

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ НАНОЧАСТИЦ
ЗОЛОТА ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ВЫСОКООЧИЩЕННОЙ
БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

Великородная Ю.И., Дворяшина И.А., Антонов В. А.

*Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский
институт гигиены, токсикологии и профпатологии» Федерального медико-
биологического агентства, 400048, г. Волгоград, ул. Землячки, 12,
Тел. (8442) 78-62-57, e-mail: niigtp@rihtop.ru*

Резюме. Цель работы – применение наночастиц золота, обладающие оптимальными параметрами, в качестве площадки для иммобилизации высокоочищенной бутирилхолинэстеразы (воБХЭ). Синтезированы и изучены возможности в качестве матрицы для иммобилизации наночастиц золота следующих форм и размерностей: наносферы 15 нм и 50 нм, а также наностержни 12×46 нм и 20×60 нм.

Изучение активности полученных иммобилизованных форм высокоочищенной бутирилхолинэстеразы в опытах *in vitro* выявило увеличение субстратной активности конъюгатов фермента с золотыми наносферами размерностью 15,1 нм на 28% по сравнению с активностью нативного фермента. Конъюгаты воБХЭ с наночастицами золота диаметром 50 нм были менее активны, но также превышали уровень исходной формы на 8,5%. Использование в качестве матрицы для иммобилизации золотых наностержней приводило к ингибированию активности фермента.

Ключевые слова: высокоочищенная бутирилхолинэстераза, сферические наночастицы золота, золотые наностержни, активность, иммобилизованные ферменты, конъюгация.

**DETERMINATION OF THE GOLD NANOPARTICLES' OPTIMAL
PARAMETERS AS A MATRIX FOR THE IMMOBILIZATION OF HIGHLY
PURIFIED HUMAN BUTYRYLCHOLINESTERASE**

Velikorodnaya Yu.I., Dvoryashina I.A., Antonov V.A.

*Federal State Unitary Enterprise “Research Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational
Pathology” of Medical and Biological Agency, Russia*

Abstract. The purpose of the work is the use of gold nanoparticles having the optimal configuration as a platform for the immobilization of highly purified butyrylcholinesterase

(hpBuChE). The possibilities as a matrix for the immobilization of gold nanoparticles of the following shapes and dimensions were synthesized and studied: nanospheres 15 nm and 50 nm, as well as nanorods 12×46 nm and 20×60 nm.

The study of the activity of the obtained immobilized forms of highly purified butyrylcholinesterase in in vitro experiments revealed the increase in substrate activity of enzyme conjugates with gold nanospheres of 15.1 nm by 28% compared with the activity of the native enzyme. HpBuChE conjugates with gold nanoparticles with a diameter of 50 nm were less active, but also exceeded the initial form by 8.5%. The use of gold nanorods as a matrix for immobilization led to inhibition of enzyme activity.

Key words: highly purified butyrylcholinesterase, spherical gold nanoparticles, gold nanorods, activity, immobilized enzymes, conjugation.

Введение

Основы иммобилизации ферментов на носителях берут начало с 1916 года, когда Nelson и Griffin показали возможность адсорбировать инвертазу на твердой матрице без потери активности фермента [12]. В процессе создания конъюгированных форм ферментов немаловажное значение играет выбор поддерживающей матрицы, к которой предъявляется ряд требований: инертность, биосовместимость, резистентность к микробному загрязнению, отсутствие неспецифической абсорбции и, в идеале, способность увеличивать специфичность/активность фермента. Обычно в качестве подложек используются неорганические (минералы, оксиды металлов, углеродные материалы) и органические (синтетические и биополимеры) соединения. Но в последнее время различные виды наноматериалов все чаще рассматриваются в качестве матрицы для иммобилизации ферментов. Установлено, что наночастицы золота (НЧЗ) легко абсорбируют белковые молекулы с сохранением их физико-химических свойств [17]. Кроме того, есть данные, что ферменты, иммобилизованные на НЧЗ, сохраняют или даже увеличивают свою биокаталитическую активность [4].

