

УДК 543.054/.645

БЕЛКОВЫЕ МОЛЕКУЛЫ: ШАБЛОНЫ И МАТРИЦЫ В МОЛЕКУЛЯРНОМ ИМПРИНТИНГЕ

© 2023 г. П. С. Пиденко^а, К. Ю. Пресняков^а, Н. А. Бурмистрова^а, *

^аСаратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Институт химии
ул. Астраханская, 83, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: naburmistrova@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2022 г.

После доработки 04.02.2023 г.

Принята к публикации 09.02.2023 г.

В обзоре рассмотрены вопросы молекулярного импринтинга с участием белковых молекул. Проведен анализ работ, опубликованных за последние пять лет в области биоимпринтинга и посвященных определению биомолекул, а также усилению ферментативной активности. Основное внимание уделено импринтингу белковых молекул как методу модификации структуры белковой молекулы за счет образования сайтов связывания в присутствии субстратов (белковыми молекулами с молекулярным отпечатками или импринтированными белками). Показана перспективность импринтинга белковых молекул при решении аналитических задач. Обсуждена неоднозначная трактовка термина “биоимпринтинг” при решении различных задач.

Ключевые слова: биоимпринтинг, молекулярно импринтированные полимеры, импринтированные белки, белки с молекулярными отпечатками, ферментативная активность, биосенсоры.

DOI: 10.31857/S0044450223070125, EDN: VSBGTH

Создание эффективных биомиметических систем молекулярного распознавания является важной и актуальной задачей современной химии. В настоящее время значительное число аналитических исследований, в том числе при доклинической [1], клинической [2] и ветеринарной диагностике [3], проводят с использованием различных форматов иммуноанализа, основанного на применении антител в качестве специфических рецепторных элементов. Несмотря на неоспоримые преимущества антител, существующие ограничения их применения и хранения, обуславливают значительный интерес к созданию искусственных рецепторных систем. Молекулярный импринтинг, основанный на получении молекулярных отпечатков (молекулярно импринтированных полимеров, МИП) различных соединений при синтезе полимерной матрицы в присутствии субстратов, является одной из наиболее эффективных технологий получения специфических сайтов связывания [4–7]. Впервые такого рода материалы, обладающие способностью к повышенной адсорбции отдельных алкилбензолов, были получены русским ученым М.В. Поляковым в 30-е годы прошлого века при полимеризации силикагеля в присутствии соответствующих углеводов [4]. Общая схема синтеза МИП включает сополимеризацию функционального и сшивающего мономеров в присут-

ствии субстратов (молекул шаблонов). Последующее элюирование молекул шаблона из полимерной матрицы позволяет получить структуру, которая характеризуется наличием “молекулярной памяти” по отношению к молекулам шаблона [7]. Достаточная жесткость полимерной структуры, достигаемая за счет перекрестного сшивания, отвечает за сохранение специфического расположения функциональных групп в МИП [8, 9]. Основным преимуществом применения молекулярного импринтинга является универсальность и относительная простота проведения синтеза, высокая стабильность получаемых структур и высокая специфичность сайтов связывания [8].

Традиционно синтез МИП основан на формировании селективных сайтов связывания в присутствии субстратов в органических и неорганических полимерах синтетического и природного происхождения. Альтернативным подходом к синтезу МИП является использование в качестве матрицы молекул белковой природы. Рецепторы, синтезированные таким методом, называют белковыми молекулами с молекулярным отпечатками или импринтированными белками (ИБ). Первоначально термин ИБ использовали для задач, связанных с усилением стабильности [10–12] и активности [10, 12, 13] ферментов. Возможность иммобилизации ИБ на подложках позволила на-

чать применять их для решения аналитических задач. Первым примером применения ИБ в качестве рецепторного элемента распознавания и определения можно считать работу группы Маттиассона [14], опубликованную в 2016 г.

Цель обзора – анализ работ, посвященных решению аналитических задач при использовании молекулярного импринтинга с участием биомолекул как в роли шаблона, так и матричного полимера. Показаны преимущества применения импринтированных белковых молекул как синтетического аналога природных антител при определении низко- и высокомолекулярных веществ.

БИОИМПРИНТИНГ И ИМПРИНТИРОВАННЫЕ БЕЛКОВЫЕ МОЛЕКУЛЫ. ОСОБЕННОСТИ ТЕРМИНОЛОГИИ

Развитие методов молекулярного импринтинга с участием белковых молекул привело к неоднозначному использованию термина “биоимпринтинг”, что вызывает определенные трудности при поиске и анализе литературных данных.

Традиционно в аналитической химии термином “биоимпринтинг” обозначают процессы формирования сайтов связывания, специфичных к веществам и структурам биологического происхождения – биомолекулам [15, 16], клеткам [17, 18], вирусам [19], ДНК и РНК [20–22], бактериям [23]. В то же время понятие “биоимпринтинг” применяют и для описания процесса импринтинга белковых молекул в присутствии субстратов, приводящего к образованию сайтов связывания, используемых для распознавания и определения низко- и высокомолекулярных соединений [14, 15, 24, 25]. Такое толкование обусловлено тем, что техника синтеза ИБ для решения аналитических задач [14] основана на подходах, разработанных ранее для решения задач биокатализа [26], где под “биоимпринтингом” понимают процесс усиления и сохранения активности ферментов, а также модификацию белков для придания им ферментативных свойств [27–29]. Кроме того, при описании модификации белковой структуры в процессе импринтинга также используют понятия “конформационная модификация” [30], “ферментативная память” [31], “импринтированный белок” [11, 32], “аналог переходного состояния (биомолекулярный импринтинг) (transition state analogue (biomolecular imprinting))” [26, 33], “молекулярный (био)импринтинг на основе межфазной активации (interfacial activation-based molecular (bio)-imprinting)” [10].

Таким образом, при решении аналитических задач на основе модификации структуры белковой молекулы за счет импринтинга, вероятно, бо-

лее целесообразно использовать термин “импринтированные белки”, а не “биоимпринтинг”. Процессы синтеза ИБ следует характеризовать в зависимости от типа молекулы шаблона.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ РАСПОЗНАВАНИЕ В АНАЛИЗЕ БИООБЪЕКТОВ (БИОИМПРИНТИНГ)

Современная классификация МИП по типу синтеза включает объемный, поверхностный и эпитопный импринтинг. Ввиду сложностей, возникающих при удалении молекул шаблона из полимерной матрицы, и диффузным ограничениям при образовании комплексов МИП–молекула шаблона, объемный импринтинг не применяется при создании МИП, специфичных к биообъектам. В то же время метод поверхностного импринтинга в случае биообъектов является более эффективным и представляет собой основной метод синтеза биоимпринтированных полимеров.

Ранее опубликованы обзоры работ, рассматривающих возможности применения молекулярного биоимпринтинга для распознавания клеток [17], при разработке биосенсоров [18], а также при решении задач биомедицины и биотехнологии [34, 35]. В данном обзоре рассмотрены работы, посвященные аналитическому применению биоимпринтированных систем (табл. 1).

Биоимпринтинг клеточных структур открывает возможность получения микро- и нанотопографических отпечатков, сохраняющих форму и размер поверхности слоя клеток [40, 41]. При этом процесс биоимпринтинга включает стадии выращивания клеток, внутриклеточной фиксации и заливки полимерным материалом для получения отпечатка. Основными полимерными материалами, используемыми для клеточного биоимпринтинга, являются полидиметилсилоксан, полистирол и полиметакрилат [42]. В плане повышения степени биоразложения и экологичности материала альтернативой могут служить пластмассы на основе казеина, апробированные при получении отпечатков мышечных клеток мыши (миобласты C2C12) [42].

