

# МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

УДК 577.27

## НОВЫЙ ПОДХОД В ОПРЕДЕЛЕНИИ АФФИННОСТИ ДВУХВАЛЕНТНЫХ АНТИТЕЛ МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА. ТЕОРИЯ

С. А. БОБРОВНИК, М. А. ДЕМЧЕНКО, С. В. КОМИСАРЕНКО

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;  
e-mail: s-bobrov@bk.ru

*В настоящей статье рассмотрены некоторые теоретические вопросы анализа аффинности двухвалентных рецепторов (или антител) с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса. Показано, что наличие лиганда в растворе, не содержащем рецептор, на этапе, когда происходит диссоциация ранее связавшегося рецептора с иммобилизованным лигандом, приводит к повышению точности определения аффинности взаимодействия. Установлено, что для определения констант скорости реакции связывания рецептора с иммобилизованным лигандом достаточно проанализировать кривую связывания исследуемых реагентов, тогда как анализ кривой диссоциации рецептора, ранее связавшегося с иммобилизованным лигандом, не является необходимым. Нами также предложен новый подход для определения аффинности двухвалентных рецепторов (или антител), которые находятся в исследуемом образце жидкости, а соответствующий лиганд (или антиген) является иммобилизованным на чипе прибора-анализатора.*

*Ключевые слова: аффинность взаимодействия; метод поверхностного плазмонного резонанса; константа равновесия; константы скорости реакции.*

Наиболее важными характеристиками процесса связывания/диссоциации рецептора и соответствующего лиганда являются константы скорости прямой и обратной реакции (т.е. константа скорости связывания,  $k_1$ , и константа скорости диссоциации,  $k_2$ ), а также константа аффинности взаимодействия,  $K$ , которая равна частному от деления константы скорости реакции ассоциации на константу скорости диссоциации рассматриваемого процесса,  $K = k_1/k_2$ . Существует много разнообразных методов определения этих величин. Данные характеристики для любой интересующей нас пары рецептор–лиганд можно определить разными способами, в том числе экспериментально с помощью получившего в последние годы большую популярность метода поверхностного плазмонного резонанса [1–4].

Считается, что метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР) является весьма гибким и удобным подходом при исследовании межмолекулярных взаимодействий и может легко подстраиваться под задачи того или иного эксперимента. Метод регистрации

лиганд–рецепторного взаимодействия при ППР имеет преимущества перед классическими методами исследования межмолекулярного взаимодействия, поскольку не требует меченых реагентов ни радиоактивными, ни какими-либо другими метками и позволяет определять равновесные параметры взаимодействия без разделения свободных и связанных форм. Кроме того, чувствительность метода позволяет работать с малым количеством реагентов. Дополнительное достоинство метода обнаруживается при изучении специфики взаимодействия, т.к. связанные с детектором молекулярные комплексы можно затем анализировать соответствующими способами, например, масс-спектрометрией.

Однако данный метод имеет и недостатки. Так, различные подходы для использования метода ППР разработаны только для взаимодействия моновалентного реагента с соответствующим реагентом, фиксированным на специальном чипе так, что иммобилизованный реагент оказывается фактически поливалентным [5–8]. Вместе с тем на практике часто воз-

никает необходимость измерять аффинность двухвалентных рецепторов, которые находятся в анализируемой жидкости, а не фиксированы на чипе. Настоящая статья предлагает подход, с помощью которого, используя метод ППР, можно оценить константы скорости интересующего лиганд-рецепторного взаимодействия и аффинность этого взаимодействия даже для случаев, когда рецептор является не только моновалентным, но и двухвалентным в том числе, если это двухвалентное антитело.

### Результаты и обсуждение

Рассмотрим вначале теорию процесса обратимого связывания моновалентного рецептора с соответствующим лигандом, иммобилизованным на поверхности чипа биосенсора, а также последующей диссоциации этого рецептора с лиганда в раствор (схема процесса представлена на рис. 1). Пусть в момент времени  $t = 0$  к чипу с иммобилизованным лигандом начинает быстро и непрерывно подаваться раствор с постоянной концентрацией рецептора, равной  $c$  (рис. 1, А), так что незначительным снижением концентрации рецептора в растворе за счет его связывания с чипом можно пренебречь. В результате реакции взаимодействия количество рецептора, обратимо связывающегося с лигандом, фиксированном на чипе, будет постепенно увеличиваться (рис. 1, Б). Скорость связывания рецептора с чипом (т.е. количество рецептора, связавшегося с чипом за единицу времени) является пропорциональной константе скорости реакции ( $k_1$ ), концентрации рецептора в растворе ( $c$ ), и количеству лиганда на чипе, незаблокированного связавшимся рецептором. Поскольку данная реакция является обратимой, то имеющийся в растворе рецептор не только будет продолжать связываться с чипом, но ранее связавшийся рецеп-

