

Московский Физико-Технический Институт
(Национальный Исследовательский Университет)

На правах рукописи

ГУТЕНЕВА Наталия Викторовна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ МАЛЫХ
МОЛЕКУЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАГНИТНЫХ НАНОМАРКЕРОВ**

03.01.02 - Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва - 2019

Работа прошла апробацию на кафедре технологического предпринимательства федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Научный руководитель: Никитин Петр Иванович, кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией биофотоники федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Защита диссертации состоится «20» декабря 2019 года в 14-00 на заседании диссертационного совета ФБМФ 03.01.02.008, по адресу: 115184, г. Москва, Климентовский пер., д.1, с.1, МФТИ

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национальный исследовательский университет) <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-fiziko-matematicheskie-nauki.php>

Работа представлена «08» октября 2019 года в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с п. 3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно - технической политике»

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. К малым молекулам относятся низкомолекулярные соединения, проявляющие высокую биологическую активность в крайне низких концентрациях, такие как антибиотики, витамины, наркотики, гормоны, некоторые лекарственные препараты, яды и токсины. Задача быстрого количественного определения таких соединений является актуальной для многих отраслей науки и техники, например, при ранней диагностике ряда инфекционных заболеваний, определении следовых количеств антибиотиков и токсинов в продуктах питания, проверках сотрудников режимных объектов на наркотики, при проведении контртеррористических операций и случаях оказания экстренной медицинской помощи. При этом к соответствующим биосенсорным системам для регистрации различных малых молекул предъявляется ряд требований: они должны обладать высокой чувствительностью и специфичностью, быть относительно простыми в использовании и позволять быстро количественно определять низкомолекулярные соединения в небольшом объеме различных биологических образцов. Существующие аналитические методы количественной детекции малых молекул либо весьма трудоемки и дорогостоящи, либо имеют недостаточно высокую чувствительность. Трудности иммунохимической регистрации данных веществ обусловлены их низкой молекулярной массой и наличием всего одного эпитопа связывания со специфичными антителами, что не позволяет их регистрировать в стандартном сэндвич-формате иммунохроматографического анализа. В связи с этим, задача быстрого и чувствительного определения малых молекул, имеющая высокую научную и практическую значимость, еще далека от решения и требует поиска новых идей и подходов.

Целью работы являлась разработка биосенсорных методов для высокочувствительной количественной экспрессной регистрации малых молекул с использованием магнитных нанометок и распознающих антител. Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи**:

- разработать магнитометрические методы измерения ультранизких концентраций малых молекул в сложных биологических жидкостях, основанные на принципе иммунохроматографии в конкурентном формате с использованием магнитных наночастиц в качестве меток, детектируемых по нелинейному перемагничиванию на комбинаторных частотах;
- исследовать с помощью методов спектрально-фазовой интерферометрии и спектрально-корреляционной интерферометрии кинетику реакций межмолекулярного взаимодействия соединений, входящих в разработанные иммунохроматографические биосенсорные системы, с целью оптимизации всех стадий иммунохроматографического анализа;

- произвести выбор реагентов путем измерения констант равновесной диссоциации с помощью методов спектрально-фазовой интерферометрии и спектрально-корреляционной интерферометрии;
- разработать мультиплексный магнитометрический метод одновременного измерения концентраций нескольких видов малых молекул в биологических жидкостях;
- провести валидацию разработанных методов на нескольких модельных малых молекулах в различных биологических образцах.

Научная новизна и практическая значимость работы

В рамках диссертационной работы впервые:

- разработан магнитометрический иммунохроматографический экспресс-метод высокочувствительного измерения концентрации свободного тироксина в сыворотке крови человека на основе магнитных наночастиц, конъюгата тироксина с биотином и высокоаффинного взаимодействия «биотин-стрептавидин» с пределом детекции 16 фг/мл, что в 100 раз лучше предела детекции традиционного иммуноферментного анализа;
- разработан мультиплексный магнитометрический иммунохроматографический метод одновременного измерения концентраций нескольких видов малых молекул, значительно превосходящий по совокупности аналитических характеристик иммунохроматографические биосенсорные системы на основе оптических меток;
- развит эффективный магнитометрический метод оптимизации конкурентных форматов иммунохроматографического анализа, основанный на регистрации нелинейных магнитных наноматериалов на комбинаторных частотах и картировании распределения магнитных нанометок по всем составляющим тест-полосок;
- с помощью оптических методов спектрально-фазовой интерферометрии и спектрально-корреляционной интерферометрии охарактеризованы кинетические параметры взаимодействия между моноклональными антителами к тироксину и конъюгатом тироксина с биотином, показана стерическая доступность двух малых молекул в составе использованного конъюгата (тироксина и биотина) для одновременного взаимодействия с двумя большими молекулами (антителом и стрептавидином);
- разработаны магнитометрические иммунохроматографические биосенсоры для быстрого измерения концентраций социально-значимых малых молекул: фолиевой кислоты, хлорамфеникола, фентанила, морфина, метамфетамина, продемонстрированы конкурентоспособные характеристики этих биосенсоров, такие как пределы детекции и величины динамических диапазонов измерения концентраций указанных молекул.