Известны примеры успешного применения биоимпринтинга клеток для решения аналитических задач. Описан [36] метод концентрирования и идентификации микроорганизмов в водных образцах. Предложена оригинальная схема иммуноферментного анализа (**ИФА**), в которой первичные антитела заменены на отпечатки соответствующих бактерий в полидиметилсилоксане и полиуретане, а вторичные антитела – бифункциональными наночастицами SiO₂, конъюгированными с пероксидазой хрена (**ПХ**). Полученные отпечатки обладали высокой специфичностью и позволили увеличить эффективность сорбции со-

Таблица 1. Примеры биоимпринтированных полимеров

Мономер/носитель	Шаблон	c_{\min} /ДОС	ИФ	Метод исследования	Литература
Полиуретан/–	<i>Escherichia coli</i> <i>Rhodococcus rhodochrous</i> <i>Sarcina aurantiaca</i>	–/–	~2	Абсорбционная спектроскопия	[36]
Полиуретан (полиэтиленимин)/–	Микрогранулы полиметилметакрилата	–/–	20	Проточная цитометрия	[37]
3-(Аминопропил)триметоксисилан, тетраэтоксисилан/наночастицы серебра	Двухцепочечная ДНК точечного мутантного гена экзона 21 EGFR	12.5 нМ/ 1.5–93 мкМ	4.1	ЦВА, ДИВА	[20]
1,2-Диаминобензол/графитовый электрод	Судан II (1-(2,4-диметилфенилазо)-2-нафтол)	0.3 нМ/ 1.0–500.0 нМ	–	ЦВА, КВВА	[21]
N,N'-метиленабисакриламид N-изопропилакриламид/эластомерная копия дифракционной решетки	Вирус ямчатости древесины яблони	10 нг/мл/–	–	Лазерный дифракционный анализ	[19]
Толуидиновый синий/золотой электрод	Простат-специфический антиген	–/0.001– 40 мМ	–	ЦВА, ДИВА	[38]
Толуидиновый синий/стеклоуглеродный электрод	Конъюгат простат-специфического антигена с пероксидазой хрена	2.23 нг/мл/ 0.01–100 мкг/мл	–	ДИВА, КВВА, Хроноамперометрия	[16]
1,2-Диаминобензол/модифицированный графитовый электрод	Дофамин	6 нМ/ 20–7000 нМ	–	ЦВА, ДИВА	[22]
Тетраметоксисилан, метилтриметоксисилан, 2-(метокси(полиэтиленокси)пропил)триметоксисилан (олиго(окись этилена)силан)/–	Цитохром С, зеленый флуоресцентный белок, бычий сывороточный альбумин, пероксидаза хрена, глюкозооксидаза, лизоцим	–/–	8	Абсорбционная спектроскопия Флуоресцентная спектроскопия	[39]

Используемые сокращения: ДОС – диапазон определяемых содержаний, АСМ – атомно-силовая микроскопия, ДИВА – дифференциально-импульсная вольтамперометрия, КВВА – квадратно-волновая вольтамперометрия, СЭМ – сканирующая электронная микроскопия, ЦВА – циклическая вольтамперометрия.

ответствующих им бактериальных культур ~ в два раза.

В работе [37] предложена методика направленного выделения раковых клеток из крови, основанная на применении шаблона-имитатора (микроранул полиметилметакрилата) в качестве размерного аналога клеток лейкемии человека (HL60). Синтезированный материал характеризовался высокими характеристиками удерживания клеток и специфичностью. Дополнительное введение модификаторов (1% полиэтиленimina, 3% Полоксамера-407) позволило увеличить эффективность удерживания клетки HL60 в 20 раз. При оптимальной композиции материала удержание клеток HL60 в пять раз превышало этот показатель по сравнению с мононуклеарными клетками периферической крови человека.

Значительный интерес представляет применение метода биоимпринтинга в сочетании с различными связывающими агентами (антителами, аптамерами и пептидами) для решения задач распознавания и захвата циркулирующих опухолевых клеток. Безметочный подход к определению циркулирующих опухолевых клеток поджелудочной железы, выделяемых из здоровых клеток периферической крови, и определение селективности опухолевых клеток-мишеней по отношению к здоровым клеткам крови человека предложены в работе [40]. Многостадийный процесс синтеза молекулярных отпечатков на пленке полиэтилентерефталата позволил получить импринтированный материал, способный захватывать и концентрировать опухолевые клетки поджелудочной железы из смешанной клеточной популяции, который использовали для изоляции клеток опухоли поджелудочной железы от здоровых лейкоцитов.

Примерами применения молекулярного импринтинга при разработке биосенсоров являются работы [20, 21]. Электрохимический нанобиосенсор для определения противоракового препарата гемцитабина на основе взаимодействия с мутантным экзоном 21 гена человека EGFR предложен в работе [20], импринтинг фактор (ИФ) материала составил 4.1. Авторами работы [21] разработана сенсорная система для определения красителя Судан II на основе ДНК-импринтированного поли-*o*-фенилендиамина. Показано, что разработанный ДНК-биосенсор в 1.8 раза эффективнее сорбирует молекулы Судана II и в 2.1 раза меньше сорбирует молекулы Судана I по сравнению с известным аналогом. Это свидетельствует о перспективности предложенного подхода как для повышения сорбционной емкости, так и для улучшения селективности определения.

Достоинством биоимпринтинга является возможность получения “молекулярных отпечатков” и значительно более крупных структур. В ра-

боте [19] использовали гидрогель, синтезированный реакцией окислительной кополимеризации N,N'-метиленбисакриламида, N-изопропилакриламида и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина в присутствии аптамера вируса ямчатости древесины (стебля) яблони для изготовления сенсора. Аналитические характеристики разработанного сенсора (табл. 1) сопоставимы с классическим ИФА и флуоресцентными методами определения.

Биоимпринтинг белков. Анализ работ, посвященных молекулярному импринтингу белковых молекул и их использованию при разработке биосенсоров, дан в обзоре [43]. Сложность молекулярной структуры белковых молекул вызывает определенные трудности при разработке такого типа сенсорных элементов. В то же время известны примеры успешного применения биоимпринтинга при разработке электрохимических сенсоров для определения белковых молекул [16, 38, 44].

Сардаремелли и соотр. [16] разработали биосенсор для определения H₂O₂ в модельных соединениях и в составе плазмы крови человека методами дифференциальной импульсной вольтамперометрии, квадратно-волновой вольтамперометрии и хроноамперометрии. Модификацию стеклоуглеродного электрода биоимпринтированным материалом проводили методом электрополимеризации толуидинового синего в присутствии конъюгата простат-специфического антигена с ПХ. Биосенсор позволил определять H₂O₂ в модельных смесях и искусственно загрязненных образцах плазмы крови человека на уровнях 0.001–40 мМ и 0.005–25 мМ соответственно. Другой пример электрохимического биосенсора для определения H₂O₂ в образце плазмы крови человека, а также ПХ представлен в работе [38]. В качестве подложки для синтеза биоимпринтированного полимера на основе β-циклодекстрина использовали стеклоуглеродный электрод, определение H₂O₂ проводили методом хроноамперометрии при pH 6.98. Последовательную модификацию золотого электрода глутаральдегид-цистеаминовой матрицей и МИП на основе толуидинового синего использовали для определения простат-специфического антигена в образце человеческой плазмы [44].

Авторами работ [16, 38, 44] показано, что аналитические характеристики определения аналитов сопоставимы с известными сенсорными системами. Это свидетельствует о перспективности применения биоимпринтированных полимеров в биомедицинских исследованиях. В то же время отсутствие информации о сорбционных характеристиках материалов не позволяет в полной мере оценить их практическую значимость.

