

ПРОТОТИПЫ «ЛОВУШЕК» ВИРУСА SARS-COV-2 НА ОСНОВЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ

Шульмейстер Г. А.¹, Чебуркин Ю. В.¹, Чекменева Ю. Д.²,
Едемская Е. В.², Бондаренко А.Б.^{1,5}, Постнов В. Н.^{1,3},
Королев Д. В.^{1,4}

Контактная информация:

Едемская Елена Владимировна,
СПбГЭТУ «ЛЭТИ»,
ул. Профессора Попова, д. 5, лит. Ф,
Санкт-Петербург, Россия, 197022.
E-mail: evedemskaya@stud.etu.ru

Статья поступила в редакцию 11.12.2023
и принята к печати 24.03.2024.

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»
имени В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени академика
И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный педиатрический медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Актуальность. Несмотря на продолжающиеся мутации вируса SARS-CoV-2, возбудителя заболевания COVID-19, его механизм проникновения в клетку остается неизменным, что можно использовать для создания «ловушек» вируса. Лекарственные препараты с внутривенным введением усугубляют симптомы заболевания. Альтернативными средствами борьбы с вирусом могут стать энтеросорбенты, синтезированные на наноразмерных носителях, перехватывающие SARS-CoV-2 непосредственно в месте его внедрения в организм, а именно в органах желудочно-кишечного тракта. **Цель.** Изучение и отработка методов синтеза различных видов спейсера на поверхности наночастиц аэросила, иммобилизация модельного белка с возможностью использования соединений в качестве энтеросорбента вируса SARS-CoV-2. **Материалы и методы.** В качестве наночастиц-носителей использовался аэросил марки А-200. Химический состав полученных соединений изучался с помощью ИК-Фурье спектроскопии. Спектры поглощения образцов исследовались спектрофотометрически. Размеры нанобъектов определялись методом динамического рассеяния света. Общее содержание аминокислот определялось титриметрическим способом и по емкости флуоресцентного красителя — индоцианина зеленого, количество меркаптогрупп определялось аргентометрией и с помощью метода Кункеля, Баркли и Горина. Проведено качественное

и количественное определение хемосорбции белка на синтезированных частицах. **Полученные результаты.** Разработаны прототипы энтеросорбентов вируса SARS-CoV-2 на частицах аэросила. Синтезированы аминок-, меркапто- и тозилый спейсеры, способные связываться с разными функциональными группами белков, изучены физико-химические свойства модифицированных наночастиц. Эффективность спейсеров проверена на модельном белке — альбумине. **Заключение.** Дальнейшие исследования могут быть направлены на разработку перорального препарата, уменьшающего вирусную нагрузку SARS-CoV-2 на органы желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: белки-«ловушки», иммобилизация белка, синтез спейсера, энтеросорбент, SARS-CoV-2.

Для цитирования: Шульмейстер Г.А., Чебуркин Ю.В., Чекменева Ю.Д. и др. Прототипы «ловушек» вируса SARS-CoV-2 на основе энтеросорбентов. Трансляционная медицина. 2024; 11(1): 28-44. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-28-44. EDN: AQPOQR

PROTOTYPES OF SARS-COV-2 VIRUS “TRAPS” BASED ON ENTEROSORBENTS

Galina A. Shulmeyster¹, Yuri V. Cheburkin¹, Yulia D. Chekmeneva²,
Elena V. Edemskaya², Andrey B. Bondarenko^{1,5},
Viktor N. Postnov^{1,3}, Dmitry V. Korolev^{1,4}

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”, Saint Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

⁴ Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

⁵ Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Elena V. Edemskaya,
Saint Petersburg Electrotechnical University
“LETI”,
Professor Popov str., 5-F, Saint Petersburg,
Russia, 197022.
E-mail: evedemskaya@stud.etu.ru

*Received 11 December 2023; accepted
24 March 2024.*

Abstract

Background. Despite the ongoing mutations of the SARS-CoV-2 virus, the causative agent of the COVID-19 disease, its mechanism of entry into the cell remains unchanged, which can be used to create virus “traps”. Intravenous medications aggravate the symptoms of the disease. An alternative means of combating the virus could be enterosorbents synthesized on nanosized carriers that intercept SARS-CoV-2 directly at the site of its introduction into the body, namely in the gastrointestinal tract. **Objective.** To study and refine the methods of synthesis of different spacer types on the surface of aerosil nanoparticles, immobilization of model protein with the possibility of using the compounds as enterosorbents of SARS-CoV-2 virus. **Design and method.** Aerosil A-200 grade was used as carrier nanoparticles. The chemical composition of the obtained compounds was studied by FTIR spectroscopy. The absorption spectra of the samples were studied using a spectrophotometer. The dimensions of nano-objects were determined by dynamic light scattering. Qualitative and quantitative determination of protein chemisorption on the synthesized particles was carried out. **Results.** Prototypes of SARS-CoV-2 enterosorbents on aerosil particles were developed. The efficacy of the spacers was tested on the model protein, albumin. **Conclusion.** Further research may be directed to the development of an oral drug that reduces the viral load of SARS-CoV-2.

Key words: enterosorbents, protein immobilization, SARS-CoV-2, spacer synthesis, trap proteins.

For citation: Shulmeyster GA, Cheburkin YuV, Chekmeneva YuD, et al. Prototypes of SARS-CoV-2 virus "traps" based on enterosorbents. Translational Medicine. 2024; 11(1): 28-44. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-1-28-44. EDN: AQPQQR

Список сокращений: АПТЭС — (3-аминопропил)триэтоксисилан, НЧК (SiNP) — наночастицы кремнезема, ACE2 — Angiotensin-converting enzyme 2/ангиотензинпревращающий фермент-2, COVID-19 — Coronavirus Disease 2019/заболевание, вызванное коронавирусом, DPP4 — дипептидилпептидаза-4, SARS-CoV-2 — Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2/тяжелый острый респираторный синдром, связанный с коронавирусом, TMPRSS2 — Transmembrane protease, serine 2/мембраносвязанная сериновая протеаза, продукт гена TMPRSS2.

Введение

Причиной развития инфекции COVID-19 является вирус SARS-CoV-2 из рода бетакоронавирусов, относящегося к семейству коронавирусов. SARS-CoV-2, как и родственные ему SARS-CoV и MERS-CoV, способен вызывать тяжелое заболевание, сопровождающееся дыхательной недостаточностью и атипичной формой респираторного дистресс-синдрома у взрослых, тогда как другие бетакоронавирусы — HKU1, NL63, OC43 и 229E — связаны с легким течением респираторной инфекции [1]. Для проникновения в клетку-мишень вирус SARS-CoV-2 связывается с экстрацеллюлярными доменами клеточных рецепторов, например, ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент-2, АПФ-2) и DPP4 (дипептидилпептидаза-4, CD26), расположенных на поверхностных мембранах альвеолярного эпителия легких, а также клеток других органов, включая сердце, почки и тонкую кишку. Фермент ACE2 важен для регуляции уровня ангиотензина-II, связанного с контролем артериального давления. Белок DPP4 участвует в некоторых важных физиологических процессах, например, в регуляции метаболизма глюкозы, в апоптозе и в клеточных сигнальных каскадах [2, 3].

Другим важным участником процесса внедрения вируса в клетку являются внеклеточные протеазы: TMPRSS2 и FURIN (фурин). TMPRSS2 и фурин — трансмембранные сериновые протеазы, экспрессирующиеся во многих тканях и органах и участвующие в протеолизе различных белков, в том числе и вирусных. Оба этих фермента способны активировать гликопротеин-S «шипа»

вируса SARS-CoV-2 путем протеолитического расщепления, что позволяет вирусу связаться с поверхностным рецептором ACE2 и проникнуть внутрь клетки-мишени [4, 5].

Из данных литературы известно, что ACE2 является пептидазой, способной расщеплять несколько пептидов ренин-ангиотензиновой системы, а также другие субстраты. ACE2 почти не присутствует в свободном кровотоке, зато широко представлен в органах, например, почках, желудочно-кишечном тракте, а также легких, хотя и с невысоким уровнем экспрессии [6, 7].

Экстрацеллюлярный домен ACE2 ранее был идентифицирован как рецептор для S-белка «шипа» SARS-CoV [8], а в 2019 г. и для SARS-CoV-2 [9]. Новый коронавирус эволюционно связан с коронавирусом летучих мышей, который также использует мембраносвязанный ACE2 в качестве рецептора [10]. Растворимая форма ACE2 не имеет связи с мембраной и в небольших количествах циркулирует в крови [11]. Было сделано предположение, что свободную форму внеклеточной части ACE2 можно использовать в качестве конкурентного перехватчика некоторых эволюционно близких коронавирусов, предотвращая связывание вирусной частицы с поверхностно-связанным полноценным рецепторным белком ACE2 [12, 13].

Проведенные исследования *in vitro* показали, что репликация SARS-CoV-2 блокируется растворимой формой ACE2 в клеточной линии почек обезьяны Vero-E6 [14, 15]. Более того, сообщалось, что химерный ACE2, несущий молекулу с Fc-частью иммуноглобулина, нейтрализует SARS-CoV-2 *in vitro* [16], а SARS-CoV-2 способен связываться с ACE2 с высокой аффинностью [17, 18].

