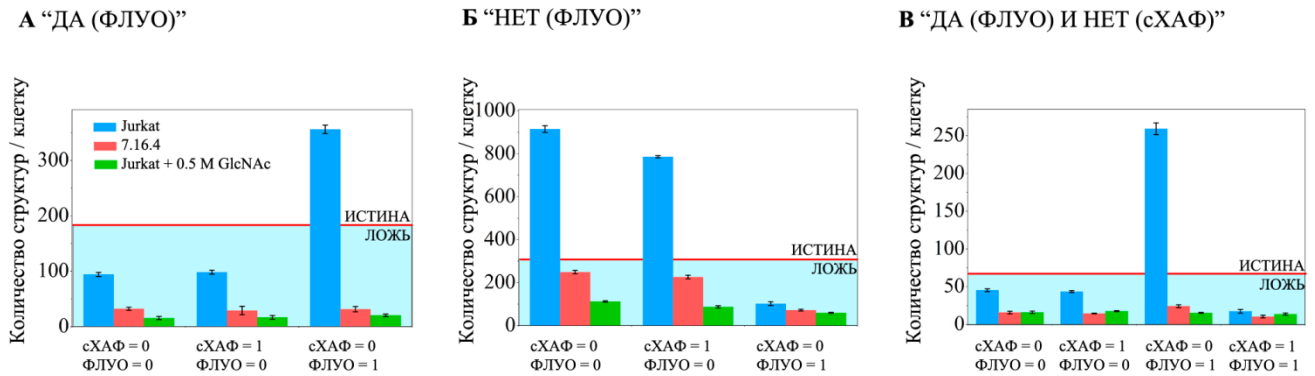


Рис. 42. Адресная доставка наночастиц к клеткам как результат выполнения логических функций. Представлено количество структур, связавшихся с клетками (определённое методом МРQ-цитометрии), в зависимости от различных комбинаций входных сигналов (ФЛУО и сХАФ) для унарных функций: "ДА (ФЛУО)" (А) и "НЕТ (ФЛУО)" (Б) и бинарной функции "ДА (ФЛУО) И НЕТ (сХАФ)" (В). В качестве клеток-мишеней были выбраны Jurkat в отсутствие (голубые столбцы) и в присутствии блокирующего моносахарида GlcNAc (зелёные столбцы) и 7.16.4 (красные столбцы). Для каждой операции порог "ИСТИНА-ЛОЖЬ" задан как среднее геометрическое между максимальным и минимальным выходным сигналом (точнее, среднего соответствующих значений) для клеток Jurkat. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

Также была продемонстрирована специфичность блокировки взаимодействия конъюгатов наночастиц WGA с клетками Jurkat моносахаридом GlcNAc инкубацией данных частиц с клетками в присутствии других, неспецифичных лектину моносахаридов (рис. 43) – маннозы (Man) и ксилозы (Xyl).

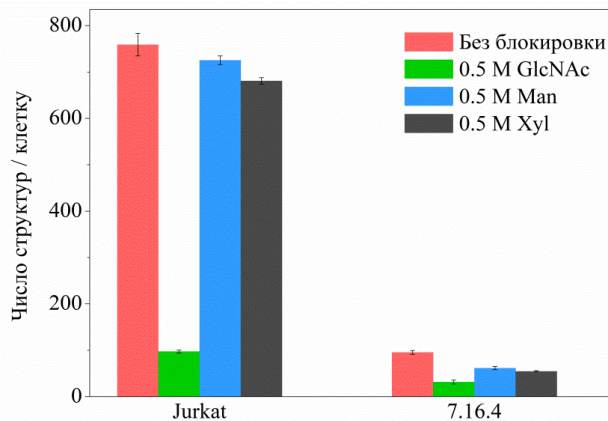


Рис. 43. Эффективность доставки к клеткам Jurkat и 7.16.4 конъюгатов ARA100-WGA (голубой цвет) в отсутствие и в присутствии моносахаридов: 0.5 M GlcNAc (красный), 0.5 M манноза (зелёный), 0.5 M ксилоза (оранжевый). Количество конъюгатов ARA100-WGA, связанных с клетками Jurkat в 7.9 выше, чем с 7.16.4. GlcNAc ингибирует связывание ARA100-WGA с Jurkat в 7.8 раз, в то время как манноза и ксилоза – в 1.05 и 1.11 раза, соответственно. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

4.5. Контролируемое мечение клеток *in vivo* на основе биокомпьютерного анализа входных сигналов

Быстро развивающаяся область молекулярного биокомпьютинга открывает много возможностей для создания тераностических агентов нового поколения. Одновременная мультипараметрическая обработка биохимических сигналов может быть использована для

увеличения специфичности адресной доставки лекарств и, как следствие, уменьшения системной токсичности. На сегодняшний день предложен ряд подходов к конструированию наноагентов, имплементирующих любые логические операции, которые, на основе анализа нескольких биохимических входных сигналов, могут, например, высвободить токсин и адресно воздействовать на клетки *in vitro*. Ранее было продемонстрировано, что нанороботы на основе ДНК [Amir et al. 2014] могут быть использованы для адресной доставки к гемоцитам (клетки гемолимфы, аналогичные лейкоцитам человека) таракана *Blaberus discoidalis in vivo*. Данная модель *in vivo* была использована ввиду низкой системной нуклеазной активности и хорошей химической совместимости со структурами ДНК. Однако до сих пор оставалось неясно, могут ли биокомпьютерные комплексы использоваться для молекулярных вычислений в более сложном организме, а именно, в млекопитающем.

Для демонстрации применимости описанного выше разработанного подхода к созданию и использованию автономных биокомпьютерных систем *in vivo*, мы реализовали адресную доставку биокомпьютерных структур, вводимых внутривенно, к CD4+ клеткам крови лабораторных мышей на основе логического анализа молекулярных входных сигналов, присутствующих в кровотоке животных.

Для нацеливания на CD4+ клетки в качестве коровых частиц использовали магнитные наночастицы Estapor 227 нм, магнетизм которых позволяет отслеживать поведение наночастиц *in vivo* по наличию сигнала внешней магнитной индукции в кровотоке животных, а модификация флуоресцентной меткой (в данном случае, ФИТЦ) позволяет оценивать интенсивность связывания частиц с клетками. В качестве модельного рецептора-медиатора взаимодействия использовали антитело анти-CD4 IgG (клон GK1.5), специфично связывающее мышиный CD4. В качестве входных сигналов выступали низкомолекулярные соединения: антибиотик – сукцинат хлорамфеникола (сХАФ) и витамин B9 – фолиевая кислота (ФК). Интерфейсом, который подвергся дезинтеграции, под воздействием входных сигналов, служили взаимодействия “антиген:антитело”, а именно анти-ХАФ IgG:сХАФ и анти-ФК IgG:ФК.

4.5.1. Характеристика биокомпьютерных структур

Были реализованы три логические функции *in vivo*: две унарные: НЕТ (сХАФ), ДА (сХАФ) и, в качестве примера бинарной функции: ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ). Для этого коровые наночастицы Estapor 227 нм конъюгировали с белками следующим образом:

1) для функции НЕТ (сХАФ): наночастицы Estapor конъюгировали с анти-ХАФ IgG и БСА-ФИТЦ (**Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ)**);

2) для функции ДА (сХАФ): наночастицы Estapor конъюгировали с анти-Rat IgG и БСА-ФИТЦ (**Estapor-(анти-Rat IgG&БСА-ФИТЦ)**);

3) для функции ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ): наночастицы Estapor конъюгировали с анти-ХАФ IgG и БСА-ФИТЦ-ФК (**Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ-ФК)**).

Подробно условия конъюгации описаны в разделе 3.5.8 главы Материалы и Методы. Распределение по гидродинамическим размерам немодифицированных частиц Estapor и конъюгатов на их основе представлено на **рис. 44**, средние значения размеров приведены в **табл. 12**. Далее, полученные конъюгаты инкубировали с нацеливающими антителами (анти-CD4 IgG или Rat IgG для контрольных экспериментов) и блокирующими антителами, как подробно описано в главе Материалы и Методы (раздел 3.5.23), после чего структуры были готовы для инъекции в кровоток.

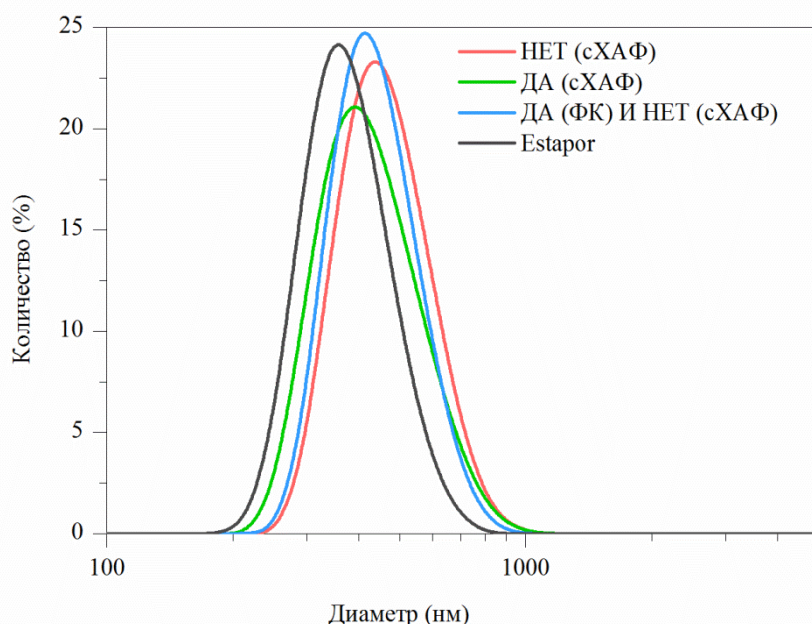


Рис. 44. Распределение по гидродинамическим размерам частиц Estapor и биоконъюгатов на их основе (представлено распределение по числу частиц), определенное с использованием анализатора Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments).

Табл. 12. Гидродинамический диаметр частиц Estapor и биоконъюгатов на их основе.

Обозначение частиц	Диаметр, нм
Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ) (НЕТ (сХАФ))	471 ± 111
Estapor-(анти-Rat IgG&БСА-ФИТЦ) (ДА (сХАФ))	435 ± 119
Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ-ФК) (ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ))	445 ± 100
Estapor	382 ± 89

Эффективность конъюгации и специфичность полученных конъюгатов частиц Estapor тестировали методом иммунохроматографии. В качестве примера, на **рис. 45** приведено

исследование специфичности конъюгатов Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ), полученных для имплементации логической функции НЕТ (сХАФ): показано специфичное взаимодействие данных конъюгатов с БСА-ХАФ, козьими анти-мышь IgG, анти-CD4 IgG-ХАФ и Rat IgG-ХАФ, сорбированных на тест-полоске; показана блокировка взаимодействия с БСА-ХАФ наличием свободного сХАФ в растворе; показано отсутствие взаимодействия с анти-CD4 IgG и Rat IgG.

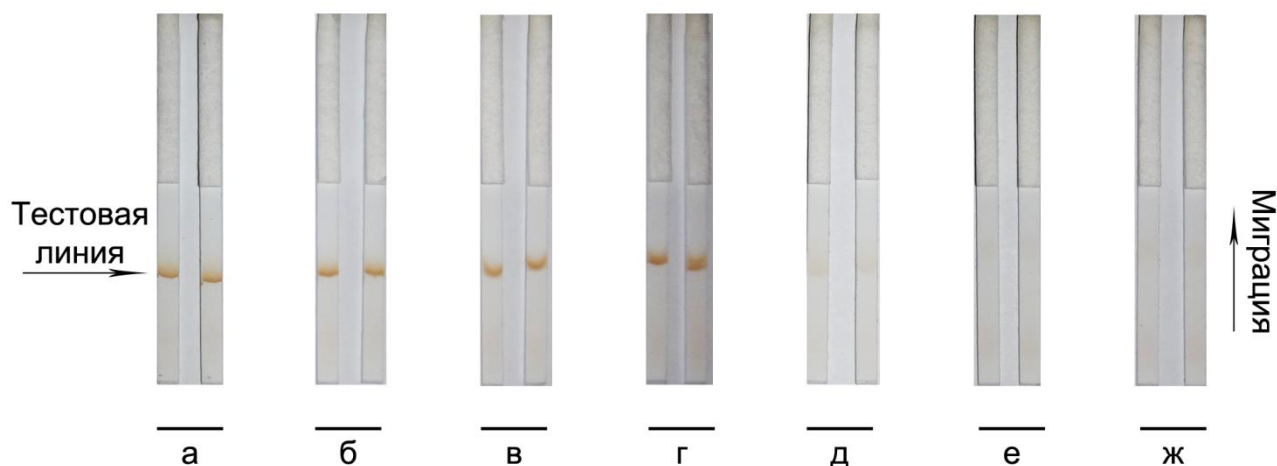


Рис. 45. Специфичность конъюгатов Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ), определённая методом иммунохроматографии. Наблюдается связывание, когда на тест-полосках сорбированы: **(а)** БСА-ХАФ, **(б)** козы анти-мышь IgG, **(в)** анти-CD4 IgG-сХАФ, **(г)** Rat IgG-сХАФ. **(е)** Незначительное связывание наблюдается, когда на тест-полоске сорбирован БСА-ХАФ и в миграционный буфер добавлен избыток молекулярного сХАФ (1 г/л). Не наблюдается связывания наночастиц на тест-полоске, когда на полоске сорбированы **(е)** анти-CD4 IgG и **(ж)** Rat IgG. Представленные результаты являются репрезентативными данными трёх независимых экспериментов с независимо сконъюгированными частицами.