Одним из наиболее актуальных для иммобилизации ферментов является сывороточная бутирилхолинэстераза (БХЭ). Интерес именно к БХЭ обусловлен тем, что одно из основных свойств фермента – защита от искусственных и природных ядов и нейротоксинов, т.е. по своей сути он является «биочистильщиком». Их главное достижение заключается в быстром выведении токсинов из циркуляции, избирательность к более токсичным изомерам, отсутствие постэкспозиционной инкапситаии и токсических эффектов, наблюдаемых после использования традиционных антидотов [5].

В число техногенных ядов входят фосфорорганические и карбаматные пестициды, а также препараты антихолинэстеразного действия: донепезил и ривастигмин. В окружающей среде также встречаются яды, обладающие нейротоксическими свойствами: физостигмин (также известный как эзерин), обнаруженный в калабарских бобах, кокаин из растения коки *Erythroxylum*, соланидин в зеленом картофеле, гуперзин А из плауна *Huperzia serrata* и фосфорорганический анатоксин-а(S) в сине-зеленых водорослях. БХЭ инактивирует указанные нейротоксины или с помощью обратимого/необратимого связывания, или путем гидролиза. Многие из этих токсинов, являющихся ингибиторами ацетилхолинэстеразы, также инактивируют и БХЭ, но в данном случае ингибирование фермента не оказывает отрицательного воздействия на организм.

Кроме того, было установлено, что препараты БХЭ хорошо адсорбируются при внутримышечном введении, что очень важно для применения фермента в условиях оказания экстренной помощи.

Цель данной работы заключалась в определении оптимальной конфигурации наночастиц золота в качестве иммобилизационной площадки для высокоочищенной бутирилхолинэстеразы человека.

Материалы и методы

Получение бутирилхолинэстеразы из плазмы крови. Высокоочищенную бутирилхолинэстеразу (воБХЭ) выделяли из плазмы человека по усовершенствованной методике, включающей препаративную анионную и аффинную хроматографии, после которых на выходе получали фермент, содержащий минимум балластных веществ. Основные этапы выделения БХЭ описаны в работе [2].

Синтез наночастиц золота. Исходя из целей и задач данной работы наибольший интерес представляли методы получения зольных форм наночастиц, пригодных для последующей конъюгации с высокоочищенной бутирилхолинэстеразой. Наиболее стабильным и технологичным является метод, при котором в растворе соли того или металла происходит под воздействием восстановителя формирование наночастиц. Изменяя концентрации реагентов, а также физико-химические условия реакции получают частицы определенных форм и размеров. Анализ данных литературы показал, что для иммобилизации бутирилхолинэстеразы оптимальным было бы ее размещение на поверхности наночастиц золота. Выбор обосновывался тем, что этот металл химически и биологически инертен, взвесь нанозолота получают при одноступенчатом процессе и полученный золь устойчив при длительном хранении [1]. Наночастицы многих других металлов и их оксидов, например, серебра, титана, железа,

алюминия, церия и других, обладают токсическими свойствами как *in vitro*, так и *in vivo* [7].

Наночастицы золота синтезированы в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов).

НЧЗ сферической формы размером 15 и 50 нм были получены методом цитратного восстановления золотохлористоводородной кислоты [1].

Наностержни золота синтезировали модифицированным методом Мерфи, проходящим в два этапа [10]. На первом этапе получали зародышевый раствор, в котором ключевыми реагентами являлись золотохлористо-водородная кислота, цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) или цетилтриметиламмоний хлорид (ЦТАХ) и борогидрид натрия. На втором этапе зародышевый раствор смешивали с ЦТАБ/ЦТАХ и аскорбиновой кислотой. Продукт реакции центрифугировали в градиенте глицерина. Был осуществлен синтез наностержней двух размерностей: 12×46 и 20×60 нм.

Получение конъюгатов наночастиц золота с высокоочищенной бутирилхолинэстеразой. Для конъюгации растворы НЧЗ сферической и несферической формы оттитровывали 0,2М раствором K_2CO_3 до достижения $pH = 7,8$.

