

УДК 541.11

## НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЙ СИНТЕЗ ГИБРИДНЫХ НАНОФОРМ НА ОСНОВЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ДИОКСИДИНА И НАНОЧАСТИЦ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МЕТАЛЛОВ (СЕРЕБРО, МЕДЬ), ВКЛЮЧЕННЫХ В БИОПОЛИМЕРНЫЕ КРИОГЕЛИ

© 2019 г. Т. И. Шабатина<sup>a,\*</sup>, О. И. Верная<sup>a</sup>, А. В. Нуждина<sup>a</sup>, В. П. Шабатин<sup>a</sup>,  
А. М. Семенов<sup>b</sup>, М. Я. Мельников<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Химический факультет, Москва, Россия

<sup>b</sup>Биологический факультет, Москва, Россия

\* e-mail: tatyanaashabatina@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.03.2019 г.

После доработки 15.03.2019 г.

Принята к публикации 09.04.2019 г.

Криохимические нанотехнологии использованы для получения гибридных систем на основе антибактериального препарата диоксидина, наночастиц металлов (Ag, Cu) и биополимерных матриц (криогелей) на основе желатина, альгината кальция и хитозана. Согласно данным методов ИК-, УФ-, ЯМР-спектроскопии, ПЭМ, СЭМ, полученные системы представляют собой широкопористые матрицы с диаметром пор от 10 до 200 мкм, в которые включены антибактериальный препарат и наночастицы серебра размером 2–30 нм или меди размером 1–5 нм. Показано, что полученные системы способны обеспечить постепенное высвобождение диоксидина от 40 мин до 3 суток (в зависимости от природы матрицы). Установлена большая активность к подавлению роста *E. coli* 52 и *S. aureus* 144 гибридных композитов на основе металлов и диоксидина, включенных в биополимерные криоструктураты, по сравнению с составляющими их компонентами, включенными в те же матрицы, по отдельности.

**Ключевые слова:** криохимическая модификация, гибридные наносистемы, диоксидин, наночастицы серебра, наночастицы меди, биополимеры, криоструктураты, желатин, альгинат кальция, хитозан

**DOI:** 10.1134/S0044453719100261

Перед выходом на фармацевтический рынок лекарственные препараты проходят длительный и дорогостоящий путь — от синтеза молекулы до проведения клинических испытаний и урегулирования окончательных юридических формальностей. Поэтому в настоящее время актуальны пути оптимизации существующих лекарственных препаратов, создание новых лекарственных форм на их основе. Оптимальная лекарственная форма должна обеспечивать наличие лекарственного вещества только в органе мишени в приемлемой концентрации (выше минимально эффективной концентрации и ниже минимальной токсической концентрации) в течение необходимого времени.

В последние десятилетия нанотехнологии нашли активное применение в различных областях науки, в том числе в медицине, например, для получения наночастиц лекарственных веществ [1, 2]. Одно из наиболее важных направлений исследований — создание систем направленной доставки лекарственных веществ на основе гибридных

наночастиц и нанокомпозитов. Известны примеры использования ряда неорганических наночастиц в комплексных системах с целью повышения эффективности лекарственного препарата [3–8]. Так, одновременное использование систем на основе антибактериальных препаратов и наночастиц золота, серебра или меди позволяет расширить диапазон их применения и активность по сравнению с индивидуальными компонентами [3–6].

