

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243672 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437380**

(22) Data zgłoszenia: **2021.03.23**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.09.26 BUP 39/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.09.25 WUP 39/2023**

(51) MKP:

C07K 17/14 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU, Poznań, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ADAM ARON MIELOCH,
Środa Wielkopolska, PL
JAKUB DALIBOR RYBKA, Poznań, PL
FILIP PORZUCEK, Poznań, PL**

(74) Pełnomocnik:

Barbara Urbańska-Łuczak, Poznań, PL

(54) Tytuł:

Nanocząstki hybrydowe wiążące przeciwciała, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie do wiązania specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2

PL 243672 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nanocząstki hybrydowe wiążące przeciwciała, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie do wiązania specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w celach diagnostycznych, do izolacji przeciwciał z osocza lub surowicy.

Znane są mikrocząstki magnetyczne, wykorzystywane do wiązania białek poprzez sekwencję histydyn. Są to rozwiązania dostępne komercyjnie, których sposoby otrzymywania nie są powszechnie dostępne. Rozwiązania te stanowią jeden z elementów składowych wynalazku – magnetyczny rdzeń. Dodatkowo, kluczową przewagą nad rozwiązaniami konkurencyjnymi, jest rozmiar rdzenia, który zachowuje pełną funkcjonalność magnetyczną, przy zwiększonym polu powierzchni w przeliczeniu na jego masę.

Zadaniem magnetycznego rdzenia jest zapewnienie rusztowania dla poszczególnych funkcjonalizacji, a ostatecznie białka wirusowego RBD. Dodatkowo, nadaje on istotną funkcjonalność, którą jest możliwość magnetycznej separacji zarówno na etapie produkcji nanocząstki, jak i jej wykorzystania do selektywnego wiązania specyficznych przeciwciał. Rdzeń wykonany może być z pierwiastków magnetycznych, ich tlenków lub stopów, takich jak np.: Fe, Co, Ni, Fe₃O₄, γ-Fe₂O₃, CoFe₂O₄, FeCo, SmCo, czy NdFeB, opisanych następującej publikacji [1]. W roli rdzenia wykorzystane mogą być nanocząstki o średnicy w przedziale 1 – 100 nm, lub mikrocząstki o średnicy w przedziale >100 nm – 1 μm. W niniejszym wynalazku, w roli magnetycznego rdzenia zastosowano superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (ang. *superparamagnetic iron oxide nanoparticles* – SPIONs) o średnicy 15 nm, które są powszechnie znane i szeroko opisywane w literaturze. Do ich syntezy wykorzystano metodę termicznej dekompozycji prekursora – acaetyloacetonianu żelaza (II) w obecności kwasu oleinowego jako surfaktantu. Przykładowe sposoby otrzymywania nanocząstek tlenku żelaza zostały opisane w niniejszych pozycjach literaturowych [2–5]. O wyborze materiału rdzenia zadecydowały niskie koszty oraz łatwość syntezy, nietoksyczność i szeroka gama możliwych funkcjonalizacji powierzchni. Rozmiar rdzenia został dobrany ze względu na wysoką stabilność koloidalną, superparamagnetyczne właściwości (obserwowane jedynie do ok. 25 nm średnicy nanocząstek tlenku żelaza) oraz optymalny rozmiar w stosunku do białka RBD.

Powłoka z ligandu chelatującego. Bezpośrednio po syntezie, nanocząstki posiadają na powierzchni reszty kwasu oleinowego, przez co są hydrofobowe. Na tym etapie przeprowadzana jest wymiana ligandu z kwasu oleinowego na ligand chelatujący, w tym przypadku kwas nitrylotrójoctowy (NTA) (PubChem ID: 57652424) lub kwas N_α,N_{α'}-Bis(karboksymetyl)-L-lizynowy (NTA-L) (PubChem ID: 57647179). Podstawowym zadaniem ligandu chelatującego jest związanie jonów Ni²⁺. Poza wymienionymi związkami, do tego celu wykorzystany może być również kwas iminodioctowy (IDA), lub inne pochodne wymienionych związków. Protokół funkcjonalizacji został opracowany na podstawie podanej publikacji, jednakże został zmodyfikowany i zoptymalizowany [6]. Właściwości chelatujące NTA i NTA-L zostały opisane w następujących pozycjach literaturowych [7, 8]. Rolą powłoki z ligandu chelatującego jest nadanie właściwości hydrofilowych oraz związanie jonów Ni²⁺, stanowiących łącznik pomiędzy nanocząstką, a sekwencją HisTag.

HisTag jest to sekwencja sześciu histydyn, zdolna do chelatowego wiązania jonów Ni²⁺. W inżynierii białek jest ona często wykorzystywana w procesie oczyszczania. Sekwencja HisTag może być wprowadzona zarówno na końcu C jak i N sekwencji białka. Szczegółowy opis tego rozwiązania znajduje się w pozycjach [9–11].