Другим, не менее интересным белком из ряда потенциальных «ворот» для входа вируса SARS-CoV-2 в клетку является рецептор DPP4 (дипептидилпептидаза-4, или CD26), который ранее был идентифицирован как «ворота» для коронавирусов других типов [3]. При сравнении структуры гликозилирования гликопротеинов SARS-CoV-2 и SARS-CoV (патоген Ближневосточного респираторного синдрома (MERS)) было установлено, что у этих двух вирусных штаммов существует ряд подобных консервативных сайтов гликозилиро-

вания, что предполагает схожую тропность к одной и той же мишени. Однако у вируса COVID-19 имеется несколько уникальных сайтов гликозилирования по сравнению с гликопротеином «шипа» SARS-CoV [19]. Не исключено, что подобные различия в гликановом маскирующем паттерне белков «шипа» обоих вирусов могут определять разницу в иммунном ответе хозяина, а их сходство — в способности проникать в клетку, используя одни и те же рецепторные «входные ворота» [20]. Известно, что рецептор CD26 (DPP4) клетки-хозяина действует как ключевой иммунорегляторный фактор при вирусных инфекциях [21].

Потенциальные молекулярные взаимодействия между спайковым белком вируса SARS-CoV-2 и человеческим DPP4 были изучены на вычислительной модели с использованием серверов Cluspro protein docking (www.cluspro.bu.edu) и Frodock (frodock.chaconlab.org), а затем валидированы в трехмерной модели структур этих белков. Комплексная модель S-гликопротеина SARS-CoV-2 и DPP4 показала большую зону взаимодействия между обоими белками, что подразумевает возможный тесный контакт между петлями домена S1 в моделируемой структуре и поверхностью DPP4. Исследования связывания DPP4 показали, что некоторые аминокислотные остатки контактируют с белком «шипа» вируса Bat-CoV (возбудителя MERS). Можно предположить, что SARS-CoV-2 может иметь общие способы заражения с SARS-CoV (возбудитель TORS) и MERS-CoV (возбудитель MERS) [19, 22, 23].

Представленные выше литературные данные определили наш выбор в качестве основных ловушек для перехвата вируса SARS-CoV-2 рецепторных доменов белков ACE2 и DPP4, которые взаимодействуют с N-концевыми доменами S-гликопротеина «шипа», что в первую очередь и обеспечивает перенос коронавируса внутрь клетки-мишени. Однако для связывания с экстрацеллюлярными доменами ACE2 или DPP4 недостаточно обыкновенной ко-локализации белков вируса и рецептора. По аналогии с уже хорошо изученными вирусами гриппа белок «шипа» коронавируса должен быть праймирован (далее: активирован) ферментами клетки-мишени [24].

Хотя SARS-CoV-2 очень похож по структуре и патогенности на близкородственный ему SARS-CoV, однако самые важные структурные белки, S-гликопротеины «шипа», у этих вирусов различаются [1]. Присутствие фуриноподобного сайта расщепления (детерминанты вирулентности, называемой polybasic cleavage site) в SARS-CoV-2 облегчает активацию S-белка и может повысить эффективность распространения SARS-CoV-2

по сравнению с другими бета-коронавирусами [25]. Этот сайт распознавания (S1/S2) — консервативный участок белка, расположенный между S1 и S2 субъединицами белка «шипа» коронавируса и состоящий всего из 4–7 аминокислот (SPRRAR↓S) [26]. Функциональная роль: место расщепления вирусного белка протеазами — фурином (FURIN) и TMPRSS2, с последующей его активацией [27, 28]. Эксперименты с SARS-CoV показали, что расщепление фурином на стыке S1/S2 усиливает межклеточные взаимоотношения, не влияя на проникновение вируса [29].

Попытки использовать рекомбинантный ACE2 для перехвата вируса были начаты сразу, как только стало известно о его аффинности к S-гликопротеину вируса [12, 16, 30]. В связи с тем, что вирус показал способность эффективно ускользать от нейтрализующих антител с помощью быстрого накопления мутаций S-гликопротеина, использование рекомбинантного растворимого ACE2 в качестве перехватывающей ловушки вызвало пристальный интерес многих научных групп [31–33]. Однако в результате проведенного в 2021 г. международного мультицентрового рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования II фазы по изучению эффективности и безопасности человеческого рекомбинантного растворимого ACE2 для лечения больных с COVID-19 было обнаружено повышение показателей системного воздействия препарата на организм, что проявлялось стойким снижением уровня ангиотензина-II и повышением ангиотензина(1–7) и ангиотензина(1–5), а также высоким уровнем побочных явлений. Смертность в группе исследуемого препарата и вовсе оказалась выше, чем в группе плацебо [34].

Учитывая изложенные выше сложности, с которыми столкнулись исследователи влияния рекомбинантного ACE2 на организм больного, нами было принято решение уйти от разработки рекомбинантной «ловушки» для внутривенного введения и использовать схему перехвата SARS-CoV-2 непосредственно в месте внедрения вируса, а именно в просвете кишечника.

Целью являлась отработка метода синтеза различных видов спейсера на поверхности наночастиц аэросила и иммобилизация модельного белка с перспективой использования в качестве энтеросорбента SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Исходные наночастицы

В качестве исходных наночастиц использовался аэросил марки А-200 (НЧК, SiNP) производства фирмы Degussa, Германия.

Был выбран именно аэросил, потому что во многих странах он разрешен как самостоятельный энтеросорбент.

Синтез спейсера, заканчивающегося аминогруппой

В грушевидную колбу емкостью 50 мл помещали навеску 1 г аэросила А-200, заливали 23,75 мл сухого бензола и 1,25 мл модификатора — (3-аминопропил)триэтоксисилана (АПТЭС, APTES, Sigma-Aldrich, США).

Реактор помещали в термостатируемую ячейку, подключенную к циркуляционному термостату (LT-105a, Loip, Санкт-Петербург, РФ), и оставляли кипятиться с обратным холодильником в течение 2 ч. при температуре кипения бензола.

Синтез спейсера, заканчивающегося меркаптогруппой

Синтез спейсера заканчивающегося меркаптогруппой, проводили аналогично аминоспейсеру. В качестве модификатора использовался 3-меркаптопропилтриметоксисилан (МПМС, MPMS, Sigma-Aldrich, США), в качестве растворителя — бензол либо о-ксилон, а реакционная смесь барбатировалась инертным газом аргоном.

Синтез спейсера, заканчивающегося тозильной группой

Синтез спейсера, заканчивающегося тозильной группой, проводился в три этапа.

На первом этапе 1 г аэросила помещался в круглодонную трехгорлую колбу, заливались 24 мл сухого бензола и добавлялся 1 мл 3-хлорпропилтрихлорсилана (ХПХС, CPCS, Sigma-Aldrich, США). Смесь кипятилась с обратным холодильником в течение 2 ч. при подаче инертного газа аргона с использованием колбонагревателя DZTW 100MI (Китай). В третий отвод колбы вставляли термометр. Затем смесь промывалась пятикратно циклогексаном, замораживалась и лиофилизировалась при помощи лиофильной сушилки VaCo-2 (ZirBus, Германия).

На втором этапе полученный лиофилизат подвергался гидролизу в псевдокипящем слое в токе азота парами воды.

На третьем этапе полученный продукт помещался в круглодонную трехгорлую колбу, заливался раствором 1 г пара-толуолсульфонилхлорида (p-Toluenesulfonyl chloride, Sigma-Aldrich, США) в 14 мл дихлорметана. Смесь кипятилась с обратным холодильником в течение 2 ч. при подаче инертного газа аргона с использованием колбонагревателя DZTW 100MI (Китай). В третий отвод

колбы вставляли термометр. Затем смесь промывалась пятикратно циклогексаном, замораживалась и лиофилизировалась при помощи лиофильной сушилки VaCo-2 (ZirBus, Германия).

Физико-химические свойства

ИК-спектр был снят на приборе Shimadzu FTIR-8400S (Shimadzu, Япония) с использованием следующих параметров: аподизация — Happ-Genzel, число сканирований — 45, разрешение — $4,0\text{ см}^{-1}$. Спектры получали в диапазоне волновых чисел от 7500 до 300 см^{-1} , проба готовилась с сухим КВг. При анализе спектров выбирался наиболее информативный участок.

Спектры поглощения образцов исследовались на двухлучевом спектрофотометре Unico 2802S (Unico Sys, США).

Размеры нанообъектов определялись методом динамического рассеяния света (DLS) на приборе Zeta Sizer Ultra (Malvern, США).

Определение емкости спейсеров

Общее содержание аминогрупп в образце определяли титрометрическим способом. К полученным частицам приливали 1 мл 0,1 н соляной кислоты и оставляли на 15 мин. для взаимодействия с аминогруппами на их поверхности, периодически встряхивая. Затем полученная суспензия центрифугировалась в течение 5 мин. на скорости 3000 мин^{-1} для отделения надосадочной жидкости, которую далее титровали щелочью (0,1 н NaOH) с кислотно-основным индикатором метилоранжем 0,1 мг/мл. По количеству этой щелочи рассчитывалось конечное содержание аминогрупп.