Конъюгацию проводили смешением на магнитной мешалке зонда, в количестве, соответствующим золотому числу, и золя золота с оптимальным значением $pH = 7,8$. При этом золотой золь добавляли к уже внесенному в колбу зонду. Процесс конъюгации продолжался 10-15 минут.

Определение активности бутирилхолинэстеразы *in vitro*. Определение активности БХЭ производили по оригинальному методу Ellman [6], адаптированному для планшетного фотометра и 48-луночных планшетов. В качестве субстрата для БХЭ использовали 5 мМоль бутирилтиохолинйодид (Sigma). Биохимические реакции ставились в трехкратных повторах при 25° С. Затем, для каждого отдельного случая вычисляли среднее значение.

Результаты исследования

При выполнении процедуры корректировке pH тестируемых НЧЗ обнаружено, что образцы золь сферических наночастиц золота диаметром 15 нм и наностержни, стабилизированные ЦТАБ, не изменяли своих свойств и оставались стабильными в течение длительного срока. В тоже время, при доведении pH золя наночастиц диаметром 50 нм до 7,8 частицы в течение короткого промежутка времени выпадали в осадок. А вот корректировка pH золя наностержней размером 20×60 нм, стабилизированных ЦТАХ, до физиологических значений оказалась невозможна, вследствие сильной кислотности

(рН=1,5) и высокой буферной емкости раствора, что делало невозможным выполнения процедуры конъюгации с ферментом.

Результаты исследования каталитической активности полученных конъюгатов воБХЭ с тестируемыми наночастицами приведены в таблице 1.

Как видно из представленных результатов, наибольшей специфической активностью обладал фермент, иммобилизованный на сферических наночастицах размером 15,1 нм. Так, активность полученного конъюгата оказалась на 28% по сравнению с нативной формой фермента.

Таблица 1 – Сравнительная активность нативной высокоочищенной бутирилхолинэстеразы и ее конъюгатов с различными типами наночастиц золота

Образцы	Специфическая активность, Ед/л	Концентрация белка, мкг/мл	Удельная активность, Ед/мг белка	Изменение активности, % (от 100% контроля)
Нативный фермент	2457,80	11,5	213,72	-
Конъюгат фермент + 15 нм сферы	3149,30	11,5	273,85	+ 128,13%
Конъюгат фермент + 50 нм сферы	2666,30	11,5	231,85	+ 8,5%
Конъюгат фермент +12×46 нм стержни	180,10	11,5	15,65	– 94,3%

При конъюгации воБХЭ со сферическими наночастицами диаметром 50 нм отмечали незначительное увеличение активности фермента (менее 10%). При этом, как было отмечено выше, изменение рН золя до 7,8 приводило к изменению стабильности раствора, в результате чего через 24 часа происходило расслоение конъюгата и частицы выпадали в осадок.

Конъюгирование воБХЭ с несферическими наночастицами оказывало негативное влияние на активности фермента, реализованное практически в его полной инактивации. Предположительно, столь негативное влияние на активность воБХЭ связана с присутствием в среде золя триметиламмоний бромида, который играет значительную роль в стабилизации структуры наностержней.

Обсуждение

На данный момент имеются многочисленные работы, свидетельствующие что модификация БХЭ функциональными материалами, улучшает ее биологические и каталитические свойства. Так, Gaydoss и соавторы [8] описали синтез полиионного комплекса, состоящего из БХЭ, сополимера поли-L-лизина и поли (этиленгликоля), с