Включение магнитных наночастиц в противоопухолевые препараты позволяет совместить гипертермию и химиотерапию и повысить эффективность противоопухолевого лечения [7–9]. Кроме того, при введении лекарственных систем не напрямую в пораженный орган, а перорально или внутривенно необходимо, чтобы они попадали только в патологические ткани и не повреждали здоровые органы. В данном случае идеальная система доставки лекарств должна не превышать размер в 200 нм (для проникновения через биоло-

гические барьеры), содержать активные компоненты, носитель, который обеспечит их высвобождение в пораженном органе, а также поверхностные специфические нацеливающие лиганды – вектора, направляющие полученную систему в орган-мишень. Для направленной доставки в опухолевые клетки используют различные векторы: белки  $\alpha$ -фетопротейн и трансферрин, обладающие сродством к поверхности раковых клеток; пептидный гормон гонадолиберин, способный направить лекарственный препарат к опухолевым клеткам молочной железы, яичников и простаты; моноклональные антитела – к различным рецепторам на поверхности раковых клеток. Также возможно нацеливание систем направленной доставки магнитным полем при использовании в качестве векторов магнитных наночастиц. В качестве носителей для лекарственных форм используют липосомы, мицеллы, мезопористые кремнеземы, наночастицы золота и полимеры.

Кроме того, эффективность лекарственных препаратов повышают, контролируя их концентрацию и высвобождение в целевом органе. Формы контролируемого высвобождения позволяют снизить колебания плазменной концентрации лекарственных препаратов, частоту и интенсивность нежелательных лекарственных реакций, и эти формы более удобны для пациентов, так как требуют меньшей частоты введения. В системе с контролируемым высвобождением биологически активный агент включен в носитель, обычно полимерный материал, который обеспечивает длительное и постоянное выделение лекарственной формы. Скорость высвобождения вещества определяется свойствами самого полимера и слабо зависит от факторов окружающей среды (таких, например, как pH жидкостей организма). Системы с контролируемым высвобождением способны доставлять вещества непрерывно в течение длительного времени от часов до месяцев.

Цель настоящей работы – синтез гибридных наноконструкций на основе антибактериального препарата диоксида и наночастиц металлов (серебра и меди), включение полученных наноконструкций в альгинатные, хитозановые и желатиновые криогели, способные обеспечить их пролонгированное выделение, а также определение антибактериальной активности полученных гибридных лекарственных наноконструкций в отношении бактериальных клеток *E. coli* 52 и *S. aureus* 144.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Субстанцию диоксида, соответствующую фармакопейной статье 42-2308-97, коллоидное серебро марки КНД-С-К (ТУ 9154-024-74107096-2008), хлорид меди II, гидразина гидрат квалификации “ч.д.а.” использовали без дополнительной очистки. Наночастицы меди получали восстанов-

лением водного раствора хлорида меди гидразин-гидратом [10]. Низкотемпературный синтез желатиновых, хитозановых и Са-альгинатных криоструктуратов проводили согласно [11–13].

Высокодисперсный порошок диоксида и гибридные наноконструкты диоксида с наночастицами серебра (Ag/диоксидин) или меди (Cu/диоксидин) получали распылением водного раствора, содержащего диоксидин и наночастицы металла (1 мас. % диоксида, 0.005 мас. % Ag или 0.02 мас. % Cu), через пневматическую форсунку в жидкий азот, затем замороженные растворы подвергали криосублимационной сушке в течение 24 ч [14–16]. Образцы криоструктурированных биополимерных матриц на основе альгината кальция, желатина и хитозана были любезно предоставлены проф. В.И. Лозинским (Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН) [11–13]. Диоксидин, а также наноконструкты Ag/диоксидин, Cu/диоксидин, включали в диски криогелей следующим образом: губчатые диски погружали на 30 мин в водные растворы диоксида и наночастиц металла (1 мас. % диоксида, 0.02 мас. % Ag или 0.02 мас. % Cu), затем диски извлекали из раствора, замораживали жидким азотом и подвергали криосублимационной сушке в течение 24 ч. Полученные образцы на основе альгината кальция (Ag/диоксидин/альгинат, Cu/диоксидин/альгинат) содержали 14 мас. % диоксида и 0.56 мас. % металла, на основе желатина (Ag/диоксидин/желатин, Cu/диоксидин/желатин) содержали 11.5 мас. % диоксида, 0.46 мас. % металла, на основе хитозана (Ag/диоксидин/хитозан, Cu/диоксидин/хитозан) содержали 4.8 мас. % диоксида, 1.5 мас. % металла, согласно результатам атомной абсорбционной спектроскопии, полученным на спектрометре Thermo iCE 3000 spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Рентгенофазовый анализ (РФА) образцов проводили на дифрактометре Rigaku D/MAX-2500 (Rigaku, Япония) на  $\text{CuK}\alpha$ -излучении ( $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$ ). Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР  $^1\text{H}$ ) регистрировали в насыщенном растворе в дейтерированной воде ( $\text{D}_2\text{O}$ ) на ЯМР-спектрометре высокого разрешения VXR-400 фирмы “Varian” (США). ИК-спектры образцов получали в интервале  $4000\text{--}400 \text{ см}^{-1}$  на спектрометре Bruker Tensor II (Германия) с приставкой ATR platinum. Регистрацию ИК-спектров образцов осуществляли по методике диффузного отражения. УФ-спектры водных растворов и экстрактов образцов снимали на спектрофотометре Jasco V-770 (Jasco, Япония) в интервале  $200\text{--}700 \text{ нм}$ . Кинетику высвобождения диоксида из криоструктуратов отслеживали спектрофотометриче-