Интересный вариант нестандартной матрицы для биоимпринтинга белков предложен в работе [39]. Палочковидные бактерии *Bacillus subtilis* использовали как носитель при создании

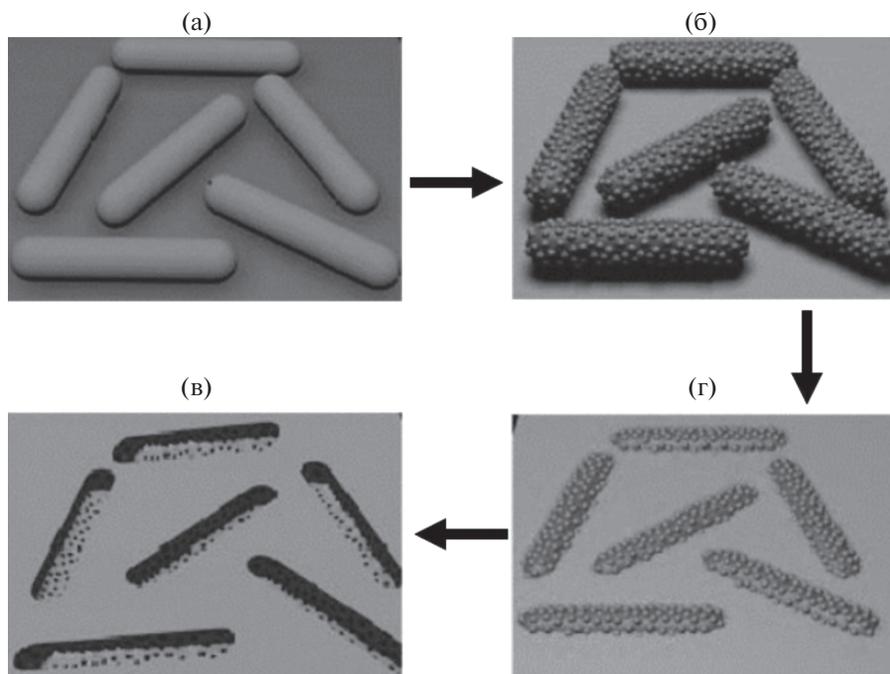


Рис. 1. Схема биоимпринтинга белков с применением бактерий. а – иммобилизация бактерий на поверхности стекла; б – белки, иммобилизованные на поверхности бактерий; в – нанесение кремнеземного золя; г – отпечатки, селективные к белку, образовавшиеся в пленке кремнезема после удаления белковых бактерий. Адаптировано из [39].

микронных отпечатков белков (цитохром С или зеленый флуоресцентный белок) в кремнеземной пленке (рис. 1). Полученный материал характеризовался высоким значением ИФ (8) и специфичностью по отношению к другим белкам, а именно к бычьему сывороточному альбумину (БСА), ПХ, глюкозооксидазе (ГО), лизоциму. Авторами обсуждены причины высокой специфичности синтезированных МИП к цитохрому С.

ИМПРИНТИРОВАННЫЕ БЕЛКОВЫЕ МОЛЕКУЛЫ

Импринтинг белковых молекул – широко распространенная техника в современной энзимологии, биотехнологии и производстве биотоплив. В данном разделе рассмотрена основа этого направления импринтинга, его краткая история и современное состояние. Импринтингом белковых молекул следует считать метод модификации структуры белковой молекулы за счет образования сайтов связывания [45]. Замена органического полимера на белковую молекулу позволяет сохранить общую концепцию молекулярного импринтинга, включающую основные этапы получения селективного сайта связывания и подходы распознавания целевых молекул [14].

Привлекательность использования белковых молекул в молекулярном импринтинге и распознавании обусловлена набором их уникальных свойств [46]. Упорядоченная укладка аминокис-

лотной последовательности формирует трёхмерную структуру белка, характеризующуюся хиральной активностью, включающую в себя щели, полости и набор функциональных групп, способных взаимодействовать как с небольшими лигандами, некоторыми видами поверхностей и с другими биополимерами посредством нековалентных гидрофобных связей. Кроме того, при взаимодействии двух и более структур проявляются кооперативные эффекты, в результате которых система получает новые свойства, отсутствующие у отдельных компонентов [47]. Взаимодействие белка с лигандом приводит к образованию наиболее комплементарного сайта связывания среди энергетически доступных конформационных микросостояний посредством незначительного изменения локальной структуры белка. Это позволяет лигандам вступать во взаимодействие с малоразличимыми конформациями белка. Таким образом, структурная память в таких системах достигается посредством конформационных изменений при образовании комплекса белок–молекула шаблона. Стабилизация и фиксация модифицированной структуры происходит при переводе комплекса в безводные среды [48], а в водных средах за счет использования сшивающих агентов [14].

Считается [8, 46], что первой попыткой создания сайта связывания в белковой молекуле явилась работа Полинга [49], в которой описывался возможный способ *in vitro* получения антител с

необходимой специфичностью из γ -глобулинов быка. Глобулин или другой белок предлагалось [50, 51] поместить в раствор, содержащий антиген, а затем обработать денатурирующим агентом или подвергнуть воздействию, вызывающим раскручивание концов цепи. Устранение влияющих денатурирующих условий приводило к ренатурации цепей и, как следствие, к образованию устойчивой в данных условиях конфигурации, комплементарной антигену и получившей свойства специфического гомологического антитела. В качестве матричного белка использовали бычий γ -глобулин, в качестве антигенов – трифенилэтиленовый краситель метиловый синий и полисахарид пневмококка III типа. Осаждение поликлональных γ -глобулинов полисахаридом пневмококка III типа показало определенную степень селективного распознавания. Считается, что полученные экспериментальные результаты обладают некоторой степенью “сомнительности”; возможно, в связи с этим идея создания искусственных антител трансформировалась в работы Дики [52] по молекулярному импринтингу на основе кремнезема для разделения смеси метилового оранжевого и этилового оранжевого. Несмотря на дальновидность Полинга, первой работой, посвященной применению описанного им подхода, можно считать работу Лиу 2004 г. [26]. В то же время работы по модификации структуры белков техникой “биоимпринтинга” за счет перевода белков в органические среды и, как следствие, усиления ферментативной активности протеазы субтилизина в органических растворителях известны с конца 1980-х годов [31]. В дальнейшем биоимпринтинг успешно применяли для сохранения конформации и химических свойств белковых молекул при глубоком замораживании или осаждении [53], улучшения свойств ферментов в системах без растворителя [12], а также в виде метода импринтирования белковых молекул при создании систем селективного распознавания [54, 55]. К области применения последних относится изготовление клинических лекарств и платформ целевой доставки лекарственных веществ в организме, поскольку получаемые белковые материалы обладают свойствами, аналогичными природным ферментам [56].

Ферментативные системы. Использование биокатализа в органическом синтезе является более эффективной и экологически чистой альтернативой традиционным химическим методам [57, 58]. Биоимпринтинг можно рассматривать как один из существующих в настоящее время экономически выгодных методов получения стабильных ферментов, характеризующихся селективными или энантиоселективными свойствами.

Основные этапы биоимпринтинга ферментов и белков представлены на рис. 2 [58]. образова-

ние комплекса между белковой молекулой и молекулой-шаблоном осуществляется в водном растворе, перевод комплекса в органический растворитель вызывает осаждение импринтированного белка и фиксацию “переходного” состояния. На следующем этапе происходит удаление молекулы шаблона, что приводит к образованию сайта связывания, устойчивого только в безводных растворителях. Водные растворы создают условия для перехода белковой молекулы к первоначальной термодинамически благоприятной конформации и, как следствие, для разрушения сайта связывания. Закс и Клибанов [57–59] используют термин “pH-память”, обозначающий сохранение и проявление ферментами каталитической активности, соответствующей кислотности водного раствора, в котором они находились при импринтинге. Объяснение этого эффекта связано с сохранением ионогенными группами белка состояния ионизации при его дегидратации и помещении в органический растворитель.

Наибольшее распространение среди ферментов, применяемых в биотехнологии, получили липазы [60] благодаря их способности катализировать ряд реакций в различных по составу средах. Тем не менее низкая стабильность и снижение активности в органических средах существенно ограничивает число коммерчески доступных липаз. Например, липаза, продуцируемая дрожжами рода *Candida antarctica*, проявляет ферментативные свойства в органической среде, однако стоимость препарата достаточно высока (2600 \$/кг в 2021 г.) [61]. Биоимпринтинг, наряду с иммобилизацией ферментов [62] и созданием липидного покрытия [63], является одним из методов модификации липаз. В случае использования липаз в качестве матричных молекул требуется межфазная активация, что связано с наличием “крышки”, закрывающей сайт связывания в водной среде и контролирующей доступ субстрата к активному центру [13, 64]. Активация межфазной поверхности двухвалентными катионами, неполярными органическими растворителями и поверхностно-активными веществами способствует повышению каталитических свойств липаз. Кроме того, успешным является применение жирных кислот, являющихся субстратами липаз, в качестве лигандов и соединений, способствующих межфазной активации [13, 48, 65, 66].