Спектры возбуждения и испускания флуоресценции (обусловленной наличием ФИТЦ в составе) полученных конъюгатов представлены на **рис. 46**, максимум длины волны возбуждения соответствует 500 нм, максимум длины волны испускания флуоресценции соответствует 525 нм. Согласно данным флуоресцентной спектроскопии, представленным на **рис. 47**, инкубация конъюгатов как с нацеливающими, так и с блокирующими антителами практически не влияет на интенсивность флуоресценции комплексов в тестируемых условиях. Более того, согласно данным флуоресцентной микроскопии (**рис. 47**) конъюгаты после инкубации с нацеливающими и с блокирующими антителами сохраняют монодисперсность и не агрегируют. Следовательно, интенсивность флуоресценции клеток, меченных данными биокомпьютерными структурами, может быть использована для количественной оценки эффективности доставки данных структур к клеткам.

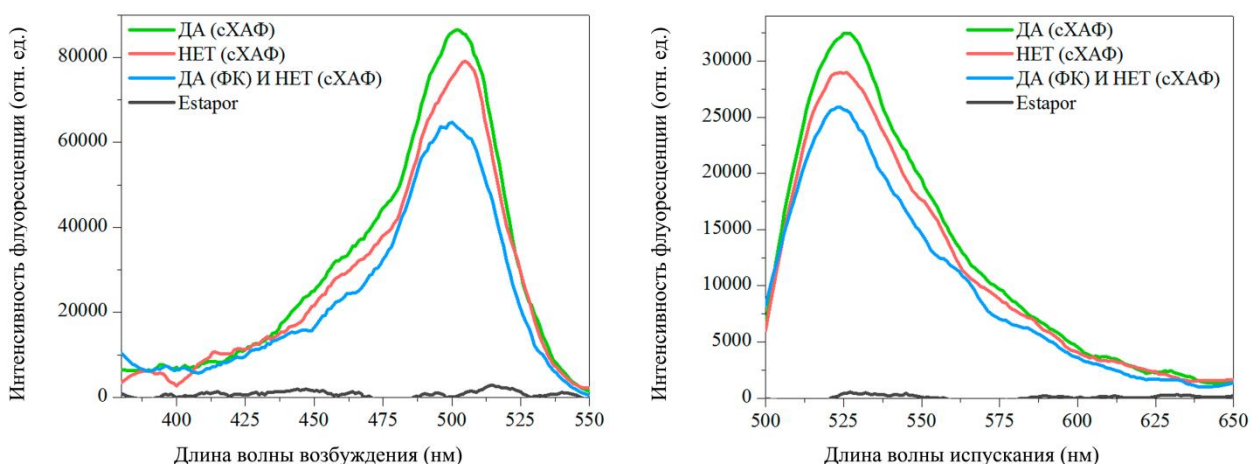
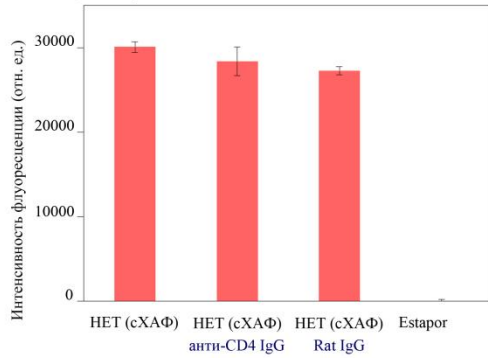


Рис. 46. Спектры возбуждения (длина волны испускания $\lambda = 560$ нм) и испускания (длина волны возбуждения $\lambda = 490$ нм) флуоресценции немодифицированных наночастиц – Estapor (чёрный), а также ФИТЦ-меченых конъюгатов, приготовленных для имплементации логических функций НЕТ (сХАФ) – Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ) (красный), ДА (сХАФ) – Estapor-(анти-Rat IgG&БСА-ФИТЦ) (зелёный) и ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ) – Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ-ФК) (синий).

4.5.2. *Ex vivo* доставка к CD4+ клеткам крови ФИТЦ-меченых биокomпьютерных структур

Предварительно эффективность биокomпьютерных структур, имплементирующих логические функции НЕТ (сХАФ), ДА (сХАФ), ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ), исследовали на образцах цельной гепаринизированной крови мышей линии Balb/c. Эффективность доставки биокomпьютерных структур к CD4+ клеткам крови оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Образцы крови (50 мкл) инкубировали с биокomпьютерными структурами в присутствии соответствующего набора молекулярных входов (сХАФ и ФК), после чего образцы крови инкубировали с анти-CD4 IgG, мечеными PerCP/Cy5.5 (клон RM4-4), лизировали эритроциты и анализировали проточной цитофлуориметрией. Клон RM4-4 не конкурирует с клоном GK1.5 (рис. 48) и, таким образом, позволяет точно идентифицировать популяцию CD4+ клеток крови, меченных биокomпьютерными структурами. Эффективность доставки биокomпьютерных структур к CD4+ клеткам крови далее оценивается как медиана интенсивности флуоресценции популяции клеток, выделенной по окрашиванию антителами анти-CD4 IgG-PerCP/Cy5.5 (RM4-4), в канале, соответствующем флуоресценции ФИТЦ.

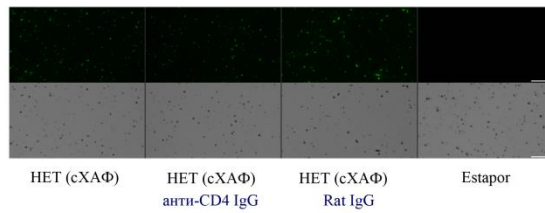
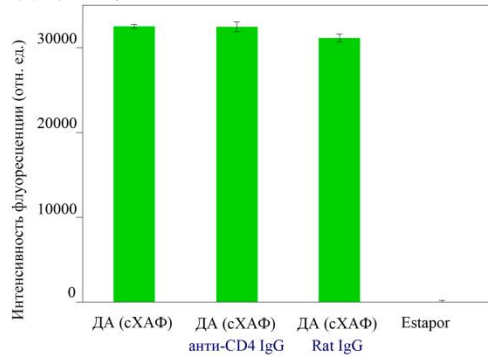
А “НЕТ (сХАФ)”


Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ) ≡ НЕТ (сХАФ)

Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ):(анти-CD4 IgG-ХАФ) ≡ НЕТ (сХАФ), анти-CD4 IgG

Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ):(Rat IgG-ХАФ) ≡ НЕТ (сХАФ), Rat IgG

Немодифицированные частицы ≡ Estapor

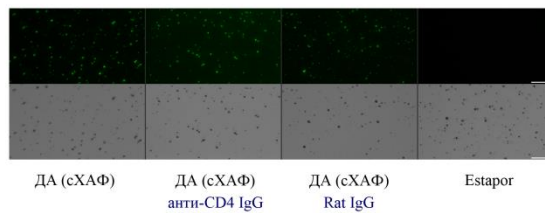
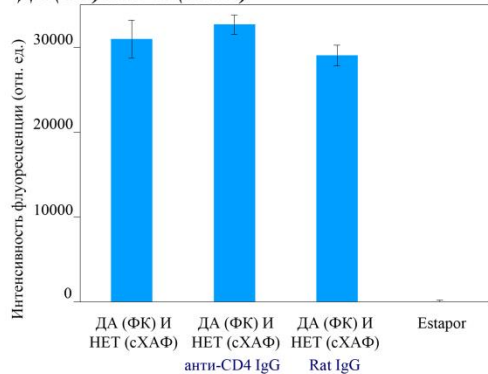

Б “ДА (сХАФ)”


Estapor-(анти-Rat IgG&БСА-ФИТЦ) ≡ ДА (сХАФ)

Estapor-(анти-Rat IgG&БСА-ФИТЦ):(анти-CD4 IgG-ХАФ):(анти-ХАФ IgG) ≡ ДА (сХАФ), анти-CD4 IgG

Estapor-(анти-Rat IgG&БСА-ФИТЦ):(Rat IgG-ХАФ):(анти-ХАФ IgG) ≡ ДА (сХАФ), Rat IgG

Немодифицированные частицы ≡ Estapor


В “ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)”


Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ-ФК) ≡ ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)

Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ-ФК):(анти-CD4 IgG-ХАФ):(анти-ФК IgG) ≡ ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ), анти-CD4 IgG

Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ-ФК):(Rat IgG-ХАФ):(анти-ФК IgG) ≡ ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ), Rat IgG

Немодифицированные частицы ≡ Estapor

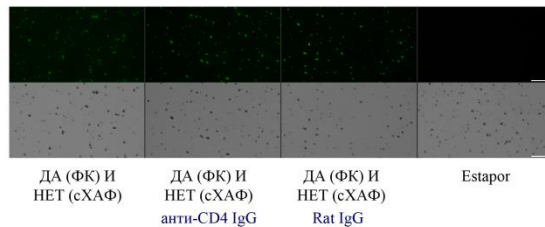


Рис. 47. Характеристика биокомпьютерных структур, реализующих логические функции **НЕТ (сХАФ)** – А, **ДА (сХАФ)** – Б и **ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)** – В. На столбчатых диаграммах представлены интенсивности флуоресценции 10 мкг немодифицированных частиц – Estapor, а также биокомпьютерных структур до и после инкубации с нацеливающими антителами (анти-CD4 IgG, Rat IgG) и антителами, стерически блокирующими взаимодействие данных комплексов с мишенью (анти-ХАФ IgG, анти-ФК IgG). Возбуждение флуоресценции – 500 нм, испускание – 525 нм. Диаграммы сопровождаются микрофотографиями структур при возбуждении флуоресценции (возбуждение 470/40 нм, испускание 525/50 нм) и в проходящем свете (шкалы – 20 мкм).