Białko RBD (ang. *Receptor Binding Domain*) jest częścią białka szpicowego S (ang. *Spike protein*) wirusa SARS-CoV-2, odpowiedzialną za wiązanie do powierzchniowego receptora ACE2. Proces wiązania domeny RBD do receptora ACE2 jest niezbędny do wnिकnięcia wirusa do wnętrza komórki. Dlatego też domena RBD stanowi kluczowe miejsce wiązania przeciwciał anty-SARS-CoV-2, które uniemożliwiają wnikanie wirusa do komórki [12, 13]. Wynalazek wykorzystuje natywną sekwencję białka RBD, zmodyfikowaną jedynie o HisTag. Tego typu podejście jest szeroko stosowane w inżynierii białek.

Celem wynalazku jest specyficzne, efektywne i ekonomiczne wiązanie przeciwciał anty-SARS-CoV-2 z osocza oraz surowicy zarówno ludzkiej jak i zwierzęcej.

Istotą wynalazku są nanocząstki hybrydowe wiążące przeciwciała, które składają się z magnetycznego rdzenia wykonanego z pierwiastków magnetycznych, ich tlenków lub stopów, takich jak Fe albo Co, albo Ni, albo Fe₃O₄, albo γ-Fe₂O₃, albo CoFe₂O₄, albo FeCo, albo SmCo, albo NdFeB o średnicy w zakresie 1 – 100 nm, lub mikrocząstki o średnicy w przedziale >100 nm – 1 μm, z hydrofilową

powłoką chelatującą jony nikiel Ni^{2+} , związaną elektrostatycznie z powierzchnią rdzenia poprzez jony tetrafluoroboranowe BF_4^- , wykonaną z kwasu nitrylotrójoctowego (NTA) albo kwasu N_{α}, N_{α} -Bis(karbo-kSYMetyl)-L-lizynowego, albo kwasu iminodiocetowego (IDA) albo ich pochodnych, które z kolei połączone są z płaszczem białkowym poprzez sekwencje histydyn mające właściwości chelatowego wiązania jonów nikiel Ni^{2+} , inkorporowanych wewnątrz powłoki chelatującej.

Sposób ich wytwarzania polega na tym, że proces składa się 4 etapów i tak w **pierwszym etapie** otrzymuje się nanocząstki tlenku żelaza w następujący sposób: 2–8 mmoli $Fe(acac)_3$ korzystnie 6 mmoli, i 12–20 korzystnie 18 mmoli kwasu oleinowego rozpuszcza się w 30–60 korzystnie 40 ml 1-oktadekenu, przy czym reakcję prowadzi się przy ciągłym mieszaniu w atmosferze azotu, w podwyższonej temperaturze do $220^{\circ}C$, którą utrzymuje się przez 1 godzinę, następnie temperaturę zwiększa się do $320^{\circ}C$ i utrzymuje przez 1 godzinę, dalej po syntezie roztwór pozostawia się do ostygnięcia do temperatury otoczenia, a następnie dodaje się 150–350 korzystnie 200 ml roztworu do przemywania, którego stanowi 3:1 obj./obj. 2-butanolu i toluenu, dalej otrzymaną mieszaninę umieszcza się na magnesie neodymowym i pozostawia do wytrącenia nanocząstek, po czym supernatant usuwa się i wprowadza świeży roztwór do przemywania, przy czym do ponownego zawieszenia nanocząstek stosuje się kąpiel sonikacyjną, a etap mycia wykonuje się trzykrotnie, zaś w ostatnim etapie nanocząstki zawieszają się w 20 ml chloroformu, w **drugim etapie** przeprowadza się funkcjonalizację z wykorzystaniem NTA lub NTA-L w następujący sposób: otrzymane nanocząstki zawieszają się w 3–10 korzystnie 5 ml chloroformu do otrzymania stężenia nanocząstek 5 mg/ml, następnie przygotowuje się 3–10 korzystnie 5 ml roztworu $NOBF_4$ o stężeniu 0,01 M w acetonitrylu, po czym obydwa roztwory łączy się i miesza do ujednoczenia w temperaturze pokojowej, a otrzymany roztwór poddaje magnetycznej separacji, aż do całkowitego wyklarowania roztworu, dalej supernatant zlewa się, a osad zawieszają w 10 ml DMSO, przy czym proces magnetycznej separacji i zawieszania w DMSO powtarzają się trzykrotnie do oczyszczenia próbki, następnie tak przygotowany roztwór nanocząstek poddaje się funkcjonalizacji, dalej przygotowuje się roztwór NTA lub NTA-L w DMSO poprzez rozpuszczenie 5–60 korzystnie 20 mg substancji w 10 ml DMSO, po czym roztwór nanocząstek łączy się z roztworem NTA lub NTA-L, dalej wytrząsa przez 1 h do otrzymania nanocząstek SPION-NTA(L), następnie tak otrzymany roztwór poddaje się magnetycznej separacji, dalej zawieszają w 20 ml demineralizowanej wody, przy czym proces powtarza się kilkakrotnie do oczyszczenia próbki, w **trzecim etapie** przeprowadza się proces inkorporacji jonów Ni^{2+} , który polega na tym, że do 5–150 korzystnie 20 ml wodnego roztworu nanocząstek sfunkcjonalizowanych NTA lub NTA-L dodaje się 0,5–15 korzystnie 3 ml wodnego roztworu jonów Ni^{2+} o stężeniu 0,25 M do otrzymania nanocząstki SPION-NTA(L)- Ni^{2+} , po czym tak otrzymany roztwór poddaje się magnetycznej separacji, a następnie zawieszają w 5–150 korzystnie 20 ml demineralizowanej wody, przy czym proces powtarza się kilkakrotnie do uzyskania czystej próbki, w **czwartym etapie** przeprowadza się proces przyłączania białka RBD w następujący sposób: do roztworu nanocząstek SPION-NTA(L)- Ni^{2+} dodaje się roztworu białka RBD posiadającego sekwencję HisTag, w stosunku 2–100 korzystnie 30 μg białka na 1 mg nanocząstek, dalej tak otrzymany roztwór poddaje się magnetycznej separacji, a następnie zawieszają w odpowiedniej objętości demineralizowanej wody, do otrzymania nanocząstek SPION-NTA(L)- Ni^{2+} -RBD w pełni funkcjonalnych i zdolnych do wiązania specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2.