Примеры импринтированных липаз представлены в табл. 2. Метод синтеза биоимпринтированных ферментов подробно описан на примере липаз, продуцируемых *Burkholderia cepacia* [66] и *Candida rugosa* [67, 68], ряд карбоновых кислот использовали в качестве молекул шаблонов. Ферментативные свойства верифицировали по реакции переэтерификации винилацетата и бензилового спирта. Модификация липазы методом “биоимпринтинга” позволила увеличить началь-

ную скорость реакции в пять раз по сравнению с неимпринтированной липазой, полученной по аналогичной методике без добавления молекул шаблонов. Наибольшее увеличение скорости реакции показала липаза, модифицированная масляной кислотой, что авторы объясняют сопоставимыми размерами молекулы шаблона и субстрата и, как следствие, достижением наилучшей конформации фермента в процессе биоимпринтинга. При использовании перфторкарбоновых кислот самая высокая скорость наблюдалась для липазы, подвергнутой биоимпринтингу в присутствии пентафторпропионовой кислоты.

Авторами работы [72] предпринята попытка иммобилизации без носителя импринтированной липазы, продуцируемой *Candida rugosa*, для сохранения свойств в водных средах. Биоимпринтинг осуществляли по известной методике [73] с использованием олеиновой кислоты в качестве молекул шаблона, полиэтиленimina как коагрегатора фермента, глутарового альдегида – для ковалентной сшивки. Проведение “биоимпринтинга” и ковалентной сшивки липазы способствовало увеличению ее каталитической активности в реакции гидролиза в 10.4 раза по сравнению с нативной, а также увеличению термостабильности и возможности пятикратного использования без существенного снижения производительности.

Сочетание биоимпринтинга и иммобилизации ферментов открывает возможность выделения фермента после проведения реакции и таким образом его многократного использования; как результат, увеличивается чистота и снижается стоимость целевого продукта [74, 75]. Кроме того, иммобилизованные импринтированные ферменты менее подвержены денатурации, что способствует повышению стабильности при нагревании, по отношению к органическим растворителям и физическому воздействию. Повышенная стабильность ферментов обусловлена увеличением структурной жесткости белка, предотвращающей конформационные изменения, потенциально способные приводить к его инактивации [70].

Влияние иммобилизации на различных носителях (хитозан, полипропиленовые гранулы, полипропиленовый порошок, Assurel MP-1000, Nanomer I.44P, Immobead 150) на активность и стабильность биоимпринтированной рекомбинантной липазы LipC12 в органическом растворителе (*n*-гептан) изучено в работе [60]. Биоимпринтинг липазы LipC12 проводили по одностадийной методике [48], в качестве молекулы шаблона использовали олеиновую кислоту. Увеличение биокаталитической эффективности биоимпринтированной липазы LipC12 в реакции этерификации олеиновой кислоты и 1-пентанола наблюдали для всех исследуемых носителей.

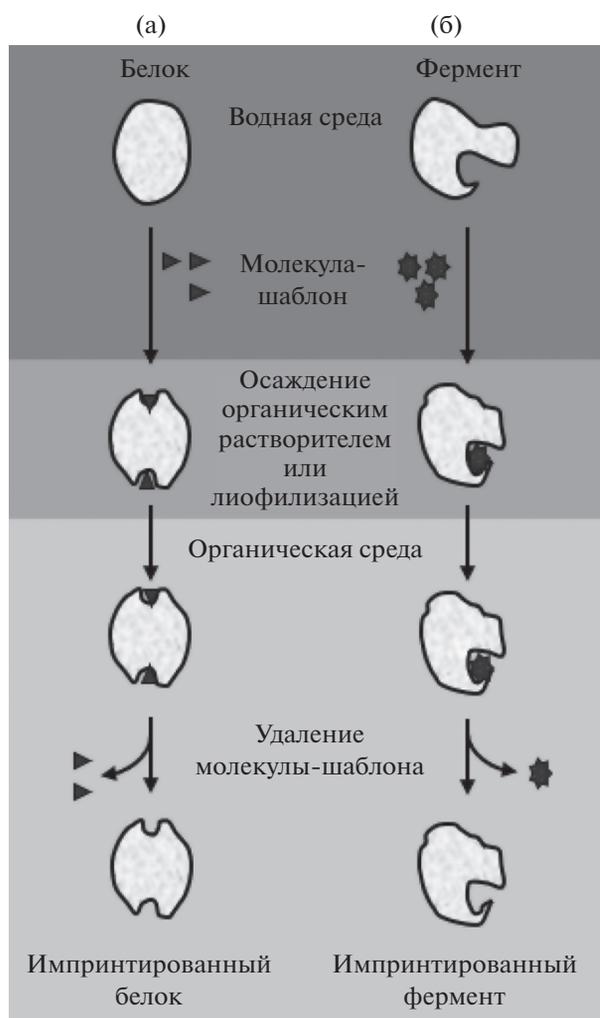


Рис. 2. Основные этапы получения импринтированных белков и ферментов методом биоимпринтинга.

Наибольшее увеличение активности наблюдалось для подложек, обладающих гидрофобными свойствами. Это может быть обусловлено проявлением у олеиновой кислоты свойств поверхностно-активного вещества и, как следствие, улучшением контакта иммобилизационной среды с носителем. Показана возможность многократного использования импринтированной липазы LipC12, иммобилизованной на подложке Immobead 150, при сохранении ферментативной активности (>95% после восьми циклов).

Биоимпринтинг рекомбинантной липазы В, полученной из *Candida antarctica* и экспрессированной в дрожжи семейства *Pichia pastoris*, описан в работе [76]. Биоимпринтинг осуществляли инкубацией предварительно иммобилизованных поперечно-сшитых ферментных агрегатов в присутствии ольванила в качестве молекул шаблона. Показано увеличение ферментативной активности липазы В в 1.6 раза по сравнению с неимприн-

Таблица 2. Импринтированные ферменты

Фермент	Молекула-шаблон	Носитель/ сшивающий агент	ИФ	Метод исследования	Литература
Липаза	<i>Burkholderia seracida</i>	–/–	4–70	Титрование	[48]
	<i>Sus scrofa domestica</i>				
Липаза	<i>Candida rugosa</i>	–/–	3	ВЭЖХ-УФ	[65]
Липаза	<i>Burkholderia seracida</i>	–/–	5	ВЭЖХ-УФ	[66]
Липаза	<i>Candida rugosa</i>	–/–	3–5	ВЭЖХ-УФ	[67]
Липаза	<i>Burkholderia seracida</i>	–/ <i>n</i> -бензохинон	–	ГХ-ПИД, титрование	[27]
Липаза	<i>Candida rugosa</i>	–/глутаровый альдегид	10.4	ГХ-ПИД, ВЭЖХ-МС	[68]
Липаза	<i>Burkholderia seracida</i>	МНЧ/–	54	ВЭЖХ-УФ, титрование	[69]
Липаза	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	–	–	ГХ-ПИД	[28]
Липаза	LipC12	Хитозан, полипропиленовые гранулы и порошок	–	Титрование	[59]
Липаза	<i>Burkholderia seracida</i>	МНЧ, МНЧ@SiO ₂ , УНТ/–	–	ГХ-ПИ/ПФД, титрование	[29]
	<i>Candida rugosa</i>				
	<i>Rhizomucor miehei</i>				
Липаза В	<i>Candida antarctica</i>	–/глутаровый альдегид	13	ВЭТСХ	[70]
Фосфолипаза D	<i>Streptomyces sp. PMF</i>	SiO ₂ НЧ/глутаровый альдегид	14	ВЭЖХ-ИКФС	[71]

Используемые сокращения: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГХ – газовая хроматография; ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография; МНЧ – магнитная наночастица; ПИД – пламенно-ионизационный детектор; ПФД – пламенно-фотометрический детектор; УНТ – углеродные нанотрубки; ИКФС – инфракрасная Фурье-спектроскопия.

