



МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ

С.Дембски*, д-р, Й.Пробст*, д-р, К.Геллерманн*, д-р, Т.Клокенбринг, д-р, С.Барт, д-р** /**
sofia.dembbski@isc.fraunhofer.de

Cегодня, если рак или сердечно-сосудистое заболевание диагностированы на самых ранних стадиях, перспективы их лечения достаточно благоприятны. По этой причине эффективные методы ранней диагностики с применением молекулярных маркеров могли бы обеспечить пациентам индивидуальное лечение раньше, чем это делается сейчас. Использование многофункциональных наночастиц открывает новые возможности ранней диагностики различных заболеваний. Благодаря своим уникальным свойствам и размерам, сопоставимым с величиной биомолекул, эти наноматериалы могут выполнять сразу несколько функций: обеспечить конъюгацию маркерспецифических антител или соответствующих антигенов и сделать их доступными для различных методов определения.

Наиболее частые причины смертности в Европе – это сердечно-сосудистые и раковые заболевания. В связи с этим их профилактика и надежная диагностика на ранних стадиях могла бы способствовать сохранению жизни больных.

Для ранней диагностики, задолго до появления первых симптомов заболевания, могут быть использованы методы, основанные на применении серологических маркеров. Несмотря на то, что современные технологии позволяют определять в сыворотке крови специфические биомаркеры (вырабатываемые организмом вещества, свидетельствующие о наличии болезни), уровень их чувствительности и точности недостаточен для определения чрезвычайно низких концентраций соответствующих веществ, характерных для начальной стадии заболевания. Не учитывается также факт, что концентрации "тревожного сигнала" (alarm-triggering) могут варьироваться от пациента к пациенту. Кроме того, такие диагностические исследования, как правило, длительны и требуют

больших финансовых затрат. Все это приводит к потере драгоценного времени, и момент, когда пациенты начинают получать лечение соответственно индивидуальному течению заболевания, откладывается. В результате часто ничего не остается, как лишь наблюдать за прогрессирующим заболеванием.

Разработка систем для диагностики на основе многофункциональных частиц, способных связывать биомаркеры или инкапсулировать активные вещества, и лекарственные препараты, открывают новые возможности в индивидуальной диагностике и терапии. Потенциал наночастиц, в качестве диагностирующего инструмента, был продемонстрирован недавно при реализации совместного исследовательского проекта IMIKRID (Интегрированные микрофлюидные диагностические системы - Integrated microfluidic diagnostic systems), поддержанного Федеральным министерством по науке и образованию Германии.

Целью проекта было формирование технологической платформы для создания интегрированной диагностирующей системы на основе микрофлюидного чипа, которая бы могла обеспечить высокочувствительный анализ антителосодержащих биомаркеров. Это должно позволить создать в будущем компактные

* Институт Фраунхофера по исследованию силикатов (Fraunhofer ISC), Вюрцбург (Германия).

** Институт Фраунхофера молекулярной биологии и прикладной экологии (Fraunhofer IME), Аахен (Германия).



и портативные диагностические системы модульного типа, способные в течение нескольких минут представить клинически важные результаты измерений.

КОМПЛЕКСНАЯ КОНЦЕПЦИЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ

Одна из целей проекта IMIKRID – разработка портативной мультисенсорной системы, способной определять одновременно специфические для опухолевого или кардиологического заболевания маркеры с чувствительностью выше 10^{-11} моль/л. Ключевой компонент системы – микрофлюидный чип, оборудованный каналами, по которым циркулирует анализируемая жидкость (например, кровь). Задача заключалась в том, чтобы на основе реакции образования комплекса антиген-антитело определить минимально возможные концентрации специфичных для данных болезней маркеров в образцах крови *in vitro*. Цель при этом – повышение чувствительности определения на два порядка (до 10^{-13} моль/л) по сравнению с современными методами.

Важная составная часть диагностического чипа – многофункциональные наночастицы на основе SiO_2 , специально адаптированные к сенсору и микрофлюидным каналам. Такие наночастицы, поверхность которых модифицирована антителами, позиционированы с помощью спайсеров в середине потока, что повышает чувствительность диагностической системы (рис.1). Реакция связанных с наночастицами антител с антигенами приводит к изменению заряда на их поверхности, который регистрируется сенсорным чипом.

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

В рамках проекта разработаны многофункциональные содержащие органический краситель SiO_2 -наночастицы. Поверхность частиц функционализирована реактивными группами, которые обеспечивают присоединение специфических биомолекул, таких как антитела. Ключевыми параметрами в этом случае являются размер, форма и свойства поверхности наночастиц. Эти геометрические характеристики определяют тип и количество антител, которые могут быть прикреплены к частицам и, тем самым, количество антигенов, которые могут быть захвачены из пробы. От этого зависит уровень точности определения концентрации маркера при анализе микроридкости.