Положения диссертационного исследования, выносимые на защиту:

- Магнитометрические иммунохроматографические биосенсорные системы для быстрых измерений ультрамалых (следовых) концентраций низкомолекулярных соединений, основанные на стандартных форматах конкурентного иммуноанализа, но с использованием магнитных наночастиц в качестве меток, детектируемых по нелинейному перемагничиванию на комбинаторных частотах.
- Мультиплексный иммунохроматографический экспресс-метод одновременного измерения малых (следовых) концентраций нескольких наркотических соединений в моче с использованием магнитных нанометок, детектируемых по нелинейному перемагничиванию на комбинаторных частотах.
- Биосенсорный метод количественной регистрации фентанила в моче на основе стандартных иммунореагентов, магнитных нанометок и универсальных иммунохроматографических полосок с тестовой линией из стрептавидина, позволяющих легко перенастроить анализ на другие малые молекулы.
- Высокочувствительные иммунохроматографические биосенсоры для измерения концентрации гормона щитовидной железы – свободного тироксина - в сыворотке крови человека на основе магнитных нанометок, конъюгата тироксина с биотином и высокоаффинного взаимодействия «биотин-стрептавидин».
- Результаты характеристики кинетики межмолекулярного взаимодействия между моноклональными антителами к тироксину и конъюгатом тироксина с биотином с помощью оптических методов спектрально-фазовой интерферометрии и спектрально-корреляционной интерферометрии, продемонстрировавшие, в том числе, стерическую доступность двух малых молекул в составе использованного конъюгата (тироксина и биотина) для одновременного взаимодействия с двумя большими молекулами (антитела и стрептавидина).

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментов, обработке полученных данных, подготовке материалов научных публикаций и написании диссертационной работы.

Степень достоверности и апробация результатов работы. В настоящей работе применялись современные экспериментальные методы и теоретические модели, проводились контрольные проверки, обеспечивающие достоверность результатов. Основные результаты исследования были представлены на международных конференциях: Moscow International Symposium on Magnetism MISM-2017, Москва, Россия, 1-5 июля 2017 г.; 4rd International Symposium "Lasers in Medicine and Biophotonics" Санкт-Петербург, Россия (в рамках Laser Optics,

2016 International Conference), 27 июня – 3 июля 2016 г.; 18th International Conference on Laser Optics ICLO 2018, Санкт-Петербург, Россия, 4–8 июня 2018 г.; 12th European Magnetic Sensors and Actuators Conference (EMSA), Афины, Греция, 1-4 июля 2018 г.; Конференции «Наука будущего» и Форум «Наука будущего – наука молодых», Сочи, Россия, 14-17 мая 2019 г.; TechConnect World Innovation Conference and Expo, Анахайм, Калифорния, США, 13-16 мая 2018 г.; 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (MagMeet 2018), Копенгаген, Дания, 22-26 мая 2018 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи и 9 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав с обзором литературы, описанием использованных материалов и методов, полученными результатами и обсуждением экспериментов, а также выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 119 страницах, включает 42 рисунка и 2 таблицы. Список цитируемой литературы включает 121 ссылку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цели и задачи работы, отражены научная новизна и практическая значимость, описана апробация полученных результатов, вклад автора, представлены защищаемые положения.

Первая глава представляет собой обзор литературы, в котором приводится описание современных методов регистрации малых молекул. Приведены методы газовой и жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией, безметочные и иммуноаналитические методы. Описаны существующие форматы иммуноанализов, проведено сравнение их характеристик. Рассмотрены различные типы меток и способы их детекции – оптические, флуориметрические, электрохимические и магнитометрические.

Во второй главе перечислены основные материалы и экспериментальные методы, которые автор использовал в работе над диссертацией.

Рассмотрен метод регистрации нелинейных магнитных материалов на комбинаторных частотах, применяемый для детекции магнитных нанометок в разработанных магнитометрических биосенсорах для высокочувствительной экспресс-регистрации низкомолекулярных соединений.

Принцип метода заключается в нелинейном намагничивании суперпарамагнитных наночастиц, помещенных в переменное магнитное поле, возбуждаемое на двух частотах f_1 и f_2 , и последующей регистрации магнитного сигнала на линейной комбинации $f = f_1 \pm 2f_2$. Отклик на комбинаторных частотах f пропорционален общей массе помещенных в магнитное поле суперпарамагнитных наночастиц или количеству самих наночастиц при небольшом разбросе их размеров.

Подбор оптимальных антител и конъюгатов, оптимизация экспериментов и изучение кинетических параметров иммунореагентов проводились с помощью безметочных биосенсоров, принцип работы которых основан на спектрально-фазовой интерферометрии и спектрально-корреляционной интерферометрии. Данные биосенсоры обеспечивают мониторинг в реальном времени межмолекулярных взаимодействий иммунокомплексов и наночастиц, связывающихся на поверхности сенсорных чипов в результате биохимических реакций. В качестве сенсорных чипов использовались покровные стекла микроскопа, представляющие собой плоскопараллельные прозрачные пластины с иммобилизованным на их поверхности биомолекулярным слоем. Падающий на поверхность сенсорного чипа луч от суперлюминесцентного диода разбивается на два интерферирующих луча: один - отраженный от нижней части пластины, а другой - от границы раздела биомолекулярного слоя на поверхности

жидкости. Результат интерференции зависит от толщины биомолекулярного слоя, изменяющейся во время анализа за счет ассоциации и диссоциации биологических молекул на поверхности сенсорного чипа, что приводит к изменению разности фаз между интерферирующими волнами и регистрируется в реальном времени в виде сенсограммы.