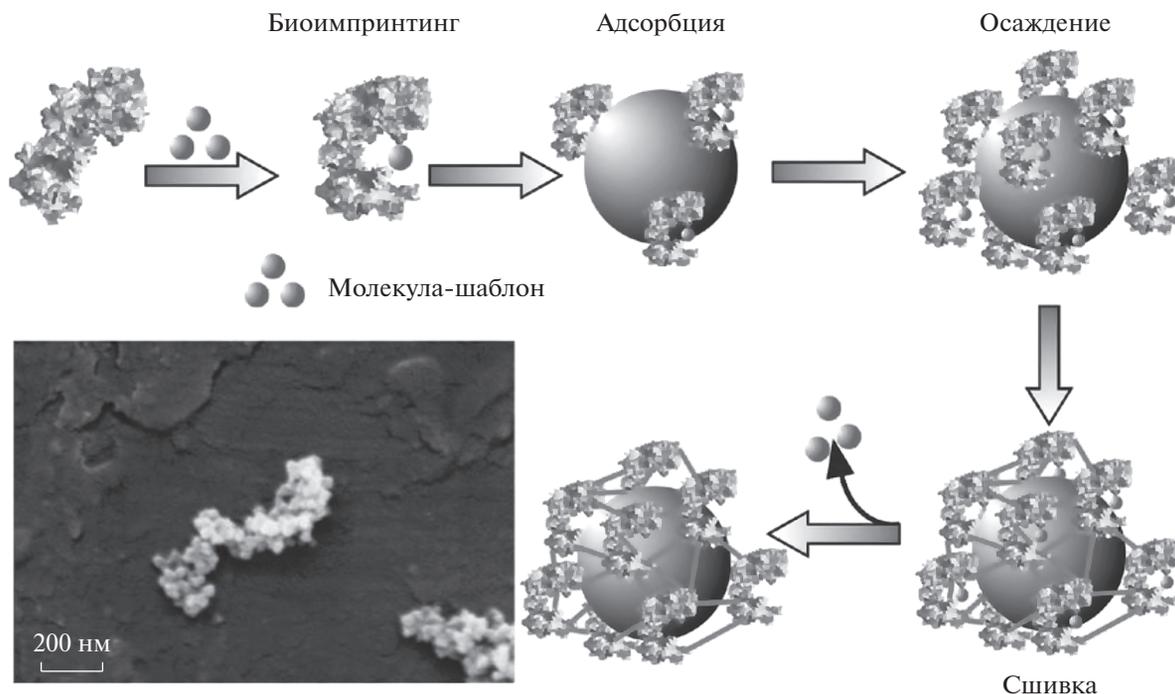


Рис. 3. Схема биопринтинга с адсорбцией и перекрёстной сшивкой. Адаптировано из [77].

тированным аналогом и в два раза по сравнению с коммерческими образцами перекрёстно-сшитой липазы.

Известны примеры иммобилизации биопринтированных молекул на носителях, характеризующихся высокоразвитой удельной поверхностью, таких как мультикапилляры [71] и наночастицы [69, 77]. Адсорбция на магнитных наночастицах липазы, полученной из *Burkholderia ceracia*, биопринтированной винилацетатом, позволила увеличить активность фермента более чем на 10%, повысить выход энантиомера (от 77.4 до 98.8%) и сократить время реакции (с 60 до 20 мин) [77]. Иммобилизованная биопринтированная липаза показала высокую стабильность работы и возможность многократного использования (не менее восьми циклов) в реакции энантиоселективной перэтерификации между рацемическим 1-фенилэтанолом и винилацетатом в гексане и гептане. Пример гиперактивации фосфолипазы D представлен в работе [69]. Биопринтинг фосфолипазы D и ее последующая иммобилизация на поверхности диоксида кремния (рис. 3) позволили в 14 раз увеличить активность белка (166 953 U/г) по сравнению со свободной формой (11 922 U/г), а также обеспечить сохранение конформационных изменений при работе в водных средах.

Приведенные данные показывают, что сочетание современных протоколов импринтинга фер-

ментов с возможностью иммобилизации на поверхности носителей позволяет существенно повысить их ферментативную активность. При этом важное значение имеет величина ИФ полученных систем, которая в данном случае оценивается как отношение ферментативной активности импринтированного и неимпринтированного ферментов (табл. 2). Наиболее высокие значения ИФ отмечены для биопринтированных ферментов, иммобилизованных на поверхности носителя [69]. В связи с этим подобные системы импринтированных белков выглядят наиболее перспективными в качестве рецепторных элементов при разработке биомиметических сенсорных систем.

Рецепторные системы. Оригинальная методика “биопринтинга” овальбумина для придания ему ферментативных свойств глутатион-пероксидазы предложена Лиу в 2004 г. [26] и может считаться предвестником современного применения ИБ как рецепторных систем в аналитической химии. Основными особенностями предложенного подхода являются проведение импринтирования белка в водной среде и использование для фиксации полученной белковой структуры сшивающего агента – глutarового альдегида (рис. 4). Рассматривая этот процесс с точки зрения молекулярного импринтинга, можно сказать, что белковая молекула выступает в роли крупного функционального ко-мономера, а глutarовый альдегид – в роли сшивающего – матричного мо-

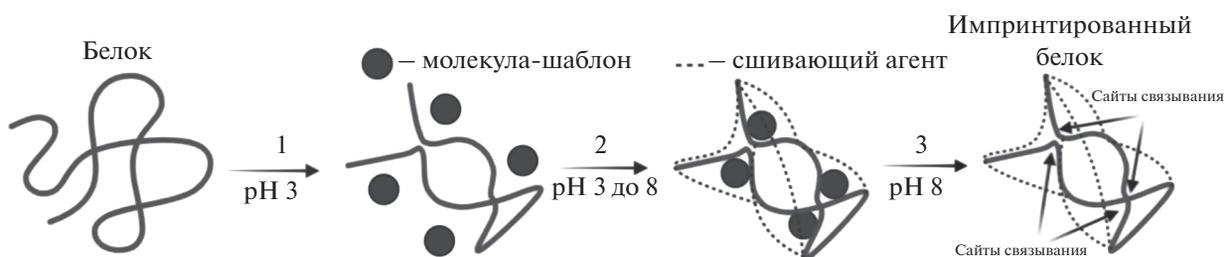


Рис. 4. Схема импринтинга белковых молекул в водной среде.

номера. Это позволяет отнести такой тип биоимпринтинга к классическому молекулярному импринтингу и использовать его терминологию.

Описанный подход получил развитие для решения задач аналитической химии, начиная с 2016 г. [14], в том числе в работах нашей группы [54, 55, 71]. Аналитические характеристики разработанных систем представлены в табл. 3.

Методика синтеза импринтированного овальбумина для определения микотоксина афлатоксина В1 разработана Матиассоном и сотр. [14]. Синтез импринтированного белка включал стадии (1) обратимой денатурации в растворе HCl

(pH 3.0, 10 мин), (2) импринтинга белка в присутствии молекул шаблона (10 мин), (3) ренатурации белка в щелочной среде (при добавлении NaOH до pH 8.0), (4) закрепления полученной структуры белковой молекулы в присутствии сшивающего агента (глутаровый альдегид, 4°C, 12 ч). Молекулы шаблона удаляли из синтезированных ИБ диализом против фосфатно-солевого буферного раствора (10 мМ, pH 7.4, 48 ч). Полученный импринтированный овальбумин успешно использовали для сенсорного определения афлатоксина В1 методом циклической вольтамперометрии. Имобилизацию ИБ проводили на золотом электроде, предварительно модифици-

Таблица 3. Рецепторные системы на основе импринтированных белковых молекул

Белок	Молекула-шаблон	Носитель	Метод исследования	c_{\min} , мкг/л	ДОС, мкг/л	ИФ	Литература
Овальбумин	Афлатоксин В1	Золотой электрод	ЦВА	0.002	1–1000	1.62	[14]
БСА	Зеараленон	МТП	ИБ-ИФА	4	8–500	2.24	[54]
Овальбумин				н/д	н/д	1.80	
ГЛУ	Зеараленон	МТП	ИБ-МФА	н/д	н/д	1.32	[24]
БСА				5	10–290	2.32	
Овальбумин	Дезоксиниваленон	МТП	ИБ-МФА	35	55–420		
Овальбумин	Зеараленон	МОВ, МК	ИБ-ИФА	0.12	1–8	2.05	[74]
Фруктозамин	Липоса-хариды	ФК	Дифракция	0.87	н/д	н/д	[77]
				<i>E. coli</i>	1.22		
Овальбумин	Квакхурин	МТП	ИБ-ИФА	4 мг/л	4.7–75.0 мг/л	1.5	[25]
	Моноклональные антитела против глицирризина	МТП	ИБ-ИФА	0.8 мг/л	2.3–37.5 мг/л	3.12	
ГО	Овальбумин	МТП	ИБ-МФА	6	10–2000	4.7	[29]

Используемые сокращения: ЦВА – циклическая вольтамперометрия; ГЛУ – гемоцианин лимфы улитки; МТП – микро титровальный планшет; ИБ-ИФА – иммуноферментный анализ на основе ИБ; ИБ-МФА – иммунофлуоресцентный анализ на основе ИБ; МОВ – микроструктурный оптический волновод; МК – мультикапилляр; ФК – фотонный кристалл.