Zastosowanie in vitro nanocząstek hybrydowych do wiązania specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2.

Wynalazek w przykładowym wykonaniu uwidocznił na rysunku, który przedstawia strukturę nanocząstki po związaniu specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2.

Dzięki zastosowaniu rozwiązania według wynalazku uzyskano następujące efekty techniczno-ekonomiczne:

- o możliwość magnetycznej oraz wirówkowej separacji przeciwciał anty-SARS-CoV-2 z osocza oraz surowicy zarówno ludzkiej jak i zwierzęcej,
- o możliwość oczyszczania oraz zateżniania przeciwciał do celów produkcyjnych lub diagnostycznych, bez konieczności wykorzystywania zaawansowanej aparatury (np. chromatograf cieczeniowy, ultrawirówka),
- o substraty wykorzystywane są niedrogie oraz powszechnie dostępne. Stosowanie wynalazku w praktyce produkcyjnej lub diagnostycznej jest ekonomicznie uzasadnione,

- zastosowanie nanocząstki jako magnetycznego rdzenia wiąże się ze zwiększeniem pola powierzchni w stosunku do masy, przez co efektywność wiązania przeciwciał w przeliczeniu na masę jest większa niż w przypadku mikrocząstek,
- wytworzone nanocząstki wykazują większą stabilność w roztworze, co przejawia się dłuższym czasem sedymentacji. Zjawisko to umożliwia efektywniejsze wyłapywanie przeciwciał z roztworu,
- możliwość uzyskania obniżenia ryzyka niespecyficznego wiązania białek, w tym przeciwciał.

Wynalazek ilustrują poniższe przykłady:

Przykład 1

Synteza nanocząstek tlenku żelaza Fe₃O₄

Nanocząstki tlenku żelaza otrzymano w następujący sposób: 2 mmoli Fe(acac)₃ i 18 mmoli kwasu oleinowego rozpuszczono w 30 ml 1-oktadekenu. Reakcję prowadzono przy ciągłym mieszaniu, w atmosferze azotu. Temperaturę roztworu podwyższono do 220°C i utrzymywano przez 1 godzinę. Następnie temperaturę zwiększono do 320°C i utrzymywano przez 1 godzinę. Po syntezie roztwór pozostawiono do ostygnięcia do temperatury otoczenia, dalej dodano 150 ml roztworu do przemywania (3:1 obj./obj. 2-butanolu i toluenu). Otrzymaną mieszaninę umieszczono na magnesie neodymowym i pozostawiono na noc do wytrącenia nanocząstek. Supernatant odrzucono i zastąpiono świeżym roztworem do przemywania. Do ponownego zawieszenia nanocząstek zastosowano kąpiel sonikacyjną. Etap mycia wykonano trzykrotnie. W ostatnim etapie nanocząstki zawieszono w 20 ml chloroformu. Stężenie nanocząstek zmierzono z wykorzystaniem pomiaru termogravimetrycznego. Rozmiar cząstek analizowano za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz oprogramowania ImageJ 1.8. Przeanalizowano 100 cząstek. Średnia średnica = 15,6 ± 0,9 nm. Opisane wyniki przedstawiono w publikacji [5].