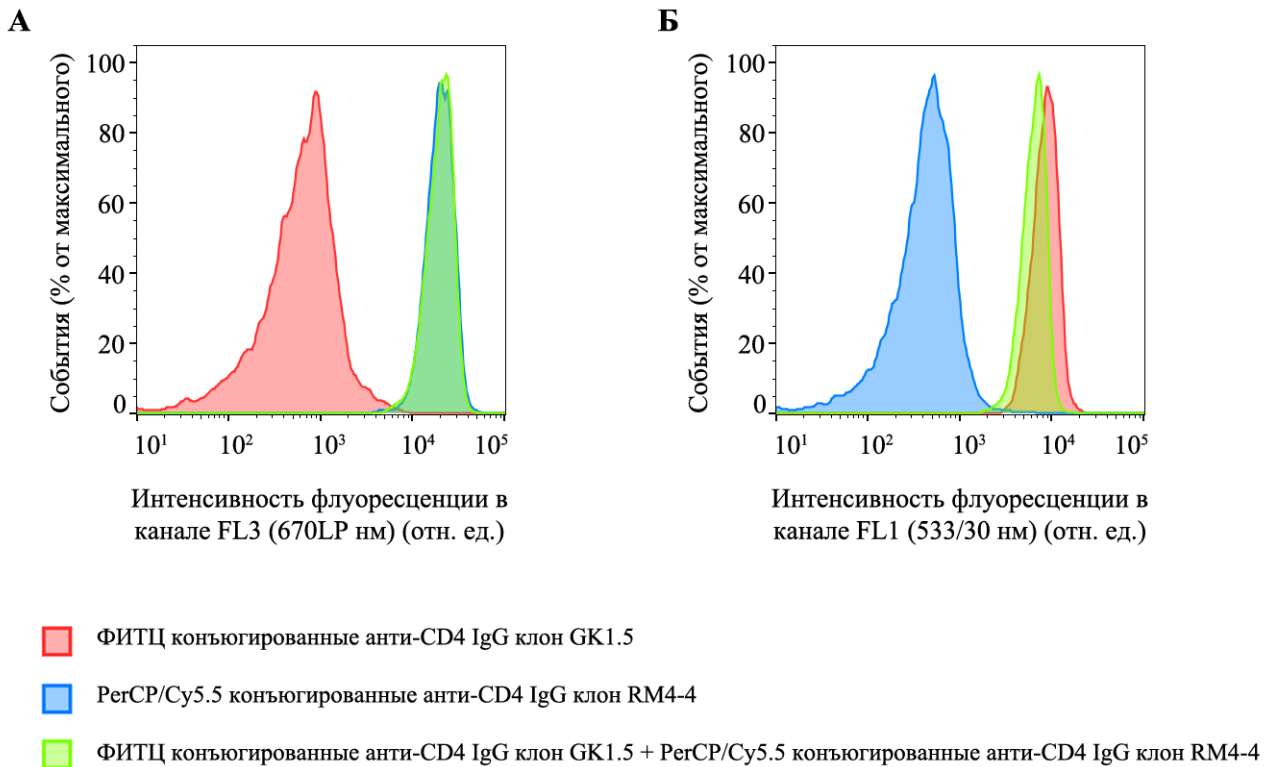


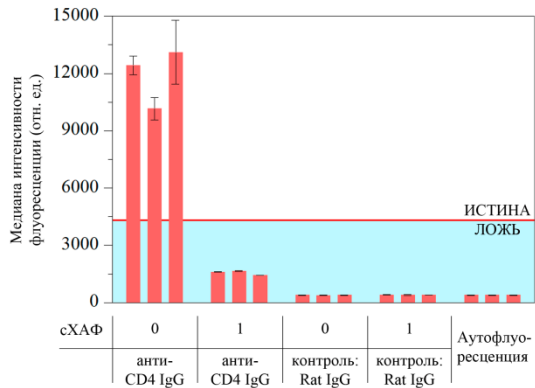
Рис. 48. Крысиные анти-мышь CD4 IgG, конъюгированные с PerCP/Cy5.5, клон RM4-4 не блокируют связывание крысиных анти-мышь CD4 IgG, конъюгированных с ФИТЦ, клон GK1.5. Гепаринизированные образцы крови инкубировали с крысиными анти-мышь CD4 IgG, конъюгированными с ФИТЦ, клон GK1.5 (красные гистограммы), крысиными анти-мышь CD4 IgG, конъюгированными с PerCP/Cy5.5, клон RM4-4 (синие гистограммы), либо с комбинацией крысиных анти-мышь CD4 IgG, конъюгированных с ФИТЦ, клон GK1.5 и крысиных анти-мышь CD4 IgG, конъюгированных с PerCP/Cy5.5, клон RM4-4 (зелёные гистограммы). После процедуры лизиса эритроцитов клетки анализировали проточной цитометрией. Репрезентативные нормализованные гистограммы представляют интенсивность флуоресценции CD4⁺ популяции клеток крови в каналах, соответствующим флуоресценции PerCP/Cy5.5 (возбуждение 488 нм, эмиссия 670LP нм) (**А**) и флуоресценции ФИТЦ (возбуждение 488 нм, эмиссия 533/30 нм) (**Б**). Присутствие клон GK1.5 не влияет на связывание клон RM4-4 с CD4⁺ клетками (и, наоборот, присутствие клон RM4-4 не влияет на связывание клон GK1.5 с CD4⁺ клетками).

На **рис. 49** представлены данные по эффективности мечения биокomпьютерными структурами CD4⁺ клеток *ex vivo* для трёх реализуемых логических функций. Порог “Истина-Ложь” проведён как среднее геометрическое между минимальным и максимальным выходным сигналом.

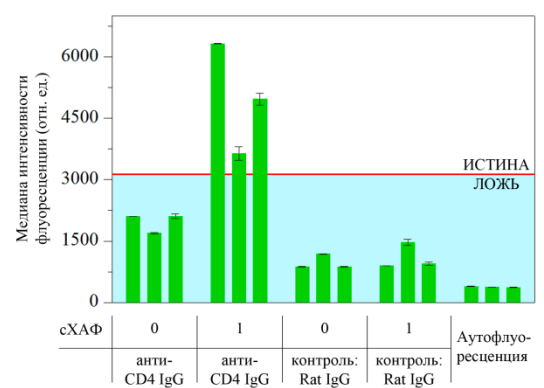
Показано, что обе унарные функции демонстрируют ожидаемое поведение и выходной сигнал превышает порог “Истина-Ложь” только в присутствии в крови входного сигнала, соответствующего истинному значению выходного сигнала (см. таблицы истинности реализуемых функций в Приложении 1). Вне зависимости от входного сигнала, контрольные агенты, содержащие контрольное антитело Rat IgG (а не анти-CD4 IgG), демонстрируют связывание с CD4⁺ популяцией существенно ниже порогового значения, сравнимое с аутофлуоресценцией клеток (т.е. результат = Ложь). Бинарная функция также демонстрирует ожидаемое поведение: выходной сигнал выше порогового значения в присутствии только ФК в

образце и в отсутствие сХАФ, во всех других случаях сигнал незначительно отличается от аутофлуоресценции.

А Биокomпьютерные структуры “НЕТ (сХАФ)”



Б Биокomпьютерные структуры “ДА (сХАФ)”



В Биокomпьютерные структуры “ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)”

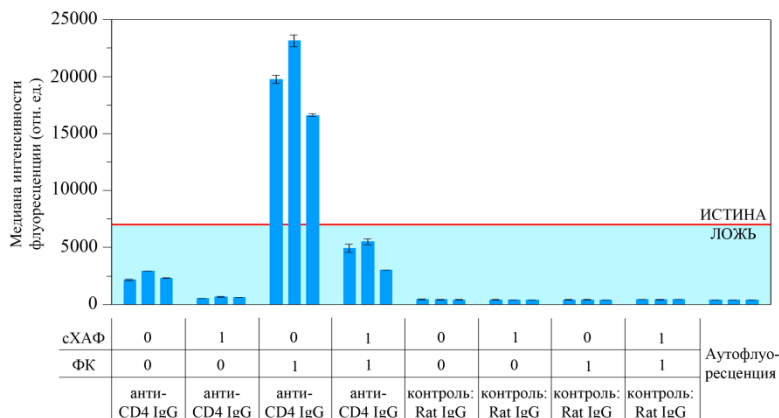


Рис. 49. *Ex vivo* доставка к CD4+ клеткам крови ФИТЦ-меченых биокomпьютерных структур, имплементирующих логические функции **НЕТ (сХАФ)** – А, **ДА (сХАФ)** – Б, и **ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)** – В. Гепаринизированные образцы крови инкубировали с молекулярными входными сигналами (сХАФ, ФК; 0 – отсутствие, 1 – наличие инъекции) и биокomпьютерными структурами, преинкубированными либо с нацеливающим антителом (анти-CD4 IgG, клон GK1.5), либо с контрольным (Rat IgG). Представлены медианы интенсивности флуоресценции CD4+ популяции клеток крови (в канале, соответствующем флуоресценции ФИТЦ), выделенной согласно окрашиванию анти-CD4–PerCP/Cy5.5 (клон RM4-4) антителами. Полученные значения представляют результаты независимых экспериментов для n = 3 мышей.

4.5.3. РЭС-блокада для доставки биокomпьютерных структур

Полученные структуры, имплементирующие логические функции НЕТ (сХАФ), ДА (сХАФ), ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ), вводили мышам линии Balb/c в дозировке 50 мг/кг. Перед инъекцией биокomпьютерных структур, мышей анестезировали и вводили им растворы сукцината хлорамфеникола или фолиевой кислоты (либо эквимольную смесь сХАФ и ФК) согласно реализуемым логическим функциям.

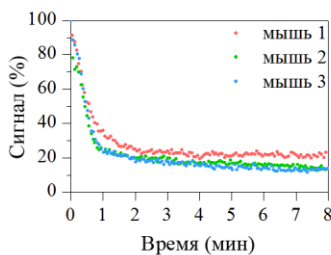
Эффективность инъекции и динамику выведения биокomпьютерных структур из кровотока животных оценивали методом MRQ, помещая хвост мыши в измерительную зону MRQ-регистратора (рис. 19). Детектируемый магнитный сигнал в хвосте мыши представлен как

процент от максимально достигнутого при данной инъекции (рис. 50А).

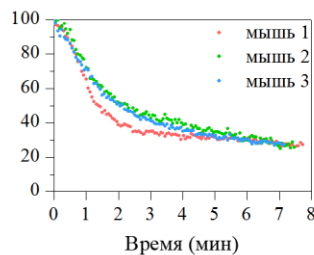
Ввиду быстрого выведения биокomпьютерных структур из кровотока (рис. 50А, I), мечение CD4+ клеток было крайне неэффективным (рис. 50Б, красные заштрихованные столбцы, приведён пример мечения CD4+ клеток *in vivo* биокomпьютерными структурами НЕТ (сХАФ) в отсутствие молекулярных входов), практически не отличимым от аутофлуоресценции клеток в канале флуоресценции, соответствующе флуоресценции ФИТЦ. Для достижения эффективного мечения CD4+ клеток крови, мы использовали блокаду ретикулоэндотелиальной системы (РЭС-блокаду), а именно проводили инъекцию наночастиц ферригидрита в дозировке 250 мг/кг за 30 минут до инъекции биокomпьютерных структур для насыщения макрофагов РЭС. Как видно из данных, представленных на рис. 50А, время циркуляции структур значительно увеличивалось и эффективность таргетинга CD4+ клеток структурами НЕТ (сХАФ) *in vivo* возрастала в 27.5 раз (рис. 50Б, красные столбцы).

А Динамики выведения из кровотока биокomпьютерных структур “НЕТ (сХАФ)”

I Без предварительной инъекции наночастиц ферригидрита



II С предварительной инъекцией наночастиц ферригидрита



Б Адресная доставка биокomпьютерных структур “НЕТ (сХАФ)” к CD4+ клеткам

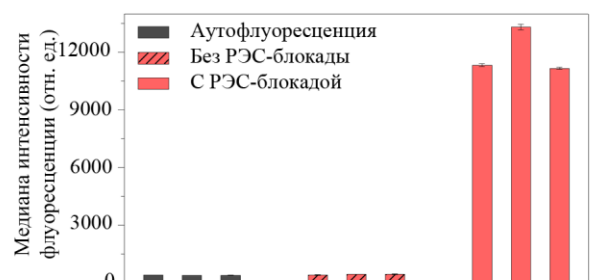
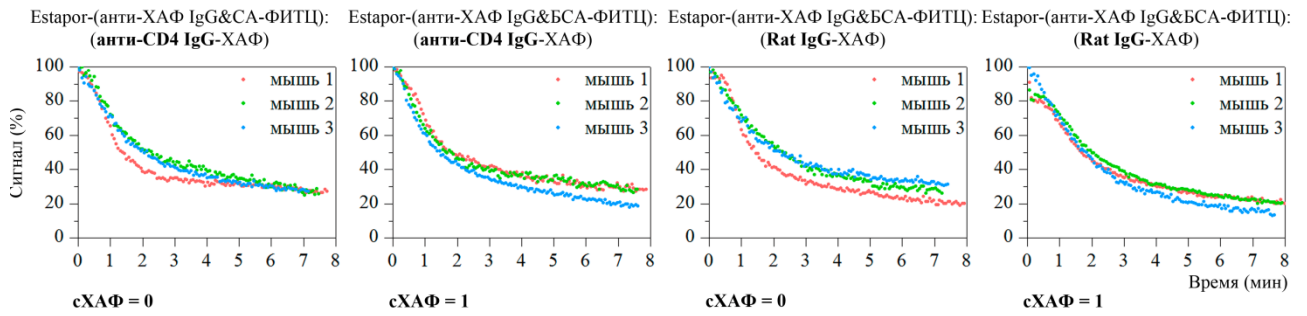


Рис. 50. Применение РЭС-блокады для адресной доставки наночастиц к клеткам как результата выполнения логических операций. **А)** МРQ-динамики циркуляции биокomпьютерных структур НЕТ (сХАФ) в кровотоке без РЭС-блокады и с предварительной инъекцией наночастиц ферригидрита, вызывающих РЭС-блокаду. **Б)** *In vivo* доставка биокomпьютерных структур НЕТ (сХАФ) в отсутствие молекулярных входов к CD4+ клеткам без РЭС-блокады и с предварительной инъекцией наночастиц ферригидрита. Представленные результаты являются репрезентативными данными трёх независимых экспериментов с независимо полученными биокomпьютерными структурами.