тор будет диссоциировать в раствор со скоростью, пропорциональной константе скорости диссоциации ( $k_2$ ), и пропорциональной количеству уже связавшегося рецептора (рис. 2). Тогда, если количество рецептора, связавшегося с чипом, регистрируется в условных единицах  $R$ , то динамику обратимого связывания рецептора с чипом можно описать при помощи следующего дифференциального уравнения:

$$\frac{dR}{dt} = k_1 c R_f - k_2 (R_{max} - R_f), \quad (1)$$

где  $R_f$  – площадь чипа с лигандом, не занятая рецептором;  $R_{max}$  – полная площадь чипа, которая пропорциональна максимальному количеству рецептора, связавшегося с лигандом, когда весь чип занят рецептором.

Поскольку  $R_f = R_{max} - R$ , откуда  $R = R_{max} - R_f$ , то получим, что

$$\frac{dR}{dt} = k_1 c (R_{max} - R) - k_2 R. \quad (2)$$

При начальных условиях  $t = 0$  и  $R = 0$  решение дифференциального уравнения (2) дает следующее выражение зависимости величины  $R$  от времени  $t$  и констант скорости  $k_1$  и  $k_2$ :

$$R = \frac{k_1 c R_{max}}{k_1 c + k_2} [1 - e^{-(k_1 c + k_2)t}]. \quad (3)$$

Динамика подобного процесса представлена на рис. 3 (кривая а). Из уравнения (3) также следует, что при  $t \rightarrow \infty$

$$R = \frac{k_1 c R_{max}}{k_1 c + k_2}. \quad (4)$$

Таким образом, при увеличении времени рассматриваемой реакции до  $t = \infty$ , количество рецептора, обратимо связавшегося с чипом,  $R$ , достигнет плато, высота которого определяет-

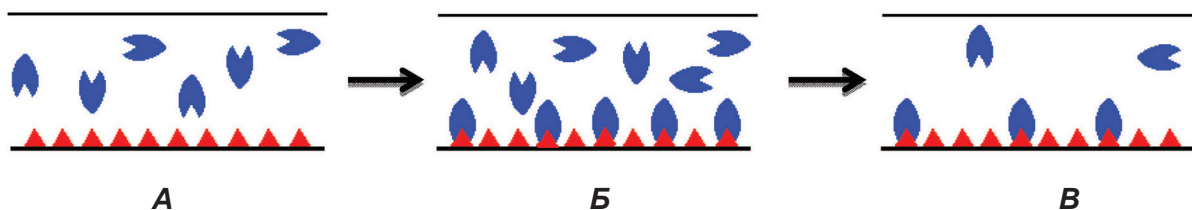


Рис. 1. Схема связывания рецептора с лигандом, иммобилизованным на чипе биосенсора. Раствор рецептора, способного связываться с определенным лигандом, непрерывно подается к чипу, на поверхности которого иммобилизован данный лиганд (А). В результате количество рецептора, связанного с чипом, постепенно увеличивается (Б) вплоть до того времени, пока весь лиганд не будет занят рецептором. Если в какой-то момент времени к чипу начать подавать раствор, не содержащий рецептор, то ранее связавшийся рецептор будет постепенно диссоциировать с чипа (В) и уноситься током раствора

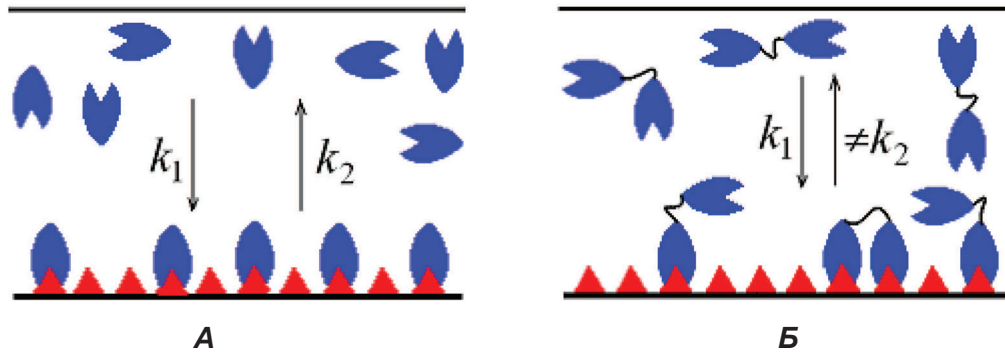


Рис. 2. А – Если имеющийся в растворе рецептор способен связываться с иммобилизованным на чипе лигандом с константой скорости  $k_1$ , а константа скорости диссоциации рецептора, ранее связавшегося с чипом, равна  $k_2$ , тогда динамика связывания рецептора с чипом и его диссоциация будет описываться с помощью дифференциального уравнения (1). Б – Если тот же рецептор является двухвалентным, то константа скорости его связывания с чипом будет примерно такой же, т.е., равна  $k_1$ , а константа скорости его диссоциации с иммобилизованным на чипе лиганда будет в сотни или даже в тысячи раз меньше, чем величина  $k_2$