Funkcjonalizacja z wykorzystaniem NTA lub NTA-L

Otrzymane nanocząstki zawieszono w 5 ml chloroformu, o finalnym stężeniu 5 mg/ml. Następnie przygotowano 3 ml roztworu NOBF₄ o stęż. 0,01 M w acetonitrylu. Obydwa roztwory złączono i mieszano przez 5 min. w temperaturze pokojowej, po czym otrzymany roztwór poddano magnetycznej separacji, aż do całkowitego wyklarowania roztworu. Następnie supernatant zlano, a osad zawieszono w 3 ml DMSO. Proces magnetycznej separacji i zawieszania w DMSO powtórzono trzykrotnie, w celu oczyszczenia próbki. Tak przygotowany roztwór nanocząstek wykorzystano do dalszej funkcjonalizacji. Następnie, przygotowano roztwór NTA lub NTA-L w DMSO, poprzez rozpuszczenie 20 mg substancji w 10 ml DMSO. Roztwór nanocząstek połączono z roztworem NTA lub NTA-L i wytrąsano przez 1 h, otrzymując nanocząstki SPION-NTA(L). Tak otrzymany roztwór poddano magnetycznej separacji, a następnie zawieszono w 20 ml demineralizowanej wody. Proces powtórzono trzykrotnie celem oczyszczenia próbki.

Inkorporacja jonów Ni²⁺

Do 5 ml wodnego roztworu nanocząstek sfunkcjonalizowanych NTA lub NTA-L dolano 0,5 ml wodnego roztworu jonów Ni²⁺ o stężeniu 0,25 M, otrzymując nanocząstki SPION-NTA(L)-Ni²⁺, dalej otrzymany roztwór poddano magnetycznej separacji, a następnie zawieszono w 5 ml demineralizowanej wody. Proces powtórzono trzykrotnie w celu oczyszczenia próbki.

Przyłączanie białka RBD

W ostatecznej funkcjonalizacji, do roztworu nanocząstek SPION-NTA(L)-Ni²⁺ dodano roztworu białka RBD posiadającego sekwencję HisTag, w stosunku 2 µg białka na 1 mg nanocząstek. Tak otrzymany roztwór poddano magnetycznej separacji, a następnie zawieszono w odpowiedniej objętości demineralizowanej wody. Przygotowane w ten sposób nanocząstki SPION-NTA(L)-Ni²⁺-RBD są funkcjonalne i zdolne do wiązania specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2.

Przygotowanie próbek do testu

Test zaprojektowano tak, aby w pośredni sposób określić zdolność nanocząstek do wiązania przeciwciał, poprzez pomiar spadku ich stężenia w surowicy.

Podwójnie stężone próbki surowicy pozytywnej, wymieszano w stosunku 1:1 z roztworem nanocząstek SPION-NTA(L)-Ni²⁺-RBD, otrzymując finalne rozcieńczenia surowicy 1:10, 1:25 oraz 1:50 dla wersji pokrytej NTA oraz NTA-L. Po wymieszaniu, nanocząstki odseparowano, a otrzymany supernatant zbadano za pomocą testu ELISA.

Przykład 2

Synteza nanocząstek tlenku żelaza Fe_3O_4

Nanocząstki tlenku żelaza otrzymano w następujący sposób: 6 mmoli $\text{Fe}(\text{acac})_3$ i 18 mmoli kwasu oleinowego rozpuszczono w 40 ml 1-oktadekenu. Reakcję prowadzono przy ciągłym mieszaniu, w atmosferze azotu. Temperaturę roztworu podwyższono do 220°C i utrzymywano przez 1 godzinę. Następnie temperaturę zwiększono do 320°C i utrzymywano przez 1 godzinę. Po syntezie roztwór pozostawiono do ostygnięcia do temperatury otoczenia, po czym dodano 200 ml roztworu do przemywania (3:1 obj./obj. 2-butanolu i toluenu). Otrzymaną mieszaninę umieszczono na magnesie neodymowym i pozostawiono na noc do wytrącenia nanocząstek. Supernatant odrzucono i zastąpiono świeżym roztworem do przemywania. Do ponownego zawieszenia nanocząstek zastosowano kąpiel sonikacyjną. Etap mycia wykonano trzykrotnie. W ostatnim etapie nanocząstki zawieszono w 20 ml chloroformu.

Stężenie nanocząstek zmierzono z wykorzystaniem pomiaru termogravimetrycznego. Rozmiar cząstek analizowano za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz oprogramowania ImageJ 1.8. Przeanalizowano 100 cząstek. Średnia średnica = $15,6 \pm 0,9$ nm. Opisane wyniki przedstawiono w spisie literatury, w pozycji [5].

Funkcjonalizacja z wykorzystaniem NTA lub NTA-L

Otrzymane nanocząstki zawieszono w 5 ml chloroformu o stężeniu 5 mg/ml. Następnie przygotowano 5 ml roztworu NOBF_4 o stęż. 0,01 M w acetonitrylu. Obydwa roztwory złączono i mieszano przez 5 min. w temperaturze pokojowej. Otrzymany roztwór poddano magnetycznej separacji, aż do całkowitego wyklarowania roztworu. Następnie supernatant zlano, a osad zawieszono w 10 ml DMSO. Proces magnetycznej separacji i zawieszania w DMSO powtórzono trzykrotnie, w celu oczyszczenia próbki. Tak przygotowany roztwór nanocząstek wykorzystano do dalszej funkcjonalizacji. Następnie, przygotowano roztwór NTA lub NTA-L w DMSO, poprzez rozpuszczenie 20 mg substancji w 10 ml DMSO. Roztwór nanocząstek połączono z roztworem NTA lub NTA-L i wytrząsano przez 1 h, otrzymując nanocząstki SPION-NTA(L). Tak otrzymany roztwór poddano magnetycznej separacji, a następnie zawieszono w 20 ml demineralizowanej wody. Proces powtórzono trzykrotnie celem oczyszczenia próbki.