Для реализации предложенной схемы высокочувствительного иммуноанализа гормона щитовидной железы был использован конъюгат, состоящий из молекулы биотина и молекулы тироксина, разделенных спейсером из 5 углеродных остатков (Рисунок 1). Конъюгация молекул тироксина и биотина производилась путем N-ацилирования N-(3-аминопропил) биотинамида N-гидроксисукцинимидным эфиром N-ацитилтироксина за счет присоединения карбоксильной группы биотина к аминогруппе тироксина.

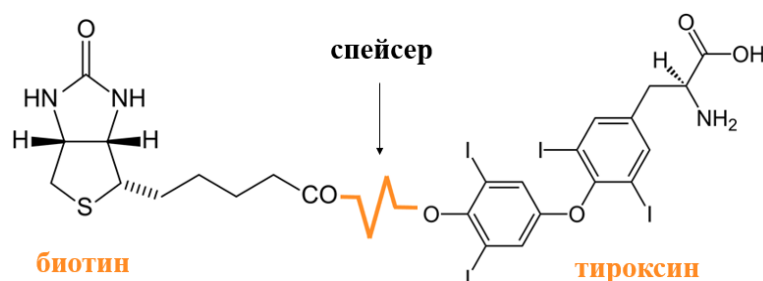


Рисунок 1 - Схематичное изображение конъюгата тироксина с биотином, разделенных спейсером из 5 углеродных остатков

Сложности конъюгации данных молекул обусловлены существенным различием их коэффициентов растворимости. Кроме того, для эффективного распознавания остатков биотина стрептавидином и распознавания остатков тироксина специфичными к тироксину антителами, а также сохранения ими функциональных активностей, молекулы биотина и тироксина в составе конъюгата должны быть стерически разделены. Для пространственного разделения тироксина и биотина использовались специальные спейсеры – молекулы, представляющие цепи углеродных остатков. При конъюгации молекул со спейсерами необходимо учитывать, что в случае большой длины спейсера может возникать неспецифическая сорбция конъюгата на белках, а при коротком спейсере функциональные остатки конъюгируемых молекул будут перекрываться. Оптимальная длина молекулы-спейсера составляет 5-6 углеродных остатков.

Разработанные магнитометрические биосенсоры для высокочувствительной экспресс-регистрации малых молекул основаны на методе иммунохроматографии в конкурентном формате с использованием магнитных наночастиц в качестве детектируемых меток. Конъюгаты

регистрируемых антигенов с белками-носителями наносились на тестовые линии тест-полосок (Рисунок 2).

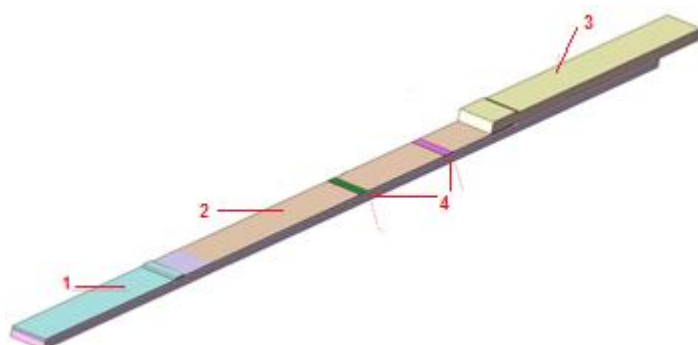


Рисунок 2 – иммунохроматографическая тест-полоска: 1 – зона образца; 2 – зона обнаружения; 3 – адсорбционная зона; 4 – тестовые линии

Исследуемые образцы, содержащие антигены в известных концентрациях и меченные магнитными частицами специфичные антитела, наносились в зону образца, после чего мигрировали вдоль тест-полосок в зону обнаружения под действием капиллярных сил. Малые молекулы в образце конкурировали с конъюгатами, иммобилизованными на тестовых линиях за ограниченное число сайтов связывания меченных антител. Некоторые из антител связывались с конъюгатами и задерживались на соответствующей тестовой линии, а оставшиеся связывались с антигенами в исследуемом образце и проходили мимо тестовой линии, накапливаясь в адсорбционной (впитывающей) мембране. Магнитные частицы на каждой из тестовых линий регистрировались магнетометром, принцип работы которого основан на методе регистрации нелинейного магнитного материала на комбинаторных частотах.

Для валидации результатов, полученных при помощи разработанных магнитометрических биосенсоров, был использован метод твердофазного иммуноферментного анализа в конкурентном формате. В качестве фермента применялась пероксидаза хрена, а в качестве субстрата – тетраметилбензидин. Измерения оптического сигнала, полученного после остановки ферментативной реакции, проводились при помощи спектрофотометра на длине волны 450 нм.