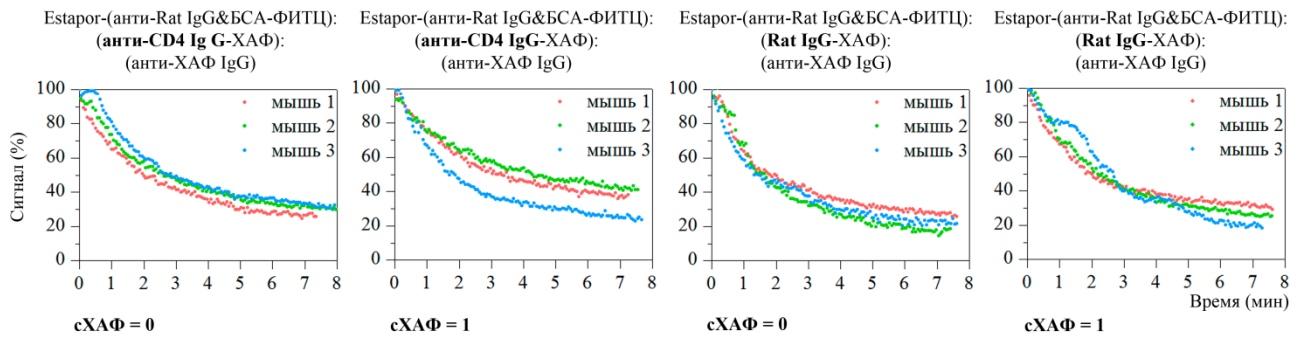
4.5.4. Динамики циркуляции в кровотоке биокomпьютерных структур

На рис. 51 представлены все динамики циркуляции в кровотоке биокomпьютерных структур, имплементирующих логические функции НЕТ (сХАФ), ДА (сХАФ) и ДА (ФК) и НЕТ (сХАФ) со всеми комбинациями входных сигналов (сХАФ и ФК) с предварительной РЭС-блокадой.

А Динамики выведения из кровотока биокomпьютерных структур “НЕТ (сХАФ)”



Б Динамики выведения из кровотока биокomпьютерных структур “ДА (сХАФ)”



В Динамики выведения из кровотока биокomпьютерных структур “ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)”

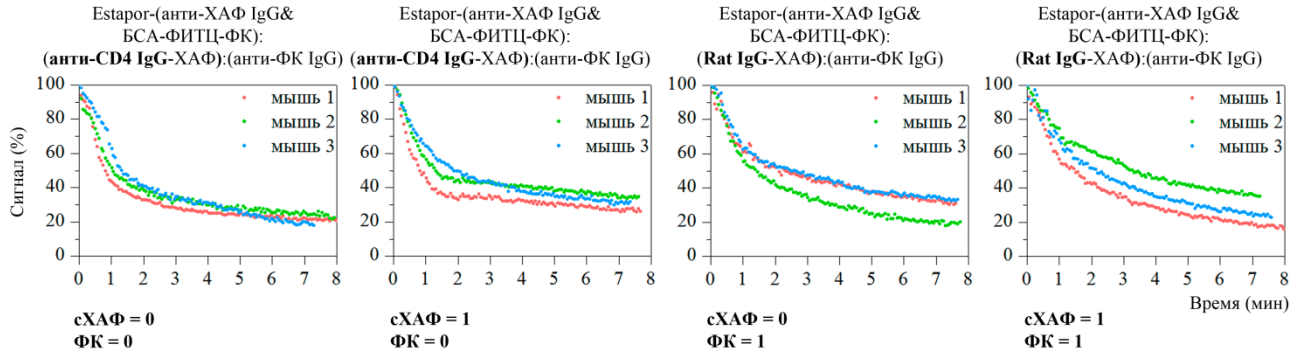


Рис. 51. Динамики выведения из кровотока биокomпьютерных структур, имплементирующих логические функции “НЕТ (сХАФ)” – А, “ДА (сХАФ)” – Б, и “ДА (ФК) и НЕТ (сХАФ)” – В. Последовательно проводили инъекции молекулярных входных сигналов (сХАФ, ФК; 0 – отсутствие, 1 – наличие инъекции) и биокomпьютерных структур, преинкубированных либо с нацеливающим антителом (анти-CD4 IgG), либо с контрольным (Rat IgG) и регистрировали динамики выведения из кровотока магнитных структур методом MPQ (*Magnetic Particle Quantification*).

Входной сигнал = 0 означает, что инъекция молекулярных входов не производилась, входной сигнал = 1 означает, что инъекция молекулярных входов производилась перед инъекцией биокomпьютерных структур. Забор крови для анализа проточной цитофлуориметрией осуществляли через 8 мин из синуса, противоположного тому, куда инъецировали биокomпьютерные структуры.

4.5.5. *In vivo* доставка к CD4+ клеткам крови ФИТЦ-меченых биокomпьютерных структур

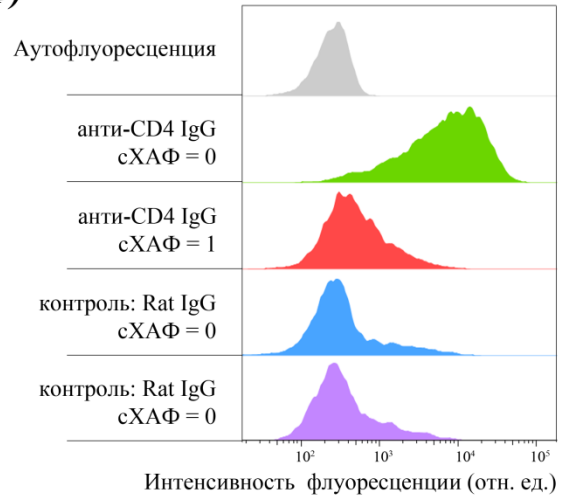
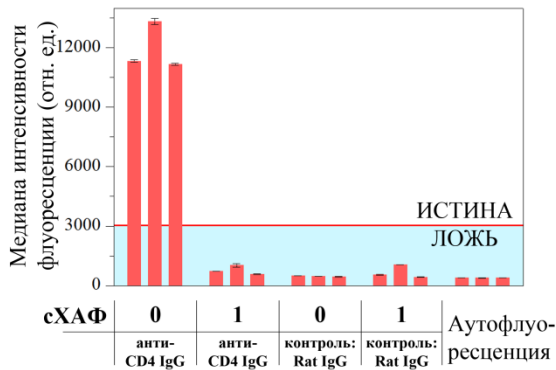
На **рис. 52** представлены данные по эффективности мечения биокomпьютерными структурами CD4+ клеток *in vivo* для трёх реализуемых логических функций. Порог “Истина-Ложь” проведён как среднее геометрическое между минимальным и максимальным выходным сигналом.

Данные, представленные на **рис. 52** показывают, что достигнутая эффективность молекулярного биокomпьютинга *in vivo*, сравнима с эффективностью *ex vivo* поведения биокomпьютерных структур. Важной особенностью предложенного подхода к конструированию биокomпьютерных агентов для их функционирования *in vivo* является независимость их работы от концентрации данных агентов, агенты действуют независимо друг от друга (в отличие от, например, взаимодействующих друг с другом структур на основе ДНК) в присутствии определённого профиля входных сигналов. Для применений *in vivo* это свойство позволяет использовать любую дозу, продиктованную терапией. Более того, в отличие от систем на основе нуклеиновых кислот, данный подход не ограничен применением в средах только с низкой нуклеазной активностью, а не, например, в крови млекопитающих, как было продемонстрировано в данной работе.

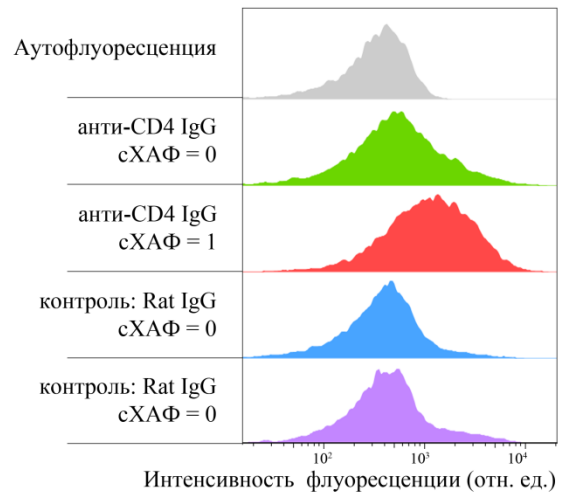
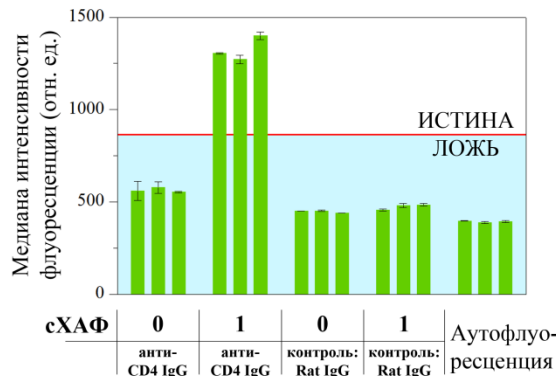
Безусловно, в данной работе были использованы относительно большие дозы наночастиц для инъекций, в частности, для РЭС-блокады. Однако целью было показать принципиальную возможность биокomпьютинга в млекопитающем, что обусловило выбор максимально простой композиции биокomпьютерных систем. Следует также отметить, что исследование поведения *in vivo* таких надмолекулярных комплексов, подвергающихся изменению непосредственно в организме, довольно сложно, поэтому в работе были использованы методы, основанные и на флуоресценции, и на магнетизме для контроля за состоянием комплексов. Вероятно, различные модификации как коровых, так и блокирующих компонентов, например, ПЭГилирование, может значительно увеличить время циркуляции структур в кровотоке и, как следствие, понизить вводимые дозы. Но при этом необходимо будет вводить дополнительные методы контроля за состоянием и трансформацией частиц на всех этапах их функционирования.

Отдельным важным вопросом является концентрация действующих соединений (молекулярных входов): при том, что каждый организм индивидуален, одна и та же концентрация вещества может являться нормой для одного и отклонением для другого. Таким образом, существует необходимость подстройки данных систем под внутренние параметры организма, однако ещё предстоит понять, как вводить такой внутренний контроль.

А Биокomпьютерные структуры “НЕТ (сХАФ)”



Б Биокomпьютерные структуры “ДА (сХАФ)”



В Биокomпьютерные структуры “ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)”

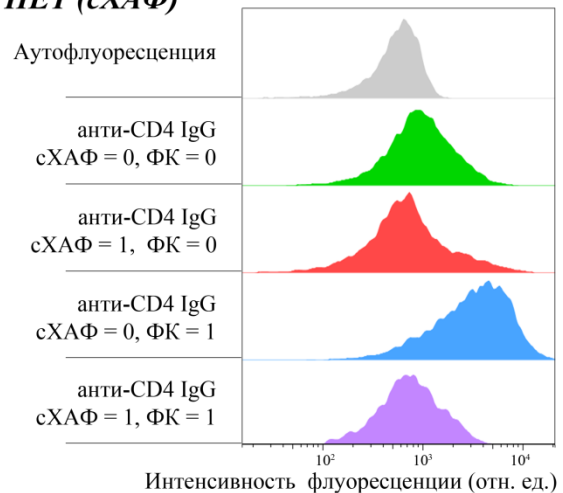
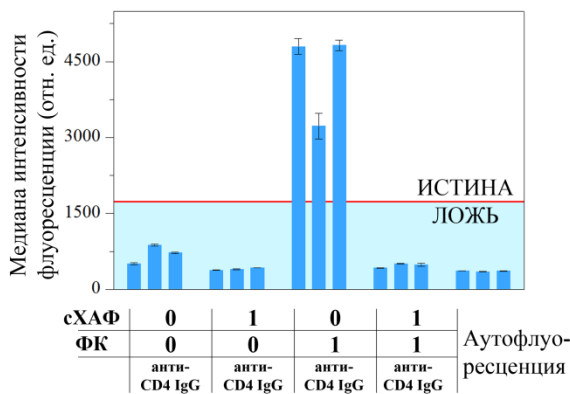


Рис. 52. *In vivo* доставка к CD4+ клеткам крови ФИТЦ-меченых биокomпьютерных структур, имплементирующих логические функции “НЕТ (сХАФ)” – А, “ДА (сХАФ)” – Б, и “ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)” – В. Последовательно проводили инъекции молекулярных входных сигналов (сХАФ, ФК; 0 – отсутствие, 1 – наличие инъекции) и биокomпьютерных комплексов, преинкубированных либо с нацеливающим антителом (анти-CD4 IgG, клон GK1.5), либо с контрольным (Rat IgG). Слева представлены медианы интенсивности флуоресценции CD4+ популяции клеток крови (в канале, соответствующем флуоресценции ФИТЦ), выделенной согласно окрашиванию анти-CD4-PerCP/Cy5.5 антителами (клон RM4-4). Полученные значения представляют результаты независимых экспериментов для n = 3 мышей. Справа представлены нормализованные гистограммы, соответствующие интенсивности флуоресценции CD4+ клеток в канале, соответствующем ФИТЦ (гистограммы представлены для образцов со средними значениями медианы интенсивности флуоресценции в триplete).

