

УДК 535.417

РЕГИСТРАЦИЯ КИНЕТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МОЛЕКУЛ НА ОСНОВЕ НИЗКОКОГЕРЕНТНОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИММУНОАНАЛИЗОВ БИОМАРКЕРОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2022 г. А. В. Орлов^{1,*}, Д. О. Новичихин^{1,2}, А. В. Пушкарев¹, Ю. А. Малкерев^{1,2}, С. Л. Знойко¹,
Н. В. Гутенева¹, Н. Н. Орлова¹, Б. Г. Горшков¹, П. И. Никитин^{1,2,**}

Представлено академиком РАН И.А. Щербаковым 08.04.2022 г.

Поступило 08.04.2022 г.

После доработки 08.04.2022 г.

Принято к публикации 18.04.2022 г.

Количественный мониторинг параметров кинетики взаимодействия биомолекул востребован во многих областях фундаментальных и прикладных исследований. В данной работе разработаны компактные биосенсорные устройства на основе низкокогерентной интерферометрии, обладающие высокой энергоэффективностью и обеспечивающие сверхчувствительную регистрацию в реальном времени изменений толщины биомолекулярных комплексов на широкодоступных одноразовых сенсорных чипах. Приборы электрически и оптически безопасны, питаются и управляются через USB-порт ноутбука, имеют пассивную термоизоляцию для подавления дрейфов. Возможности приборов продемонстрированы на примере кинетической характеристики антител для выбора наиболее эффективных для иммуноанализа на маркер сердечно-сосудистых заболеваний — мозговой натрийуретический пептид. Разработанные устройства и методики позволяют эффективно выбирать оптимальные биораспознающие агенты для *in vitro* диагностики, направленной доставки нано-препаратов к мишеням и т.д.

Ключевые слова: низкокогерентная интерферометрия, спектрально-фазовая интерферометрия, спектрально-корреляционная интерферометрия, безметочные биосенсоры, поверхностный плазмонный резонанс, регистрация межмолекулярных взаимодействий, биомаркеры кардиозаболеваний, мозговой натрийуретический пептид

DOI: 10.31857/S2686740022040101

Стремительное расширение сфер применений безметочных оптических биосенсоров обусловлено совокупностью свойств, привлекательных как для фундаментальных исследований, так и для решения практических задач в медицине, биотехнологиях, экологии, биобезопасности и многих других областях [1–3]. Эти устройства дают возможность прямого обнаружения аналита в режиме реального времени с хорошей специфичностью и воспроизводимостью [4], исследований молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов [5] и т.д. Безметочные методики представляют особую ценность для выбора рас-

познающих рецепторов для направленной доставки нанопрепаратов, в частности, для активного нацеливания наночастиц на опухоли — одного из наиболее быстро развивающихся направлений в наномедицине [6], а также при выборе антител для разработки разнообразных форматов иммуноанализа [7–9]. Необходимо выбирать антитела, обеспечивающие быстрое и специфичное образование прочного иммунного комплекса с антигеном, т.е. обладающие наилучшими равновесными и кинетическими константами ассоциации/диссоциации [8–10]. Безметочные методы в настоящее время являются золотым стандартом для количественной оценки кинетических параметров взаимодействия антител с антигенами, поскольку присутствие меток на каком-либо из иммунореагентов может существенно исказить исследуемое взаимодействие и даже воспрепятствовать его осуществлению.

Оптические подходы, используемые в безметочных регистраторах, разнообразны: от отража-

¹Институт общей физики им. А.М. Прохорова
Российской академии наук, Москва, Россия