ски на спектрофотометре Jasco V-770 (Jasco, Япония) при  $\lambda = 375$  нм.

Микроструктуру образцов изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на электронном микроскопе LEO 912 AB Omega (ZEISS, Germany) при увеличениях  $\times 80$ – $\times 500000$  и методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на растровом электронном микроскопе Phenom (FEI Company, Германия) при увеличениях  $\times 20$ – $\times 4000$ . Определение удельной поверхности ( $S_{уд}$ ) образцов проводили методом низкотемпературной адсорбции – тепловой десорбции аргона на лабораторной установке на базе хроматографа Хром 5. Предварительно адсорбированные газы удаляли с поверхности образцов на вакуумной установке. Средний размер частиц ( $a$ ) диоксида рассчитывали по формуле:  $a = 6/\rho S_{уд}$ , где  $\rho$  – плотность диоксида.

Определение антибактериальной активности различных форм диоксида и гибридных наноконструкций Ag/диоксидин и Cu/диоксидин в сравнении с исходным диоксидом и растворами коллоидного серебра и меди осуществляли диско-диффузионным методом [17], с использованием дисков фильтровальной бумаги марки “красная лента” (диаметром 5 мм) и дисков альгинатных, хитозановых и желатиновых криоструктуратов (диаметром 4 и высотой 2 мм). В качестве тест-культур использовали бактериальные клетки, полученные из коллекции бактериальных культур кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова: *E. coli* 52, *S. aureus* 144. Эксперименты проводили в чашках Петри, содержащих 20 мл агаризованной питательной среды, подсушенной в течение суток (толщина слоя среды 4 мм). Измерение зон подавления роста (ЗПР) тест-культур проводили через 24 ч инкубации. Статистически достоверные результаты получали девятикратным повторением измерений ЗПР для каждой серии образцов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### *Гибридные наноконструкты диоксида с наночастицами серебра и меди*

На начальном этапе была проведена модификация диоксида, которая заключалась в микронизации его частиц и включении в них наночастиц серебра и меди. ИК-спектры полученных систем соответствовали ИК-спектрам высокодисперсного диоксида, полученного методом сублимационной сушки [16] (полоса колебания хиноксалинового кольца находится при  $1510\text{ см}^{-1}$ , полосы колебаний C–H бензольного кольца проявляются при  $975$ ,  $113$ ,  $1160\text{ см}^{-1}$ , а полоса колебаний C–O–H – при  $1288\text{ см}^{-1}$ ). Рентгеновские дифрактограммы, а также набор межплоскостных расстояний ( $d$ , Å) и интенсивностей ( $I_{отн}$ , %) со-