Inkorporacja jonów Ni^{2+}

Do 20 ml wodnego roztworu nanocząstek sfunkcjonalizowanych NTA lub NTA-L dolano 3 ml wodnego roztworu jonów Ni^{2+} o stężeniu 0,25 M, otrzymując nanocząstki SPION-NTA(L)- Ni^{2+} . Tak otrzymany roztwór poddano magnetycznej separacji, a następnie zawieszono w 20 ml demineralizowanej wody. Proces powtórzono trzykrotnie celem oczyszczenia próbki.

Przylączenie białka RBD

Celem ostatecznej funkcjonalizacji, do roztworu nanocząstek SPION-NTA(L)- Ni^{2+} dodano roztworu białka RBD posiadającego sekwencję HisTag, w stosunku 30 μg białka na 1 mg nanocząstek. Tak otrzymany roztwór poddano magnetycznej separacji, a następnie zawieszono w demineralizowanej wodzie.

Przygotowane w ten sposób nanocząstki SPION-NTA(L)- Ni^{2+} -RBD charakteryzują się funkcjonalnością i są zdolne do wiązania specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2.

Przykład 3

Synteza nanocząstek tlenku żelaza wzbogacanych kobaltem CoFe_2O_4

Nanocząstki tlenku żelaza wzbogacane kobaltem otrzymano w następujący sposób: 6 mmoli $\text{Fe}(\text{acac})_3$ i 2 mmole $\text{Co}(\text{acac})_2$ oraz 20 mmoli kwasu oleinowego rozpuszczono w 60 ml 1-oktadekenu. Reakcję prowadzono przy ciągłym mieszaniu i w atmosferze azotu. Temperaturę roztworu podwyższono do 210°C i utrzymywano przez 1,5 godziny. Następnie temperaturę zwiększono do 320°C i utrzymywano przez 45 minut. Po syntezie roztwór pozostawiono do ostygnięcia do temperatury otoczenia i dodano 350 ml roztworu do przemywania (3:1 obj./obj. 2-butanolu i toluenu). Otrzymaną mieszaninę umieszczono na magnesie neodymowym i pozostawiono na noc, w celu wytrącenia nanocząstek. Supernatant odrzucono i zastąpiono świeżym roztworem do przemywania. Do ponownego zawieszenia nanocząstek zastosowano kąpiel sonikacyjną. Etap mycia wykonano trzykrotnie. W ostatnim etapie nanocząstki zawieszono w 20 ml chloroformu.

Stężenie nanocząstek zmierzono z wykorzystaniem pomiaru termogravimetrycznego. Rozmiar cząstek analizowano za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz oprogramowania ImageJ 1.8. Przeanalizowano 100 cząstek. Średnia średnica = $14,2 \pm 1,1$ nm.

Funkcjonalizacja z wykorzystaniem NTA lub NTA-L

Otrzymane nanocząstki zawieszono w 5 ml chloroformu, o finalnym stężeniu 10 mg/ml. Następnie przygotowano 10 ml roztworu NOBF_4 o stęż. 0,01 M w acetonitrylu. Obydwa roztwory złączono i mieszano przez 5 min. w temperaturze pokojowej. Otrzymano roztwór, który poddano magnetycznej separacji, aż do całkowitego wyklarowania roztworu. Następnie supernatant zlano, a osad zawieszono w 10 ml DMSO. Proces magnetycznej separacji i zawieszania w DMSO powtórzono trzykrotnie w celu oczyszczenia próbki. Tak przygotowany roztwór nanocząstek wykorzystano do dalszej funkcjonalizacji. Następnie, przygotowano roztwór NTA lub NTA-L w DMSO poprzez rozpuszczenie 60 mg substancji w 10 ml DMSO. Roztwór nanocząstek połączono z roztworem NTA lub NTA-L i wytrząsano przez 1 h, otrzymując nanocząstki SPION-NTA(L). Tak otrzymany roztwór poddano magnetycznej separacji, a następnie zawieszono w 20 ml demineralizowanej wody. Proces powtórzono trzykrotnie celem oczyszczenia próbki.

Inkorporacja jonów Ni^{2+}

Do 150 ml wodnego roztworu nanocząstek sfunkcjonalizowanych NTA lub NTA-L dodano 15 ml wodnego roztworu jonów Ni^{2+} o stężeniu 0,25 M, otrzymując nanocząstki SPION-NTA(L)- Ni^{2+} . Tak otrzymany roztwór poddano magnetycznej separacji, a następnie zawieszono w 150 ml demineralizowanej wody. Proces powtórzono trzykrotnie w celu oczyszczenia próbki.