²Национальный исследовательский ядерный
университет “МИФИ”, Москва, Россия

*E-mail: alexey.orlov@kapella.gpi.ru

**E-mail: petr.nikitin@nsc.gpi.ru

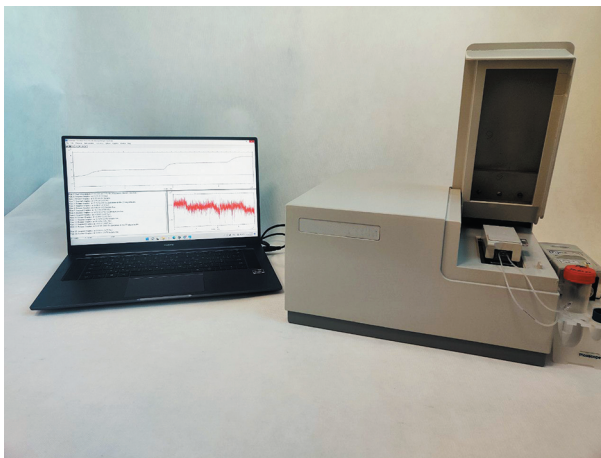


Рис. 1. Фотография разработанного биосенсорного устройства на основе низкокогерентной интерферометрии с электропитанием и управлением через USB-порт ноутбука.

тельной интерференционной спектроскопии [11] и различных волноводных методик (например, “резонансного зеркала” [12], планарного интерферометра Маха–Цандера [13]) до эллипсометрии [14] и флуоресценции с полным внутренним отражением [15]. В настоящее время наибольшее распространение получили устройства на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [16–18].

ППР обладает высокой чувствительностью, однако не позволяет в полной мере реализовать высокопроизводительный режим анализа путем многоканальной регистрации с использованием микрочипов [19]. Кроме того, зависимость ППР от объемного показателя преломления анализируемого раствора, который варьирует на 10^{-4} при изменении температуры на 1°C , ограничивает динамический диапазон ППР-устройств, а также тип используемых реагентов. Компенсация температурных дрейфов достигается либо различными схемными решениями, которые ограничивают портативность биосенсоров, либо за счет организации референсного канала в многоканальных вариантах. Кроме того, высокая стоимость сенсорных чипов на основе прецизионно напыленных пленок золота является серьезным препятствием для применения ППР-биосенсоров в задачах, где приоритетны одноразовые расходные материалы.

Избавиться от указанных выше недостатков при сохранении всех достоинств безметочного принципа прямой оптической регистрации межмолекулярных взаимодействий позволило появление подходов на основе низкокогерентной интерферометрии (НКИ), таких как методы спектрально-фазовой [20] и спектрально-корреляционной [21] интерферометрии, а также соответствующих биосенсоров.

Цель настоящей работы состояла в разработке и демонстрации компактных биосенсорных

НКИ-устройств нового поколения (рис. 1), обладающих высокой энергоэффективностью (питание от USB-порта персонального компьютера), пассивной термоизоляцией и обеспечивающих сверхчувствительные измерения в реальном времени изменений толщины биослоя на поверхности сенсорного чипа. В основе разработанных НКИ-биосенсоров лежит использование одной из поверхностей тонкой (100 мкм) плоскопараллельной стеклянной пластины в качестве опорной. Относительно нее с высокой чувствительностью и метрологической точностью в реальном времени регистрируется изменение высоты рельефа на противоположной поверхности. Такая пластина используется в качестве двухлучевого интерферометра, освещаемого широкополосным низкокогерентным излучением суперлюминесцентных диодов, и одновременно выполняет функцию сенсорного чипа для исследования молекулярных взаимодействий. На поверхности такого чипа, функционализированного моноклональными антителами, происходят реакции ассоциации и диссоциации молекул антигенов из контактирующего раствора. Для регистрации изменений толщины биослоя на поверхности используется интерференция между опорным лучом, отраженным от нижней поверхности пластины, и зондирующим лучом, отраженным от границы раздела “жидкость – поверхность стекла с биомолекулами”, где существует скачок показателя преломления. Результат интерференции зависит от фазовой толщины суммарного слоя стекла и биомолекул, изменение которой фиксируется по изменению фазы основной гармоники в спектре отраженного излучения. Регулируемые режимы смены растворов вдоль поверхности сенсорного чипа осуществляются за счет применения прижимных микрофлюидных кювет, обеспе-

чивающих либо пассивное (за счет гравитации) протекание растворов, либо их прокачку с варьируемой скоростью потока для минимизации расходов реагентов, с одной стороны, и обеспечения постоянства концентраций реагентов при измерении кинетических параметров межмолекулярных взаимодействий, с другой стороны.