Для подтверждения успешного функционирования поверхности наночастиц антителами необходима визуальная проверка. С этой целью наночастицы были маркированы люминесцентным красителем. Синтез SiO_2 -наночастиц размером 60–200 нм проводился химическим методом с использованием золь-гель технологии [1, 2]. Частицы окрашены равномерно за счет ковалентных связей между молекулами красителя и матрицей диоксида кремния. Как следствие, наночастицы демонстрируют значительную стойкость к фотообесцвечиванию и потере красителя. Маркирование наночастиц люминесцентным веществом также открывает новые возможности по использованию оптических сенсорных систем.

Полученные частицы были модифицированы с использованием традиционных методов различными химическими функциональными группами, в частности, аминными и карбоксильными [1–5]. Качественный и количественный анализы функциональных групп проводились с помощью ряда методов, включая определение ξ -потенциала или тест на краситель (рис.2) [6, 7]. Такие реакционноспособные группы обеспечивают целенаправленное присоединение биомолекул, например, антител к поверхности частиц.

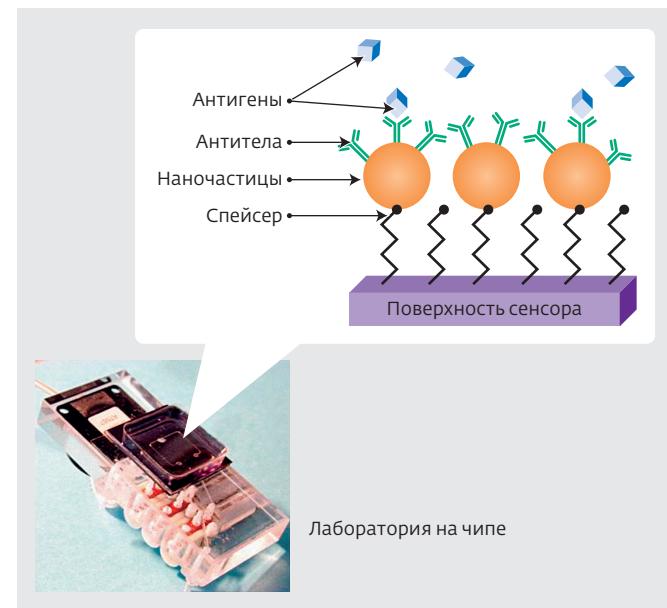


Рис.1. Принцип действия микрофлюидного чипа. Функционализированные антителами SiO_2 -наночастицы позволяют выявлять специфические антигены в анализируемой жидкости и адаптированы к поверхности сенсора

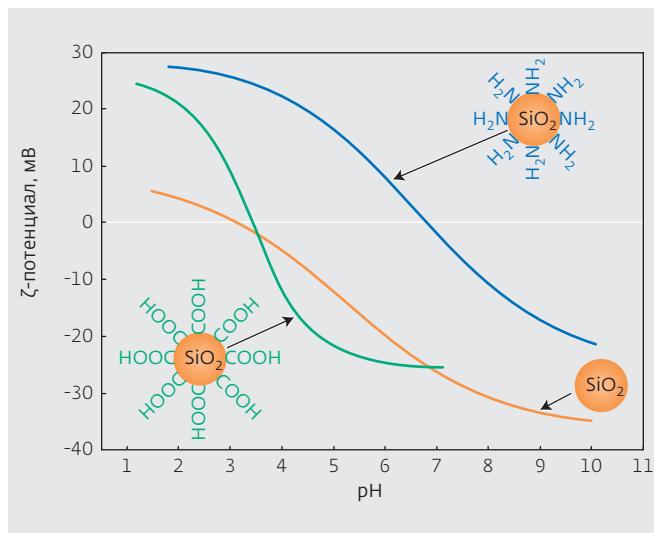


Рис.2. ξ -потенциал немодифицированных и модифицированных SiO_2 -наночастиц как функция pH

Функциональность антител на поверхности наночастиц проверена с помощью биологических тестов. Для этого люминесцирующие функционализированные наночастицы были модифицированы как полными антителами, так и рекомбинантными вариабельными фрагментами (single chain Fv).

ИММУННО-ДЕТЕКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ

Для тестирования процесса формирования комплекса антиген-антитело использовались маркированные карбоксиродамином SiO_2 -наночастицы. В качестве ассоциированного с опухолью целевого антигена был выбран рецептор CD30, сильно экспрессированный на поверхности клеток лимфомы Ходжкина. Рекомбинантный растворимый внеклеточный домен рецептора CD30 – CD30L, а также scFv Ki4, фрагмент антитела с высокой аффинностью, полученный на основе моноклонального антитела анти-CD30, характерны для целевых клеток лимфомы Ходжкина L540. Повышенная концентрация этого биомаркера в крови указывает на наличие заболевания [8, 9]. Наночастицы были функционализированы антителами анти-CD30 Ki4 посредством метода SNAP-Tag, разработанного для прикрепления биомолекул к различным красителям, биотину и другим субстратам [10]. SNAP-Tag получен из человеческого фермента репарации ДНК 0(6)-алкилгуанин ДНК алкилтрансферазы. Этот протеин способен