5. ВЫВОДЫ

1. Синтезированы и охарактеризованы адресные наночастицы оксида железа, с высокой специфичностью связывающие рецептор HER2/neu на поверхности клеток-мишеней. Показана высокая селективность (130:1) мечения клеток-мишеней полученными адресными наночастицами по сравнению с клетками, не несущими маркера HER2/neu.
2. На примере полученных адресных наночастиц оксида железа разработан новый метод МРQ-цитометрии для количественной детекции взаимодействия наночастиц с клетками эукариот, позволяющий с высокой чувствительностью (0.33 нг или $6.5 \cdot 10^{-18}$ моль частиц в объеме 30 мкл) детектировать наночастицы в оптически непрозрачных средах вне зависимости от факторов, влияющих на оптические свойства образца. Показано, что метод МРQ-цитометрии вместе с полученными адресными частицами может быть использован для высокочувствительной селективной детекции клеток-мишеней в составе сложной смеси, а также для количественной оценки уровня экспрессии мембраноассоциированных антигенов.
3. Созданы конъюгаты и надмолекулярные конструкции на основе наночастиц магнетита, рекомбинантных мини-антител 4D5scFv и модуля барназа:барстар. Продемонстрирована селективность мечения клеток-мишеней и количественный анализ экспрессии онкомаркера HER2/neu на их поверхности полученными конструкциями.
4. Разработана эффективная система селективного мечения опухолевых клеток с различным профилем гликозилирования поверхностных белков с помощью магнитных частиц, модифицированных лектинами.
5. Продемонстрировано специфичное взаимодействие конъюгатов магнитных частиц, модифицированных лектинами, с эукариотическими клетками в культуре. Показано, что конъюгаты магнитных частиц с агглютинином зародыша пшеницы могут быть использованы для идентификации клеточных линий. Показана обратимость взаимодействия данных конъюгатов с клетками эукариот в присутствии конкурирующего моносахарида.
6. Впервые получены и охарактеризованы биокomпьютерные комплексы на основе наночастиц и белкового интерфейса, подвергающегося дезинтеграции под воздействием молекулярных входных сигналов, которые позволяют реализовать полный набор булевых функций. Продемонстрирована способность полученных биокomпьютерных комплексов избирательно связываться с клетками-мишенями *in vitro* в результате логических вычислений под воздействием низкомолекулярных соединений как входных сигналов.
7. Впервые показано выполнение унарных и бинарных логических операций биокomпьютерными комплексами на основе наночастиц и белкового интерфейса *ex vivo* в цельной крови и *in vivo* в млечопитающем под воздействием растворимых низкомолекулярных соединений, циркулирующих в крови.

6. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает сердечную благодарность научному руководителю Сергею Михайловичу Дееву за неоценимую помощь на всех этапах работы и Максиму Никитину за огромный вклад в диссертационную работу, мотивацию, поддержку и бесконечную преданность науке. Искреннюю благодарность автор выражает всему дружному коллективу лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН, в особенности Екатерине Николаевне Лебедежке, Татьяне Здобновой, Олегу Стрёмовскому, Екатерине Суловой, Агаевой Улькер, Галине Прошкиной, Ивану Зелепукину, Ольге Шиловой и Кристине Мироновой за отзывчивость, помощь в работе и создание дружественной атмосферы в лаборатории. Искреннюю благодарность автор выражает Петру Ивановичу Никитину и Ирине Львовне Никитиной за живое обсуждение работ и помощь в написании статей. Также автор выражает благодарность Александру Михайловичу Сапожникову и Марине Шевченко за помощь в работе с оборудованием. Автор выражает сердечную признательность сотрудникам учебно-научного центра и отдела аспирантуры ИБХ РАН, в особенности Татьяне Владимировне Овчинниковой и Юлии Рудольфовне Савельевой. Также автор выражает благодарность Елене Шипуновой за поддержку.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЭС/ОЭС – атомно-эмиссионная / оптическая эмиссионная спектроскопия

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗЧ – золотые частицы

ИСП-МС – спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

ИФА – иммуноферментный анализ

КТ – квантовые точки

ЛППР – локализованный поверхностный плазмонный резонанс

МИА – магнитный иммуноанализ

МНЧ – магнитные наночастицы

моноАТ – моноклональные антитела

МРТ – магнитно-резонансная томография

МТТ – 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид

МЧ – магнитные частицы

НЧ – наночастицы

ОФД – *o*-фенилендиамин

ПВА – поливиниловый спирт

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭО – полиэтиленоксид

РНК – рибонуклеиновая кислота

РЭС – ретикулоэндотелиальная система

сХАФ – сукцинат хлорамфеникола

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ФИТЦ – флуоресцеин изотиоцианат

ФК – фолиевая кислота

ФЛУО – конъюгат флуоресцеина с этаноламином

ФМР – ферромагнитный резонанс

ХАФ – хлорамфеникол

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity, антитело зависимая клеточная цитотоксичность

CMD – carboxymethyl-dextran, карбоксиметил-декстран

ConA – *Concanavalin A*, конканавалин А

EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид

EGF – epidermal growth factor, эпидермальный фактор роста

EGFR – epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермального фактора роста

FBS – fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка

FDA – Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

Gal – галактоза

IgG – иммуноглобулин G

HER2/neu – human epidermal growth factor receptor-2, рецептор эпидермального фактора роста человека 2

HER2-ECD – extracellular domain HER2/neu, внеклеточный домен HER2/neu

Man – манноза

MDT – Magnetic Drug Targeting, магнитоуправляемая доставка лекарств

MPQ – Magnetic Particle Quantification

MES – морфолиноэтансульфоновая кислота

NHS – N-гидроксисукцинимид

NTA – Nanoparticle Tracking Analysis, анализ траекторий наночастиц

PBS – phosphate buffered saline, фосфатно-солевой раствор

PEI – polyethyleneimine, полиэтиленимин

PerCP/Cy5.5 – tandemный краситель peridinin chlorophyll/cyanine5.5, перидинин-хлорофилл/цианин5.5

PLA – полилактат

PLGA – сополимер молочной и гликолевой кислот

PNA – *Peanut Agglutinin*, агглютинин арахиса

SBA – *Soybean Agglutinin*, агглютинин из соевых бобов

SNP – single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм

Sulfo-NHS – N-гидроксисульфосукцинимид

UV/VIS – спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой области спектра

VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule 1, молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа

WGA – *Wheat Germ Agglutinin*, агглютинин зародыша пшеницы

Xyl – ксилоза

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adleman, L., 1994. Molecular computation of solutions to combinatorial problems. *Science* 266 (5187), 1021–1024.
2. Aghayeva, U.F., Nikitin, M.P., Lukash, S.V., Deyev, S.M., 2013. Denaturation-resistant bifunctional colloidal superstructures assembled via the proteinaceous barnase-barstar interface. *ACS nano* 7 (2), 950–961.
3. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K., Farokhzad, O.C., 2008. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics* 5 (4), 505–515.
4. Alivisatos, P., 2004. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat. Biotechnol.* 22 (1), 47–52.
5. Amir, Y., Ben-Ishay, E., Levner, D., Ittah, S., Abu-Horowitz, A., Bachelet, I., 2014. Universal computing by DNA origami robots in a living animal. *Nature nanotechnology* 9 (5), 353–357.
6. Angelos, S., Yang, Y.-W., Khashab, N.M., Stoddart, J.F., Zink, J.I., 2009. Dual-controlled nanoparticles exhibiting AND logic. *Journal of the American Chemical Society* 131 (32), 11344–11346.
7. Araujo, A.C.V., Abreu, F., Silva, K.T., Bazylnski, D.A., Lins, U., 2015. Magnetotactic bacteria as potential sources of bioproducts. *Mar Drugs* 13 (1), 389–430.
8. Arugula, M.A., Shroff, N., Katz, E., He, Z., 2012. Molecular AND logic gate based on bacterial anaerobic respiration. *Chemical communications (Cambridge, England)* 48 (82), 10174–10176.
9. Ashkenasy, G., Dadon, Z., Alesebi, S., Wagner, N., Ashkenasy, N., 2011. Building Logic into Peptide Networks: Bottom-Up and Top-Down. *Isr. J. Chem.* 51 (1), 106–117.
10. Ashkenasy, G., Ghadiri, M.R., 2004. Boolean logic functions of a synthetic peptide network. *Journal of the American Chemical Society* 126 (36), 11140–11141.
11. Baron, R., Lioubashevski, O., Katz, E., Niazov, T., Willner, I., 2006. Elementary Arithmetic Operations by Enzymes. A Model for Metabolic Pathway Based Computing. *Angew. Chem.* 118 (10), 1602–1606.
12. Benenson, Y., 2011. Biocomputing: DNA computes a square root. *Nature nanotechnology* 6 (8), 465–467.
13. Benenson, Y., 2012. Biomolecular computing systems: principles, progress and potential. *Nature reviews. Genetics* 13 (7), 455–468.
14. Bies, C., Lehr, C.-M., Woodley, J.F., 2004. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced drug delivery reviews* 56 (4), 425–435.
15. Bird, R., Hardman, K., Jacobson, J., Johnson, S., Kaufman, B., Lee, S., Lee, T., Pope, S., Riordan, G., Whitlow, M., 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242 (4877), 423–426.
16. Blume-Jensen, P., Hunter, T., 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411 (6835), 355–365.
17. Boal, Ilhan, DeRouchey, Thurn-Albrecht, Russell, Rotello, 2000. Self-assembly of nanoparticles into structured spherical and network aggregates. *Nature* 404 (6779), 746–748.
18. Borgert, J., Schmidt, J.D., Schmale, I., Bontus, C., Gleich, B., David, B., Weizenecker, J., Jockram, J., Lauruschkat, C., Mende, O., Heinrich, M., Halkola, A., Bergmann, J., Woywode, O., Rahmer, J., 2013. Perspectives on clinical magnetic particle imaging. *Biomedizinische Technik. Biomedical engineering* 58 (6), 551–556.
19. Care, A., Chi, F., Bergquist, P.L., Sunna, A., 2014. Biofunctionalization of silica-coated magnetic particles mediated by a peptide. *J Nanopart Res* 16 (8).

20. Cheng, J., Teply, B.A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F.X., Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A.F., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2007. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for *in vivo* targeted drug delivery. *Biomaterials* 28 (5), 869–876.
21. Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C.W., 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 6 (4), 662–668.
22. Cohen, H., Levy, R.J., Gao, J., Fishbein, I., Kousaev, V., Sosnowski, S., Slomkowski, S., Golomb, G., 2000. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther.* 7 (22), 1896–1905.
23. Cole, A.J., Yang, V.C., David, A.E., 2011. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 29 (7), 323–332.
24. Costa, E.C., Gaspar, V.M., Marques, J.G., Coutinho, P., Correia, I.J., 2013. Evaluation of nanoparticle uptake in co-culture cancer models. *PLoS ONE* 8 (7), e70072.
25. Cromer Berman, Stacey M, Walczak, P., Bulte, Jeff W M, 2011. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 3 (4), 343–355.
26. de Jong, 2008. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *IJN*, 133.
27. de Vries, Anthony H B, Krenn, B.E., van Driel, R., Subramaniam, V., Kanger, J.S., 2007. Direct observation of nanomechanical properties of chromatin in living cells. *Nano Lett.* 7 (5), 1424–1427.
28. Desai, M.P., Labhasetwar, V., Amidon, G.L., Levy, R.J., 1996. *Pharmaceutical Research* 13 (12), 1838–1845.
29. Desai, M.P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R.J., Amidon, G.L., 1997. *Pharmaceutical Research* 14 (11), 1568–1573.
30. Deyev, S.M., PolianovskiI, O.L., 2008. Monoclonal antibodies for diagnostics and therapy. *Biotechnology in Russia* 2 (3), 1–13.
31. Deyev, S.M., Lebedenko, E.N., 2008. Multivalency: the hallmark of antibodies used for optimization of tumor targeting by design. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 30 (9), 904–918.
32. Deyev, S.M., Waibel, R., Lebedenko, E.N., Schubiger, A.P., Plückthun, A., 2003. Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module. *Nat. Biotechnol.* 21 (12), 1486–1492.
33. Ding, H., Lv, Y., Ni, D., Wang, J., Tian, Z., Wei, W., Ma, G., 2015. Erythrocyte membrane-coated NIR-triggered biomimetic nanovectors with programmed delivery for photodynamic therapy of cancer. *Nanoscale* 7 (21), 9806–9815.
34. Discher, D.E., Eisenberg, A., 2002. Polymer vesicles. *Science* 297 (5583), 967–973.
35. Douglas, S.M., Bachelet, I., Church, G.M., 2012. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science (New York, N.Y.)* 335 (6070), 831–834.
36. Durazo, S.A., Kompella, U.B., 2012. Functionalized nanosystems for targeted mitochondrial delivery. *Mitochondrion* 12 (2), 190–201.
37. Escudero, A., Carrillo-Carrion, C., Zyuzin, M.V., Parak, W.J., 2016. Luminescent Rare-earth-based Nanoparticles: A Summarized Overview of their Synthesis, Functionalization, and Applications. *Topics in current chemistry (Journal)* 374 (4), 48.
38. Ezziiane, Z., 2006. DNA computing: applications and challenges. *Nanotechnology* 17 (2), R27.
39. Faraji, A.H., Wipf, P., 2009. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.* 17 (8), 2950–2962.