ся уравнением (4). Если в какой-либо определенный момент времени  $t_a < t_o$ , т.е. в момент, когда  $R = R_a$ , из подаваемого к чипу раствора удалить рецептор, то, благодаря обратимости связывания рецептора с иммобилизованным лигандом, начнется диссоциация рецептора (рис. 3, кривая б), который ранее связался с чипом, и, следовательно, постепенное уменьшение его количества. Скорость этого процесса описывается уравнением

$$\frac{dR}{dt} = -k_2 R, \quad (5)$$

решение которого дает следующую зависимость величины  $R$  от времени  $t$ :

$$R = R_a e^{-k_2 t}. \quad (6)$$

Тогда кривая, описывающая процесс диссоциации рецептора с чипа, будет иметь вид, представленный на рис. 3, б.

Важно отметить, что рассмотренная выше теория описывает процесс связывания исключительно моновалентного рецептора, который находится в растворе и взаимодействует с лигандом, иммобилизованным на чипе сенсора [5–7]. В то же время очевидно, что данный подход невозможно использовать для определения искомых параметров взаимодействия, если аналит содержит двухвалентный рецептор (например, антитело), который способен связываться с сорбированным на чипе лигандом с помощью двух сайтов взаимодействия. Однако на практике часто встречаются такие случаи, где желательно определить аффинность какого-либо двухвалентного рецептора,

находящегося в исследуемом растворе. В связи с этим существует потребность теоретического и практического решения подобной проблемы.

Ниже мы рассмотрим, как с помощью метода ППР можно оценить константы скорости и константу равновесия реакции двухвалентного рецептора (или двухвалентного антитела), находящегося в растворе, и соответствующего лиганда (антигена), иммобилизованного на чипе. Однако, чтобы в нашем изложении в дальнейшем все было достаточно ясным, вначале следует сделать некоторые замечания относительно того, каким способом можно

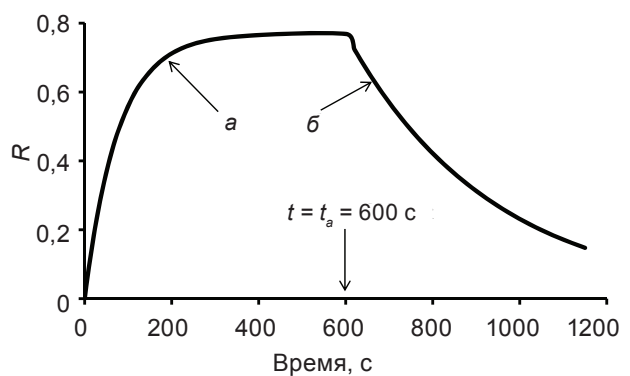


Рис. 3. Теоретическая кривая (а) обратимого связывания рецептора, находящегося в растворе, с лигандом, иммобилизованным на чипе, при подаче к чипу раствора с постоянной концентрацией рецептора, а также теоретическая кривая (б) диссоциации рецептора с чипа при отсутствии рецептора в подаваемом к чипу растворе (сенсограмма)

не только упростить, но и повысить точность определения констант скорости и аффинности взаимодействия в эксперименте для реакции моновалентных рецепторов и соответствующих лигандов, используя рассматриваемый метод.

Как показано выше, константу скорости диссоциации,  $k_2$ , можно определить, используя экспериментальную кривую диссоциации (рис. 3, б) и соответствующее этой кривой уравнение (6). Отметим, что на данном этапе в ход эксперимента можно внести некоторые изменения, которые не только не снижают, но даже повышают точность данного метода. Суть их в следующем. Рассматривая процесс диссоциации моновалентных рецепторов с чипа, когда в пространство над чипом непрерывно подается раствор, не содержащий рецептора, то предполагается, что, начиная с момента времени  $t_a$ , концентрация рецептора вблизи чипа равна нулю. Это допущение было отображено математически с помощью дифференциального уравнения (5), где с правой стороны уравнения отсутствует член  $k_1 R_f$ , поскольку считается, что он равен нулю из-за того, что  $R_f = 0$ . Однако так ли это на самом деле?