Общее содержание аминогрупп не дает информации о том, сколько действующего вещества можно сорбировать на модифицированную аминоспейсерами поверхность, поэтому проводилось определение количества доступных аминогрупп по емкости флуоресцентного красителя — индоцианина зеленого (ИЦЗ). Для этого к 50 мг аэросила, покрытого оболочкой с аминоспейсером, приливали 4 мл раствора ИЦЗ, концентрацией 1 мг/мл. Для сорбции суспензию оставляли на 1 ч. на орбитальном шейкере LS-220 (ЛОИП, РФ) с частотой вращения 300 мин^{-1} . Затем пятикратно промывали от излишков ИЦЗ центрифугированием.

Для определения иммобилизованного индоцианина проводили десорбцию, залив 10 мл 0,1 н раствора NaOH к промытому осадку и оставив на 15 мин. на шейкере. После чего центрифугированием осаждали частицы, а для анализа с по-

мощью спектрофотометра брали надосадочную жидкость, которую разбавляли, чтобы максимум относительной оптической плотности был не более 1 на длине волны 700 нм [35].

Определение общего количества меркапто-групп определялось аргентометрией (вариант косвенного титрования). В 15 мл воды растворяли исследуемое вещество. Добавляли 1 мл 0,04 % (0,4 мг/мл) бромтимолового синего и перемешивали. Затем заливали 5 мл 0,1М нитрата серебра, перемешивали. Далее начинали титрование 0,1М раствором гидроксида натрия, разбавленным в 10 раз для удобства, от желтого цвета надосадочного раствора до достижения не исчезающего зеленого (pH = 7). Один мл 0,1М раствора натрия гидроксида соответствует 11,42 мг препарата [36].

Для определения количества доступных для хемосорбции меркаптогрупп на поверхности аэросила использовался метод Кункеля, Бакли и Горина. Готовили дитизонат серебра. В мерную колбу на 100 мл засыпали 0,01 г дитизона и заливали четыреххлористый углерод. По возможности растворяли краситель и получали раствор темно-зеленого цвета, при этом водный раствор дитизона ярко-розового оттенка [37]. Далее, растворив в 50 мл воды 0,5 г нитрата серебра, в коническую колбу на 250 мл поместили эти два раствора, при смешивании ничего не происходило, поскольку это две несмешивающиеся жидкости. Затем добавляли 2,5 мл 5М H_2SO_4 и интенсивно перемешивали 5–10 мин., получали слой красно-оранжевой маслянистой жидкости внизу и воду сверху, а на границе раздела сред скапливались нерастворенные и непрореагировавшие вещества. Далее с помощью делительной воронки промывали водой дитизонат серебра: сливали тяжелую красно-оранжевую жидкость (дитизонат серебра), удаляли остатки, заливали чистую воду к дитизонату серебра и повторяли так 3 раза. Получившийся дитизонат серебра, объемом менее 100 мл, хранили в холодильнике. Для проведения измерений получившийся дитизонат серебра разбавляли в 5 раз, получая его максимум показателя оптической плотности относительно CCl_4 близким к единице на спектрофотометре с кварцевыми кюветами при nm [38].

Иммобилизация белка

Иммобилизация модельного белка альбумина проводилась следующим образом. В конические пробирки, емкостью 15 мл, помещали 50 мг модифицированных НЧК и добавляли 1 мл водного раствора альбумина определенной концентрации. После чего образцы перемешивались с помощью

орбитального шейкера с частотой 300 мин.⁻¹ на протяжении 2 ч. при комнатной температуре. Затем растворы промывали дистиллированной водой с помощью центрифугирования. Надосадочная жидкость каждого образца после первой процедуры промывки анализировалась спектрофотометрическим методом на содержание альбумина.

Качественное и количественное определение белка

Для качественного определения хемосорбированного альбумина брали 20 мг модифицированных НЧК, в полипропиленовой пробирке емкостью 15 мл смешивали с 2 мл 2%-ного водного раствора альбумина. Пробирку оставляли на 30 мин. на орбитальном шейкере LS 220 при частоте вращения 300 мин.⁻¹. Затем проводили трехкратную промывку по следующей схеме. Центрифугировали на скорости 2000 мин.⁻¹ в течение 2 мин. Супернатант сливали, а полученный осадок снова разбавляли водой до 6 мл. Для проведения нингидринового теста небольшое количество осадка смешивали с 2%-ным раствором нингидрина в ацетоне и нагревали на водяной бане в течение 10 мин. О наличии сорбированного белка судили по изменению цвета раствора с прозрачного на синий [39].

Определение содержания белка альбумина в процессе работы проводилось с помощью красителя бромкрезолового зеленого (БКЗ) [40]. Изначально предполагалось, что в пробе не находилось веществ, которые могли бы помешать анализу [41].

Для приготовления цитрата натрия в колбу на 500 мл помещали 10,508 г лимонной моноводной кислоты, 100 мл NaOH и доводили до объема 500 мл водой. Далее в колбе 100 мл смешивали 61,1 мл цитрата натрия и 38,9 мл NaOH, тщательно перемешивали. В стакан 250 мл помещали полученную смесь, 10 мкл ПАВ (ТВИН 80) и 18 мг бромкрезолового зеленого (БКЗ). Смесь перемешивали до растворения красителя, далее для ускорения процесса подогревали на водяной бане до 70 °C с интенсивным перемешиванием. Получали раствор чайного цвета.

Для проб брали по 0,5 мл полученного раствора (надосадочной жидкости) и 4,5 мл буфера. Наставляли раствор в течение 10 мин. и измеряли спектры поглощения против буфера с БКЗ. Измерения проводились на длине волны 628 нм в трех повторностях, и вычислялось среднее квадратическое отклонение, которое было минимально.

Получение изотерм адсорбции

Исследование изотермы адсорбции альбумина проводилось следующим образом. В пробирки

конической формы емкостью 15 мл помещали по 50 мг исследуемых наночастиц кремнезема с каждым из привитых спейсеров. Затем в каждую пробирку добавляли 2 мл ЧСА, постепенно убывающей концентрации, после чего ставили на орбитальный шейкер и перемешивали образцы в течение 2 ч. при частоте 300 мин⁻¹. По окончании перемешивания к образцам добавляли 2 мл дистиллированной воды и с помощью центрифугирования (3000 мин.⁻¹ в течение 4 мин.) сепарировали образцы, надосадочную жидкость которых сливали в отдельную пробирку и доводили ее до 10 мл.

Для проведения анализа 0,5 мл полученной надосадочной жидкости добавляли к 4,5 мл цитратного буфера, настаивали 10 мин. и снимали значения оптической плотности относительно цитратного буфера. Для определения содержания альбумина пользовались калибровочной кривой, при построении которой проводился анализ наличия альбумина в аналогичных растворах альбумина без испытаний с наночастицами.

Результаты и их обсуждение

Общая концепция иммобилизации белков

Аминоспейсер потенциально может связывать моноаминодикарбоновые аминокислоты аспартат, глутамат (частота в белках 5,49 и 6,42 соответственно [42]), имеющие дополнительную карбоксильную группу и проявляющие функциональность в боковой цепи белков (рис. 1а). Меркаптоспейсер может связывать цистеин (рис. 1б, частота в белках 1,38), содержащий сульфгидридную функциональную группу. Тозильный спейсер может связывать диаминомонокарбоновые: лизин, аргинин (рис. 1в, частота в белках 5,19 и 5,78 соответственно), имеющие дополнительную аминогруппу. Указанные аминокислоты легче всего иммобилизуются, если имеют терминальное положение.

Для иммобилизации белков на поверхности наночастиц был отработан синтез всех трех спейсеров, изучены физико-химические характеристики модифицированных наночастиц и проведена иммобилизация белков.