Функционал разработанного биосенсора продемонстрирован в данной работе на примере кинетической характеристики различных моноклональных антител с целью выбора наиболее эффективных из них с точки зрения рациональной разработки иммуноанализов для определения концентрации мозгового натрийуретического пептида (МНП, *англ.* NT-proBNP) – молекулярного биомаркера острого инфаркта миокарда. МНП локализуется в кардиомиоцитах желудочков сердца и участвует в регуляции сердечных сокращений [22]. При повреждении сердечной мышцы МНП попадает в кровь, поэтому его количественное определение является одним из перспективных подходов к дифференциальной диагностике острого инфаркта миокарда. Кроме того, по уровню данного биомаркера можно судить о риске возникновения сердечно-сосудистых заболеваний у здоровых людей и осложненных в постинфарктный период.

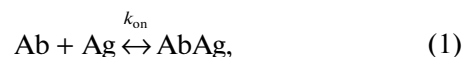
Исследуемые антитела ковалентно иммобилизуются на предварительно эпоксилированную поверхность покровного стекла, которая изготавливается по следующей методике. Трижды промытые метанолом покровные стекла помещаются в смесь 30%-й перекиси водорода и 95%-й серной кислоты (1 : 3) и инкубируются 40 мин при 70°C. После этого смесь охлаждается до комнатной температуры, и покровные стекла трижды промываются дистиллированной и деионизованной водой, дважды метанолом и высушиваются. Микроскопные покровные стекла с образованными на их поверхности силанольными группами помещаются в 3%-й раствор (3-глицидоксипропил)триметоксилана в метаноле и инкубируются в течение ночи при комнатной температуре, после чего трижды промываются изопропанолом и высушиваются. Подготовленные таким образом сенсорные чипы могут храниться до использования при комнатной температуре без ухудшения качества, обеспечивая прочную ковалентную сорбцию распознающих биомолекул и не требуют предварительной активации. Следует отметить, что благодаря совместимости с высокопроизводительным микроматричным форматом на стеклянных сенсорных чипах НКИ обладает значительным потенциалом для мультиплексирования и характеристики большого количества различных антител одновременно.

Для регистрации в реальном времени биохимических реакций сенсорный чип помещается в

Таблица 1. Равновесные и кинетические константы, рассчитанные для различных клонов антител к МНП

Клон	$k_{\text{on}} \times 10^{-4}$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{\text{off}} \times 10^4$, с ⁻¹	$K_A \times 10^{-7}$, М ⁻¹	$K_D \times 10^8$, М
50B7	6.71 ± 0.97	28.3 ± 2.1	2.37 ± 0.52	4.22 ± 0.92
50E1	5.73 ± 0.63	16.2 ± 1.3	3.54 ± 0.67	2.83 ± 0.54
24C5	3.56 ± 0.33	8.35 ± 1.02	4.26 ± 0.92	2.35 ± 0.50

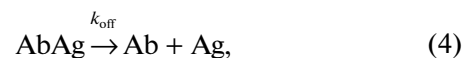
проточную ячейку НКИ-биосенсора. В процессе регистрации биосенсор записывает сенсограмму – зависимость от времени толщины биослоя на поверхности сенсорного чипа. На этапе ассоциации вдоль поверхности сенсорного чипа пропускается раствор антигена. Затем пропускается буферный раствор, не содержащий антигена, чтобы зарегистрировать реакцию диссоциации. Зарегистрированные зависимости толщины биослоя от времени аппроксимировались экспоненциальными зависимостями, которые на этапе ассоциации определялись из следующих соотношений [23]:



$$R = R_{\text{max}} \cdot (1 - e^{-k_{\text{ob}} \cdot t}), \quad (2)$$

$$k_{\text{ob}} = k_{\text{off}} + k_{\text{on}} \cdot [\text{Ag}], \quad (3)$$

где k_{on} и k_{off} – кинетические константы ассоциации и диссоциации соответственно. Поскольку на этапе диссоциации не происходит взаимодействия антитела с антигеном из раствора, то реакция взаимодействия и соответствующая аппроксимирующая функция описываются следующими выражениями:



$$R = R_{\text{max}} \cdot e^{-k_{\text{off}} \cdot t}. \quad (5)$$

С помощью метода наименьших квадратов, наилучшим образом аппроксимирующего нарастающие и спадающие ветви экспериментально зарегистрированных сенсограмм (рис. 2), на основе приведенных соотношений (1)–(5) рассчитывались кинетические константы ассоциации и диссоциации, а затем вычислялись соответствующие равновесные константы K_D и K_A :