Третья глава посвящена описанию и обсуждению полученных в диссертации результатов.

В первом подразделе главы рассмотрен разработанный магнитометрический биосенсор для высокочувствительной количественной экспресс-регистрации свободного тироксина (Т4), принцип работы которого основан на иммунохроматографическом анализе в конкурентном формате с использованием магнитных наночастиц, конъюгата тироксина с биотином и

высокоаффинного взаимодействия «биотин-стрептавидин». В стандартном иммунохроматографическом анализе магнитные частицы, связанные со специфическими антителами, проходят тестовую линию тест-полоски всего за несколько секунд и не всегда успевают связаться с иммобилизованными на тестовой линии конъюгатами, что значительно ограничивает чувствительность анализа. В связи с этим, для высокочувствительной регистрации свободного тироксина была предложена схема конкурентного иммунохроматографического анализа, отличающаяся от традиционного подхода, в котором антитела иммобилизуются на тестовой линии, а конъюгат малой молекулы с белком-носителем (например, альбумином) иммобилизуется на регистрируемой метке, или наоборот. В предложенной схеме захват магнитных частиц на тестовой линии происходил за счет высокоаффинного взаимодействия биотина со стрептавидином, характеризующегося чрезвычайно высоким значением равновесной константы диссоциации $\sim 10^{-15}$ М.

Образец, содержащий конъюгат тироксина с биотином и конъюгаты специфичных к тироксину антител с магнитными нанометками, мигрирует по тест-полоске под действием капиллярных сил и взаимодействует со стрептавидином, нанесенным на тестовую линию (Рисунок 3).

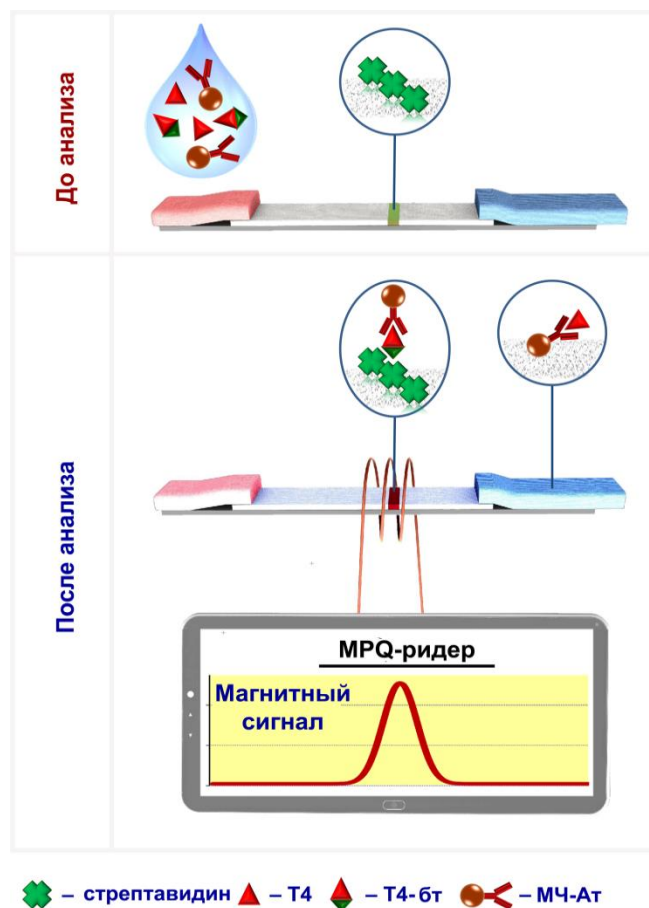


Рисунок 3 - Принцип конкурентного иммунохроматографического анализа на тест-полоске со стрептавидином на тестовой линии и регистрация магнитного сигнала при помощи метода регистрации магнитных материалов по нелинейному перемагничиванию на комбинаторных частотах

Таким образом, на тестовой линии образуются комплексы стрептавидин/конъюгат тироксина с биотином/меченные антитела. Причем чем меньшее количество конкурирующего свободного тироксина находится в анализируемом образце, тем больше таких комплексов образуется на тестовой линии. Для количественной регистрации магнитного сигнала тест-полоска вставляется в измерительную катушку магнетометра.

Для определения аналитических характеристик биосенсора была построена калибровочная кривая, демонстрирующая зависимость магнитного сигнала от концентрации свободного тироксина в сыворотке крови человека (Рисунок 4). В экспериментах использовались образцы сыворотки крови с известными концентрациями свободного тироксина: 10 пМ, 3 пМ, 1 пМ, 0,32 пМ, 0,1 пМ, 0,032 пМ, и 0,01 пМ. Предел детекции, определенный по критерию 2σ - отрицательный контроль минус двойное стандартное отклонение, составил 20 фМ или 16 фг/мл, что значительно превосходит пределы детекции стандартных методов регистрации свободного тироксина. Динамический диапазон разработанного иммунохроматографического анализа составил 3 порядка. Среднее время анализа не превышало 30 мин с учетом инкубации образцов сыворотки крови с конъюгатом тироксина с биотином и мечеными магнитными частицами антителами и сканирования тестовой линии тест-полоски при помощи магнетометра (40 сек).