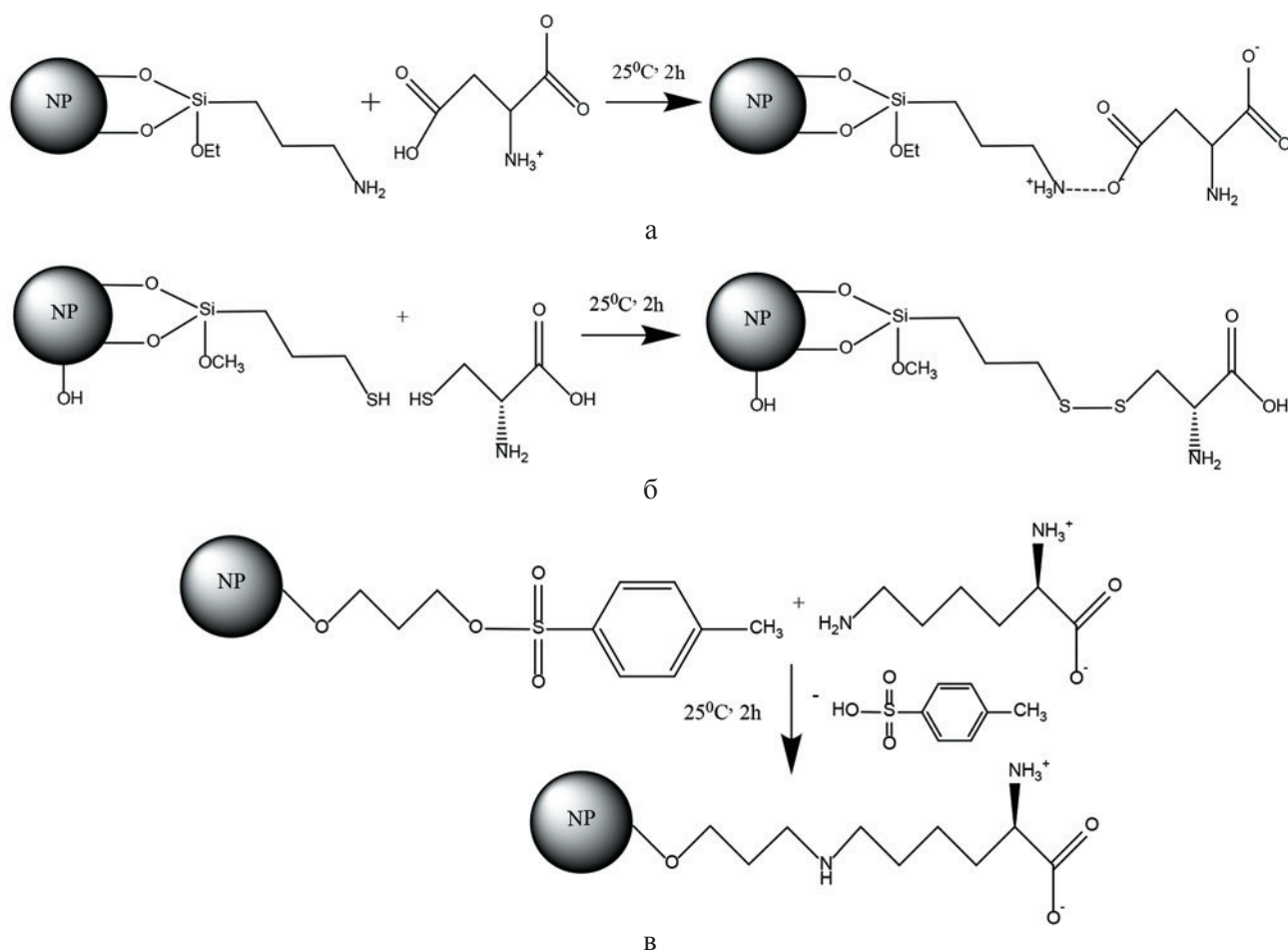


Рис. 1. Варианты иммобилизации аминокислот на различных спейсерах: а — аминоспейсер–аспарагиновая кислота; б — меркаптоспейсер–цистеин; в — тозильный спейсер–лизин

Figure 1. Options for immobilization of amino acids on various spacers: а — amino spacer–aspartic acid; б — mercapto-spacer–cysteine; в — tosyl spacer–lysine

Аминоспейсер

Большинство спейсеров можно синтезировать на поверхности твердых наночастиц, в том числе и НЧК за счет гидроксированной поверхности последней, которая при взаимодействии с этоксилированной группой модификатора образует ковалентную связь, отщепляя соответствующий спирт. Традиционно для синтеза на поверхности наночастиц спейсера, заканчивающегося аминогруппой, используется (3-аминопропил)триэтоксисилан (АПТЭС) [43–45]. При этом синтез может осуществляться из различных растворителей: бензол, толуол, циклогексан, этанол или изопропанол. Схема реакции АПТЭС с НЧК показана на рисунке 2.

Меркаптоспейсер

Для синтеза меркаптоспейсера можно использовать (3-меркаптопропил)триметоксимилан (рис. 3). Некоторые авторы утверждают, что реакцию эту лучше проводить в ксилоле при продувке инертным газом аргоном [46, 47]. Поэтому реакцию проводили в бензоле и в ксилоле. Никаких различий в конечном продукте обнаружено не было.

Тозильный спейсер

Изначально для первой стадии синтеза спейсера был взят вариант реакции гидроксильной группы наночастицы с 3-хлор-1-пропанолом для

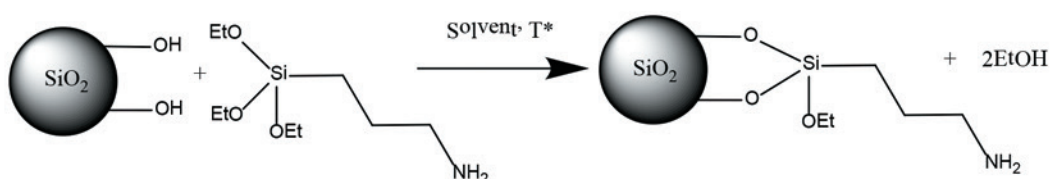


Рис. 2. Синтез спейсера, заканчивающегося аминогруппой

Figure 2. Synthesis of a spacer ending with an amino group

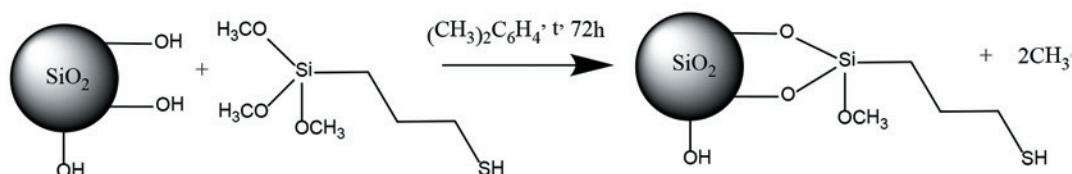


Рис. 3. Синтез спейсера, заканчивающегося меркаптогруппой

Figure 3. Synthesis of a spacer ending with an mercapto group

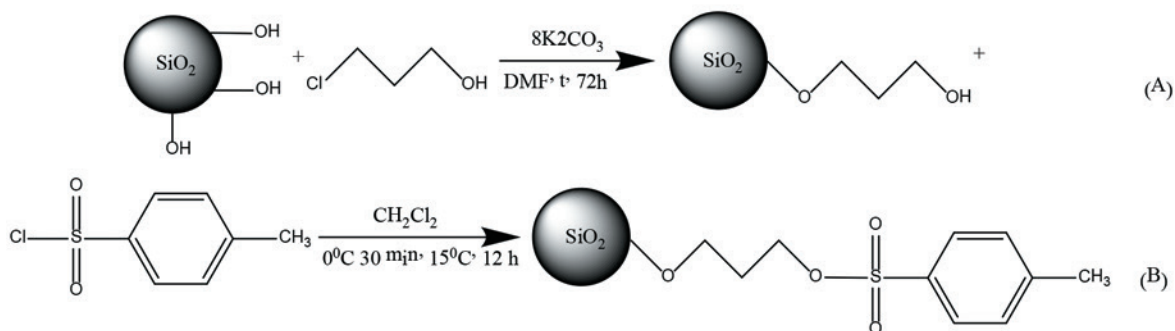


Рис. 4. Предположительный механизм реакции гидроксированной наночастицы с 3-хлор-1-пропанолом

Figure 4. Proposed mechanism of the reaction of hydroxylated nanoparticles with 3-chloro-1-propanol

наночастиц диоксида титана [48, 49] (рис. 3). Для наночастиц кремнезема эта схема оказалась неприемлемой ввиду восьмикратного избытка щелочи, которая растворяет НЧК до геля.

Таким образом, для синтеза было решено использовать три стадии (рис. 5):

- реакция гидроксильных групп с (3-хлорпропил)трихлорсиланом, аналогично методикам синтеза amino- и меркаптоспейсеров;
- гидролиз хлоридной группы;
- реакция гидроксильной группы с паратолуолсульфонилхлоридом.

Физико-химические характеристики модифицированных наноматериалов

Концентрация функциональных групп в образцах аминированных наночастиц составила 0,84 ммоль/г (табл. 1). Это согласуется с полученными ранее результатами в другой работе [36]. Полная концентрация меркаптогрупп, определенная методом аргентометрии, практически не отличается для обоих растворителей (бензола и о-ксилола) и на порядок ниже количества функциональных аминогрупп. Скорее всего, это связано не с методом определения их количества, а с активностью самого модификатора.