расчетным диаметром около 15 нм. В исследовании было продемонстрировано, что инъецированные флуоресцентно-меченные комплексы БХЭ-сополимер мышам в небольшом количестве способны проникать через гемато-энцефалический барьер. В другом исследовании авторы, опираясь на методические подходы Gaydoss синтезировали серию сополимерных комплексов БХЭ сферической формы с медианным диаметром полученных конъюгатов 35 нм. При этом конъюгированная форма БХЭ оказалась чувствительнее к антихолинэстеразному действию параоксона в опытах *in vitro* и устойчивее к действию протеаз и нагреванию по сравнению с нативной формой фермента. [9, 14]. Проводились работы по модификации рекомбинантной димерной формы БХЭ с квантовыми точками CdSe/CdZnS [16]. Полученные конъюгаты сохранили частичную активность фермента и показали сходную чувствительность к параоксону. В другом недавнем исследовании покрытие лошадиной сывороточный БХЭ цвиттер-ионным полимерным гелем [18] приводило к образованию наночастиц диаметром 15-30 нм, которые сопротивлялись инактивации под действием высоких температур и трипсина. Кроме того, связанный с полимером фермент продемонстрировал примерно 3-х кратное увеличение времени циркуляции в кровеносном русле по сравнению со свободной формой фермента, а повторное введение модифицированной БХЭ не вызывало иммунной сенсibilизации. Rahhal и его коллеги [15] сообщили об интересном способе мобилизации лошадиной БХЭ с помощью пресс-формы в виде ламинирующей белковой пленки с размером микрочастиц БХЭ в 1 мкм. После очистки препарат вводили путем инсуффляции, при этом время удержания фермента в легочной ткани через 48-72 ч после введения в трахею было аналогичным, как и у свободного фермента.

При иммобилизации ферментов, важным параметром, во многом определяющим эффективность конъюгата, является форма и размерность наночастиц. Согласно данным исследователей [3, 13] наиболее устойчивыми во внутренних средах организма млекопитающих являются сферические и стержневидные наночастицы золота. Однако, как было показано, использование при синтезе наностержней различных химических соединений в качестве стабилизаторов может оказывать негативное влияние на активность фермента.

Кроме того, при выборе размеров наночастиц для размещения на них фермента необходимо соблюдать определенный баланс. Так, используя самые мелкие формы (до 5 нанометров), получают большую удельную поверхность иммобилизации, однако такие частицы быстро выводятся из кровотока и несут определенные риски повреждения

клеток. Установлено, что минимальным размером для преодоления этих препятствий является величина в 12 нм и более [11], что и подтвердили полученные нами результаты.

Таким образом, результаты исследования продемонстрировали, что в качестве иммобилизационной площадки для размещения высокоочищенной бутирилхолинэстеразы наиболее оптимальными являются сферические наночастицы золота, синтезированные цитратным способом, со средним диаметром 15,1 нм.

Литература

1. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы. М.: Наука, 2008. 319 с.
2. Соколов О.И., Селиванов Н.Ю., Селиванова О.Г., Великородная Ю.И., Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Почепцов А.Я., Филатов Б.Н. Сравнительный анализ Каталитической активности высокоочищенной бутирилхолинэстеразы человека в нативной и конъюгированной с наночастицами золота формах в опытах *in vivo* / Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2017. Т. 64. № 4. С. 90-95. doi: 10.19163/1994-9480-2017-4(64)-90-95.
3. Arnida, Janát-Amsbury M.M., Ray A., Peterson C.M., Ghandehari H. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages / Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011. Vol. 77, N 3. P. 417-423. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.11.010.
4. Ding S., Cargill A.A., Medintz I.L., Claussen J.C. Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation / Curr. Opin. Biotechnol. 2015. Vol. 34. P. 242-250. doi: 10.1016/j.copbio.2015.04.005.
5. Doctor B.P., Saxena A. Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity / Chem-Biol. Interact. 2005. Vol. 157-158. P. 167-171. DOI:10.1016/j.cbi.2005.10.024.
6. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity / Biochemical. Pharmacology. 1961. Vol. 7. P. 88-95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
7. Fard J.K., Jafari S., Eghbal M.A. A Review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles / Adv. Pharm. Bull. 2015. Vol. 5, N 4. P. 447-454. doi: 10.15171/apb.2015.061.