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}, \quad (6)$$

$$K_A = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}. \quad (7)$$

Кинетическая характеристика с помощью разработанного биосенсора проводилась для трех различных коммерчески доступных клонов антител, специфичных к МНП: 50B7, 50E1, 24C5. На

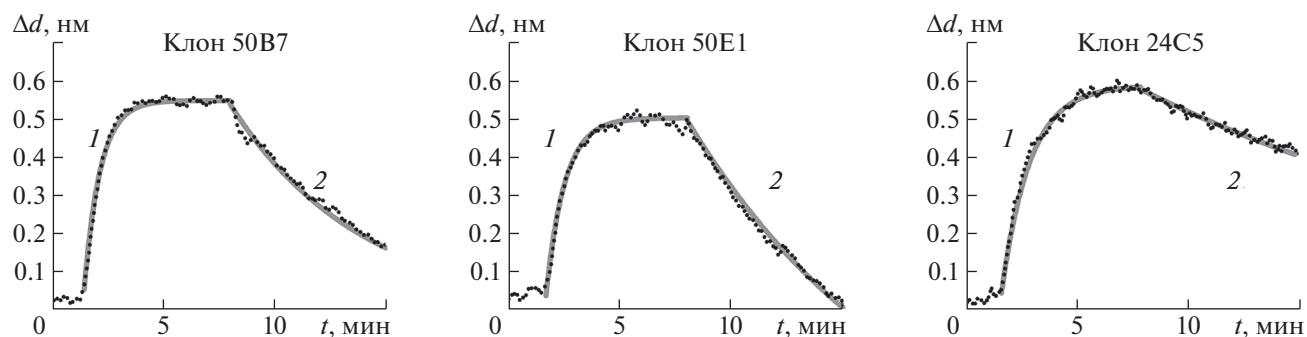


Рис. 2. Сенсограммы, зарегистрированные с помощью разработанного НКИ-биосенсора для различных клонов антител к МНП, демонстрирующие этапы ассоциации (1) и диссоциации (2) антигена.

рис. 2 для каждого антитела представлены сенсограммы, зарегистрированные на этапах ассоциации и диссоциации, а в табл. 1 – результаты вычисления по соотношениям (6) и (7) кинетических и равновесных констант их взаимодействия с антигеном.

Как видно из табл. 1, моноклональные антитела 24С5 демонстрируют минимальное значение равновесной константы диссоциации ($K_D = 2.35 \times 10^{-8}$ М), определенной с помощью разработанного биосенсора. Это свидетельствует о том, что из исследованного набора именно эти антитела являются самыми перспективными для разработки высокочувствительных иммуноанализов для определения МНП. Следует отметить, что выбор оптимального антитела на основе представленных в табл. 1 значений кинетических констант может существенно зависеть от типа и формата разрабатываемого иммуноанализа. Так, при схожих равновесных константах антитела могут характеризоваться существенно различными кинетическими константами. Это указывает на то, что при одинаковых условиях одно из антител будет быстрее образовывать комплекс с антигеном. В то же время этот комплекс будет быстрее диссоциировать в отсутствие антигена в окружении. Таким образом, для создания сверхбыстрых одностадийных анализов предпочтительно выбирать клоны, обладающие самыми высокими значениями кинетической константы ассоциации, что обеспечит короткое время образования связи антитело – антиген. При этом для конструирования ультрачувствительных многостадийных систем, включающих этапы отмывок и относительно длительные инкубации, приоритетным является достижение низких значений кинетической константы диссоциации. Такое антитело позволит сохранить максимальное количество захваченного антигена к моменту его детектирования на последнем этапе анализа.