Действительно, с достаточно высокой точностью мы можем считать, что именно так оно и есть, поскольку, как полагает теория, во-первых, раствор к чипу подается с высокой скоростью и, во-вторых, концентрацией рецептора, который диссоциировал с поверхности чипа и находится в растворе вблизи чипа, вполне можно пренебречь. И все же очевидно, что, по крайней мере, небольшая часть рецептора, диссоциировавшего с чипа, может быть не полностью унесена с током растворителя, а способна повторно связаться с лигандом, иммобилизованным на чипе. В этом случае очевидно, что  $R_f \neq 0$  и имеющийся в реальности процесс диссоциации рецептора будет, хотя и незначительно, но все же отличаться от процесса, описываемого уравнением (5).

В подобных случаях события, происходящие в реальном эксперименте можно максимально приблизить к процессу, описываемому уравнением (5), если в момент времени  $t_a$  к чипу подается не сам растворитель, а раствор лиганда, который способен связываться с данным рецептором и, как следствие, блокировать диссоциировавший с чипа рецептор, не позволяя ему повторно связаться с чипом. Очевидно, что в этом случае уравнение (5) будет более точно описывать процесс диссоциации рецептора с лиганда, иммобилизованного на чипе.

Впрочем, подобная модификация протокола эксперимента может вообще не понадо-

биться, если экспериментатор не будет использовать для вычисления константы скорости диссоциации ( $k_2$ ) часть сенсограммы (рис. 3, кривая б), представляющей процесс диссоциации рецептора. Как оказывается, такая возможность имеется, поскольку вся информация, необходимая для определения значений обоих констант,  $k_1$  и  $k_2$ , уже содержится в первой части сенсограммы, т.е. в форме кривой 3, а. Следовательно, кривая 3, б вообще не требуется для вычисления значения  $k_2$ . Отметим, что этот факт может иметь важное значение для вычисления искомых констант скорости в тех случаях, когда диссоциация рецептора с поверхности сенсора является очень медленной, и вследствие этого на сенсограмме кривая диссоциации рецептора будет выражена не вогнутой кривой, как на рис. 3, б, а будет напоминать прямую, почти параллельную оси абсцисс (рис. 4).

Чтобы наглядно проиллюстрировать подобный пример, проведем теоретические расчеты сенсограммы для случая, когда значения  $R_{max}$  и  $k_1$  такие же, как и в предыдущем примере, представленном на рис. 3, а величина  $k_2$  снижена в 30 раз (рис. 4, кривые 1 и 2). В этом случае получим кривую 2, которая заметно отличается от кривой 1 и, в свою очередь, идентична кривой на рис. 3. Как видно из кривой 2, после того, как к сенсору прекратили подавать раствор рецептора и заменили его растворителем, не содержащим рецептор, сенсограмма стала представлять собой не быстро снижающуюся кривую  $b_2$ , а кривую  $b_1$ ,

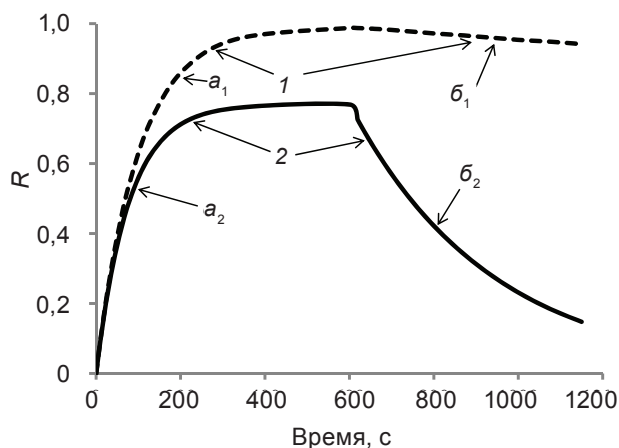


Рис. 4. Теоретические сенсограммы, рассчитанные для следующих параметров связывания находящегося в растворе рецептора с иммобилизованным на чипе соответствующим лигандом: 1)  $R_{max} = 1$ ;  $k_1 = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{сек}^{-1}$ ;  $k_2 = 3 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$ ; 2)  $R_{max} = 1$ ;  $k_1 = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{сек}^{-1}$ ;  $k_2 = 1 \times 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$

близкую к прямой, похожую на плато. Из-за этого вычислить значение  $k_2$  с помощью уравнения (5) затруднительно, поскольку сложно понять, наблюдается ли процесс диссоциации рецептора с чипа вообще. Тем не менее, начальная часть сенсограммы, т.е. кривые  $a_1$  и  $a_2$ , содержат всю необходимую информацию для вычисления обеих констант скорости,  $k_1$  и  $k_2$ . В связи с этим, сравнивая теоретические кривые, описываемые уравнением (3), с начальными частями кривых,  $a_1$  или  $a_2$ , мы можем с помощью метода нелинейной регрессии легко определить искомые константы скорости исследуемой реакции.