40. Farokhzad, O.C., Cheng, J., Teply, B.A., Sherifi, I., Jon, S., Kantoff, P.W., Richie, J.P., Langer, R., 2006. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *PNAS* 103 (16), 6315–6320.
41. Farokhzad, O.C., Langer, R., 2009. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS nano* 3 (1), 16–20.
42. Fayol, D., Luciani, N., Lartigue, L., Gazeau, F., Wilhelm, C., 2013. Managing Magnetic Nanoparticle Aggregation and Cellular Uptake. A Precondition for Efficient Stem-Cell Differentiation and MRI Tracking (*Adv. Healthcare Mater.* 2/2013). *Advanced Healthcare Materials* 2 (2), 312.
43. Feng, S.-S., 2004. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. *Expert Rev Med Devices* 1 (1), 115–125.
44. Fréchet, J.M.J., 2002. Dendrimers and supramolecular chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (8), 4782–4787.
45. Freeman, R., Finder, T., Willner, I., 2009. Multiplexed analysis of Hg²⁺ and Ag⁺ ions by nucleic acid functionalized CdSe/ZnS quantum dots and their use for logic gate operations. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48 (42), 7818–7821.
46. Freese, C., Gibson, M.I., Klok, H.-A., Unger, R.E., Kirkpatrick, C.J., 2012. Size- and coating-dependent uptake of polymer-coated gold nanoparticles in primary human dermal microvascular endothelial cells. *Biomacromolecules* 13 (5), 1533–1543.
47. Freese, C., Uboldi, C., Gibson, M.I., Unger, R.E., Weksler, B.B., Romero, I.A., Couraud, P.-O., Kirkpatrick, C.J., 2012. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells. *Part Fibre Toxicol* 9, 23.
48. Gaumet, M., Gurny, R., Delie, F., 2009. Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: the influence of particle size. *Eur J Pharm Sci* 36 (4-5), 465–473.
49. Generalova, A.N., Oleinikov, V.A., Sukhanova, A., Artemyev, M.V., Zubov, V.P., Nabiev, I., 2013. Quantum dot-containing polymer particles with thermosensitive fluorescence. *Biosensors & bioelectronics* 39 (1), 187–193.
50. Girard, O.M., Ramirez, R., McCarty, S., Mattrey, R.F., 2012. Toward absolute quantification of iron oxide nanoparticles as well as cell internalized fraction using multiparametric MRI. *Contrast Media Mol Imaging* 7 (4), 411–417.
51. Giustini, A.J., Perreard, I., Rauwerdink, A.M., Hoopes, P.J., Weaver, J.B., 2012. Noninvasive assessment of magnetic nanoparticle-cancer cell interactions. *Integr Biol (Camb)* 4 (10), 1283–1288.
52. Gleich, B., Weizenecker, J., 2005. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature* 435 (7046), 1214–1217.
53. Grobmyer, S.R., Morse, D.L., Fletcher, B., Gutwein, L.G., Sharma, P., Krishna, V., Frost, S.C., Moudgil, B.M., Brown, S.C., 2011. The promise of nanotechnology for solving clinical problems in breast cancer. *Journal of surgical oncology* 103 (4), 317–325.
54. Grossman, H.L., Myers, W.R., Vreeland, V.J., Bruehl, R., Alper, M.D., Bertozzi, C.R., Clarke, J., 2004. Detection of bacteria in suspension by using a superconducting quantum interference device. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (1), 129–134.
55. Gu, H., Xu, K., Xu, C., Xu, B., 2006. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. *Chem. Commun. (Camb.)* (9), 941–949.
56. Gupta, A.K., Gupta, M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26 (18), 3995–4021.

57. Guthi, J.S., Yang, S.-G., Huang, G., Li, S., Khemtong, C., Kessinger, C.W., Peyton, M., Minna, J.D., Brown, K.C., Gao, J., 2010. MRI-visible micellar nanomedicine for targeted drug delivery to lung cancer cells. *Mol. Pharm.* 7 (1), 32–40.
58. Hama, S., Itakura, S., Nakai, M., Nakayama, K., Morimoto, S., Suzuki, S., Kogure, K., 2015. Overcoming the polyethylene glycol dilemma via pathological environment-sensitive change of the surface property of nanoparticles for cellular entry. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 206, 67–74.
59. Hamidi, M., Azadi, A., Rafiei, P., 2008. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (15), 1638–1649.
60. Harries, M., 2002. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocrine Related Cancer* 9 (2), 75–85.
61. Hatakeyama, H., Akita, H., Harashima, H., 2013. The polyethyleneglycol dilemma: advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. *Biological & pharmaceutical bulletin* 36 (6), 892–899.
62. Hermanson, G.T., 2008. Bioconjugate techniques.
63. Hoehn, M., Wiedermann, D., Justicia, C., Ramos-Cabrera, P., Kruttwig, K., Farr, T., Himmelreich, U., 2007. Cell tracking using magnetic resonance imaging. *The Journal of physiology* 584 (Pt 1), 25–30.
64. Hoffman, A.S., Stayton, P.S., Press, O., Murthy, N., Lackey, C.A., Cheung, C., Black, F., Campbell, J., Fausto, N., Kyriakides, T.R., Bornstein, P., 2002. Design of Smart polymers that can direct intracellular drug delivery. *Polym. Adv. Technol.* 13 (10-12), 992–999.
65. Hounkumnuard, K., Natenapit, M., 2013. Magnetic drug targeting by ferromagnetic microwires implanted within blood vessels. *Medical physics* 40 (6), 62302.
66. Hsing, I.-M., Xu, Y., Zhao, W., 2007. Micro- and Nano- Magnetic Particles for Applications in Biosensing. *Electroanalysis* 19 (7-8), 755–768.
67. Hu, C.-M.J., Fang, R.H., Wang, K.-C., Luk, B.T., Thamphiwatana, S., Dehaini, D., Nguyen, P., Angsantikul, P., Wen, C.H., Kroll, A.V., Carpenter, C., Ramesh, M., Qu, V., Patel, S.H., Zhu, J., Shi, W., Hofman, F.M., Chen, T.C., Gao, W., Zhang, K., Chien, S., Zhang, L., 2015. Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature* 526 (7571), 118–121.
68. Hu, C.-M.J., Zhang, L., Aryal, S., Cheung, C., Fang, R.H., Zhang, L., 2011. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (27), 10980–10985.
69. Hu, Z., Li, J., Li, C., Zhao, S., Li, N., Wang, Y., Wei, F., Chen, L., Huang, Y., 2013. Folic acid-conjugated graphene–ZnO nanohybrid for targeting photodynamic therapy under visible light irradiation. *J. Mater. Chem. B* 1 (38), 5003.
70. Huang, X., El-Sayed, I.H., Qian, W., El-Sayed, M.A., 2007. Cancer cells assemble and align gold nanorods conjugated to antibodies to produce highly enhanced, sharp, and polarized surface Raman spectra: a potential cancer diagnostic marker. *Nano Lett.* 7 (6), 1591–1597.
71. Irache, J.M., Esparza, I., Gamazo, C., Agüeros, M., Espuelas, S., 2011. Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Veterinary parasitology* 180 (1-2), 47–71.
72. Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T., 2005. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* 100 (1), 1–11.
73. James, S.A., Feltis, B.N., Jonge, M.D. de, Sridhar, M., Kimpton, J.A., Altissimo, M., Mayo, S., Zheng, C., Hastings, A., Howard, D.L., Paterson, D.J., Wright, P.F.A., Moorhead, G.F., Turney, T.W.,

- Fu, J., 2013. Quantification of ZnO nanoparticle uptake, distribution, and dissolution within individual human macrophages. *ACS Nano* 7 (12), 10621–10635.
74. Janib, S.M., Moses, A.S., MacKay, J.A., 2010. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (11), 1052–1063.
75. Janssen, X.J.A., van IJzendoorn, L.J., Prins, M.W.J., 2008. On-chip manipulation and detection of magnetic particles for functional biosensors. *Biosensors & bioelectronics* 23 (6), 833–838.
76. Jeng, J., Lin, M.-F., Cheng, F.-Y., Yeh, C.-S., Shiea, J., 2007. Using high-concentration trypsin-immobilized magnetic nanoparticles for rapid in situ protein digestion at elevated temperature. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (18), 3060–3068.
77. Jiao, Y., 2002. *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of Oral Heparin-Loaded Polymeric Nanoparticles in Rabbits. *Circulation* 105 (2), 230–235.
78. Kang, J.S., Deluca, P.P., Lee, K.C., 2009. Emerging PEGylated drugs. *Expert opinion on emerging drugs* 14 (2), 363–380.
79. Katz, E., 2012. *Biomolecular Information Processing*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
80. Katz, E., 2015. Biocomputing - tools, aims, perspectives. *Current opinion in biotechnology* 34, 202–208.
81. Katz, E., Privman, V., 2010. Enzyme-based logic systems for information processing. *Chemical Society reviews* 39 (5), 1835–1857.
82. Kelf, T.A., Sreenivasan, V.K.A., Sun, J., Kim, E.J., Goldys, E.M., Zvyagin, A.V., 2010. Non-specific cellular uptake of surface-functionalized quantum dots. *Nanotechnology* 21 (28), 285105.
83. Koeppen, H.K.W., Wright, B.D., Burt, A.D., Quirke, P., McNicol, A.M., Dybdal, N.O., Sliwkowski, M.X., Hillan, K.J., 2001. Overexpression of HER2/neu in solid tumours. An immunohistochemical survey. *Histopathology* 38 (2), 96–104.
84. Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (5517), 495–497.
85. Kolb, H.C., Finn, M.G., Sharpless, K.B., 2001. Click Chemistry. Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (11), 2004–2021.
86. Kreuter, J., 2013. Mechanism of polymeric nanoparticle-based drug transport across the blood-brain barrier (BBB). *J Microencapsul* 30 (1), 49–54.
87. Kularatne, B.Y., Lorigan, P., Browne, S., Suvarna, S.K., Smith, M.O., Lawry, J., 2002. Monitoring tumour cells in the peripheral blood of small cell lung cancer patients. *Cytometry* 50 (3), 160–167.
88. Lara, H.H., Ayala-Nuñez, N.V., Ixtapan-Turrent, L., Rodriguez-Padilla, C., 2010. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J Nanobiotechnology* 8, 1.
89. Leamon, C.P., Reddy, J.A., 2004. Folate-targeted chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews* 56 (8), 1127–1141.
90. Lebedenko, E.N., Balandin, T.G., Edelweiss, E.F., Georgiev, O., Moiseeva, E.S., Petrov, R.V., Deyev, S.M., 2007. Visualization of cancer cells by means of the fluorescent EGFP-barnase protein. *Dokl Biochem Biophys* 414 (1), 120–123.
91. Lee, H., Sun, E., Ham, D., Weissleder, R., 2008. Chip-NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells. *Nat. Med.* 14 (8), 869–874.
92. Lee, S.Y., Park, H.S., Lee, K.Y., Kim, H.J., Jeon, Y.J., Jang, T.W., Lee, K.H., Kim, Y.C., Kim, K.S., Oh, I.J., Kim, S.Y., 2013. Paclitaxel-loaded polymeric micelle (230 mg/m²) and cisplatin (60

mg/m(2)) vs. paclitaxel (175 mg/m(2)) and cisplatin (60 mg/m(2)) in advanced non-small-cell lung cancer: a multicenter randomized phase IIB trial. *Clinical lung cancer* 14 (3), 275–282.