Таким образом, разработаны энергоэффективные и компактные НКИ-биосенсорные устройства

с пассивной термоизоляцией для прямой безметочной регистрации в реальном времени биохимических реакций, и их возможности продемонстрированы на примере кинетической характеристики различных антител. Разработанные устройства, сенсорные чипы и методы позволяют эффективно и рационально создавать новые биосенсорные системы на основе различных биораспознающих рецепторов для *in vitro* диагностики, ветеринарии, мониторинга окружающей среды и контроля качества продуктов питания [24], исследования лекарственных препаратов, а также выбора распознающих рецепторов для направленной доставки наноагентов к адресным мишеням *in vivo* [6, 25].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят И.Л. Никитину за плодотворные дискуссии и помощь при подготовке рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Различные аспекты данного междисциплинарного исследования были частично поддержаны грантами Российского научного фонда: № 19-73-10205 (безметочная кинетическая характеристика моноклональных антител, оптимизация аналитической системы для определения молекулярных сердечных биомаркеров) и № 21-12-00407 (разработка методов выбора распознающих молекул, функционализации поверхности и экспериментальных прототипов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Altug H. et al. Advances and applications of nanophotonic biosensors // Nat. Nanotechnol. 2022. V. 17 (1). P. 5–16. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-01045-5>
2. Zanchetta G. et al. Emerging applications of label-free optical biosensors // Nanophotonics. 2017. V. 6 (4). P. 627–645. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0158>

3. *Kaur B. et al.* Recent advancements in optical biosensors for cancer detection // *Biosensors and Bioelectronics*. 2022. V. 197. P. 113805. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113805>
4. *Soltermann F. et al.* Label-free methods for optical in vitro characterization of protein–protein interactions // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2021. V. 23 (31). P. 16488–16500. <https://doi.org/10.1039/d1cp01072g>
5. *Красникова Т.Л. и др.* Влияние пептидного фрагмента (65–76) с-концевого домена моноцитарного хемотаксического белка-1 (мср-1) на взаимодействие мср-1 с гепарином // *ДАН*. 2010. Т. 433. № 4. С. 559–562. <https://doi.org/10.1134/S0012496610040150>
6. *Drozdov A.S. et al.* Systematic review of cancer targeting by nanoparticles revealed a global association between accumulation in tumors and spleen // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22 (23). P. 13011. <https://doi.org/10.3390/ijms222313011>
7. *Bragina V.A. et al.* Nanobiosensing based on optically selected antibodies and superparamagnetic labels for rapid and highly sensitive quantification of polyvalent hepatitis B surface antigen // *Analytical Methods*. 2021. V. 13 (21). P. 2424–2433. <https://doi.org/10.1039/d1ay00354b>
8. *Yang D. et al.* Comparison of biosensor platforms in the evaluation of high affinity antibody-antigen binding kinetics // *Anal. Biochem.* 2016. V. 508. P. 78–96. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.024>
9. *Kamat V. et al.* High affinity human Fc specific monoclonal antibodies for capture kinetic analyses of antibody-antigen interactions // *Analytical Biochemistry*. 2022. V. 640. P. 114455. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114455>
10. *Orlov A.V. et al.* Express high-sensitive detection of ochratoxin A in food by a lateral flow immunoassay based on magnetic biolabels // *Food Chemistry*. 2022. V. 383. P. 132427. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132427>
11. *Ghiasi Tarzi M. et al.* Real-time biosensing of growth hormone on porous silicon by reflectometric interference Fourier transform spectroscopy // *Applied Physics A*. 2022. V. 128 (1). P. 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00339-021-05208-y>
12. *Zourob M. et al.* Label-free detection with the resonant mirror biosensor // *Biosensors and Biodetection*. 2009. V. 503. P. 89–138. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-567-5_6
13. *Ren M. et al.* Optimization of the classical interference visibility of an asymmetric Mach–Zehnder interferometer based on planar lightwave circuit technology // *Applied Optics*. 2019. V. 58 (28). P. 7817–7822. <https://doi.org/10.1364/ao.58.007817>
14. *Sohrabi F. et al.* Plasmonic structures for phase-sensitive ellipsometry biosensing: a review // *Optical and Quantum Electronics*. 2021. V. 53 (12). P. 1–30. <https://doi.org/10.1007/s11082-021-03356-2>
15. *Song D. et al.* Development of dual-color total internal reflection fluorescence biosensor for simultaneous quantitation of two small molecules and their affinity constants with antibodies // *Biosensors and Bioelectronics*. 2019. V. 126. P. 824–830. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.010>
16. *Firdous S. et al.* Development of surface plasmon resonance (SPR) biosensors for use in the diagnostics of malignant and infectious diseases // *Laser Physics Letters*. 2018. V. 15(6). P. 65602. <https://doi.org/10.1088/1612-202X/aab43f>
17. *Wang Q. et al.* Research advances on surface plasmon resonance biosensors // *Nanoscale*. 2022. V. 14. P. 564–591. <https://doi.org/10.1039/D1NR05400G>
18. *Park J.-H. et al.* Recent Advances in Surface Plasmon Resonance Sensors for Sensitive Optical Detection of Pathogens // *Biosensors (Basel)*. 2022. V. 12 (3). P. 180. <https://doi.org/10.3390/bios12030180>
19. *Wang D. et al.* Recent Advances in Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors. // *Sensors*. 2019. V. 19 (6). P. 1266. <https://doi.org/10.3390/s19061266>
20. *Nikitin P.I. et al.* Spectral-phase interference method for detecting biochemical reactions on a surface // *Quantum Electronics*. 2000. V. 30 (12). P. 1099–1104. <https://doi.org/10.1070/QE2000v030n12ABEH001876>
21. *Nikitin P.I. et al.* New direct optical biosensors for multi-analyte detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2003. V. 90 (1–3). P. 46–51. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00020-0)
22. *Goryacheva O.A. et al.* Heart failure biomarkers BNP and NT-proBNP detection using optical labels // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2022. V. 146. P. 116477. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116477>
23. *Pushkarev A.V. et al.* Rapid and easy-to-use method for accurate characterization of target binding and kinetics of magnetic particle bioconjugates for biosensing // *Sensors*. 2021. V. 21 (8). P. 2802. <https://doi.org/10.3390/s21082802>
24. *Nekrasov N. et al.* Real-time detection of ochratoxin A in wine through insight of aptamer conformation in conjunction with graphene field-effect transistor // *Biosensors and Bioelectronics*. 2021. V. 200. P. 113890. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113890>
25. *Котельникова П.А. и др.* Синтез магнитных наночастиц, стабилизированных магнетитсвязывающим белком, для адресной доставки к раковым клеткам // *ДАН*. 2018. Т. 481. № 2. С. 219–221. <https://doi.org/10.1134/S1607672918040051>