Таким образом, нами показано, что, во-первых, присутствие лиганда в растворе, не содержащем рецептор и подающимся к чипу для наблюдения за процессом диссоциации ранее связавшегося с чипом рецептора, может не снизить, а, наоборот, повысить точность определения величины  $k_2$ . Во-вторых, использование кривых  $b_1$  и  $b_2$  не является обязательным для определения значения  $k_2$ , т.к. обе константы скорости могут быть определены при использовании начальных частей сенсограмм, т.е. кривых  $a_1$  и  $a_2$ .

Теперь рассмотрим, почему же данный протокол эксперимента и полученные уравнения (1–6) не могут быть использованы для определения констант скорости и аффинности двухвалентных рецепторов (или двухвалентных антител)? Все дело в том, что двухвалентный рецептор (или антитело), связанный с поливалентным лигандом, ни в коем случае не диссоциирует с лиганда (т.е. с поверхности чипа для рассматриваемого нами случая) с такой же константой скорости  $k_2$ , как и одновалентный рецептор. Однако данная величина константы скорости диссоциации характеризует только моновалентное взаимодействие. Если же рецептор двухвалентный, то каждый из его сайтов, связанных с лигандом, действительно может диссоциировать с константой скорости  $k_2$ . Однако диссоциация одного из сайтов связывания не приведет к немедленному отрыву молекулы двухвалентного рецептора от чипа, поскольку при этом сохраняется связь рецептора с чипом посредством второго сайта (рис. 2, Б).

Для того, чтобы молекула рецептора была оторвана от чипа и унесена током растворителя, необходима диссоциация и второго сайта рецептора. Однако, поскольку первый сайт, уже диссоциировавший, продолжает находиться в непосредственной близости от чипа с лигандом, то вероятность его повторного

связывания с чипом намного выше, чем вероятность того, что второй сайт рецептора также диссоциирует. Вследствие этого скорость диссоциации (а значит и величина константы скорости отрыва) двухвалентного рецептора от чипа в сотни, а иногда и в тысячи раз меньше, чем скорость диссоциации точно такого же, но моновалентного рецептора. Отсюда ясно, что уравнения (1–6) ни в коей мере не описывают процесс связывания и диссоциации двухвалентного рецептора (или антитела), взаимодействующего с чипом, на котором сорбирован поливалентный лиганд.

Каков же выход из создавшейся ситуации и как можно определить аффинность взаимодействия данного двухвалентного рецептора и соответствующего лиганда, используя метод поверхностного плазмонного резонанса? Одно из возможных решений — иммобилизовать данный рецептор на чипе, а в качестве аналита использовать раствор лиганда, если он имеет только один сайт связывания. Отметим, что в данном случае при использовании иммобилизованных на чипе антител регенерировать подобный чип не представляется возможным, поскольку обработка антител жесткими реагентами (например, обработка при низких значениях pH или высокими концентрациями хаотропных ионов) с целью диссоциировать связавшийся антиген, приведет к трансформации специфичных антител в полиреактивные иммуноглобулины и потере их специфичности [8–10].

Другое решение упомянутой проблемы следующее: попытаться сделать так, чтобы связывание двухвалентного рецептора с чипом, содержащим на своей поверхности поливалентный лиганд, стало моновалентным. Для этого можно с помощью протеолитических энзимов расщепить молекулу рецептора пополам, чтобы сделать его моновалентным, а затем такой моновалентный фрагмент использовать для определения его аффинности методом поверхностного плазмонного резонанса. В том случае, если в качестве двухвалентного рецептора выступает двухвалентное IgG-антитело, подобный подход предполагает получение моновалентных Fab фрагментов интересующего антитела.

Однако такой путь является не только методически сложным, т.к. предполагает еще и необходимость очистки моновалентных фрагментов рецептора от нерасщепленных двухвалентных молекул, но и затратным по времени и по количеству материала исследуемого рецептора, а также требует применения соответ-

ствуючих методів хімії протеїнів. По цій причині ми пропонуємо більш простий, як нам здається, метод проведення необхідних експериментів для визначення афінності двохвалентного рецептора (або антитіла) за допомогою методу поверхневого плазмонного резонанса.