рованном самоорганизующимся монослоем альфа-липоевой кислоты и активированном N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом.

Синтез ИБ, специфичных к микотоксину зеараленону, с использованием различных белков (БСА, овальбумина и гемоцианин лимфы улитки) изучен в работе [55]. Сравнение сорбционных характеристик ИБ показало, что наибольшим ИФ (2.2) характеризуется БСА. Имобилизация ИБ на поверхности микропланшета позволила разработать методику определения зеараленона в формате иммуноанализа и показать возможность использования ИБ для замены антител. Валидация разработанной методики проведена на примере искусственно загрязненных образцов пшеницы и кукурузы с использованием ВЭЖХ-МС/МС. Аналитические характеристики сопоставимы с коммерческими тест-системами на основе антител. В дальнейшем работа получила продолжение [24]. Авторами предложен подход к одновременному определению зеараленона и дезоксиэваленола в формате иммунофлуоресцентного анализа на основе ИБ и применению в качестве меток люминесцентных нанокристаллов (квантовых точек) с разными длинами волн испускания (547 и 632 нм). Предложенный подход успешно апробирован при одновременном определении микотоксинов в образцах пшеницы и кукурузы. Аналитические характеристики позволяют контролировать присутствие микотоксинов на уровнях, рекомендованных Европейской Комиссией (ЕК 401/2006).

Нами показана возможность использования ИБ для модификации внутренней поверхности стеклянных микроструктурных оптических волноводов и мультикапилляров [71]. В качестве белка-носителя использовали овальбумин, молекулы шаблона – зеараленон. Показано, что использование высокоэффективных оптических платформ и систем с развитой поверхностью позволяет снизить ϵ_{\min} в 33 раза по сравнению с результатами, полученными на микропланшете.

Определенный интерес в плане применения возможностей ИБ в аналитической химии представляет работа [25]. Авторами проведено систематическое изучение влияния природы белка на свойства ИБ с использованием в качестве молекулы шаблона квакхурин. Установлено, что наилучшие сорбционные и аналитические характеристики достигаются при импринтировании моноклональных антител. Этот факт подтверждает концепцию Полинга по *in vitro* синтезу антител [49–51]. Возможность направленной смены специфичности моноклональных антител с учетом поставленной задачи является перспективным направлением современной биотехнологии. В то же время использование для импринтинга моно-

клональных антител приводит к увеличению стоимости анализа.

В ряде работ для определения биомолекул (биоимпринтинга) в качестве функционального мономера использованы белковые молекулы [14, 24, 25, 54, 55]. По аналогии с синтезом МИП, специфичных к клеточным структурам, предложена оригинальная методика обнаружения грамотрицательных бактерий на основе импринтированного фруктозоамина [78]. Липосахариды, выделенные из бактерий, использованы в качестве молекул-шаблонов, а фотонный кристалл на основе гидрогелей полистирола применен в качестве носителя. Обнаружение бактерий основано на измерении изменения дифракционных характеристик фотонного кристалла. Нами разработана методика синтеза импринтированной ГО, специфичной к овальбумину и ПХ [54]. Возможность прямого определения ПХ на основе хромогенной реакции с 3,3',5,5'-тетраметилбензидином использовали для оптимизации условий импринтинга, которые в дальнейшем применяли для синтеза импринтированной ГО, специфичной к овальбумину.

Представленные работы демонстрируют возможность создания сенсорных элементов на основе ИБ с использованием протоколов, известных для иммунохимических методов анализа. Основным преимуществом ИБ является возможность быстрого получения сенсорного элемента на целевые молекулы, отказа от использования лабораторных животных и сложного оборудования. Немаловажной является также возможность существенного снижения себестоимости анализа по сравнению с иммунохимическими аналогами при многосерийном производстве.

* * *

Синтез белков с молекулярными отпечатками является перспективной альтернативой методам определения и выделения на основе моноклональных и поликлональных антител в формате иммунохимического анализа. При этом возможность интеграции подходов, известных в области молекулярного импринтинга, позволяет получать ИБ, специфичные как к низко-, так и к высокомолекулярным соединениям и характеризующиеся более высокой стабильностью к изменениям температуры и кислотности среды по сравнению с природными антителами. Немаловажным является и тот факт, что ИБ полностью соответствуют принципам “зеленой химии” и теоретически могут быть использованы при проведении аналитических исследований и специфическом выделении молекул-мишеней как в *in vitro*, так и в *in vivo* форматах.

При получении белков с молекулярными отпечатками необходимо учитывать, что важным этапом является подбор белковой молекулы, да-

ющей возможность импринтинга отдельно для каждой молекулы-шаблона, что может занимать значительное время. Отсутствие теоретической базы при выборе белковой матрицы не позволяет в настоящее время говорить о возможности широкого внедрения данной технологии в аналитическую практику.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22–16–00102).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Korbakis D., Schiza C., Brinc D., Soosaipillai A., Karakosta T D., Légaré C., Sullivan R., Mullen B., Jarvi K., Diamandis E.P., Drabovich A.P.* Preclinical evaluation of a TEX101 protein ELISA test for the differential diagnosis of male infertility // *BMC Medicine*. 2017. V. 15. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s12916-017-0817-5>
2. *Chau C.H., Strope J.D., Figg W.D.* COVID-19 clinical diagnostics and testing technology // *Pharmacotherapy*. 2020. V. 40. № 8. P. 857.
<https://doi.org/10.1002/phar.2439>
3. *Saushkin N.Y., Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E.* Strip-dried blood sampling: applicability for bovine leukemia virus detection with ELISA and real-time PCR // *J. Virol. Methods*. 2019. V. 263. P. 101.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.11.004>
4. *Поляков М.В.* Адсорбционные свойства силикагеля и его структура // *Журн. физ. химии*. 1931. Т. 2. № 6. С. 799.
5. *Belbruno J.J.* Molecularly imprinted polymers // *Chem. Rev*. 2019. V. 119. № 1. P. 94.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>
6. *Гендриксон О.Д., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* Молекулярно импринтированные полимеры и их применение в биохимическом анализе // *Успехи биол. химии* 2006. Т. 46. С. 149.
7. *Mosbach K.* Molecular imprinting // *Trends Biochem. Sci*. 1994. V. 19. № 1. P. 9.
8. *Sellergren B.* Molecularly Imprinted Polymers. Man-Made Mimics of Antibodies and their Applications in Analytical Chemistry. (Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry. Netherlands: Elsevier, 2001. 558 p.
9. *Spivak D.A., Shea K.J.* Binding of nucleotide bases by imprinted polymers // *Macromolecules*. 1998. V. 31. № 7. P. 2160.
<https://doi.org/10.1021/ma971310d>
10. *Mingarro I., Abad C., Braco L.* Interfacial activation-based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. № 8. P. 3308.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3308>
11. *Peißker F., Fischer L.* Crosslinking of imprinted proteases to maintain a tailor-made substrate selectivity in aqueous solutions // *Bioorg. Med. Chem*. 1999. V. 7 № 10. P. 2231.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(99\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(99)00156-X)
12. *González-Navarro H., Braco L.* Improving lipase activity in solvent-free media by interfacial activation-based molecular bioimprinting // *J. Mol. Catal. B: Enzym*. 1997. V. 3. № 1. P. 111.
[https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(96\)00038-0](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(96)00038-0)
13. *Fishman A., Cogan U.* Bio-imprinting of lipases with fatty acids // *J. Mol. Catal. B: Enzym*. 2003. V. 22. № 3–4. P. 193.
[https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00032-8](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00032-8)
14. *Gutierrez A.V., Hedström M., Mattiasson B.* Bioimprinting as a tool for the detection of aflatoxin B1 using a capacitive biosensor // *Biotechnol. Rep*. 2016. V. 11. P. 12.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.05.006>
15. *Mujahid A., Iqbal N., Afzal A.* Bioimprinting strategies: From soft lithography to biomimetic sensors and beyond // *Biotechnol. Adv*. 2013. V. 31. № 8. P. 1435.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.06.008>
16. *Sardarelli S., Razmi H., Hasanzadeh M., Shadjou N.* A novel bioassay for the monitoring of hydrogen peroxide in human plasma samples based on binding of horseradish peroxidase-conjugated prostate specific antigen to poly (toluidine blue) as imprinted polymer receptor // *Int. J. Biol. Macromol*. 2020. V. 145. P. 311.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.195>
17. *Piletsky S., Canfarotta F., Poma A., Bossi A.M., Piletsky S.* Molecularly imprinted polymers for cell recognition // *Trends Biotechnol*. 2020. V. 38. № 4. P. 368.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.10.002>
18. *Hasanzadeh M., Shadjou N., de la Guardia M.* Cyto-sensing of cancer cells using antibody-based molecular imprinting: A short-review // *Trends Anal. Chem*. 2018. V. 99. P. 129.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.010>
19. *Bai W., Spivak D.A.* A double-imprinted diffraction-grating sensor based on a virus-responsive super-aptamer hydrogel derived from an impure extract // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 2014. V. 53. № 8. P. 2095.
<https://doi.org/10.1002/anie.201309462>
20. *Shoja Y., Kermanpur A., Karimzadeh F., Ghodsi J., Rafati A.A., Adhami S.* Electrochemical molecularly bioimprinted siloxane biosensor on the basis of core/shell silver nanoparticles/EGFR exon 21 L858R point mutant gene/siloxane film for ultra-sensing of Gemcitabine as a lung cancer chemotherapy medication // *Biosens. Bioelectron*. 2019. V. 145. Article 111611.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111611>
21. *Rezaei B., Boroujeni M.K., Ensafi A.A.* Development of Sudan II sensor based on modified treated pencil graphite electrode with DNA, o-phenylenediamine, and gold nanoparticle bioimprinted polymer // *Sens. Actuators B: Chem*. 2016. V. 222. P. 849.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.09.017>
22. *Rezaei B., Boroujeni M.K., Ensafi A.A.* Fabrication of DNA, o-phenylenediamine, and gold nanoparticle bioimprinted polymer electrochemical sensor for the determination of dopamine // *Biosens. Bioelectron*. 2015. V. 66. P. 490.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.009>
23. *Qi P., Wan Y., Zhang D.* Impedimetric biosensor based on cell-mediated bioimprinted films for bacterial detection // *Biosens. Bioelectron*. 2013. V. 39. № 1. P. 282.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.078>