93. Lemmon, M.A., Schlessinger, J., 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141 (7), 1117–1134.
94. Lenglet, L., 2009. Multiparametric magnetic immunoassays utilizing non-linear signatures of magnetic labels. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 321 (10), 1639–1643.
95. Leslie-Pelecky, D.L., Rieke, R.D., 1996. *Magnetic Properties of Nanostructured Materials*. Chem. Mater. 8 (8), 1770–1783.
96. Lesniak, A., Salvati, A., Santos-Martinez, M.J., Radomski, M.W., Dawson, K.A., Åberg, C., 2013. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* 135 (4), 1438–1444.
97. Liang, L., Care, A., Zhang, R., Lu, Y., Packer, N.H., Sunna, A., Qian, Y., Zvyagin, A.V., 2016. Facile Assembly of Functional Upconversion Nanoparticles for Targeted Cancer Imaging and Photodynamic Therapy. *ACS applied materials & interfaces* 8 (19), 11945–11953.
98. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90 (12), 1649–1664. PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25.1. *Advanced drug delivery reviews* 46 (1-3), 3–26.
99. Liu, J., Lu, Y., 2006. Smart Nanomaterials Responsive to Multiple Chemical Stimuli with Controllable Cooperativity. *Adv. Mater.* 18 (13), 1667–1671.
100. Lueshen, E., Venugopal, I., Soni, T., Alaraj, A., Linninger, A., 2015. Implant-Assisted Intrathecal Magnetic Drug Targeting to Aid in Therapeutic Nanoparticle Localization for Potential Treatment of Central Nervous System Disorders. *Journal of biomedical nanotechnology* 11 (2), 253–261.
101. Lukianova-Hleb, E.Y., 2011. Tunable Plasmonic Nanoprobes for Theranostics of Prostate Cancer. *Theranostics*, 3.
102. Lytton-Jean, A.K.R., Kauffman, K.J., Kaczmarek, J.C., Langer, R., 2015. Cancer nanotherapeutics in clinical trials. *Cancer treatment and research* 166, 293–322.
103. Ma, Y.-J., Gu, H.-C., 2007. Study on the endocytosis and the internalization mechanism of aminosilane-coated Fe₃O₄ nanoparticles *in vitro*. *J Mater Sci Mater Med* 18 (11), 2145–2149.
104. Mailloux, S., Katz, E., 2014. Role of biomolecular logic systems in biosensors and bioactuators. *Opt. Eng* 53 (9), 97107.
105. Maltzahn, G. von, Harris, T.J., Park, J.-H., Min, D.-H., Schmidt, A.J., Sailor, M.J., Bhatia, S.N., 2007. Nanoparticle self-assembly gated by logical proteolytic triggers. *Journal of the American Chemical Society* 129 (19), 6064–6065.
106. Mao, C., LaBean, T.H., Relf, J.H., Seeman, N.C., 2000. Logical computation using algorithmic self-assembly of DNA triple-crossover molecules. *Nature* 407 (6803), 493–496.
107. McAteer, M.A., Sibson, N.R., von Zur Muhlen, Constantin, Schneider, J.E., Lowe, A.S., Warrick, N., Channon, K.M., Anthony, D.C., Choudhury, R.P., 2007. *In vivo* magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide. *Nature medicine* 13 (10), 1253–1258.
108. Mérian, J., Gravier, J., Navarro, F., Texier, I., 2012. Fluorescent nanoprobes dedicated to *in vivo* imaging: from preclinical validations to clinical translation. *Molecules* 17 (5), 5564–5591.
109. Mesiha, M.S., Sidhom, M.B., Fasipe, B., 2005. Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *International journal of pharmaceutics* 288 (2), 289–293.

- 110.** Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S., Weiss, S., 2005. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science* 307 (5709), 538–544.
- 111.** Miyamoto, T., Razavi, S., DeRose, R., Inoue, T., 2013. Synthesizing biomolecule-based Boolean logic gates. *ACS synthetic biology* 2 (2), 72–82.
- 112.** Montenegro, J.-M., Grazu, V., Sukhanova, A., Agarwal, S., de la Fuente, Jesus M, Nabiev, I., Greiner, A., Parak, W.J., 2013. Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery. *Advanced drug delivery reviews* 65 (5), 677–688.
- 113.** Morisada, S., Miyata, N., Iwahori, K., 2002. Immunomagnetic separation of scum-forming bacteria using polyclonal antibody that recognizes mycolic acids. *Journal of Microbiological Methods* 51 (2), 141–148.
- 114.** Motornov, M., Zhou, J., Pita, M., Gopishetty, V., Tokarev, I., Katz, E., Minko, S., 2008. "Chemical transformers" from nanoparticle ensembles operated with logic. *Nano letters* 8 (9), 2993–2997.
- 115.** Mura, S., Nicolas, J., Couvreur, P., 2013. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature materials* 12 (11), 991–1003.
- 116.** Mykhaylyk, O., Antequera, Y.S., Vlaskou, D., Plank, C., 2007. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection *in vitro*. *Nat Protoc* 2 (10), 2391–2411.
- 117.** Nikitin, M.P., Torno, M., Chen, H., Rosengart, A., Nikitin, P.I., 2008. Quantitative real-time *in vivo* detection of magnetic nanoparticles by their nonlinear magnetization. *J. Appl. Phys.* 103 (7), 07A304.
- 118.** Nikitin, M.P., Shipunova, V.O., Deyev, S.M., Nikitin, P.I., 2014. Biocomputing based on particle disassembly. *Nature nanotechnology* 9 (9), 716–722.
- 119.** Nikitin, M.P., Vetoshko, P.M., Brusentsov, N.A., Nikitin, P.I., 2009. Highly sensitive room-temperature method of non-invasive *in vivo* detection of magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 321 (10), 1658–1661.
- 120.** Nikitin, M.P., Zdobnova, T.A., Lukash, S.V., Stremovskiy, O.A., Deyev, S.M., 2010. Protein-assisted self-assembly of multifunctional nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (13), 5827–5832.
- 121.** Nikitin, P.I., Vetoshko, P.M., Ksenevich, T.I., 2007. New type of biosensor based on magnetic nanoparticle detection. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311 (1), 445–449.
- 122.** Orlov, A.V., Khodakova, J.A., Nikitin, M.P., Shepelyakovskaya, A.O., Brovko, F.A., Laman, A.G., Grishin, E.V., Nikitin, P.I., 2013. Magnetic immunoassay for detection of staphylococcal toxins in complex media. *Analytical chemistry* 85 (2), 1154–1163.
- 123.** Osterfeld, S.J., Yu, H., Gaster, R.S., Caramuta, S., Xu, L., Han, S.-J., Hall, D.A., Wilson, R.J., Sun, S., White, R.L., Davis, R.W., Pourmand, N., Wang, S.X., 2008. Multiplex protein assays based on real-time magnetic nanotag sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (52), 20637–20640.
- 124.** Oswald, P., Clement, O., Chambon, C., Schouman-Claeys, E., Frija, G., 1997. Liver positive enhancement after injection of superparamagnetic nanoparticles. Respective role of circulating and uptaken particles. *Magnetic Resonance Imaging* 15 (9), 1025–1031.
- 125.** Owens, D.E., Peppas, N.A., 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceutics* 307 (1), 93–102.

- 126.** Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M., 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (6), 1712–1720.
- 127.** Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K., Dobson, J., 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (13), R167-R181.
- 128.** Pei, R., Matamoros, E., Liu, M., Stefanovic, D., Stojanovic, M.N., 2010. Training a molecular automaton to play a game. *Nature nanotechnology* 5 (11), 773–777.
- 129.** Perez, J.M., Josephson, L., O'Loughlin, T., Högemann, D., Weissleder, R., 2002. Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions. *Nat. Biotechnol.* 20 (8), 816–820.
- 130.** Perez, J.M., Simeone, F.J., Saeki, Y., Josephson, L., Weissleder, R., 2003. Viral-induced self-assembly of magnetic nanoparticles allows the detection of viral particles in biological media. *Journal of the American Chemical Society* 125 (34), 10192–10193.
- 131.** Pischel, U., Andreasson, J., Gust, D., Pais, V.F., 2013. Information processing with molecules-- Quo vadis? *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 14 (1), 28–46.
- 132.** Plank, C., Anton, M., Rudolph, C., Rosenecker, J., Krötz, F., 2003. Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. *Expert Opin Biol Ther* 3 (5), 745–758.
- 133.** Plank, C., Rosenecker, J., 2009. Magnetofection: the use of magnetic nanoparticles for nucleic acid delivery. *Cold Spring Harbor protocols* 2009 (6), pdb.prot5230.
- 134.** Popovtzer, R., Agrawal, A., Kotov, N.A., Popovtzer, A., Balter, J., Carey, T.E., Kopelman, R., 2008. Targeted Gold Nanoparticles Enable Molecular CT Imaging of Cancer. *Nano Lett.* 8 (12), 4593–4596.
- 135.** Privman, V., Katz, E., 2015. Can bio-inspired information processing steps be realized as synthetic biochemical processes? *Phys. Status Solidi A* 212 (2), 219–228.
- 136.** Qian, L., Winfree, E., 2011. Scaling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades. *Science (New York, N.Y.)* 332 (6034), 1196–1201.
- 137.** Qian, L., Winfree, E., Bruck, J., 2011. Neural network computation with DNA strand displacement cascades. *Nature* 475 (7356), 368–372.
- 138.** Rad, A., Janic, B., Iskander, A.S., Soltanian-Zadeh, H., Arbab, A., 2007. Measurement of quantity of iron in magnetically labeled cells. Comparison among different UV/VIS spectrometric methods. *Biotech.* 43 (5), 627–636.
- 139.** Ray, D., Ahsan, A., Helman, A., Chen, G., Hegde, A., Gurjar, S.R., Zhao, L., Kiyokawa, H., Beer, D.G., Lawrence, T.S., Nyati, M.K., 2011. Regulation of EGFR Protein Stability by the HECT-type Ubiquitin Ligase SMURF2. *Neoplasia* 13 (7), 570–IN1.
- 140.** Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., Nann, T., 2008. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods* 5 (9), 763–775.
- 141.** Rodriguez, P.L., Harada, T., Christian, D.A., Pantano, D.A., Tsai, R.K., Discher, D.E., 2013. Minimal "Self" Peptides That Inhibit Phagocytic Clearance and Enhance Delivery of Nanoparticles. *Science* 339 (6122), 971–975.
- 142.** Rosman, C., Pierrat, S., Henkel, A., Tarantola, M., Schneider, D., Sunnick, E., Janshoff, A., Sönnichsen, C., 2012. A new approach to assess gold nanoparticle uptake by mammalian cells: combining optical dark-field and transmission electron microscopy. *Small* 8 (23), 3683–3690.
- 143.** Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., Sharpless, K.B., 2002. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 41 (14), 2596–2599.

- 144.** Rouse, J.G., Yang, J., Barron, A.R., Monteiro-Riviere, N.A., 2006. Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol In Vitro* 20 (8), 1313–1320.
- 145.** Rudchenko, M., Taylor, S., Pallavi, P., Dechkovskaia, A., Khan, S., Butler, V.P., JR, Rudchenko, S., Stojanovic, M.N., 2013. Autonomous molecular cascades for evaluation of cell surfaces. *Nature nanotechnology* 8 (8), 580–586.
- 146.** Sahoo, S.K., Ma, W., Labhasetwar, V., 2004. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 112 (2), 335–340.
- 147.** Sainz, V., Coniot, J., Matos, A.I., Peres, C., Zupancic, E., Moura, L., Silva, L.C., Florindo, H.F., Gaspar, R.S., 2015. Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochemical and biophysical research communications* 468 (3), 504–510.
- 148.** Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A.K.-Y., Schulten, K., Baneyx, F., 2003. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nature materials* 2 (9), 577–585.
- 149.** Schlessinger, J., Ullrich, A., 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9 (3), 383–391.
- 150.** Schweiger, C., Hartmann, R., Zhang, F., Parak, W.J., Kissel, T.H., Rivera Gil, P., 2012. Quantification of the internalization patterns of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with opposite charge. *J Nanobiotechnology* 10, 28.
- 151.** Scott, A.M., Wolchok, J.D., Old, L.J., 2012. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12 (4), 278–287.
- 152.** Seifriz, W., 1924. An Elastic Value of Protoplasm, with Further Observations on the Viscosity of Protoplasm. *The Journal of Experimental Biology* 11 (1), 1–11.
- 153.** Seker, U.O.S., Demir, H.V., 2011. Material binding peptides for nanotechnology. *Molecules (Basel, Switzerland)* 16 (2), 1426–1451.
- 154.** Sengupta, A., Thai, C.K., Sastry, M.S.R., Matthaei, J.F., Schwartz, D.T., Davis, E.J., Baneyx, F., 2008. A genetic approach for controlling the binding and orientation of proteins on nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 24 (5), 2000–2008.
- 155.** Serebrovskaya, E.O., Edelweiss, E.F., Stremovskiy, O.A., Lukyanov, K.A., Chudakov, D.M., Deyev, S.M., 2009. Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (23), 9221–9225.
- 156.** Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., Tsien, R.Y., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology* 22 (12), 1567–1572.
- 157.** Shepard, H.M., Lewis, G.D., Sarup, J.C., Fendly, B.M., Maneval, D., Mordenti, J., Figari, I., Kotts, C.E., Palladino, M.A., Ullrich, A., Slamon, D., 1991. Monoclonal antibody therapy of human cancer: Taking the HER2 protooncogene to the clinic. *J Clin Immunol* 11 (3), 117–127.
- 158.** Shipunova, V.O., Nikitin, M.P., Nikitin, P.I., Deyev, S.M., 2016. MPQ-cytometry: a magnetism-based method for quantification of nanoparticle-cell interactions. *Nanoscale* 8 (25), 12764–12772.
- 159.** Silindir, M., Erdoğan, S., Özer, A.Y., Maia, S., 2012. Liposomes and their applications in molecular imaging. *J Drug Target* 20 (5), 401–415.
- 160.** Silva, A.P. de, Uchiyama, S., 2007. Molecular logic and computing. *Nature nanotechnology* 2 (7), 399–410.