Разработанный магнитометрический биосенсор может использоваться для обнаружения в небольших объемах сыворотки крови человека сверхнизких концентраций свободного Т4 в пределах от 20 фМ до 10 пМ (16 фг/мл – 8 пг/мл), являющихся клинически значимыми при гипотиреозе.

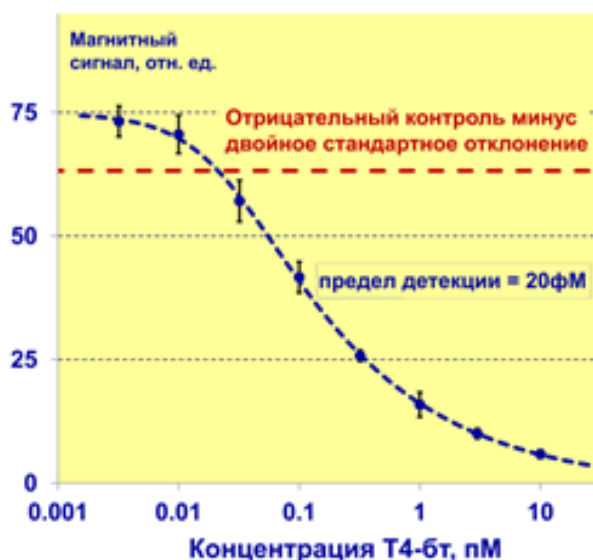


Рисунок 4 - Калибровочная кривая для количественного иммунохроматографического анализа на свободный тироксин.

Горизонтальная пунктирная линия красного цвета показывает пороговое значение в соответствии с критерием 2σ - отрицательный контроль минус двойное стандартное отклонение

Разработанный биосенсор обеспечивает значительно лучшие пределы детекции и больший динамический диапазон, чем у стандартных лабораторных методов иммунохимической регистрации свободного тироксина. Например, предел детекции методов на основе иммуноферментного анализа составляет около 3 пМ при динамическом диапазоне, равном 2 порядкам, и времени анализа свыше 1,5 ч. Самые чувствительные традиционные методы, основанные на хемилюминесцентном иммуноанализе с использованием микрочастиц, регистрируют свободный тироксин с пределом детекции в 0,25 пМ, при динамическом диапазоне и времени анализа, сопоставимыми с иммуноферментным анализом. Кроме того, все указанные современные методы детекции не могут осуществляться вне лабораторных условий и не подходят для экспресс-детекции тироксина. В отличие от них, разработанный биосенсор подходит для регистрации малых молекул *in situ* за время, не превышающее 30 мин, включая инкубацию, а также может выполняться персоналом, не обладающим специальной квалификацией.

Кинетическая характеристика и подбор используемых в экспериментах реагентов были осуществлены при помощи безметочных биосенсоров на основе методов спектрально-фазовой интерферометрии и спектрально-корреляционной интерферометрии. В подобных экспериментах растворы стрептавидина, конъюгата тироксина с биотином и моноклональных антител, специфичных к тироксину, в фосфатно-солевом буферном растворе последовательно пропускались через проточную систему оптического биосенсора с установленным биотинилированным сенсорным чипом. В качестве сенсорных чипов в экспериментах использовались микроскопные покровные стекла. Изменение толщины биослоя на поверхности сенсорного чипа происходило за счет ассоциации и диссоциации биомолекулярных комплексов, иммобилизованных в результате биохимических реакций на поверхности стекла. Зависимость изменения толщины от времени регистрировалось в реальном времени в виде сенсограмм. На рисунке 5 показан пример типичной сенсограммы, характеризующей взаимодействия специфичных антител с конъюгатом биотина с тироксином и того же конъюгата со стрептавидином на поверхности сенсорного чипа.

Согласно экспериментальным данным, сайты связывания конъюгата тироксин/биотин со стрептавидином и специфичными антителами к тироксину обладали хорошей стерической доступностью. Используемые безметочные интерферометрические методы позволили не только осуществлять количественный мониторинг каждого этапа анализа в реальном времени, но и оценить кинетические параметры взаимодействия между компонентами разработанного формата иммуноанализа.