Наша ідея перетворення двохвалентного рецептора в моновалентний, складається в наступному. В тому випадку, якщо до досліджуваного розчину двохвалентного рецептора додати достатньо високу концентрацію моновалентного ліганду, то після досягнення рівноваги в даній реакції може бути отримана така ситуація, коли частину рецепторів буде повністю заблоковано лігандом, а невелика частина – заблокована наполовину (тобто фактично вони стануть моновалентними) і тільки дуже невелика частина рецепторів буде повністю вільною від ліганду, тобто рецептори будуть залишатися двохвалентними. Очевидно, що для наших цілей нам потрібно досягти такого стану, щоб частина рецепторів, які залишаються двохвалентними (тобто не зв'язаними лігандом), була б незначною порівняно з частиною рецепторів, у яких заблокований тільки один з сайтів зв'язування, щоб такий рецептор поведінку мав, як якщо б він був моновалентним. Нижче ми розглянемо кількісні взаємозв'язки між співвідношеннями концентрацій рецепторів, у яких в суміші з лігандом при досягненні рівноваги заблоковані лігандом як обидва сайти зв'язування, один з сайтів зв'язування або ж обидва сайти зв'язування двохвалентного рецептора залишаються вільними.

Нехай у нас є концентрація досліджуваного рецептора, рівна  $r/2$ . Оскільки рецептор двохвалентний, то концентрація сайтів зв'язування буде в два рази вище, тобто рівна  $r$ . Якщо до даного розчину рецептора додати розчин відповідного ліганду певної концентрації, то при досягненні рівноваги між вільними реагентами і їх комплексами встановиться рівновага. Нехай концентрація сайтів рецептора, зв'язаних лігандом при рівновазі, буде рівною певній величині  $c$ . Звернемо увагу, що концентрацію ліганд-рецепторного комплексу  $c$  можна легко визначити за допомогою відомого співвідношення між константою рівноваги даної реакції,  $K$ , і початковими концентраціями рецептора  $r$  і ліганду  $l$ :

$$K = \frac{c}{(r-c)(l-c)} . \quad (7)$$

Тоді ймовірність,  $f$ , того, що будь-який з сайтів зв'язування заблокований лігандом, буде рівна  $f = c/r$ , а ймовірність того, що сайт зв'язування вільний, буде рівна  $1 - f$ , тобто:

$$1 - f = 1 - \frac{c}{r} = \frac{(r-c)}{r} . \quad (8)$$

Якщо зв'язування ліганду кожним з двох сайтів рецептора є взаємно незалежним, то ймовірність того, що при досягненні рівноваги обидва сайти рецептора зв'язали ліганд, рівна квадрату ймовірності зв'язування лігандом кожним з сайтів, тобто  $f_2 = f^2 = c^2/r^2$ . Точно так же ймовірність того, що обидва сайти рецептора не будуть заблоковані лігандом,  $f_0$ , рівна квадрату ймовірності того, що будь-який з сайтів є незблокованим, тобто:

$$f_0 = \frac{(r-c)^2}{r^2} . \quad (9)$$

Тоді ймовірність,  $f_1$ , того, що у двохвалентного рецептора буде заблокований лігандом тільки один з двох сайтів зв'язування, буде рівна:

$$f_1 = 1 - \frac{c^2}{r^2} - \frac{(r-c)^2}{r^2} = \frac{2c(r-c)}{r^2} . \quad (10)$$

Щоб знайти чисельні концентрації частин рецепторів, у яких в стані рівноваги будуть заблоковані лігандом як обидва сайти зв'язування, або тільки один з сайтів зв'язування, або ж обидва сайти зв'язування будуть вільні, слід помножити ймовірність існування кожного з перерахованих варіантів на концентрацію наявного рецептора, тобто на  $r/2$ .

Очевидно також, що співвідношення між концентраціями рецепторів, у яких один з рецепторів вільний, а інший заблокований лігандом, і тих рецепторів, у яких обидва сайти зв'язування вільні, буде рівно співвідношенню  $f_1/f_0$ , тобто:

$$\frac{f_1}{f_0} = \frac{2c(r-c)}{r^2} : \frac{(r-c)^2}{r^2} = \frac{2c}{r-c} . \quad (11)$$

Використовуючи рівняння (8–11), легко розрахувати, яка частина двохвалентних рецепторів буде при досягненні рівноваги повністю заблокована лігандом, яка частина заблокована наполовину і яка частина рецепторів буде не зв'язана з лігандом. Щоб спростити розрахунки, приймемо за одиницю повну концентрацію рецептора,