24. *Beloglazova N., Lenain P., Tessier M., Goryacheva I., Hens Z., De Saeger S.* Bioimprinting for multiplex luminescent detection of deoxynivalenol and zearalenone // *Talanta*. 2019. V. 192. P. 169. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.042>
25. *Sakamoto S., Minami K., Nuntawong P., Yusakul G., Putalun W., Tanaka H., Fujii S., Morimoto S.* Bioimprinting as a receptor for detection of kwakhurin // *Biomolecules*. 2022. V. 12. № 8. Article 1064. <https://doi.org/10.3390/biom12081064>
26. *Liu J., Zhang K., Ren X., Luo G., Shen J.* Bioimprinted protein exhibits glutathione peroxidase activity // *Anal. Chim. Acta*. 2004. V. 504. № 1. P. 185. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00763-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00763-3)
27. *Gao J., Yin L., Feng K., Zhou L., Ma L., He Y., Wang L., Jiang Y.* Lipase Immobilization through the combination of bioimprinting and cross-linked protein-coated microcrystal technology for biodiesel production // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2016. V. 55 № 42. P. 11037. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b03273>
28. *Mukherjee J., Gupta M.N.* Dual bioimprinting of *Thermomyces lanuginosus* lipase for synthesis of biodiesel // *Biotechnol. Rep.* 2016. V. 10. P. 38. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.02.005>
29. *Fan Y., Ke C., Su F., Li K., Yan Y.* Various types of lipases immobilized on dendrimer-functionalized magnetic nanocomposite and application in biodiesel preparation // *Energy and Fuels*. 2017. V. 31. № 4. P. 4372. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b00036>
30. *Keyes M.H., Albert D.E., Saraswathi S.* Enzyme semi-synthesis by conformational modification of proteins // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1987. V. 501 № 1. P. 201. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb45709.x>
31. *Russell A.J., Klibanov A.M.* Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 24. P. 11624. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)37828-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)37828-1)
32. *Ohya Y., Miyaoka J., Ouchi T.* Recruitment of enzyme activity in albumin by molecular imprinting // *Macromol. Rapid Commun.* 1996. V. 17. № 12. P. 871. <https://doi.org/10.1002/marc.1996.030171205>
33. *Slade C.J., Vulfson E.N.* Induction of catalytic activity in proteins by lyophilization in the presence of a transition state analogue // *Biotechnol. Bioeng.* 1998. V. 57. № 2. P. 211. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980120\)57:2<211::AID-BIT9>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980120)57:2<211::AID-BIT9>3.0.CO;2-Q)
34. *Дмитриенко Е.В., Пышная И.А., Мартыанов О.Н., Пышный Д.В.* Молекулярно импринтированные полимеры для биомедицинских и биотехнологических применений // *Успехи химии*. 2016. Т. 85. № 5. С. 513. <https://doi.org/10.1070/RCR4542>
35. *Medlock J., Das A.A.K., Madden L.A., Allsup D.J., Paunov V.N.* Cancer bioimprinting and cell shape recognition for diagnosis and targeted treatment // *Chem. Soc. Rev.* 2017. V. 46. № 16. P. 5110. <https://doi.org/10.1039/c7cs00179g>
36. *Filby B.W., Hardman M.J., Paunov V.N.* Antibody-free bioimprint aided sandwich ELISA technique for cell recognition and rapid screening for bacteria // *Nano Select.* 2020. V. 1. № 6. P. 673. <https://doi.org/10.1002/nano.202000113>
37. *Remaud P., Medlock J., Das A.A.K., Allsup D.J., Madden L.A., Nees D., Weldrick P.J., Paunov V.N.* Targeted removal of blood cancer cells from mixed cell populations by cell recognition with matching particle imprints // *Mater. Chem. Front.* 2020. V. 4. № 1. P. 197. <https://doi.org/10.1039/c9qm00531e>
38. *Sardarelli S., Hasanzadeh M., Razmi H.* Chemical binding of horseradish peroxidase enzyme with poly beta-cyclodextrin and its application as molecularly imprinted polymer for the monitoring of H₂O₂ in human plasma samples // *J. Mol. Recognit.* 2021. V. 34. № 5. Article e2884. <https://doi.org/10.1002/jmr.2884>
39. *Cai W., Li H.H., Lu Z.X., Collinson M.M.* Bacteria assisted protein imprinting in sol-gel derived films // *Analyst*. 2018. V. 143. № 2. P. 555. <https://doi.org/10.1039/c7an01509g>
40. *Pelle M., Das A.A.K., Madden L.A., Paunov V.N.* Bioimprint mediated label-free isolation of pancreatic tumor cells from a healthy peripheral blood cell population // *Adv. Biosyst.* 2020. V. 4. № 11. P. 1. <https://doi.org/10.1002/adbi.202000054>
41. *Sarwar M., Evans J.J.* Bioimprinting: bringing together 2D and 3D in dissecting cancer biology // *BioTechniques*. 2021. V. 71. № 5. P. 543. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0058>
42. *Hashemi A., Nock V., Alkaiji M., Ali A.* Enhancing the resolution of bioimprinted casein microdevices // *Int. J. Nanotechnol.* 2018. V. 15. № 8. P. 676–682. <https://doi.org/10.1504/IJNT.2018.098433>
43. *Ansari S., Masoum S.* Molecularly imprinted polymers for capturing and sensing proteins: current progress and future implications // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 114. P. 29. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.008>
44. *Abbasy L., Mohammadzadeh A., Hasanzadeh M., Razmi N.* Development of a reliable bioanalytical method based on prostate specific antigen trapping on the cavity of molecular imprinted polymer towards sensing of PSA using binding affinity of PSA-MIP receptor: A novel biosensor // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020. V. 188. Article 113447. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113447>
45. *Teke M., Sezgintürk M.K., Dinçkaya E., Telefoncu A.* A bio-imprinted urease biosensor: Improved thermal and operational stabilities // *Talanta*. 2008. V. 74. № 4. P. 661. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.06.031>
46. *Piletsky S.* *Molecular Imprinting of Polymers*. CRC Press, 2006. <https://doi.org/10.1201/9781498713542>
47. *Whitty A.* Cooperativity and biological complexity // *Nat. Chem. Biol.* 2008. V. 4. № 8. P. 435. <https://doi.org/10.1038/nchembio0808-435>