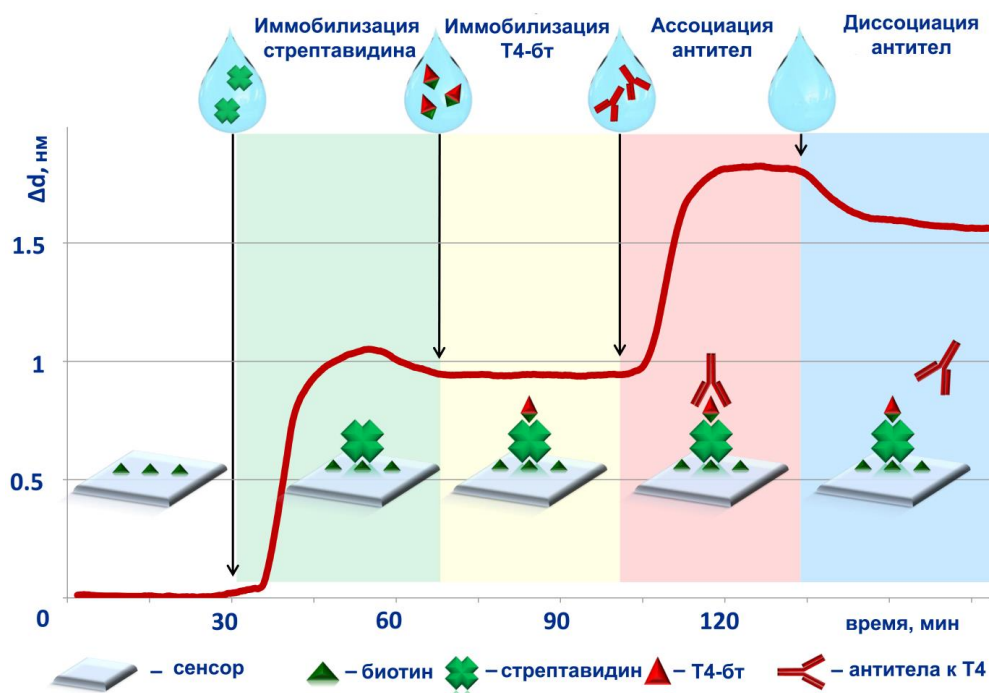


Рисунок 5 - Сенсограмма молекулярного взаимодействия на поверхности сенсорного чипа в процессе последовательного пропускания вдоль его поверхности растворов, содержащих: стрептавидин, конъюгат тироксина с биотином и антитела к тироксину

С помощью сенсограмм сорбции-десорбции, аналогичных приведенной на рисунке 5, была рассчитана равновесная константа диссоциации, равная $(6.0 \pm 0.8) \cdot 10^{-8}$ М, для взаимодействий между антителами к тироксину и конъюгатом тироксина с биотином. Полученное значение константы равновесной диссоциации указывает на хорошую аффинность тироксина в составе конъюгата, а также приемлемые кинетические параметры выбранных антител. Для характеристики конкуренции между свободным тироксином и конъюгатом тироксина с биотином была также вычислена равновесная константа диссоциации для взаимодействия между антителами и свободным тироксином, равная $(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-8}$ М. Важно отметить, что константы взаимодействия антитела с антигеном и его биотинилированным аналогом были одного порядка. Следовательно, использованный конъюгат тироксина с биотином способен эффективно конкурировать с анализируемым свободным тироксином за сайты связывания специфичных антител.

Выбранная схема детекции со стрептавидином на тестовой линии и конъюгатом тироксина с биотином представляется наиболее выгодной для высокочувствительной регистрации свободного тироксина, поскольку обеспечивает быстрое связывание нанометок за счет высокоаффинного взаимодействия биотина со стрептавидином.

В процессе разработки иммунохроматографической биосенсорной системы свободный тироксин подвергался химической модификации с целью получения биотинилированного Т4. Применение конъюгата тироксина с биотином в комбинации со стрептавидиновой тест-полоской для повышения чувствительности анализа является крайне перспективным подходом при разработке биосенсоров для регистрации широкого спектра малых молекул. Однако функционализация ряда малых молекул, относящихся к регламентированным веществам, например, особых категорий ядов и токсинов, а также наркотиков, не может быть осуществлена исследовательскими организациями, не имеющими специальных лицензий, необходимых для работы с перечисленными веществами в чистом виде. Поэтому для разработки биосенсорных систем для высокочувствительной количественной регистрации морфина, метамфетамина и фентанила была предложена модифицированная схема иммунохроматографического анализа в конкурентном формате, исключающая взаимодействие с перечисленными соединениями в чистом виде и основанная на использовании стандартных антител и коммерческих реагентов «антиген-белок-носитель».

В предложенной схеме конкурентного иммунохроматографического анализа стрептавидин наносился на тестовую линию тест-полоски (Рисунок 6), а конъюгат «магнитная частица/антиген-белок-носитель» и свободный антиген конкурировали за ограниченное число сайтов связывания биотинилированных антител в анализируемом образце.

Важным преимуществом данной схемы конкурентного формата иммунохроматографического анализа является универсальность используемой стрептавидиновой тест-полоски. Для регистрации других антигенов в конкурентном формате нет необходимости наносить их конъюгаты или специфичные к ним антитела на тестовую линию. Достаточно использовать универсальные тест-полоски, а исследуемые образцы инкубировать с соответствующими иммунореагентами для конкретного анализата.