Przylączenie białka RBD

Ostateczna funkcjonalizacja: do roztworu nanocząstek SPION-NTA(L)- Ni^{2+} dodano roztworu białka RBD posiadającego sekwencję HisTag, w stosunku 100 μg białka na 1 mg nanocząstek. Tak otrzymany roztwór poddano magnetycznej separacji, a następnie zawieszono w demineralizowanej wodzie.

Przygotowane w ten sposób nanocząstki SPION-NTA(L)- Ni^{2+} -RBD są w pełni funkcjonalne i zdolne do wiązania specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2.

Przykład 4

Postępujemy jak w przykładzie 1, przy czym zamiast rdzenia wykonanego z Fe_3O_4 wprowadza się rdzeń wykonany z FeCo. Dodatkowo, funkcjonalizację powierzchni rdzenia chelatującą jony Ni^{2+} dokonuje się z wykorzystaniem kwasu iminodiocetowego (IDO). Dalsza część wykonania pozostaje bez zmian.

Przykład 5

Postępujemy jak w przykładzie 3, przy czym zamiast rdzenia wykonanego z CoFe_2O_4 wprowadza się rdzeń wykonany z SmCo. Dodatkowo, funkcjonalizację powierzchni rdzenia chelatującą jony Ni^{2+} dokonuje się z wykorzystaniem kwasu $\text{N}\alpha,\text{N}\alpha$ -Bis(karboksymetyl)-L-lizynowego (NTA-L). Dalsza część wykonania pozostaje bez zmian.

Przykład 6

Postępujemy jak w przykładzie 2, przy czym zamiast rdzenia wykonanego z Fe_3O_4 wprowadza się rdzeń wykonany z NdFeB. Dodatkowo, funkcjonalizację powierzchni rdzenia chelatującą jony Ni^{2+} dokonuje się z wykorzystaniem kwasu iminodiocetowego (IDO). Dalsza część wykonania pozostaje bez zmian.

Przykład 7

Postępujemy jak w przykładzie 2, przy czym zamiast rdzenia wykonanego z Fe_3O_4 wprowadza się rdzeń wykonany z Ni. Dodatkowo, funkcjonalizację powierzchni rdzenia chelatującą jony Ni^{2+} dokonuje się z wykorzystaniem kwasu nitrylotrójoctowego (NTA). Dalsza część wykonania pozostaje bez zmian.

Przykład 8

Postępujemy jak w przykładzie 1, przy czym zamiast rdzenia wykonanego z Fe_3O_4 wprowadza się rdzeń wykonany z Fe. Dodatkowo, funkcjonalizację powierzchni rdzenia chelatującą jony Ni^{2+} dokonuje się z wykorzystaniem kwasu $\text{N}\alpha,\text{N}\alpha$ -Bis(karboksymetyl)-L-lizynowego (NTA-L). Dalsza część wykonania pozostaje bez zmian.

Przykład 9

Postępujemy jak w przykładzie 3, przy czym zamiast rdzenia wykonanego z CoFe_2O_4 wprowadza się rdzeń wykonany z $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Dodatkowo, funkcjonalizację powierzchni rdzenia chelatującą jony Ni^{2+}

dokonywane z wykorzystaniem kwasu $N\alpha, N\alpha$ -Bis(karboksymetyl)-L-lizynowego (NTA-L). Dalsza część wykonania pozostaje bez zmian.

Przykład 10

Postępujemy jak w przykładzie 2, przy czym zamiast rdzenia wykonanego z Fe_3O_4 wprowadza się rdzeń wykonany z NdFeB. Dodatkowo, funkcjonalizację powierzchni rdzenia chelatującą jony Ni^{2+} dokonuje się z wykorzystaniem kwasu iminodiocetowego (IDO). Dalsza część wykonania pozostaje bez zmian.

Przygotowanie próbek do testu na przykładzie nanocząstek SPION-NTA(L)- Ni^{2+} -RBD.

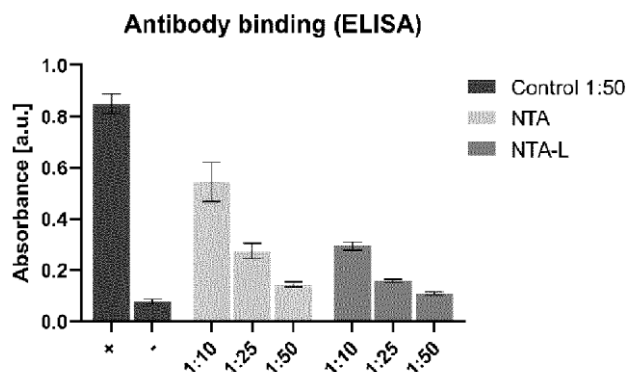
Test zaprojektowano tak, aby w pośredni sposób określić zdolność nanocząstek do wiązania przeciwciał, poprzez pomiar spadku ich stężenia w surowicy.