тогда концентрация сайтов рецептора, которые находятся в комплексе с лигандом при состоянии равновесия, можно представлять как часть единицы. Например, пусть для данной лиганд-рецепторной пары при определенных условиях в состоянии равновесия заблокирована половина сайтов связывания рецептора, т.е.  $c = 0,5$  и, следовательно,  $f = 0,5$ . Тогда, согласно уравнениям (8) и (9), часть рецепторов, у которых лигандом заблокирован один из сайтов связывания, равна 0,5, а часть рецепторов, у которых оба сайта свободны, равна 0,25. Следовательно,  $f_1/f_0 = 2$ , т.е. в рассматриваемой смеси часть рецепторов, которые наполовину заблокированы лигандом и, следовательно, которые можно рассматривать, как моновалентные, всего в два раза выше, чем часть рецепторов, не связавших лиганд, т.е. бивалентных рецепторов. Очевидно, что подобная смесь лиганда и рецептора не может быть использована в экспериментах по определению аффинности рецепторов с помощью поверхностного плазмонного резонанса, т.к. в ней слишком велика часть двухвалентных рецепторов, т.е. таких, которые не заблокированы лигандом, и поэтому точность определения аффинности взаимодействия будет невысокой.

Представим себе, что концентрацию лиганда в смеси с рецептором увеличили так, что 90% сайтов связывания образовали комплексы с лигандом, т.е.  $c = 0,9$ . Тогда часть двухвалентных рецепторов, у которых оба сайта связывания заблокированы лигандом, будет равна  $c^2/r^2 = 0,81$  (таблица), часть рецепторов, совершенно не связавших лиганд, будет равной  $(r-c)^2/r^2 = 0,01$ , а часть рецепторов, у которых один сайт заблокирован лигандом, а второй является свободным, достигнет  $2c(r-c)^2/r^2 = 0,18$ . Следовательно при данных обстоятельствах

часть рецепторов, ставших моновалентными вследствие блокирования лигандом одного из сайтов связывания, превышает в 18 раз часть рецепторов, не связавших лиганд и ведущих себя как двухвалентные рецепторы. Иными словами, только чуть более 5% рецепторов, способных при данных условиях взаимодействовать с чипом, являются двухвалентными, а остальные (почти 95%) являются моновалентными. Полагаем, что подобную смесь рецептора с лигандом вполне можно использовать для определения аффинности взаимодействия рецептора и лиганда методом поверхностного плазмонного резонанса.

Большого соотношения между наполовину заблокированными рецепторами и рецепторами, не связавшими антиген, можно достичь еще более повысив концентрацию лиганда в смеси с исследуемым рецептором (таблица). Например, при концентрации лиганда, которая приводит к блокированию 95% сайтов связывания, данное соотношение достигает 38, а при блокировании 99% сайтов связывания это соотношение увеличивается до 198. Следовательно, часть рецепторов, остающихся двухвалентными при подобных условиях, является ничтожной по сравнению с частью рецепторов, наполовину заблокированных лигандом, и поэтому присутствием двухвалентных рецепторов в данной смеси рецептора с лигандом вполне можно пренебречь.

Недостатком предложенного нами подхода может быть то, что для подобных экспериментов придется использовать более высокие концентрации исследуемого рецептора (в 5–10 раз выше), чем для случая, когда рецептор используют в отсутствие лиганда. Тем не менее, предлагаемый подход является простым и позволяет определить аффинность взаимодей-

*Зависимость соотношения между концентрациями двухвалентных рецепторов, у которых оба сайта заблокированы лигандом  $f_2$ , один из сайтов связывания заблокирован лигандом  $f_1$ , и концентрацией рецепторов, не связавших лиганд  $f_0$ , от того, какая часть сайтов связывания рецепторов ( $f$ ) заблокирована антигеном после достижения состояния равновесия в реакции лиганд-рецепторного взаимодействия*

$f = \frac{c}{r}$	$f_2 = \frac{c^2}{r^2}$	$f_0 = \frac{(r-c)^2}{r^2}$	$f_1 = \frac{2c(r-c)}{r^2}$	$\frac{f_1}{f_0}$
0,10	0,0100	0,8100	0,1800	0,22
0,50	0,2500	0,2500	0,5000	2
0,90	0,8100	0,0100	0,1800	18
0,95	0,9025	0,0025	0,0950	38
0,99	0,9801	0,0001	0,0198	198

ствія рецептора и соответствующего лиганда, который фиксируют на поверхности чипа (или же двухвалентного антитела и антигена) с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса.