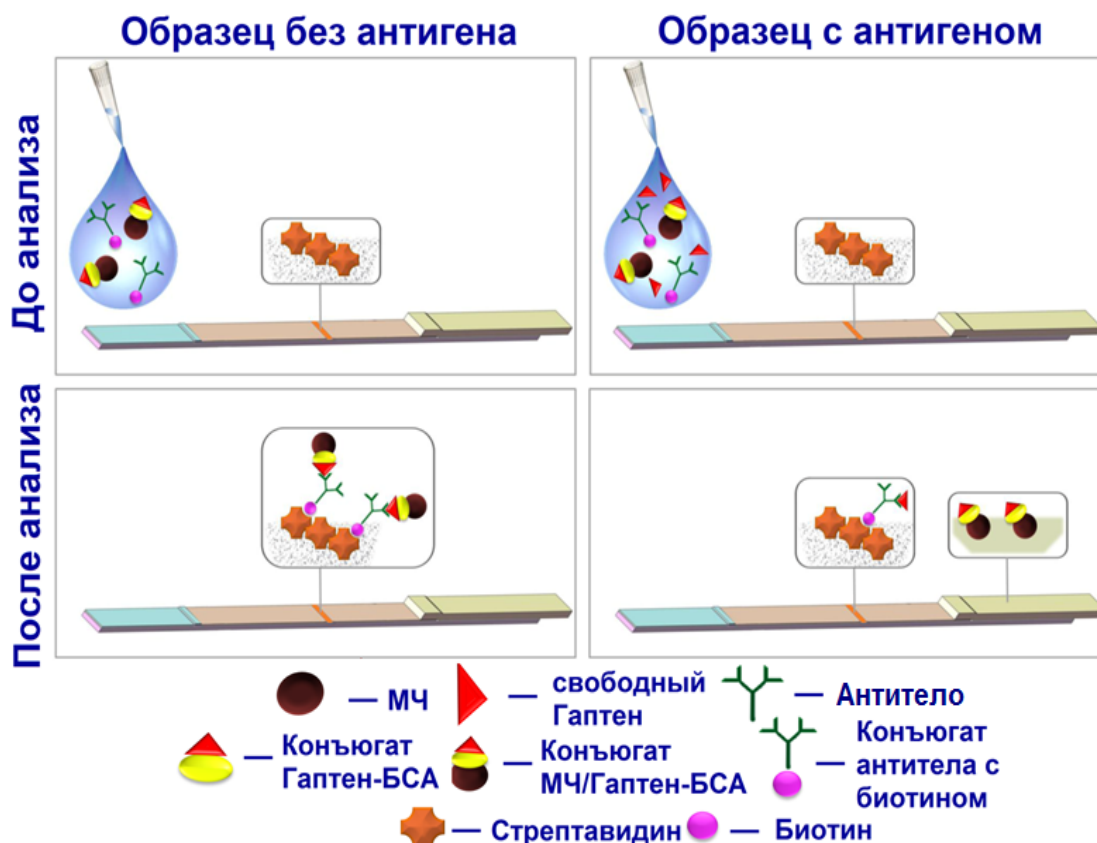


Рисунок 6 - Принцип метода конкурентного иммунохроматографического анализа на основе высокоаффинного взаимодействия «биотин-стрептавидин» с использованием магнитных частиц в качестве детектируемых меток

На рисунке 7 приведены калибровочные кривые, показывающие зависимости магнитных сигналов на тестовой линии от концентрации фентанила в прямом конкурентном иммунохроматографическом анализе (Рисунок 7а) и иммунохроматографическом анализе на основе высокоаффинного взаимодействия «биотин-стрептавидин» (Рисунок 7б).

Пределы детекции анализов составили 0,36 нг/мл и 0,05 нг/мл для прямого конкурентного формата иммунохроматографического анализа и иммунохроматографического анализа на основе высокоаффинного взаимодействия «биотин-стрептавидин», соответственно.