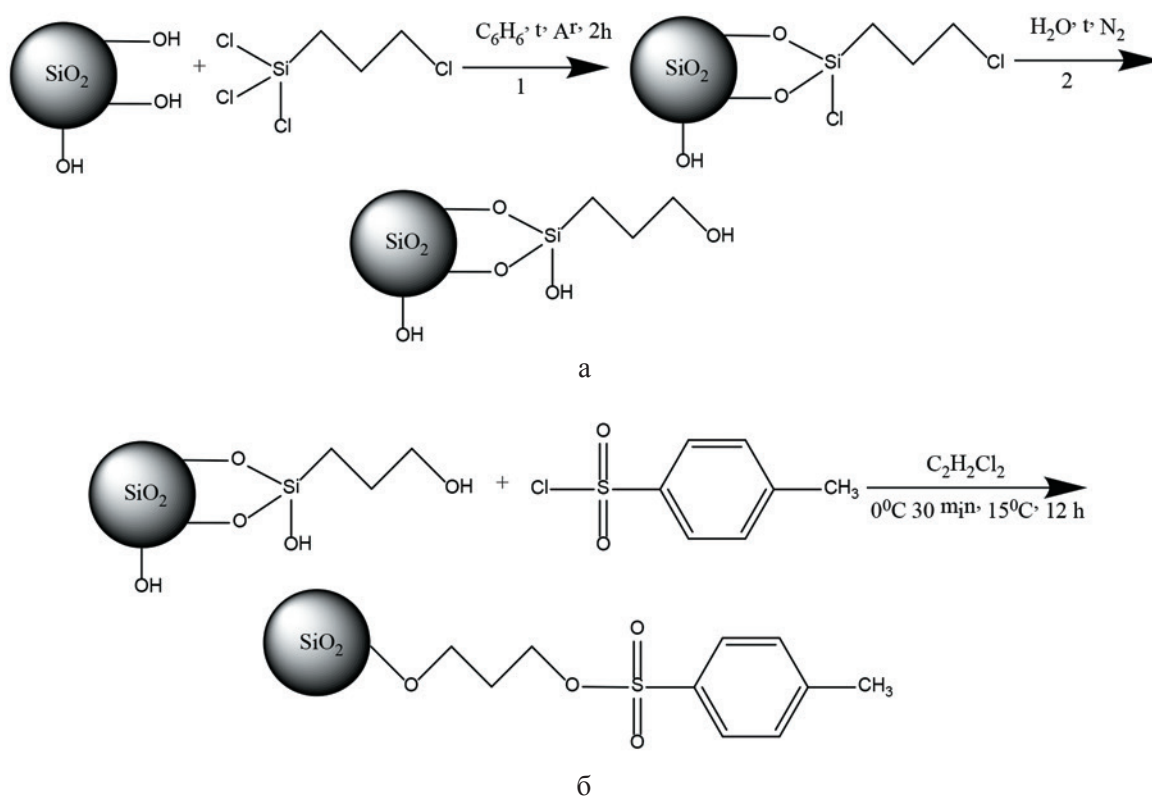


Рис. 5. Схема синтеза тозильного спейсера

Figure 5. Scheme for the synthesis of a tosyl spacer

Таблица 1. Общее содержание функциональных групп в образцах

Table 1. Total content of functional groups in samples

Тип частиц	НЧК-NH ₂	НЧК-SH в бензоле	НЧК-SH в о-ксилоле
Концентрация функциональных групп, ммоль/г	0,841 ± 0,001	0,079 ± 0,001	0,081 ± 0,001

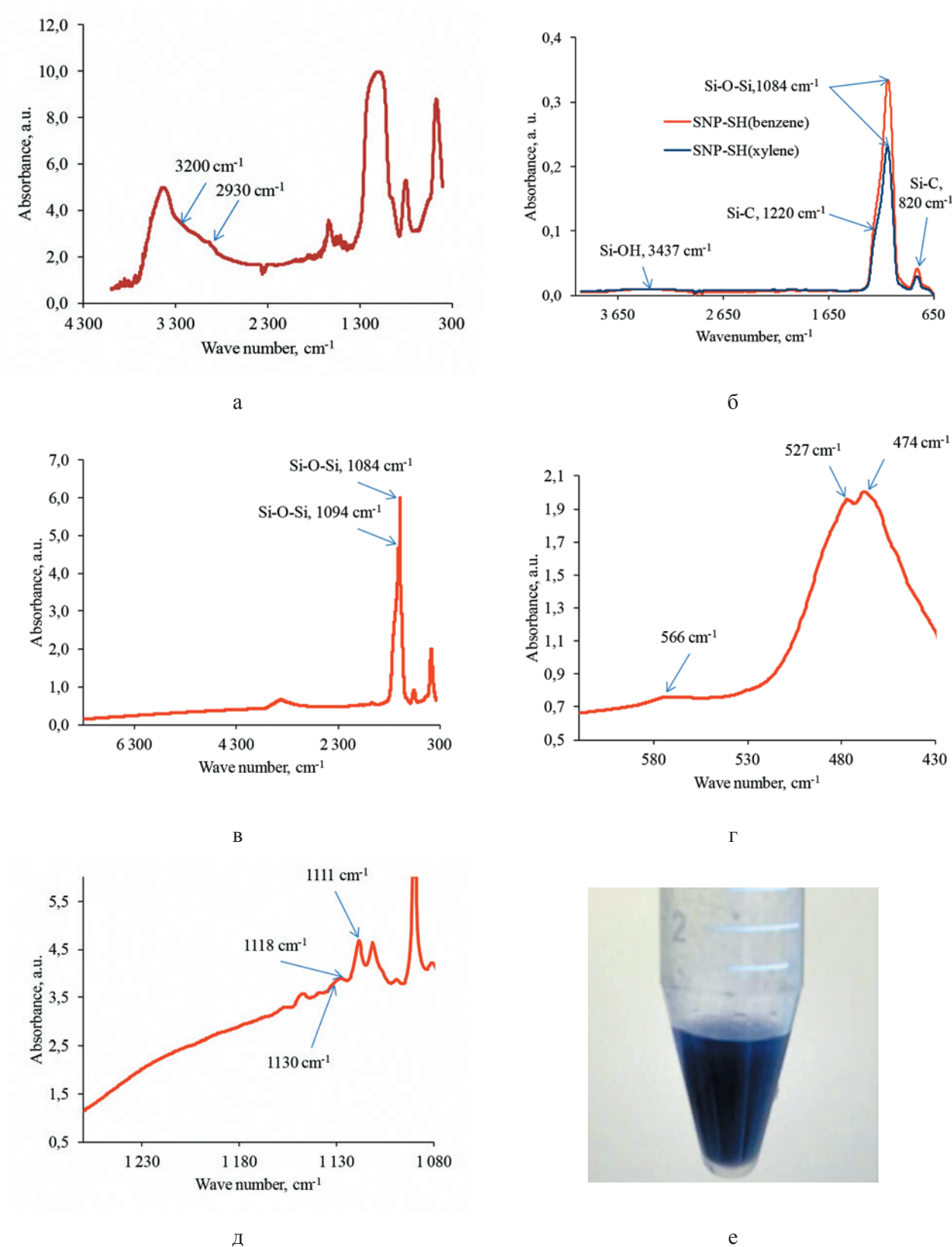


Рис. 6. ИК-Фурье спектры полученных образцов: а — аминокспейсер; б — меркаптоспейсер; в, г, д — тозилый спейсер

Figure 6. IR spectra of the obtained samples: a — amino spacer; б — mercapto spacer; в, г, д — tosyl spacer

Ввиду сложности определения количества и емкости тозильного спейсера проводилось лишь его качественное определение при помощи ИК-Фурье спектроскопии и емкость по модельному белку из изотермы адсорбции.

Количество доступных аминогрупп для образцов с аминспейсером составило 0,059 ммоль/г, то есть почти на порядок ниже, чем общее их содержание в образце. Это согласуется с результатами, полученными ранее авторами для наночастиц магнетита [36]. Количество доступных меркаптогрупп, полученных для модифицированных наночастиц в бензоле, составило 0,025 ммоль/г, в о-ксилоле — 0,051 ммоль/г. Как видно, порядок этих величин соответствует порядку величины для аминспейсера, что говорит о том, что емкость одинаковая, но есть пространственные затруднения для аминогруппы.

При анализе ИК-Фурье спектров образцов со спейсерами, заканчивающимися аминогруппой, были обнаружены линии, которые согласно [50] можно отнести к валентным колебаниям аминов в диапазоне 2000–3000 см⁻¹ и деформационным колебаниям 1460–1600 см⁻¹ (рис. 6а).

Согласно [51] меркаптогруппы имеют очень слабо выраженные линии на ИК-Фурье спектрах. Поэтому о наличии модификатора на поверхности наночастиц можно судить только по косвенным признакам, то есть по наличию других линий связей этого модификатора. Так, согласно [52, 53] были обнаружены линии связей Si-O-Si (1084 см⁻¹) и Si-OH (рис. 6б). Это говорит о том, что модификация действительно протекает согласно схеме, показанной на рисунке 3, и образуется связь Si-O-Si, но часть -ОН групп не реакционноспособна. Также присутствуют колебания связи Si-C модификатора.

При анализе ИК-Фурье спектра тозильного спейсера его можно сравнивать с различными участками концевой группы — пара-толуолсульфонилхлорида из хранилища SpectraBase [54, 55]. На общем спектре (рис. 6в) можно выделить также колебания Si-O-Si. В других участках спектра, более укрупненных (рис. 6г, д), можно выделить линии различных связей тозилата (474, 527, 566, 1111, 1116 см⁻¹).