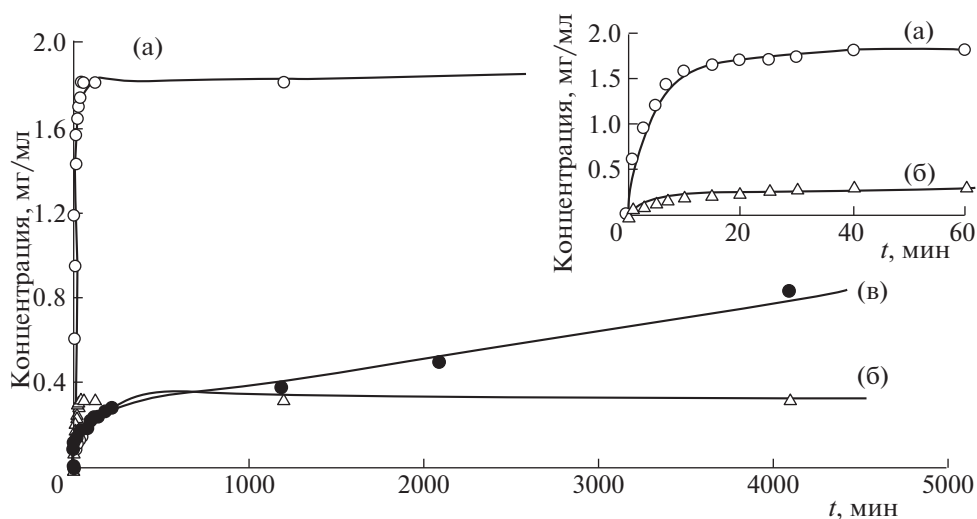
ответствовали той же высокодисперсной форме диоксида [19] ( $d$ , Å –  $I_{отн}$ , %:  $8.740$ – $100.0\%$ ;  $8.026$ – $94.2\%$ ;  $6.899$ – $57.8\%$ ;  $6.288$ – $50.9\%$ ;  $5.978$ – $43.4\%$ ;  $3.358$ – $99.3\%$ ;  $3.304$ – $67.6\%$ ). Отсутствие на рентгеновской дифрактограмме пиков серебра и меди связано с их низким содержанием в образце и малым размером их частиц.

Спектры ЯМР- $^1\text{H}$  полученных гибридных систем ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :  $4.94$ – $5.22$  (m, 4H,  $2^*\text{CH}_2$ ),  $7.85$ – $8.05$  (m, 2H, H Ar),  $8.37$ – $8.52$  (m, 2H, H Ar) соответствовали диоксидину. УФ-спектры водных растворов композитов Ag/диоксидин и Cu/диоксидин соответствуют диоксидину, в них присутствует интенсивная полоса поглощения при  $250$  нм, относящаяся к  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходу электронов атомов углерода ароматической системы, и полоса низкой интенсивности при  $375$  нм, относящаяся к  $n \rightarrow \pi^*$ -переходу. Отсутствие в УФ-спектре водных растворов композитов полос, соответствующих плазмонному поглощению наночастиц серебра и меди, связано как с невысокой интенсивностью поглощений по сравнению с диоксидом, так и малым содержанием наночастиц серебра и меди в образце.

Согласно данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), наноконструкты Ag/диоксидин и Cu/диоксидин состоят из органических частиц (размером  $50$ – $350$  нм), внутрь которых включены наноразмерные частицы серебра (размером  $2$ – $30$  нм) или Cu (размером  $1$ – $5$  нм). Удельная поверхность для композитов Ag/диоксидин составила  $31\text{ м}^2/\text{г}$  (средний размер частиц  $130$  нм), для композитов Cu/диоксидин  $24\text{ м}^2/\text{г}$  (средний размер частиц  $166$  нм), что согласуется с микрофотографиями, полученными методом ПЭМ.