- 161.** Smith, R.A., Giorgio, T.D., 2009. Quantitative measurement of multifunctional quantum dot binding to cellular targets using flow cytometry. *Cytometry A* 75 (5), 465–474.
- 162.** Sniadecki, N.J., Anguelouch, A., Yang, M.T., Lamb, C.M., Liu, Z., Kirschner, S.B., Liu, Y., Reich, D.H., Chen, C.S., 2007. Magnetic microposts as an approach to apply forces to living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (37), 14553–14558.
- 163.** Soltesz, E.G., Kim, S., Laurence, R.G., DeGrand, A.M., Parungo, C.P., Dor, D.M., Cohn, L.H., Bawendi, M.G., Frangioni, J.V., Mihaljevic, T., 2005. Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots. *Ann. Thorac. Surg.* 79 (1), 269-77; discussion 269-77.
- 164.** Song, N., Yang, Y.-W., 2015. Molecular and supramolecular switches on mesoporous silica nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 44 (11), 3474–3504.
- 165.** Sreenivasan, V.K.A., Ivukina, E.A., Deng, W., Kelf, T.A., Zdobnova, T.A., Lukash, S.V., Veryugin, B.V., Stremovskiy, O.A., Zvyagin, A.V., Deyev, S.M., 2011. Barstar. Barnase — a versatile platform for colloidal diamond bioconjugation. *J. Mater. Chem.* 21 (1), 65–68.
- 166.** Srinivasan, B., Huang, X., 2008. Functionalization of magnetic nanoparticles with organic molecules: loading level determination and evaluation of linker length effect on immobilization. *Chirality* 20 (3-4), 265–277.
- 167.** Sriram, M.I., Kanth, S.B.M., Kalishwaralal, K., Gurunathan, S., 2010. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *Int J Nanomedicine* 5, 753–762.
- 168.** Stojanovic, M.N., Stefanovic, D., 2003. A deoxyribozyme-based molecular automaton. *Nature biotechnology* 21 (9), 1069–1074.
- 169.** Stojanovic, M.N., Stefanovic, D., Rudchenko, S., 2014. Exercises in molecular computing. *Accounts of chemical research* 47 (6), 1845–1852.
- 170.** Ström, V., Hultenby, K., Grüttner, C., Teller, J., Xu, B., Holgersson, J., 2004. A novel and rapid method for quantification of magnetic nanoparticle–cell interactions using a desktop susceptometer. *Nanotechnology* 15 (5), 457–466.
- 171.** Sunna, A., Chi, F., Bergquist, P.L., 2013. A linker peptide with high affinity towards silica-containing materials. *New biotechnology* 30 (5), 485–492.
- 172.** Takeuchi, H., Yamamoto, H., Kawashima, Y., 2001. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 47 (1), 39–54.
- 173.** Tan, W., Wang, K., He, X., Zhao, X.J., Drake, T., Wang, L., Bagwe, R.P., 2004. Bionanotechnology based on silica nanoparticles. *Med Res Rev* 24 (5), 621–638.
- 174.** Tao, L., Hu, W., Liu, Y., Huang, G., Sumer, B.D., Gao, J., 2011. Shape-specific polymeric nanomedicine: emerging opportunities and challenges. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 236 (1), 20–29.
- 175.** Tarahovsky, Y.S., 2009. Cell transfection by DNA-lipid complexes — Lipoplexes. *Biochemistry Moscow* 74 (12), 1293–1304.
- 176.** Thanh, N.T., Green, L.A., 2010. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today* 5 (3), 213–230.
- 177.** Tibbe, A.G., Grooth, B.G. de, Greve, J., Liberti, P.A., Dolan, G.J., Terstappen, L.W., 1999. Optical tracking and detection of immunomagnetically selected and aligned cells. *Nat. Biotechnol.* 17 (12), 1210–1213.
- 178.** Tietze, R., Lyer, S., Durr, S., Struffert, T., Engelhorn, T., Schwarz, M., Eckert, E., Goen, T., Vasylyev, S., Peukert, W., Wiekhorst, F., Trahms, L., Dorfler, A., Alexiou, C., 2013. Efficient drug-

delivery using magnetic nanoparticles--biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 9 (7), 961–971.

179. Torchilin, V.P., 2006. Multifunctional nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews* 58 (14), 1532–1555.

180. Torchilin, V.P., 2006. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annual review of biomedical engineering* 8, 343–375.

181. Torchilin, V.P., 2008. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews* 60 (4-5), 548–558.

182. Tornøe, C.W., Christensen, C., Meldal, M., 2002. Peptidotriazoles on solid phase: 1,2,3-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of organic chemistry* 67 (9), 3057–3064.

183. Treuel, L., Brandholt, S., Maffre, P., Wiegele, S., Shang, L., Nienhaus, G.U., 2014. Impact of protein modification on the protein corona on nanoparticles and nanoparticle-cell interactions. *ACS Nano* 8 (1), 503–513.

184. Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J., 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55.

185. Ulbrich, K., Hekmatara, T., Herbert, E., Kreuter, J., 2009. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 71 (2), 251–256.

186. Unger, R., Moul, J., 2006. Towards computing with proteins. *Proteins* 63 (1), 53–64.

187. Vitol, E.A., Novosad, V., Rozhkova, E.A., 2012. Microfabricated magnetic structures for future medicine: from sensors to cell actuators. *Nanomedicine (Lond)* 7 (10), 1611–1624.

188. Wais, U., Jackson, A.W., He, T., Zhang, H., 2016. Nanoformulation and encapsulation approaches for poorly water-soluble drug nanoparticles. *Nanoscale* 8 (4), 1746–1769.

189. Wang, J., Yu, X., Boriskina, S.V., Reinhard, B.M., 2012. Quantification of differential ErbB1 and ErbB2 cell surface expression and spatial nanoclustering through plasmon coupling. *Nano Lett.* 12 (6), 3231–3237.

190. Wilhelm, C., Gazeau, F., Bacri, J.-C., 2002. Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically labeled cells. *Eur. Biophys. J.* 31 (2), 118–125.

191. Wilhelm, C., Gazeau, F., 2008. Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 29 (22), 3161–3174.

192. Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K.N., Treadway, J.A., Larson, J.P., Ge, N., Peale, F., Bruchez, M.P., 2003. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature biotechnology* 21 (1), 41–46.

193. Xin, H., Sha, X., Jiang, X., Zhang, W., Chen, L., Fang, X., 2012. Anti-glioblastoma efficacy and safety of paclitaxel-loading Angiopep-conjugated dual targeting PEG-PCL nanoparticles. *Biomaterials* 33 (32), 8167–8176.

194. Xu, Z., Shen, G., Xia, X., Zhao, X., Zhang, P., Wu, H., Guo, Q., Qian, Z., Wei, Y., Liang, S., 2011. Comparisons of three polyethyleneimine-derived nanoparticles as a gene therapy delivery system for renal cell carcinoma. *Journal of translational medicine* 9, 46.

195. Yang, J., Zhang, Y., Gautam, S., Liu, L., Dey, J., Chen, W., Mason, R.P., Serrano, C.A., Schug, K.A., Tang, L., 2009. Development of aliphatic biodegradable photoluminescent polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (25), 10086–10091.

- 196.** You, M., Peng, L., Shao, N., Zhang, L., Qiu, L., Cui, C., Tan, W., 2014. DNA "nano-claw": logic-based autonomous cancer targeting and therapy. *Journal of the American Chemical Society* 136 (4), 1256–1259.
- 197.** Yu, D., Hung, M.-C., 2000. Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 19 (53), 6115–6121.
- 198.** Zdobnova, T.A., Stremovskiy, O.A., Lebedenko, E.N., Deyev, S.M., 2012. Self-assembling complexes of quantum dots and scFv antibodies for cancer cell targeting and imaging. *PloS one* 7 (10), e48248.
- 199.** Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., Gurunathan, S., 2016. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International journal of molecular sciences* 17 (9).
- 200.** Zhao, M., Josephson, L., Tang, Y., Weissleder, R., 2003. *Angew. Chem.* 115 (12), 1413–1416.
- 201.** Zhao, X., Tapscott, R., Wang, K., Tan, W., 2003. Collection of Trace Amounts of DNA/mRNA Molecules Using Genomagnetic Nanocaptors. *Anal. Chem.* 75 (14), 3476–3483.
- 202.** Zigeuner, R.E., Riesenberger R., Pohla, H., Hofstetter, A., Oberneder, R., 2003. Isolation of Circulating Cancer Cells From Whole Blood By Immunomagnetic Cell Enrichment and Unenriched Immunocytochemistry *In Vitro*. *The Journal of Urology* 169 (2), 701–705.
- 203.** Деев, С., Лебедеенко, Е., 2009. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения. *Acta Naturae* 1, 32–50.

Приложение 1

Булевой алгеброй называется непустое множество A с двумя бинарными операциями \wedge (аналог конъюнкции), \vee (аналог дизъюнкции), одной унарной операцией \neg (аналог отрицания) и двумя выделенными элементами: 0 (или Ложь) и 1 (или Истина) такими, что для всех a, b и c из множества A верны следующие аксиомы:

$a \vee (b \wedge c) = (a \vee b) \wedge c$	$a \wedge (b \vee c) = (a \wedge b) \vee c$	ассоциативность
$a \vee b = b \vee a$	$a \wedge b = b \wedge a$	коммутативность
$a \vee (a \wedge b) = a$	$a \wedge (a \vee b) = a$	законы поглощения
$a \vee (b \wedge c) = (a \vee b) \wedge (a \vee c)$	$a \wedge (b \vee c) = (a \wedge b) \vee (a \wedge c)$	дистрибутивность
$a \vee \neg a = 1$	$a \wedge \neg a = 0$	дополнительность

Самая простая нетривиальная булева алгебра содержит всего два элемента, 0 и 1, а действия в ней определяются таблицами:

\wedge	0	1	\vee	0	1	a	0	1
0	0	0	0	0	1	$\neg a$	1	0
1	0	1	1	1	1			

Унарной операцией на множестве A называется отображение множества в себя $A \rightarrow A$, которое каждому элементу множества A , называемому операндом, ставит в соответствие некоторый элемент того же множества, называемый результатом.

Бинарной операцией называется математическая операция, принимающая два операнда и возвращающая один результат.

Таблица истинности – таблица, описывающая значение логической функции в зависимости от значений операндов.

Ниже приведены таблицы истинности для реализованных в работе: унарной операции НЕТ (также отрицание, инверсия); унарной операции ДА (также повторение, буфер) и одной бинарной операции ДА (X) И НЕТ (Y) (также запрет по второму входному сигналу, отрицание импликации):

X	ДА (X)	X	НЕТ (X)	X	Y	ДА (X) И НЕТ (Y)
0	0	0	1	0	0	0
1	1	1	0	0	1	0
				1	0	1
				1	1	0

X	ДА (X)	X	НЕТ (X)	X	Y	ДА (X) И НЕТ (Y)
Л	Л	Л	И	Л	Л	Л
И	И	И	Л	Л	И	Л
				И	Л	И
				И	И	Л

Дизъюнктивная нормальная форма (ДНФ) в булевой логике — нормальная форма, в которой булева формула имеет вид дизъюнкции конъюнкций литералов. Любая булева формула может быть приведена к ДНФ.

Литерал – логическая переменная или её отрицание (но не 0 или 1).

Система булевых функций называется **функционально полной**, если можно построить их суперпозицию, тождественную любой заранее заданной функции. Иначе говоря, произвольная булева функция может быть записана в виде формулы через функции этой системы.