Водная суспензия аэросила, в том числе и модифицированного любым из трех рассматриваемых спейсеров, является практически прозрачной опалесцирующей жидкостью. Нингидриновая реакция для всех трех спейсеров показала хорошую иммобилизацию белка по фиолетовому цвету окраски (рис. 6е).

Средний гидродинамический диаметр агломератов наночастиц кремнезема составляет 200 нм (см. рис. 7а, б). Этот показатель значительно увеличивается при реакции с АПТЭС и составляет 500 нм. Во-видимому, имеет место образование ассоциатов ввиду активности аминогруппы. И, напротив, размер практически не увеличивается при реакции с МПМС. При этом в реакции с МПМС в бензоле имеется большое количество агломератов, что, по-видимому, свидетельствует об образовании некоторого количества полимера из модификатора. Зета-потенциал возрастает по модулю при введении меркаптогруппы с -20 до -33 мВ, что делает коллоидный раствор более стабильным. При обработке НЧК АПТЭС зета-потенциал практически не изменяется и составляет -22 мВ. При обработке НЧК ХПХС средний размер наночастиц слегка возрастает с 200 до 230 нм, что свидетельствует о средней толщине оболочки модификатора. Затем при проведении гидролиза и тозилации средний размер частиц возрастает еще до 270 нм. При этом на первой стадии зета-потенциал возрастает по модулю до -30 мВ, а затем падает до -22 мВ. При этом коллоидный раствор все равно остается устойчивым в течение длительного времени.

Количественное определение иммобилизованного белка и изотермы адсорбции

Как видно из графиков на рисунке 8, при содержании альбумина 4–6 % в первоначальной пробе степень адсорбции (емкость по белку) меняется очень слабо для всех трех спейсеров и составляет около единицы (50 мг белка на 50 мг частиц). Затем происходит рост степени адсорбции, которая достигает 5-кратного значения, то есть на 50 мг модифицированных наночастиц частиц А-200 сорбируется 250 мг белка, а в случае тозильного спейсера это количество возрастает 11-кратно. Нам не удалось достигнуть максимальной емкости. По виду зависимости можно судить о принадлежности изотермы адсорбции к III типу в классификации, предложенной Брунауэром [56]. Такая зависимость характерна для полимолекулярной адсорбции на непористых адсорбентах с малой энергией взаимодействия между адсорбентом и адсорбатом. Поэтому наблюдается рост степени адсорбции при приближении к максимальному содержанию альбумина в жидкой фазе. Можно рекомендовать для практических целей использовать концентрацию белка 4–6 %.

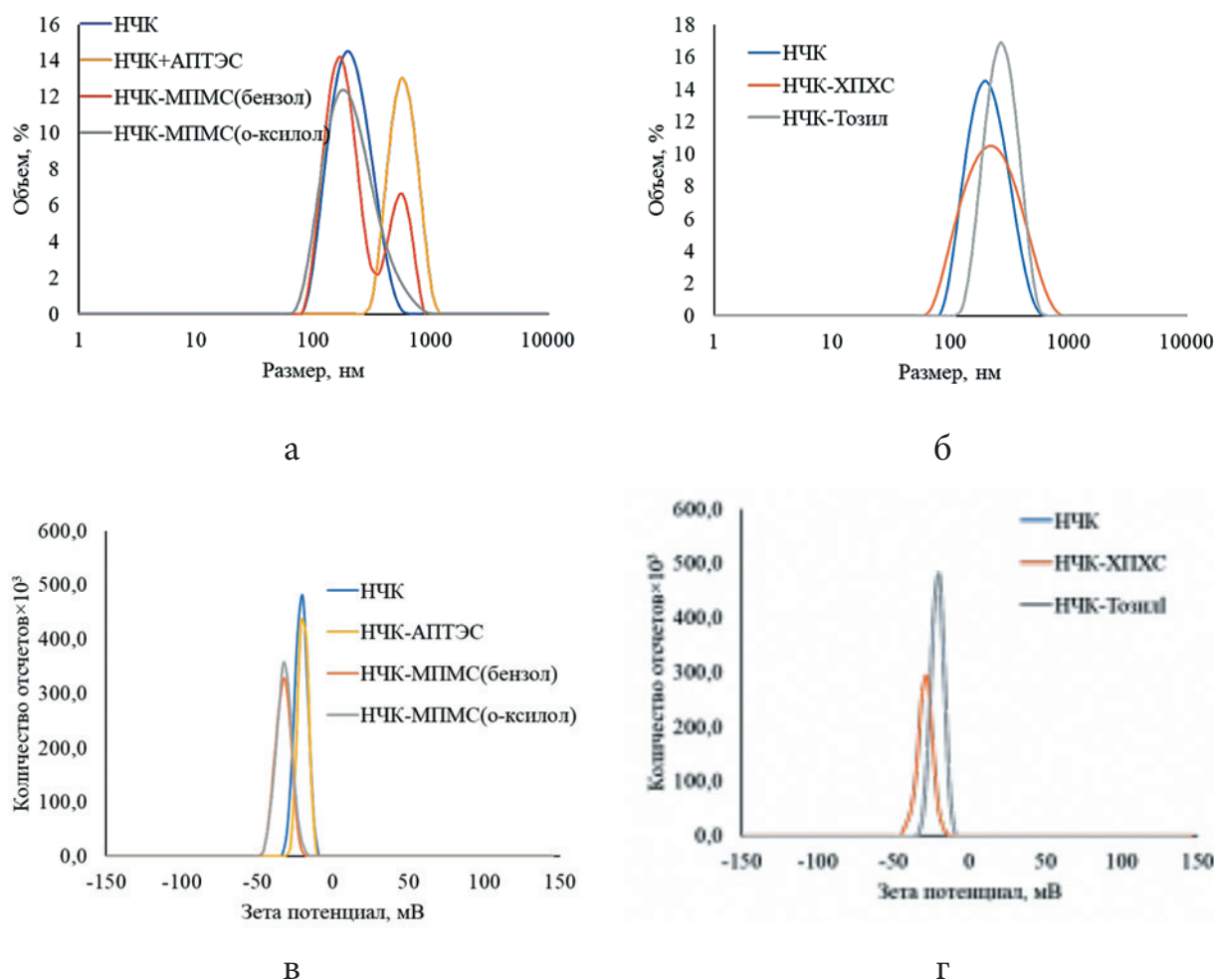


Рис. 7. Гидродинамический диаметр и зета-потенциал образцов

Figure 7. Hydrodynamic diameter and zeta potential of samples

Таблица 2. Степень адсорбции белка при его максимальной концентрации (20 %)

Table 2. Degree of protein adsorption at its maximum concentration (20 %)

Тип спейсера	Аминоспейсер	Меркаптоспейсер	Тозильный спейсер
Степень адсорбции, мг/мг	$5,0 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,1$

В таблицу 2 сведены данные о степени адсорбции белка на различные виды спейсеров. Аминоспейсер и меркаптоспейсер проявляют одинаковую эффективность $5,0 \pm 0,1$ мг/мг. Тозильный спейсер — более чем в два раза ($12,0 \pm 0,1$ мг/мг). Скорее всего, это связано с координационно-ионной иммобилизацией белка на аминоспейсер, дисульфидной — на меркаптоспейсер. Тозильный спейсер образует с белком ковалентную связь.

Выводы

Еще недавно высококонтагиозный вирус SARS-CoV-2 погрузил население Земли в пандемию COVID-19, что заставило лучшие умы научных институтов и фармацевтических компаний искать эффективные и безопасные средства борьбы с этой инфекцией. Одновременно по всему миру огромные усилия были направлены на разработку нейтрализующих антител, различных вакцин и иных препара-