48. *Brandão L.M.S., Barbosa M.S., Souza R.L., Pereira M.M., Lima Á.S., Soares C.M.* Lipase activation by molecular bioimprinting: The role of interactions between fatty acids and enzyme active site // *Biotechnol. Prog.* 2021. V. 37 № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1002/btpr.3064>
49. *Pauling L.* A theory of the formation of antibodies // *J. Am. Chem. Soc.* 1940. V. 372. № 62. P. 2643.
50. *Pauling L., Campbell D.H.* The production of antibodies in vitro // *Science.* 1942. V. 95. № 2469. P. 440. <https://doi.org/10.1126/science.95.2469.440>
51. *Pauling L., Campbell D.H.* The manufacture of antibodies in vitro // *J. Exp. Med.* 1942. V. 76. № 2. P. 211. <https://doi.org/10.1084/jem.76.2.211>
52. *Dickey F.H.* The preparation of specific adsorbents. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1949. V. 35. № 5. P. 227. <https://doi.org/10.1073/pnas.35.5.227>
53. *Li Z., Liu H., Zhao G., Wang P., Wang L., Wu H., Fang X., Sun X., Wu X., Zheng Z.* Enhancing the performance of a phospholipase A1 for oil degumming by bio-imprinting and immobilization // *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2016. V. 123. P. 122. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.11.018>
54. *Pidenko P., Presnyakov K., Beloglazova N., Burmistrova N.* Imprinted proteins for determination of ovalbumin // *Anal. Bioanal. Chem.* 2022. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04009-3>
55. *Pidenko P., Zhang H., Lenain P., Goryacheva I., De Saeger S., Beloglazova N.* Imprinted proteins as a receptor for detection of zearalenone // *Anal. Chim. Acta.* 2018. V. 1040. P. 99. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.062>
56. *Yin Y., Dong Z., Luo Q., Liu J.* Biomimetic catalysts designed on macromolecular scaffolds // *Prog. Polym. Sci.* 2012. V. 37. № 11. P. 1476. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.04.001>
57. *Klibanov A.M.* Improving enzymes by using them in organic solvents // *Nature.* 2001. V. 409. № 6817. P. 241. <https://doi.org/10.1038/35051719>
58. *Zaks A., Klibanov A.M.* Enzyme-catalyzed processes in organic solvents // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. № 10. Article 31923196. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.10.3192>
59. *Zaks A., Klibanov A.M.* Enzymatic catalysis in non-aqueous solvents // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 7. P. 3194. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)69054-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)69054-4)
60. *Sánchez D.A., Alnoch R.C., Tonetto G.M., Krieger N., Ferreira M.L.* Immobilization and bioimprinting strategies to enhance the performance in organic medium of the metagenomic lipase LipC12 // *J. Biotechnol.* 2021. V. 342. P. 13. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.022>
61. *Mustafa A., Niikura F., Pastore C., Allam H.A., Hassan O.B., Mustafa M., Inayat A., Salah S.A., Salam A.A., Mohsen R.* Selective synthesis of alpha monoglycerides by a clean method: Techno-economic and environmental assessment // *Sustain. Chem. Pharm.* 2022. V. 27. Article 100690. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100690>
62. *Almeida F.L.C., Castro M.P.J., Travália B.M., Forte M.B.S.* Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis // *Process Biochem.* 2021. V. 110. P. 37. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.07.005>
63. *Joyce P., Gustafsson H., Prestidge C.A.* Engineering intelligent particle-lipid composites that control lipase-mediated digestion // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2018. V. 260. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.08.001>
64. *Bordes F., Cambon E., Dossat-Létisse V., An dré I., Croux C., Nicaud J.M., Narty A.* Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase enantioselectivity by using mutagenesis targeted to the substrate binding site // *Chem Bio Chem* 2009. V. 10. № 10. P. 1705. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900215>
65. *Yan Y., Zhang X., Chen D.* Enhanced catalysis of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 immobilized on macroporous resin and its application in enrichment of polyunsaturated fatty acids // *Bioresour. Technol.* 2013. V. 131. P. 179. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.092>
66. *Matsumoto M., Matsui E.* Enhanced activities and thermostability of lipase pretreated with carboxylic and perfluorocarboxylic acids in transesterification // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2018. V. 93. № 11. P. 3219. <https://doi.org/10.1002/jctb.5678>
67. *Matsumoto M., Nakao K., Tahara Y.* Effects of imprinting and water activity on transesterification and thermostability with lipases in ionic liquid // *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2021. V. 35. № 1. P. 57. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2020.1899>
68. *Matsumoto M., Hasegawa Y.* Enzymatic kinetics of solvent-free esterification with bio-imprinted lipase // *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2020. V. 33. № 4. P. 495. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2019.1692>
69. *Li B., Duan D., Wang J., Li H., Zhang X., Zhao B.* Improving phospholipase D activity and selectivity by bio-imprinting-immobilization to produce phosphatidylglycerol // *J. Biotechnol.* 2018. V. 281. P. 67. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.06.343>
70. *Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques // *Enzyme Microb. Technol.* 2007. V. 40. № 6. P. 1451. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
71. *Burmistrova N.A., Pidenko P.S., Pidenko S.A., Zacharevich A.M., Skibina Y.S., Beloglazova N.V., Goryacheva I.Y.* Soft glass multi-channel capillaries as a platform for bioimprinting // *Talanta.* 2020. V. 208. Article 120445. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120445>
72. *Sampath C., Belur P.D., Iyyasami R.* Enhancement of n-3 polyunsaturated fatty acid glycerides in sardine oil by a bioimprinted cross-linked *Candida rugosa* lipase // *Enzyme Microb. Technol.* 2018. V. 110. P. 20. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.12.003>
73. *Kahveci D., Xu X.* Enhancement of activity and selectivity of *Candida rugosa* lipase and *Candida antarctica* lipase A by bioimprinting and/or immobilization for application in the selective ethanolysis of fish oil // *Biotechnol. Lett.* 2011. V. 33. № 10. P. 2065. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0671-z>

74. *Sheldon R.A., van Pelt S.* Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how // *Chem. Soc. Rev.* 2013. V. 42. № 15. P. 6223.
<https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>
75. *Cui J.D., Zhang S., Sun L.M.* Cross-Linked enzyme aggregates of phenylalanine ammonia lyase: Novel biocatalysts for synthesis of L-phenylalanine // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. V. 167. № 4. P. 835.
<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9738-0>
76. *Diaz-Vidal T., Armenta-Perez V.P., Rosales-Rivera L.C., Mateos-Díaz J.C., Rodríguez J.A.* Cross-linked enzyme aggregates of recombinant *Candida antarctica* lipase B for the efficient synthesis of olvanil, a nonpungent capsaicin analogue // *Biotechnol. Prog.* 2019. V. 35. № 4. P. 1.
<https://doi.org/10.1002/btpr.2807>
77. *Li K., Wang J., He Y., Cui G., Abdulrazaq M.A., Yan Y.* Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles // *Chem. Eng. J.* 2018. V. 351. P. 258.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.06.086>
78. *Murtaza G., Rizvi A.S., Irfan M., Yan D., Khan R.U., Rafique B., Xue M., Meng Z.S.* Glycated albumin based photonic crystal sensors for detection of lipopolysaccharides and discrimination of gram-negative bacteria // *Anal. Chim. Acta.* 2020. V. 1117. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.018>