Podwójnie stężone próbki surowicy pozytywnej wymieszano w stosunku 1:1 z roztworem nanocząstek SPION-NTA(L)- Ni^{2+} -RBD, do otrzymania rozcieńczenia surowicy 1:10, 1:25 oraz 1:50 dla wersji pokrytej NTA oraz NTA-L. Po wymieszaniu, nanocząstki odseparowano, a otrzymany supernatant zbierzano za pomocą testu ELISA.

Podsumowanie wyników:

Zdolność opracowanych nanocząstek do wiązania specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2 potwierdzono z wykorzystaniem testu ELISA, przeprowadzonego w następujący sposób. Według standardowej metodologii opłaszczono płytki 96-dółkowe białkiem RBD. Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 wykrywano z wykorzystaniem II-rzędowego przeciwciała antyludzkiego z przyłączonym enzymem HRP. Jeśli przeciwciała anty-SARS-CoV-2 są obecne w badanej próbce, nastąpi ich przyłączenie do białka RBD immobilizowanego na płytce. Następnie, przeciwciała II-rzędowe przyłącza się do przeciwciał anty-SARS-CoV-2. Po dodaniu substratu, enzym HRP katalizuje reakcję dającą barwny produkt, którego stężenie jest następnie określane metodami kolorymetrycznymi. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano osocze zdiagnozowane jako pozytywne, komercyjnie dostępnym testem antygenowym na obecność przeciwciał anty-SARS-CoV-2. Jako próbkę negatywną wykorzystano surowicę zdiagnozowaną jako negatywną, z użyciem tego samego testu. Rozcieńczenia kontrolne wynosiły 1:50.

Analiza skuteczności wiązania przeciwciał z surowicy:



Wykres 1.

Zgodnie z założeniami, zaobserwowano znaczny spadek sygnału w próbkach pozytywnej surowicy, które miały kontakt z funkcjonalnymi nanocząstkami, co świadczy o tym, że nanocząstki SPION-NTA(L)- Ni^{2+} -RBD związały specyficzne przeciwciała anty-SARS-CoV-2. Na wykresie 1 przedstawiono wyniki testu ELISA na obecność przeciwciał w surowicy po ekspozycji na nanocząstki SPION-NTA-Ni-RBD (NTA) oraz SPION-NTAL-Ni-RBD (NTA-L). Zaobserwowano liniowy spadek sygnału wraz ze spadkiem stężenia surowicy. Na wykresie przedstawiono wyniki testu ELISA, co świadczy o maksymalnym wysyceniu nanocząstek SPION-NTA(L)- Ni^{2+} -RBD, przeciwciałami. Analizy przeprowadzone dla nanocząstek wykonanych z użyciem rdzeni opisanych w przykładach 1–10 wykazały rezultaty zbieżne, potwierdzając możliwość substytucji rdzenia.

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednokierunkowej analizy wariancji (one-way ANOVA). Analiza wykazała wysoką istotność statystyczną ($P < 0,001$) wszystkich prób badanych,

w odniesieniu do kontroli pozytywnej. W odniesieniu do kontroli negatywnej, nie zaobserwowano istotności statystycznej dla próbek: NTA 1:50, NTA-L 1:25, NTA-L 1:50. Uzyskane wyniki wskazują na wysoką skuteczność wiązania przeciwciał anti-SARS-CoV-2 z wykorzystaniem niniejszego wynalazku.

Przykład zastosowania

Przykładem zastosowania jest wiązanie specyficznych przeciwciał anti-SARS-CoV-2 z surowicy ludzkiej. Do kolejnych rozcieńczeń ludzkiej surowicy, pozytywnej na obecność przeciwciał anti-SARS-CoV-2, dodano hybrydowe nanocząstki posiadające białko RBD na powierzchni. Następnie, za pomocą magnetycznej separacji oddzielono nanocząstki z roztworu. Pozostały roztwór poddano analizie metodą ELISA na obecność przeciwciał anti-SARS-CoV-2 (wykres 1).

Zaobserwowano wyraźny spadek ilości przeciwciał w roztworze, wskazujący na ich adsorpcję na powierzchni hybrydowych nanocząstek. Przedstawione wyniki wskazują na zdolność hybrydowych nanocząstek do wiązania specyficznych przeciwciał anti-SARS-CoV-2.