### *Системы на основе гибридных композитов диоксида с наночастицами металлов и биополимерных матриц*

В качестве носителей для лекарственных препаратов используют системы на основе полисахаридов (крахмала, целлюлозы, хитозана, гиалуроновой кислоты, альгината кальция) и белков (протеинов, полипептидов, таких как альбумин, желатин, трансферрин, лактоферрин, шелк, коллаген,  $\beta$ -казеин) [18]. Для оптимизации размера, биоразлагаемости и способности к высвобождению включенных в матрицу соединений биополимеры перед нанесением на них лекарственного препарата подвергают предварительной модификации, которая определяет их размер и внутреннюю пространственную сетку. Для систем контролируемого высвобождения лекарственных веществ биополимеры используются в виде наночастиц и микрочастиц (для перорального и



**Рис. 1.** Кинетические кривые высвобождения диоксида из альгинатной (а), желатиновой (б) и хитозановой (в) матриц.

внутривенного введения в организм) и массивных матриц (гидрогелей или если формирование матрицы протекало при низких температурах — криогелей) для местного применения [19, 20].

Затем гибридные композиты Ag/диоксидин и Cu/диоксидин включали в биополимерные криогели на основе желатина, хитозана и альгината кальция. Включение диоксида в биополимерные матрицы подтверждают ИК-спектры полученных систем, которые представляют суперпозицию ИК-спектров гибридных нанокompозитов и используемой матрицы. Широкие полосы хитозана при  $580\text{ см}^{-1}$ , желатина при  $534\text{ см}^{-1}$  и альгината при  $550\text{ см}^{-1}$  накладываются на несколько более узких полос диоксида. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  экстрактов гибридных систем в  $\text{D}_2\text{O}$  идентичны спектрам ЯМР  $^1\text{H}$  диоксида. УФ-спектры водных экстрактов систем Ag/диоксидин/желатин, Ag/диоксидин/хитозан, Ag/диоксидин/альгинат, Cu/диоксидин/желатин, Cu/диоксидин/хитозан, Cu/диоксидин/альгинат были идентичны УФ-спектрам диоксида. Также спектрофотометрически получены кинетические кривые высвобождения диоксида из биополимерных матриц, которые представлены на рис. 1. Высвобождение диоксида из матриц в зависимости от их природы протекает за время от 40 мин до 3 суток.

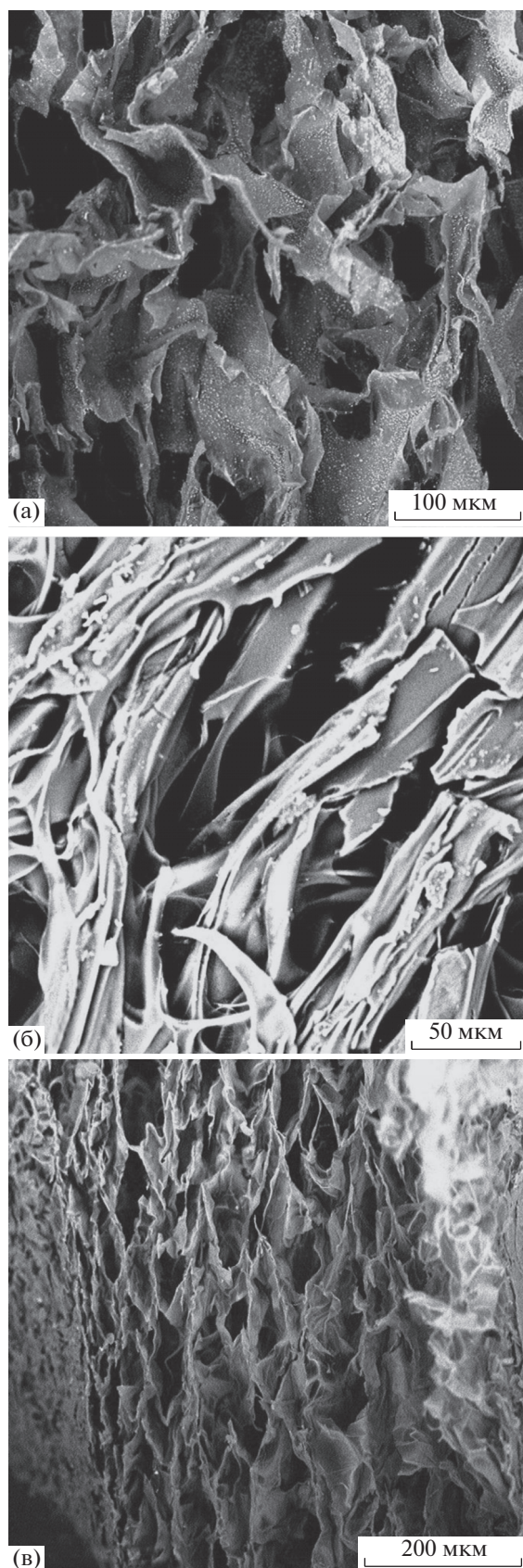
Микрофотографии СЭМ (рис. 2) до и после включения гибридных нанокompозитов в матрицу были идентичны. Размер пор как гибридных систем Ag/диоксидин/желатин, Ag/диоксидин/хитозан, Ag/диоксидин/альгинат, Cu/диоксидин/желатин, Cu/диоксидин/хитозан, Cu/диоксидин/альгинат, так и исходных биополимерных матриц составляет 10–200 мкм. Это наряду с ИК-