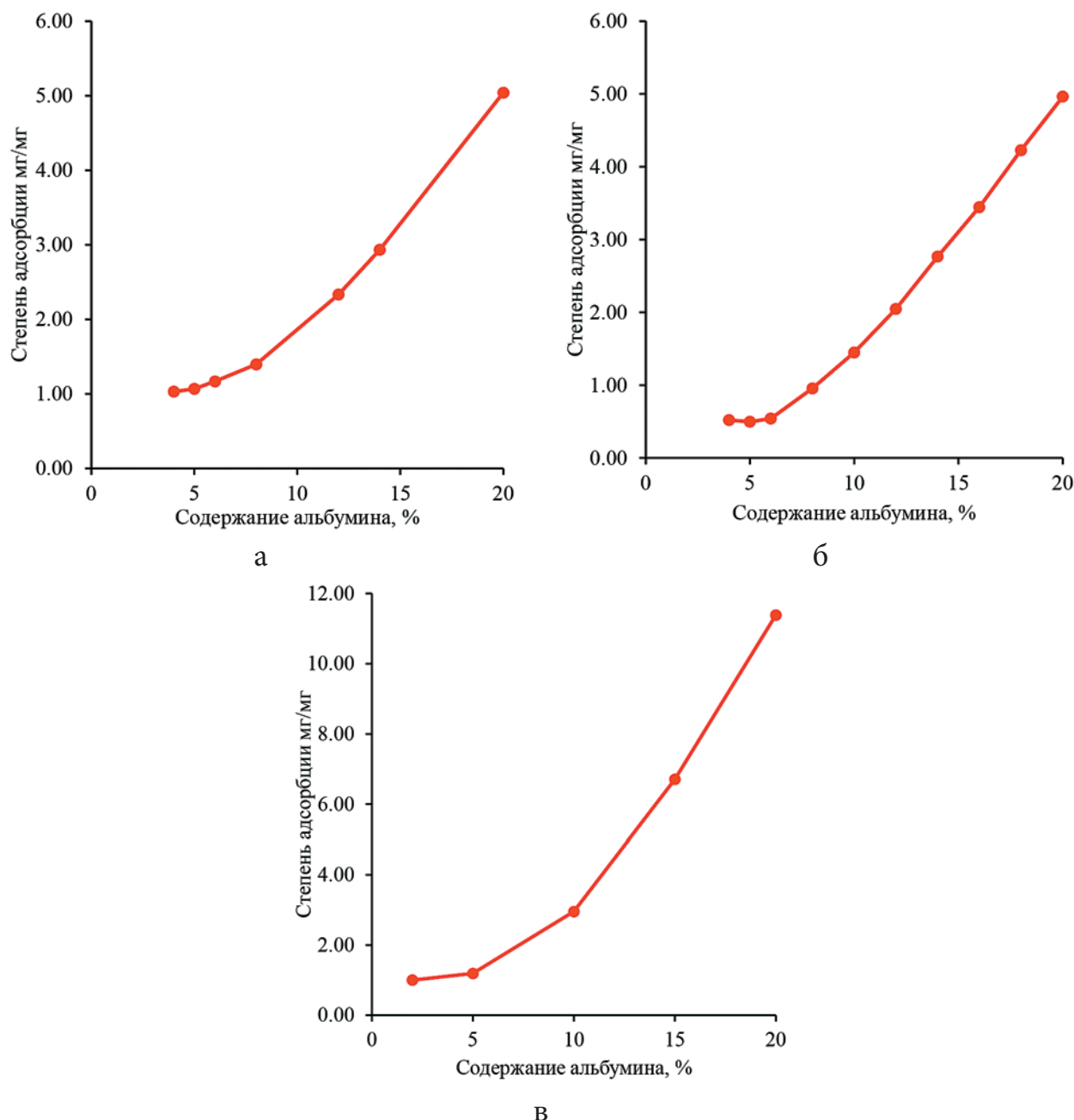


Рис. 8. Изотермы адсорбции на различные виды спейсеров: а — аминокспейсер; б — меркаптоспейсер; в — тозилый спейсер

Figure 8. Adsorption isotherms for various types of spacers: а — amino spacer; б — mercapto spacer; в — tosyl spacer

тов для профилактики и лечения COVID-19. В том числе было предложено использовать для этих целей рекомбинантные растворимые белки ACE2. Однако известно, что свободный растворенный белок гораздо более подвержен деградации, чем иммобилизованный на наночастицах [16, 57].

К сожалению, при отсутствии специфического механизма полной биологической ликвидации комплекса нанопрепарат–патоген, остается риск за-

ражения при высвобождении патогена в процессе биодеградации самой наночастицы. Поскольку этот вопрос особенно актуален при производстве наноловушек, предназначенных для перехвата вируса в просвете бронхолегочного тракта, М. Chen и соавторы в 2021 г. предложили дополнительно функционализировать поверхность наночастиц (липосом) молекулами фосфатидилсерина, который является специфической приманкой для макрофагов. После

образования наноконплекса с SARS-CoV-2, фосфатидилсерин запускал последующий фагоцитоз биоразлагаемых нанолушек и, одновременно, связанных с ними вирусных частиц [58].

В нашей работе мы исходили из того, что разрабатываемый энтеросорбент, предназначенный для связывания вируса SARS-CoV-2 в просвете желудочно-кишечного тракта, в течение относительно короткого периода времени так или иначе будет подвержен естественному клиренсу. Поэтому дополнительные меры, как, например, стимуляция фагоцитоза или тому подобные, в нашем случае не принесут заметного повышения эффективности препарата. Таким образом, нами разработаны прототипы энтеросорбентов, где в качестве наносферы был взят широко известный энтеросорбент — аэросил, обладающий достоверно высоким уровнем биосовместимости и биобезопасности у человека и активно применяемый в практической медицине. На его основе были синтезированы три типа спейсеров, способных связываться с разными функциональными группами белков. Эффективность спейсеров проверена на модельном белке — альбумине. При достаточном количестве рекомбинантного белка ACE2 (а также вспомогательных протеаз TMPRSS2 или фурина), можно продолжить разработку перорального препарата, предназначенного для уменьшения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в желудочно-кишечном тракте, обезвреживания и элиминации вирусных частиц из организма больного. В случае успеха подобный подход послужит основой в создании платформенных решений для борьбы с другими опасными вирусами, патогенез которых эволюционно связан с алиментарным путем заражения.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава РФ № 121031100284–7. / The work is performed within the State task of the Ministry of Health of the Russian Federation № 121031100284–7.

Список литературы / References

1. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 2020; 26: 450–452. DOI: 10.1038/s41591-020-0820-9.
2. Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, et al. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat. Rev. Cardiol.* 2020; 17: 259–260. DOI: 10.1038/s41569-020-0360-5.
3. Raj VS, Mou H, Saskia L, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature.* 2013; 495: 251–254. DOI: 10.1038/nature12005.
4. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020; 176: 104742. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.
5. Bestle D, Heindl MR, Limburg H, et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci. Alliance.* 2020; 3(9). DOI: 10.26508/lsa.202000786.
6. Serfozo P, Wysocki J, Gulua G, et al. Ang II (angiotensin II) conversion to angiotensin-(1-7) in the circulation is pop (prolyloligopeptidase)-dependent and ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2)-independent. *Hypertension.* 2020; 75: 173–182. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14071.
7. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 2004; 203: 631–637. DOI: 10.1002/path.1570.
8. Du L, He Y, Zhou Y, et al. The spike protein of SARS-CoV-a target for vaccine and therapeutic development. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 226–236. DOI: 10.1038/nrmicro2090.
9. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020; 395: 565–574. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
10. Menachery VD, Yount BL, Debbink K, et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* 2015; 21: 1508–1513. DOI: 10.1038/nm.3985.
11. Wysocki J, Ye M, Rodriguez E, et al. Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: Prevention of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2010; 55: 90–98. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138420.
12. Hofmann H, Geier M, Marzi A. Susceptibility to SARS coronavirus S protein-driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 319(4): 1216–1221. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.05.114.
13. Batlle D, Wysocki J, Satchell K. Soluble angiotensin-converting enzyme 2: a potential approach for coronavirus infection therapy? *Clin. Sci. (Lond.).* 2020; 134(5): 543–545. DOI: 10.1042/CS20200163.
14. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003; 426: 450–454. DOI: 10.1038/nature02145.

15. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 1953–1966. DOI: 10.1056/NEJMoa030781.
16. Lei C, Qian K, Li T, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus by recombinant ACE2-Ig. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 2070. DOI: 10.1038/s41467-020-16048-4.
17. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020; 367(6483): 1260–1263. DOI: 10.1126/science.abb2507.
18. Wan Y, Shang J, Graham R, et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 2020; 94(7). DOI: 10.1128/JVI.00127-20.
19. Vankadari N, Wilce JA. Emerging WuHan COVID-19 coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. *Emerg. Microbes. Infect.* 2020; 9(1): 601–604. DOI: 10.1080/22221751.2020.1739565.
20. Watanabe Y, Bowden TA, Wilson IA, et al. Exploitation of glycosylation in enveloped virus pathobiology. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* 2019; 1863(10): 1480–1497. DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.05.012.
21. Morimoto C, Schlossman SF. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol. Rev.* 1998; 161: 55–70. DOI: 10.1111/j.1600-065x.1998.tb01571.x.
22. Wang Q, Qi J, Yuan Y, et al. Bat origins of MERS-CoV supported by bat coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26. *Cell Host & Microbe.* 2014; 16(3): 328–337. DOI: 10.1016/j.chom.2014.08.009.
23. Xu X, Chen P, Wang J, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(3): 457–460. DOI: 10.1007/s11427-020-1637-5.
24. Gohrbandt S, Veits J, Breithaupt A, et al. H9 avian influenza reassortant with engineered polybasic cleavage site displays a highly pathogenic phenotype in chicken. *J. Gen. Virol.* 2011; 92: 1843–1853. DOI: 10.1099/vir.0.031591-0.
25. Rabaan AA, Al-Ahmed Shamsah H, Haque S, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview *Infez Med.* 2020; 28(2): 174–184.
26. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020; 181(2): 281–292. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
27. Nao N, Yamagishi J, Miyamoto H, et al. Genetic predisposition to acquire a polybasic cleavage site for highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin. *MBio.* 2017; 8(1). DOI: 10.1128/mBio.02298-16.
28. Jaimes JA, Millet JK, Whittaker GR. Proteolytic Cleavage of the SARS-CoV-2 Spike Protein and the Role of the Novel S1/S2 Site. *IScience.* 2020; 23(6): 101212. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101212.
29. Follis KE, York J, Nunberg JH. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell–cell fusion but does not affect virion entry. *Virology.* 2006; 350(2): 358–69. DOI: 10.1016/j.virol.2006.02.003.
30. Monteil V, Kwon H, Prado P, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. *Cell.* 2020; 181(4): 905–913. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.004.
31. Cheburkin YV, Sonin DL, Polozov AS, et al. The role of membrane and circulating forms of ACE 2 in pathological processes in COVID19 infection. *Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension.* 2021; 27(6):608–616. In Russian [Чебуркин Ю.В., Сонин Д.Л., Полозов А.С. и др. Роль мембранной и циркулирующей форм ACE 2 в развитии различных патологических процессов на фоне COVID-19. Артериальная гипертензия. 2021; 27(6):608–616. DOI:10.18705/1607-419X-2021-27-6-608-616].
32. Zhang G, Pomplun S, Loftis A, et al. Investigation of ACE2 N-terminal fragments binding to SARS-CoV-2 Spike RBD. *BioRxiv.* 2020. [Preprint]. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.03.19.999318>.
33. Baum A, Fulton B, Wloga E, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science.* 2020; 369(6506): 1014–1018. DOI: 10.1126/science.abd0831.
34. Clinical Trial NCT04335136. Recombinant Human Angiotensin-converting Enzyme 2 (rhACE2) as a Treatment for Patients with COVID-19 (APN01-COVID-19). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04335136>.
35. Zorin VN, Naumisheva EB, Postnov VN, et al. Magnetic nanoparticles for medical application with a coating deposited with various methods. *J. Phys. Conf. Series. IOP Publishing,* 2018; 1124(3). DOI: 10.1088/1742-6596/1124/3/031009.
36. Ivanovskaya AM, Voronin AV, Seryakova AN. Quantitative analysis of drugs of organic nature. Samara: Insoma-press, 2018. P. 88. In Russian [Ивановская А.М., Воронин А.В., Серякова А.Н. Количественный анализ лекарственных средств органической природы. Самара: Инсома-пресс, 2018. С. 88].
37. Murashova VI, Tananaeva AN, Khovyakova RF. Qualitative chemical fractional analysis. M.: Khimiya, 1976. P. 279. In Russian [Мурашова В.И., Тананаева А.Н., Ховякова Р.Ф. Качественный химический дробный анализ. М.: Химия, 1976. С. 279].
38. Siggia S. Instrumental methods for the analysis of functional groups of organic compounds. M.: Mir, 1974. P. 464. In Russian [Сиггия С. Инструментальные методы анализа функциональных групп органических соединений. М.: Мир, 1974. С. 464].

39. Mahler GR, Cordes JG. Fundamentals of biological chemistry. Transl. from Eng. M.: Mir, 1970. P. 568. In Russian [Малер Г.Р., Кордес Ю.Г. Основы биологической химии. Пер. с англ. М.: Мир, 1970. С. 568].
40. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin. Chim. Acta. 1971; 31: 87–96. DOI: 10.1016/s0009-8981(96)06447-9.
41. Narang AS, Varia S. Role of tumor vascular architecture in drug delivery. Adv. Drug. Deliv. Rev. 2011; 63(8): 640–658. DOI: 10.1016/j.addr.2011.04.002.
42. Kozłowski LP. Proteome-pI: proteome isoelectric point database. Nuc. Acids Res. 2017; 45(D1): D1112–D1116. DOI: 10.1093/nar/gkw978.
43. Gareev KG, Babikova KY, Postnov VN, et al. Fluorescence imaging of the nanoparticles modified with indocyanine green. J. Phys. 2017: Conf. Series 917 042008. DOI: 10.1088/1742-6596/917/4/042008.
44. Korolev DV, Evreinova NV, Zakharova EV, et al. Phosphocreatine immobilization of the surface of silica and magnetite nanoparticles for targeted drug delivery. Russian Chemical Bulletin. 2019; 68(5): 1096–1101. DOI: 10.1007/s11172-019-2525-0.
45. Korolev DV, Postnov VN, Evreinova NV, et al. Synthesis of Magnetic Nanoparticles with Radiopaque Marker. Rus. J. Gen. Chem. 2018; 88(12): 2698–2701. DOI: 10.1134/S1070363218120381.
46. Han H, Wang Q, Liu X, et al. Polymeric ionic liquid modified organic-silica hybrid monolithic column for capillary electrochromatography/ J. Chromatogr. A. 2012; 1246: 9–14. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.12.029.
47. Lee BY, Li Z, Clemens DL, et al. Redox-triggered release of moxifloxacin from mesoporous silica nanoparticles functionalized with disulfide snap-tops enhances efficacy against pneumonic tularemia in mice. Small. 2016; 12(27): 3690–3702. DOI: 10.1002/smll.201600892.
48. Klesiewicz K, Karczewska E, Budak A, et al. Anti-Helicobacter pylori activity of some newly synthesized derivatives of xanthone. The Journal of antibiotics. 2016; 69(11): 825–834. DOI: 10.1038/ja.2016.36.
49. Sahudin MA, Su'ait MS, Tan LL, et al. Schiff base complex/TiO₂ chemosensor for visual detection of food freshness level. Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomolec. Spectr. 2021; 248: 119129. DOI: 10.1016/j.saa.2020.119129.
50. Kim J, Cho J, Seidler PM, et al. Investigations of chemical modifications of amino-terminated organic films on silicon substrates and controlled protein immobilization. Langmuir. 2010; 26(4): 2599–608. DOI: 10.1021/la904027p.
51. Li H, Pan J, Gao C, et al. Mercapto-functionalized porous organosilica monoliths loaded with gold nanoparticles for catalytic application. Molecules. 2019; 24(23): 4366. DOI: 10.3390/molecules24234366.
52. Senkevich JJ, Mitchell CJ, Yang GR, et al. Surface chemistry of mercaptan and growth of pyridine short-chain alkoxy silane molecular layers. Langmuir. 2002; 18(5): 1587–1594. DOI: 10.1021/la010970f.
53. Kocyigit A. Properties of silicon–ZnO hybrid nanoparticles. In: Silicon-Based Hybrid Nanoparticles: Fundamentals, Properties, and Applications. 2022: 65–88. DOI: 10.1016/B978-0-12-824007-6.00001-0.
54. SpectraBase p-Toluenesulfonyl chloride 630–430 cm⁻¹ wave number. <https://spectrabase.com/spectrum/LNTt3QsvohK>.
55. SpectraBase p-Toluenesulfonyl chloride 1260–1080 cm⁻¹ wave number. <https://spectrabase.com/spectrum/AODKWz6bA9P>.
56. Brunauer S, Deming LS, Deming WE, et al. On a theory of the van der Waals adsorption of gases. J. Amer. Chem. Soc. 1940; 62: 1723–1732. DOI: 10.1021/ja01864a025.
57. Yu M, Wu J, Shi J, Farokhzad OC. Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. J Control Release. 2016; 240: 24–37. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.012.
58. Chen M, Rosenberg J, Cai X, et al. Nanotraps for the containment and clearance of SARS-CoV-2. Matter. 2021; 4(6): 2059–2082. DOI: 10.1016/j.matt.2021.04.005.

Информация об авторах:

Шульмейстер Галина Анатольевна, младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Чебуркин Юрий Владимирович, к.м.н., заведующий НИЛ инфекционных патогенов и биомолекулярных наноструктур, старший научный сотрудник НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Чекменева Юлия Дмитриевна, студент СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Едемская Елена Владимировна, студент СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Бондаренко Андрей Борисович, младший научный сотрудник НИЛ инфекционных патогенов и биомолекулярных наноструктур, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; старший преподаватель кафедры медицинской биологии ФГБОУ ВО «СПбГПМУ» Минздрава России;

Постнов Виктор Николаевич, к.х.н., доцент кафедры химии твердого тела Института химии ФГБОУ ВО СПбГУ; старший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Королёв Дмитрий Владимирович, д.х.н., заведующий НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; научный сотрудник ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России.

Authors information:

Galina A. Shulmeyster, Junior Research Assistant of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Yuri V. Cheburkin, MD, PhD, Head of Research Laboratory of Infectious Pathogens and Biomolecular Nanostructures, Senior Research Scientist of Microcirculation and Myocardial Metabolism, Almazov National Medical Research Centre;

Yulia D. Chekmeneva, Student of Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI";

Elena V. Edemskaya, Student of Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI";

Andrey B. Bondarenko, junior research assistant, Research Laboratory of Infectious Pathogens and Biomolecular Nanostructures, Almazov National Medical Research Centre; senior lecturer of Department of Medical Biology, the Saint Petersburg State Pediatric Medical University;

Viktor N. Postnov, MD, PhD, Assistant Professor of the Institute of Chemistry of Saint Petersburg State University; Senior Researcher of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Dmitry V. Korolev, PhD, Head of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre; Researcher of the Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.