8. Gaydess A., Duysen E., Li Y., Gilman V., Kabanov A., Lockridge O., Bronich T. Visualization of exogenous delivery of nanoformulated butyrylcholinesterase to the central nervous system / *Chem. Biol. Interact.* 2010. Vol. 187. P. 295-298. doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.005.
9. Hester K., Liu J., Flynn N., Sultatos L.G., Geng L., Brimijoin S., Ramsey J.D., Hartson S., Ranjan A., Pope C. Polyionic complexes of butyrylcholinesterase and poly-l-lysine-g-poly(ethylene glycol): comparative kinetics of catalysis and inhibition and in vitro inactivation by proteases and heat / *Chem. Biol. Interact.* 2017. Vol. 275. P. 86-94. doi: 10.1016/j.cbi.2017.07.019.
10. Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods / *J. Phys. Chem. B.* 2001. Vol. 105, N 19. P. 4065-4067. doi.org/10.1021/jp0107964.
11. Longmire M.R., Ogawa M., Choyke P.L., Kobayashi H. Biologically optimized nanosized molecules and particles: more than just size / *Bioconjugate Chem.* 2011. Vol. 22. N 6. P. 993-1000. doi: 10.1021/bc200111p.
12. Nelson J.M., Griffin E.G. Adsorption of Invertase / *J. Am. Chem. Soc.* 1916. Vol. 38. P. 1109-1115. doi: org/10.1021/ja02262a018.
13. Pissuwan D., Niidome T., Cortie M.B. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems / *J. Control Release.* 2011. Vol. 149. P. 65-71. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.12.006.
14. Pope C., Uchea C., Flynn N., Poindexter K., Geng L., Brimijoin W.S., Hartson S., Ranjan A., Ramsey J.D., Liu J. In vitro characterization of cationic copolymercomplexed recombinant human butyrylcholinesterase / *Biochem. Pharmacol.* 2015. Vol. 98. P. 531–539. doi. org/10.1016/j.bcp.2015.10.005.
15. Rahhal T.B., Fromen C.A., Wilson E.M., Kai M.P., Shen T.W., Luft J.C., DeSimone J.M. Pulmonary delivery of butyrylcholinesterase as a model protein to the lung / *Mol. Pharmacol.* 2016. Vol. 13. P. 1626-1635. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00066.
16. Waiskopf N., Shweky I., Lieberman I., Banin U., Soreq H. Quantum dot labeling of butyrylcholinesterase maintains substrate and inhibitor interactions and cell adherence features / *ACS Chem. Neurosci.* 2011. Vol. 2. P. 141-150. doi: 10.1021/cn1000827.
17. Wu C-L., Chen Y-P., Yang J-C., Lo H-F., Long L-L. Characterization of lysine-tagged *Bacillus stearothermophilus* leucine aminopeptidase II immobilized onto carboxylated gold nanoparticles / *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2008. Vol. 54. P. 83-89. doi: 10.1016/j.molcatb.2007.12.024.

18. Zhang P., Jain P., Tsao C., Sinclair A., Sun F., Hung H.C., Bai T., Wu K., Jiang S. Butyrylcholinesterase nanocapsule as a long circulating bioscavenger with reduced immune response / *J. Control. Release*. 2016. Vol. 230. P. 73-78. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.040.