Zastrzeżenia patentowe

1. Nanocząstki hybrydowe wiążące przeciwciała, **znamiennie tym**, że składają się z magnetycznego rdzenia wykonanego z pierwiastków magnetycznych, ich tlenków lub stopów, takich jak Fe albo Co, albo Ni, albo Fe_3O_4 , albo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, albo CoFe_2O_4 , albo FeCo, albo SmCo, albo NdFeB o średnicy w zakresie 1 – 100 nm, lub mikrocząstki o średnicy w przedziale >100 nm – 1 μm , z hydrofilową powłoką chelatującą jony niklu Ni^{2+} , związaną elektrostatycznie z powierzchnią rdzenia poprzez jony tetrafluoroboranowe BF_4^- , wykonaną z kwasu nitrylotrójoctowego (NTA) albo kwasu $\text{N}\alpha, \text{N}\alpha\text{-Bis}(\text{karboksymetyl})\text{-L-lizynowego}$, albo kwasu iminodiocetowego (IDA) albo ich pochodnych, które z kolei połączone są z płaszczem białkowym poprzez sekwencje histydyn mające właściwości chelatowego wiązania jonów niklu Ni^{2+} , inkorporowanych wewnątrz powłoki chelatującej.
2. Sposób wytwarzania nanocząstek hybrydowych wiążących przeciwciała, **znamiennie tym**, że proces składa się 4 etapów i tak w **pierwszym etapie** otrzymuje się nanocząstki tlenku żelaza w następujący sposób: 2–8 mmoli $\text{Fe}(\text{acac})_3$ korzystnie 6 mmoli, i 12–20 korzystnie 18 mmoli kwasu oleinowego rozpuszcza się w 30–60 korzystnie 40 ml 1-oktadekenu, przy czym reakcję prowadzi się przy ciągłym mieszaniu w atmosferze azotu, w podwyższonej temperaturze do 220°C, którą utrzymuje się przez 1 godzinę, następnie temperaturę zwiększa się do 320°C i utrzymuje przez 1 godzinę, dalej po syntezie roztwór pozostawia się do ostygnięcia do temperatury otoczenia, a następnie dodaje się 150–350 korzystnie 200 ml roztworu do przemywania, którego stanowi 3:1 obj./obj. 2-butanolu i toluenu, dalej otrzymaną mieszaninę umieszcza się na magnesie neodymowym i pozostawia do wytrącenia nanocząstek, po czym supernatant usuwa się i wprowadza świeży roztwór do przemywania, przy czym do ponownego zawieszenia nanocząstek stosuje się kąpiel sonikacyjną, a etap mycia wykonuje się trzykrotnie, zaś w ostatnim etapie nanocząstki zawieszają się w 20 ml chloroformu, w **drugim etapie** przeprowadza się funkcjonalizację z wykorzystaniem NTA lub NTA-L w następujący sposób: otrzymane nanocząstki zawieszają się w 3–10 korzystnie 5 ml chloroformu do otrzymania stężenia nanocząstek 5 mg/ml, następnie przygotowuje się 3–10 korzystnie 5 ml roztworu NOBF_4 o stężeniu 0.01 M w acetonitrylu, po czym obydwa roztwory łączy się i miesza do ujednoczenia w temperaturze pokojowej, a otrzymany roztwór poddaje magnetycznej separacji, aż do całkowitego wyklarowania roztworu, dalej supernatant zlewa się, a osad zawieszają w 10 ml DMSO, przy czym proces magnetycznej separacji i zawieszania w DMSO powtórza się trzykrotnie do oczyszczenia próbki, następnie tak przygotowany roztwór nanocząstek poddaje się funkcjonalizacji, dalej przygotowuje się roztwór NTA lub NTA-L w DMSO poprzez rozpuszczenie 5–60 korzystnie 20 mg substancji w 10 ml DMSO, po czym roztwór nanocząstek łączy się z roztworem NTA lub NTA-L, dalej wytrząsa przez 1 h do otrzymania nanocząstek SPION-NTA(L), następnie tak otrzymany roztwór poddaje się magnetycznej separacji, dalej zawieszają w 20 ml demineralizowanej wody, przy czym proces powtarza się kilkakrotnie do oczyszczenia próbki, w **trzecim etapie** przeprowadza się proces inkorporacji jonów Ni^{2+} , który polega na tym, że do 5–150 korzystnie 20 ml wodnego roztworu nanocząstek sfunkcjonalizowanych NTA lub NTA-L dodaje się 0,5–15 korzystnie 3 ml wodnego roztworu jonów Ni^{2+} o stężeniu 0.25 M do otrzymania nanocząstki SPION-NTA(L)- Ni^{2+} , po czym tak otrzymany roztwór poddaje się

- magnetycznej separacji, a następnie zawieszają w 5–150 krotnie 20 ml demineralizowanej wody, przy czym proces powtarza się kilkakrotnie do uzyskania czystej próbki, w **czwartym etapie** przeprowadza się proces przyłączania białka RBD w następujący sposób: do roztworu nanocząstek SPION-NTA(L)-Ni²⁺ dodaje się roztworu białka RBD posiadającego sekwencję HisTag, w stosunku 2–100 krotnie 30 µg białka na 1 mg nanocząstek, dalej tak otrzymany roztwór poddaje się magnetycznej separacji, a następnie zawieszają w odpowiedniej objętości demineralizowanej wody, do otrzymania nanocząstek SPION-NTA(L)-Ni²⁺-RBD w pełni funkcjonalnych i zdolnych do wiązania specyficznych przeciwciał anti-SARS-CoV-2.
3. Zastosowanie in vitro nanocząstek hybrydowych określonych zastrzeżeniem 1 do wiązania specyficznych przeciwciał anti-SARS-CoV-2.

Rysunek