REGISTRATION OF INTERACTION KINETICS OF MOLECULES USING LOW-COHERENT INTERFEROMETRY FOR DEVELOPING IMMUNOASSAYS FOR BIOMARKERS OF CARDIAC DISEASES

A. V. Orlov^a, D. O. Novichikhin^{a,b}, A. V. Pushkarev^a, Yu. A. Malkerov^{a,b}, S. L. Znoyko^a, N. V. Guteneva^a,
N. N. Orlova^a, B. G. Gorshkov^a, and P. I. Nikitin^{a,b}

^a*Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia*

Presented by Academician of the RAS I.A. Scherbakov

Quantitative monitoring of kinetic parameters of interactions between biomolecules is highly demanded in many areas of basic and applied research. In this work, compact biosensing devices have been developed based on low-coherent interferometry. They are highly power-efficient and provide ultra-sensitive real-time detection of changes in the thickness of biomolecular complexes on widely available disposable sensor chips. These electrically and optically safe devices are powered and controlled via a laptop USB port, and have passive thermal insulation for drift suppression. The functionality of the instruments has been demonstrated by kinetic characterization of antibodies to select the most effective ones for immunoassays of detection of brain natriuretic peptide, which is a marker of cardiovascular diseases. The developed devices and techniques enable effective selection of optimal biorecognition agents for *in vitro* diagnostics, targeted delivery of nano-preparations, etc.

Keywords: low-coherence interferometry, spectral-phase interferometry, spectral-correlation interferometry, label-free biosensors, surface plasmon resonance, registration of inter-molecular interactions, markers of cardiac diseases, brain natriuretic peptide