Таким образом, нами показано, что присутствие лиганда в растворе, не содержащем рецептор, на этапе, когда происходит диссоциация ранее связавшегося рецептора с иммобилизованным лигандом, приводит к повышению точности определения аффинности взаимодействия. Продемонстрировано также, что для определения констант скорости реакции связывания рецептора с иммобилизованным лигандом достаточно проанализировать кривую связывания исследуемых реагентов, тогда как анализ кривой диссоциации рецептора, ранее связавшегося с иммобилизованным лигандом, не является необходимым. Нами также предложен новый подход для определения аффинности двухвалентных рецепторов (или антител), которые находятся в исследуемом образце жидкости, а соответствующий лиганд (или антиген) является иммобилизованным на чипе прибора-анализатора. Идея этого подхода состоит в том, что в присутствии избытка лиганда более 90% двухвалентных рецепторов являются наполовину заблокированы лигандом и по этой причине ведут себя, как одновалентные рецепторы. Это позволяет применить теорию, разработанную для моновалентного рецептора с целью оценки аффинности двухвалентных рецепторов или антител методом ППР.

### НОВИЙ ПІДХІД У ВИЗНАЧЕННІ АФІННОСТІ ДВОВАЛЕНТНИХ АНТИТІЛ МЕТОДОМ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ. ТЕОРІЯ

*С. О. Бобровник, М. О. Демченко,  
С. В. Комісаренко*

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ;  
e-mail: s-bobrov@bk.ru

В статті розглянуто деякі теоретичні питання аналізу аффинності двовалентних рецепторів (або антитіл) за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу. Показано, що наявність ліганду в розчині, який не містить рецептор на етапі, коли відбувається дисоціація раніше зв'язаного рецептора з іммобілізованим лігандом, приводить до підвищення точності визначення аффинності взаємодії. Встановлено, що

для визначення констант швидкості реакції зв'язування рецептора з іммобілізованим лігандом достатньо проаналізувати криву зв'язування досліджуваних реагентів, тоді як аналіз кривої дисоціації рецептора, раніше зв'язаного з іммобілізованим лігандом, не є необхідним. Нами також запропоновано новий підхід для визначення аффинності двовалентних рецепторів (або антитіл), які знаходяться в досліджуваному зразку рідини, а відповідний ліганд (або антиген) є іммобілізованим на чипі приладу-аналізатора.

**Ключові слова:** аффинність взаємодії; метод поверхневого плазмонного резонансу; константа рівноваги; константи швидкості реакції.

### NEW APPROACH IN EVALUATING AFFINITY OF BIVALENT ANTIBODIES BY THE METHOD OF SURFACE PLASMON RESONANCE. THEORY

*S. A. Bobrovnik, M. O. Demchenko,  
S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: s-bobrov@bk.ru

#### Summary

Theoretical aspects of the affinity evaluation for the interaction between bivalent receptors (or antibodies) and corresponding ligands (or antigens) are considered. It was shown that the ligand presence in the solution at the stage when the receptor dissociation occurs leads to the increase of the affinity evaluation accuracy. We demonstrated that the analysis of the dissociative curve of the receptor from the chip is not necessary for affinity determination; the analysis of associative curve is sufficient for this purpose. We also suggested a new approach for evaluating the affinity of bivalent receptors (or antibodies) when these reagents are present in the studied solution and the correspondent ligand (or antigen) is immobilized on the chip.

**Key words:** affinity of interaction; method of surface plasmon resonance; equilibrium constant; rate constants.

1. *Malmqvist M.* // Nature. — 1993. — **361** (6408). — P. 186–187.
2. *Malmqvist M.* // Curr. Opin. Immunol. — 1993. — **2**. — P. 282–286.
3. *Zhang X., Oglesbee M.* // Biol. Proced. Online. — 2003. — **5**. — P. 170–181.



4. *Karlsson R., Larsson A.* // *Mol. Biol.* – 2004. – **248**. – P. 389–415.
5. *MacKenzie C. R., Hirama T., Deng S. J. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**. – P. 1527–1533.
6. *Schuck P., Millar D. B., Kortt A. A.* // *Anal. Biochem.* – 1998. – **265**. – P. 79–91.
7. *Heinrich L., Tissot N., Hartmann D. J., Cohen R.* // *J. Immunol. Methods.* – 2010. – **352**. – P. 13–22.
8. *Бобровник С. А., Лященко К. П., Комиссаренко С. В.* // *Доп. АН УРСР.* – 1990. – № 6. – С. 71–74.
9. *Bobrovnik S. A.* // *Comments Molec. Cellular Biophys.* – 1999. – 9. – P. 323–356.
10. *Bouvet J. P., Stahl D., Rose S. et al.* // *J. Autoimmun.* – 2001. – **16**. – P. 163–172.

Получено 14.05.2012