спектрами свидетельствует в пользу того, что включенный в биополимерные криоструктуры диоксидин находится на поверхности матрицы в высокодисперсном состоянии, а также объясняет сравнительно высокую скорость высвобождения лекарственного вещества из альгинатной и желатиновой матриц (40–60 мин). Изменение структуры этих матриц за счет варьирования условий их синтеза может позволить в дальнейшем снизить скорость высвобождения диоксида и получить более длительный эффект постепенного высвобождения лекарственного препарата. Высвобождение диоксида из хитозановой матрицы протекает за значительно больший период времени, вероятно, за счет более сильного взаимодействия лекарственного препарата с матрицей, что делает хитозановые криогели оптимальными носителями в системах контролируемого высвобождения диоксида.

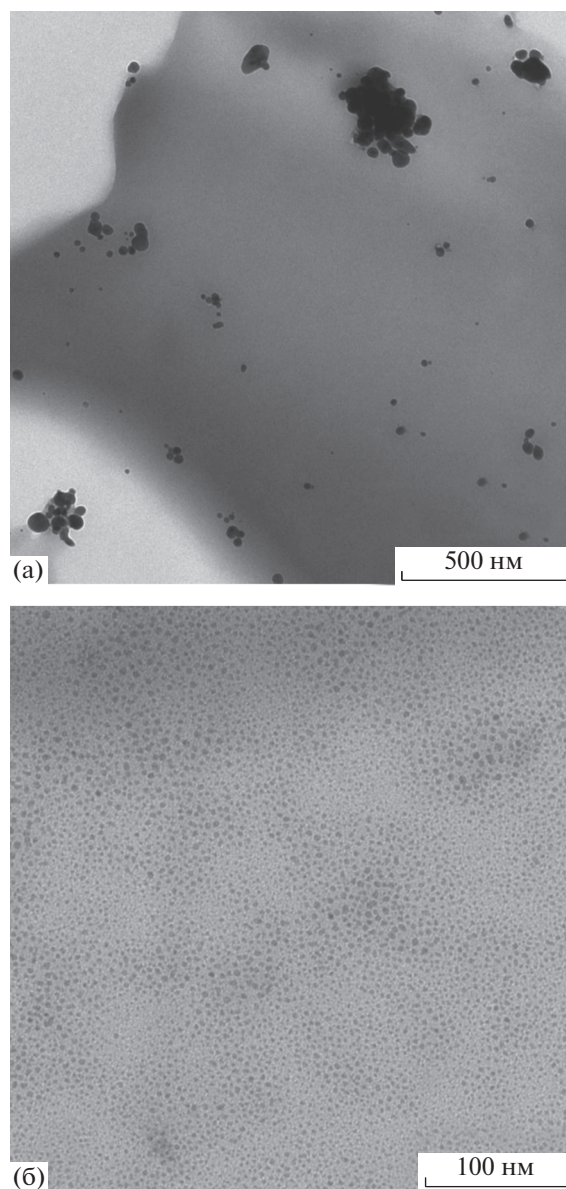
Согласно микрофотографиям ПЭМ (рис. 3) и электронным дифрактограммам полученных гибридных систем контролируемого высвобождения, внутри органических матриц находятся наночастицы серебра с размером от 2 до 30 нм или меди с размером от 1 до 5 нм.