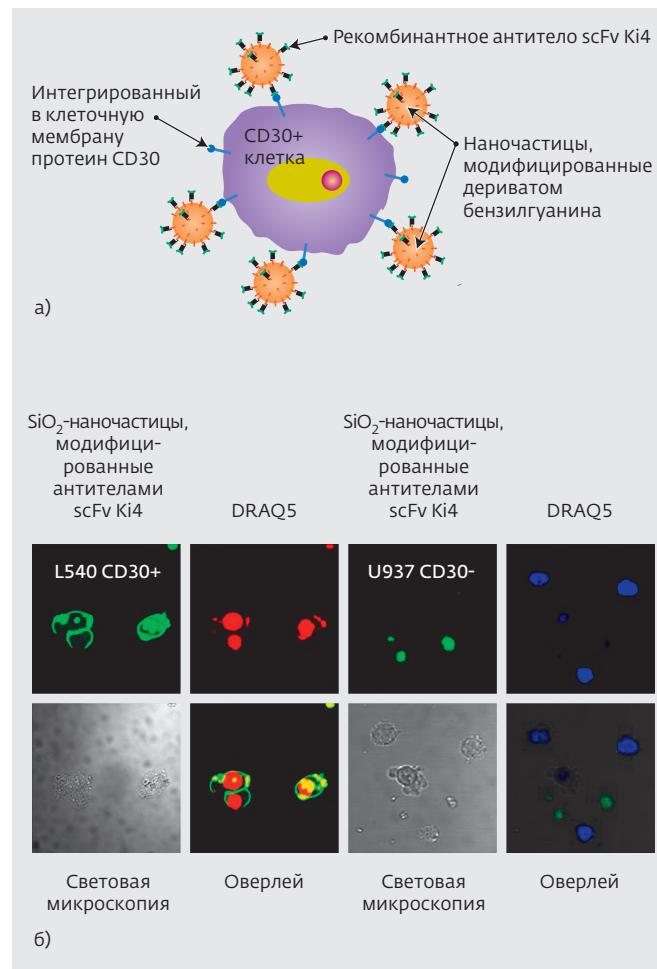


Рис.3. Ориентированная конъюгация

одноцепочечных рекомбинантных антител Ki4 и модифицированных бензилгуанином наночастиц методом SNAP-Tag (а); конфокальная микроскопия распределения люминесцентных SiO_2 -наночастиц, модифицированных Ki4-SNAP, в клетках L540 (модифицированные антителами наночастицы в мемbrane клетки имеют зеленый цвет; ядро клетки подкрашено Draq5 в красный цвет) (б)

быстро и специфично образовывать ковалентную связь с субстратами, содержащими 0(6)-бензилгуанин. Кроме того, метод SNAP-Tag был протестирован в рамках различных экспериментов: создание внутриклеточных меток для протеинов, их иммобилизация на поверхности чипа и т. д.

Эффективность образования комплекса антиген-антитело анализировалась методом конфокальной микроскопии. В ходе эксперимента продемонстрировано специфическое присоединение люминесцирующих наночастиц,



модифицированных рекомбинантными антителами scFv Ki4, к мемbrane клеток L540, экспрессирующих рецептор CD30 (рис.3). При анализе клеток CD30-U937 (отрицательный контроль) взаимодействия наночастиц с мембраной клетки не наблюдалось.

Все вышеизложенное подтверждает, что наночастицы специфично связываются с опухолевыми маркерами, интегрированными в мембрану клетки в результате образования комплекса антитело-антigen.

В течение последних лет успешно испытаны отдельные модули интегрированной микрофлюидной диагностической системы с использованием молекулярных маркеров, присутствующих в малых концентрациях в сыворотке крови пациентов. Многофункциональные SiO_2 -наночастицы обеспечивают конъюгацию маркерспецифических антител или соответствующих антигенов. Это подтверждает факт целенаправленного присоединения антитела к поверхности такой частицы. Кроме того, продемонстрировано, что после подобного присоединения антитела остаются активными и способны связывать различные антигены-биомаркеры. Также была показана возможность адаптации многофункциональных наночастиц к сензору

и микрофлюидным каналам диагностической системы. Визуальное подтверждение успешного присоединения антитела к наночастицам открывает новые возможности по использованию оптических сенсорных систем.

Литература

1. Stoeber W. et al. – J. Colloid Interface Sci., 1968, v.26, p.62.
2. Gellermann C. et al. – J. Sol-Gel Sci. Technol., 1997, v.8, p.173.
3. Van Blaaderen A. et al. – J. Colloid Interface Sci., 1993, v.156, p/1.
4. Waddell T.G. et al. – J. Am. Chem. Soc., 1981, v.103, p.5303.
5. Zhao X. et al. – Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A , 2004, v.101, p.15027.
6. Schiestel T. et al. – J. Nanosc. Nanotechnol., 2004, v.4, p.504.
7. Udenfriend S. et al. – Science, 1972, v.178, p.871.
8. Huhn M. et al. – Cancer Res., 2001, v.61, p.8737.
9. Klimka A. et al. Br. – J. Cancer, 1999, v.80, p.1214.
10. Kampmeier F. et al. – Bioconjugate Chem., 2009,