References

1. Dykman L.A., Bogatyrev V.A., Shchegolev S.Yu., Khlebtsov N.G. Gold nanoparticles. – M.: Nauka, 2008. 319 p. [In Russian].
2. Sokolov O.I., Selivanova O.G., Velikorodnaya Yu.I., Dykman L.A., Bogatyrev V.A., Pocheptsov A.Ya., Filatov B.N. Comparative analysis of the catalytic activity of highly purified human butyrylcholinesterase in native and conjugated gold nanoparticles in vivo / *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* = *Journal of Volgograd State Medical University*. 2017. Vol. 64. № 4. P. 90-95. [In Russian]. doi: 10.19163/1994-9480-2017-4(64)-90-95
3. Arnida, Janát-Amsbury M.M., Ray A., Peterson C.M., Ghandehari H. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages / *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011. Vol. 77, N 3. P. 417-423. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.11.010.
4. Ding S., Cargill A.A., Medintz I.L., Claussen J.C. Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation / *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015. V.34. P.242-250. doi: 10.1016/j.copbio.2015.04.005.
5. Doctor B.P., Saxena A. Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity / *Chem-Biol. Interact.* 2005. Vol. 157-158. P. 167-171. DOI:10.1016/j.cbi.2005.10.024.
6. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity / *Biochemical. Pharmacology*. 1961. Vol. 7. P. 88-95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
7. Fard J.K., Jafari S., Eghbal M.A. A Review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles / *Adv. Pharm. Bull.* 2015. Vol. 5, N 4. P. 447-454. doi: 10.15171/apb.2015.061.
8. Gaydess A., Duysen E., Li Y., Gilman V., Kabanov A., Lockridge O., Bronich T. Visualization of exogenous delivery of nanoformulated butyrylcholinesterase to the central nervous system / *Chem. Biol. Interact.* 2010. Vol. 187. P. 295-298. doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.005.

9. Hester K., Liu J., Flynn N., Sultatos L.G., Geng L., Brimijoin S., Ramsey J.D., Hartson S., Ranjan A., Pope C. Polyionic complexes of butyrylcholinesterase and poly-l-lysine-g-poly(ethylene glycol): comparative kinetics of catalysis and inhibition and in vitro inactivation by proteases and heat / *Chem. Biol. Interact.* 2017. Vol. 275. P. 86-94. doi: 10.1016/j.cbi.2017.07.019.
10. Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods / *J. Phys. Chem. B.* 2001. Vol. 105, N 19. P. 4065-4067. doi.org/10.1021/jp0107964.
11. Longmire M.R. Ogawa M., Choyke P.L., Kobayashi H. Biologically optimized nanosized molecules and particles: more than just size / *Bioconjugate Chem.* 2011. Vol. 22. N 6. P. 993-1000. doi: 10.1021/bc200111p.
12. Nelson J.M., Griffin E.G. Adsorption of Invertase / *J. Am. Chem. Soc.* 1916. Vol. 38. P. 1109-1115. doi: org/10.1021/ja02262a018.
13. Pissuwan D., Niidome T., Cortie M.B. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems / *J. Control Release.* 2011. Vol. 149. P. 65-71. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.12.006.
14. Pope C., Uchea C., Flynn N., Poindexter K., Geng L., Brimijoin W.S., Hartson S., Ranjan A., Ramsey J.D., Liu J. In vitro characterization of cationic copolymercomplexed recombinant human butyrylcholinesterase / *Biochem. Pharmacol.* 2015. Vol. 98. P. 531-539. doi. org/10.1016/j.bcp.2015.10.005.
15. Rahhal T.B., Fromen C.A., Wilson E.M., Kai M.P., Shen T.W., Luft J.C., DeSimone J.M. Pulmonary delivery of butyrylcholinesterase as a model protein to the lung / *Mol. Pharmacol.* 2016. Vol. 13. P. 1626-1635. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00066.
16. Waiskopf N., Shweky I., Lieberman I., Banin U., Soreq H. Quantum dot labeling of butyrylcholinesterase maintains substrate and inhibitor interactions and cell adherence features / *ACS Chem. Neurosci.* 2011. Vol. 2. P. 141-150. doi: 10.1021/cn1000827.
17. Wu C-L., Chen Y-P., Yang J-C., Lo H-F. Long L-L. Characterization of lysine-tagged *Bacillus stearothermophilus* leucine aminopeptidase II immobilized onto carboxylated gold nanoparticles / *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2008. Vol. 54. P.83-89. doi: 10.1016/j.molcatb.2007.12.024.
18. Zhang P., Jain P., Tsao C., Sinclair A., Sun F., Hung H.C., Bai T., Wu K., Jiang S. Butyrylcholinesterase nanocapsule as a long circulating bioscavenger with reduced immune response / *J. Control. Release.* 2016. Vol. 230. P. 73-78. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.040.