#### *Антибактериальная активность гибридных систем*

Антибактериальная активность полученных различных форм диоксида и гибридных наносистем на его основе была определена в отношении микробных клеток *E. coli* 52 и *S. aureus* 144. Полученные данные обобщены в табл. 1, 2. Антибактериальная активность гибридных композитов наночастиц металлов с диоксидином оказалась выше, чем индивидуальных наночастиц ме-



**Рис. 2.** Микрофотография СЭМ систем Ag/диоксидин/альгинат (а), Ag/диоксидин/желатин (б), Ag/диоксидин/хитозан (в).



**Рис. 3.** Микрофотография ПЭМ систем Ag/диоксидин/желатин (а), Cu/диоксидин/желатин (б).

таллов и диоксидина, как в случае тестирования их стандартным диско-диффузионным методом, так и в случае использования для тестирования дисков альгинатных и желатиновых криогелей. Исключением была лишь биополимерная матрица на основе хитозана, нанесение гибридных наноконструктов на которую приводит к их более низкой антибактериальной активности по сравнению с диоксидином. Вероятно, хитозановый криогель отличается не только сильным взаимодействием диоксидин–носитель, но и более сильным взаимодействием металл–диоксидин–носитель, которое замедляет выделение не только диоксидина, но и ионов металлов с его поверхности

**Таблица 1.** Диаметры ЗПР ( $d$ , мм) *E. coli* 52 и *S. aureus* 144, вокруг дисков фильтровальной бумаги, пропитанных растворами диоксида и наночастиц Ag и Cu и их гибридными нанокомпозитами

Бактериальный штамм	Ag	Cu	Диоксидин	Ag/диоксидин	Cu/диоксидин
<i>E. coli</i> 52	0	0	$26.2 \pm 1.2$	$36.7 \pm 0.6$	$32.1 \pm 1.2$
<i>S. aureus</i> 144	0	0	$30.3 \pm 0.6$	$37.1 \pm 0.6$	$33.3 \pm 1.2$

Примечание: диоксидин – 0.3 мас. %, Ag – 0.0015 мас. %, Cu – 0.006 мас. %.

и, таким образом снижает активность систем наночастицы металла–диоксидин–хитозан.

Таким образом, методом криохимического синтеза получены новые системы контролируемого высвобождения на основе гибридных нанокомпозитов диоксида с наночастицами серебра (размером 2–30 нм) и меди (размером 1–5 нм), и биополимерных криогелей, которые обеспечивают постепенное высвобождение диоксида за период времени от 40 мин до 3 суток. Полученные системы на основе желатиновых и альгинатных матриц показали большую антибактериальную активность в отношении *E. coli* 52 и *S. aureus* 144, чем в случае, когда в эти матрицы были включены только наночастицы металлов или диоксидин. В случае хитозанового криогеля наблюдается иная закономерность, которая, вероятно, связана с

**Таблица 2.** Диаметр ЗПР ( $d$ , мм) бактериальных штаммов вокруг дисков криогелей, пропитанных диоксидом, наночастицами металлов и их гибридными нанокомпозитами

Криогель на основе	Компоненты криогеля	<i>E. coli</i> 52	<i>S. aureus</i> 144
Альгината	Ag	$10.0 \pm 0.6$	0
	Cu	0	0
	диоксидин	$20.0 \pm 0.6$	$17 \pm 0.6$
	диоксидин/Ag	$23.0 \pm 0.8$	$32 \pm 0.8$
	диоксидин/Cu	$22.1 \pm 1.2$	$23 \pm 0.6$
Желатина	Ag	$4 \pm 1.2$	0
	Cu	0	0
	диоксидин	$35 \pm 0.6$	$10 \pm 0.6$
	диоксидин/Ag	$38 \pm 1.2$	$15 \pm 0.6$
	диоксидин/Cu	$37 \pm 1.2$	$14 \pm 0.6$
Хитозана	Ag	$7 \pm 1.0$	$6.6 \pm 0.5$
	Cu	0	0
	диоксидин	$33.2 \pm 1.6$	$11.5 \pm 2.5$
	диоксидин/Ag	$23.4 \pm 1.2$	$7.5 \pm 0.6$
	диоксидин/Cu	$22.0 \pm 1.2$	$6.5 \pm 0.5$

сильным взаимодействием в системе носитель–наночастицы металлов–диоксидин.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 16-13-10365).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thomas B.G. // Rec. Pat. on Nanomed. 2012. V. 2. P. 52.
2. Rizvi S., Saleh A.M. // Saudi Pharm. J. 2017. V. 26. № 1. P. 64.
3. Yang P., Pageni P., Rahman Md A. et al. // Adv. Healthcare Mater. 2018. 1800854. 8p.
4. Верная О.И., Шабатин В.П., Семенов А.М. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2016. 57. № 6. С. 388.
5. Верная О.И., Шабатин В.П., Нуржидина А.В. и др. // Изв. АН. Сер. хим. 2017. № 11. С. 2152.
6. Шабатина Т.И., Верная О.И., Карлова Д.Л. и др. // Рос. нанотех. 2018. Т. 13. № 9–10. С. 92.
7. Revia R.A., Zhang M. // Mater. Today. 2016. V. 19. № 3. P. 157.
8. Ito A., Fujioka M., Yoshida T. et al. // Cancer. Sci. 2007. V. 98. № 3. P. 424.
9. Sharma A.K. // Biopolymers in Drug Delivery. Biopolymers Res. 1. 2017. e101.
10. Сайкова С.В., Воробьев С.А., Николаева Р.Б. и др. // Журн. общ. химии. 2010. Т. 80. № 6. С. 952.
11. Lozinsky V.I., Kulakova V.K., Ivanov R.V. et al. // E-Polymers. 2018. V. 18. № 2. P. 172.
12. Сажнев Н.А., Дроздова М.Г. // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 5. С. 455.
13. Lozinsky V.I. // Gels. 2018. V. 4. № 3. P. 77.
14. Верная О.И., Шабатин В.П., Семенов А.М. и др. // Вестн. МГУ Сер. 2. Химия. 2016. Т. 57. № 5. С. 315.
15. Верная О.И., Шабатин В.П., Хватов Д.И. и др. // Журн. физ. химии. 2017. Т. 91. № 2. С. 230.
16. Shabatina T.I., Vernaya O.I., Sabatin V.P. et al. // Crystals. 2018. V. 8. № 7. P. 298.
17. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания / Под ред. Г.Г. Онищенко. М., 2004. 40 с.
18. Nitta S.K. and Numata K. // Engineering Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 1629.
19. Gopi S., Amalraj A., Thomas S. // Drug Des. 2016. V. 5. P. 129.
20. Lozinsky V.I., Galaev I., Plieva M. et al. // Trends in biotechnol. V. 21. P. 445.