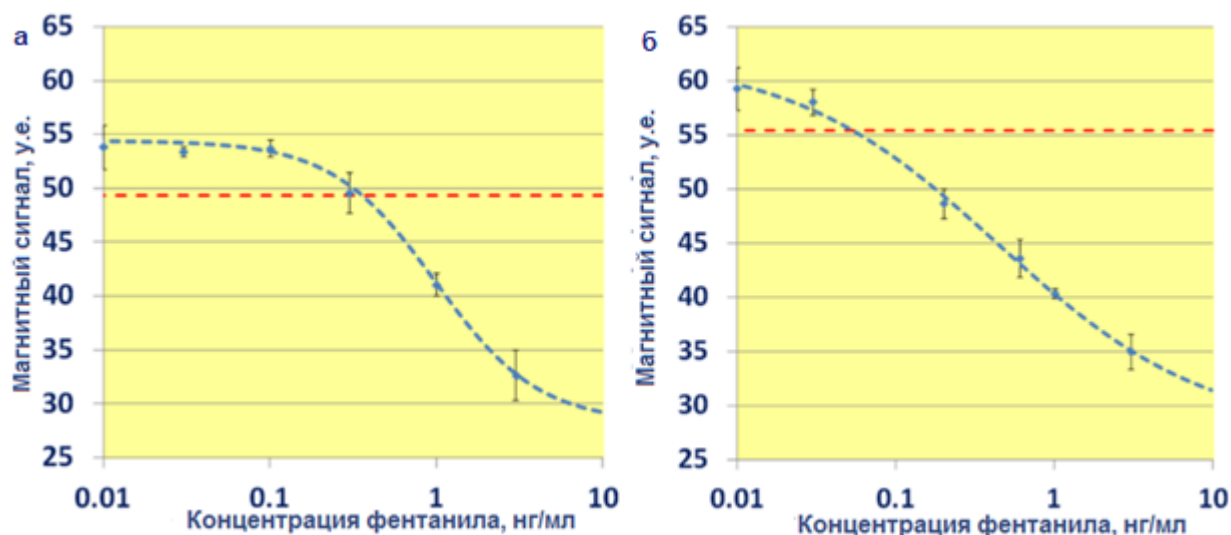


Рисунок 7 - Калибровочные кривые для детекции фентанила для: прямого конкурентного иммунохроматографического анализа (а) и иммунохроматографического анализа на основе высокоаффинного взаимодействия «биотин-стрептавидин» (б). Красными пунктирными линиями показаны пороговые значения в соответствии с критерием 2σ (отрицательный контроль минус двойное стандартное отклонение).

В прямом формате анализа из-за высокой скорости потока пробы через тест-полоску под действием капиллярных сил не все антигены, связавшиеся с антителами, успевают задержаться на тестовой линии, что снижает чувствительность анализа. Повышение чувствительности во втором предложенном формате, наблюдаемое в наших экспериментах, связано с тем, что для захвата магнитных частиц на тестовой линии использовано одно из самых сильных нековалентных взаимодействий между стрептавидином и биотином.

Во втором подразделе третьей главы описывается разработанный мультиплексный биосенсор для одновременного обнаружения трех разных наркотиков в моче. Антитела к морфину, фентанилу и метамфетамину наносились на соответствующие тестовые линии (ТЛ1, ТЛ2 и ТЛ3) (Рисунок 8). Магнитные частицы, ковалентно соединенные с конъюгатами морфина, фентанила, метамфетамина и бычьим сывороточным альбумином, добавляли к исследуемым образцам мочи объемом 75 мкл, содержащим известные концентрации морфина и метамфетамина и не содержащие фентанила. Полученный раствор инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре и наносили на зону начала миграции вдоль иммунохроматографической тест-полоски. После завершения миграции раствора, тест-полоску вставляли в трехканальный магнетометр, имеющий 3 индуктивные катушки, для одновременной регистрации магнитных сигналов на трех тестовых линиях.

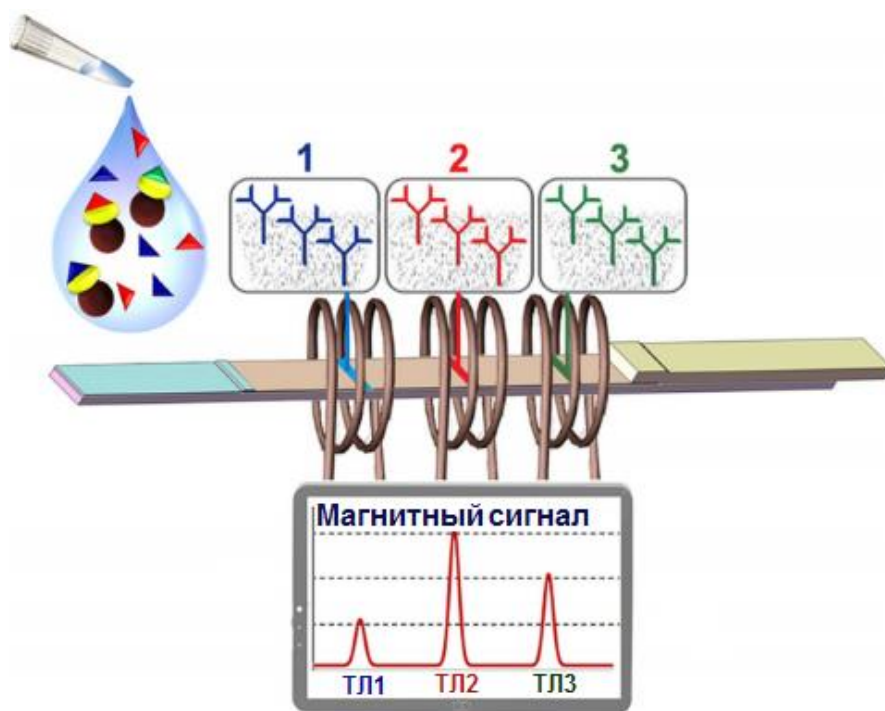


Рисунок 8 - Схема одновременной регистрации нескольких малых молекул

В экспериментах по мультиплексному анализу использовались сертифицированные образцы мочи человека, содержащие известные концентрации морфина и метамфетамина. Это позволило установить пределы мультиплексной детекции данных веществ и сравнить их с пределами детекции соответствующих малых молекул в моноплексном прямом конкурентном анализе.

Пределы детекции мультиплексного анализа составили 0,60 нг/мл и 3,0 нг/мл для морфина и метамфетамина, соответственно (Рисунок 9).

Антитела к фентанилу были нанесены на ТЛ2 тест-полосок (как показано на рисунке 9), однако сам антиген не присутствовал в исследуемом образце. Детектируемый магнитный сигнал для фентанила не изменялся при разбавлении образцов в широких пределах, что указывает на высокую специфичность и отсутствие кросс-реактивности.

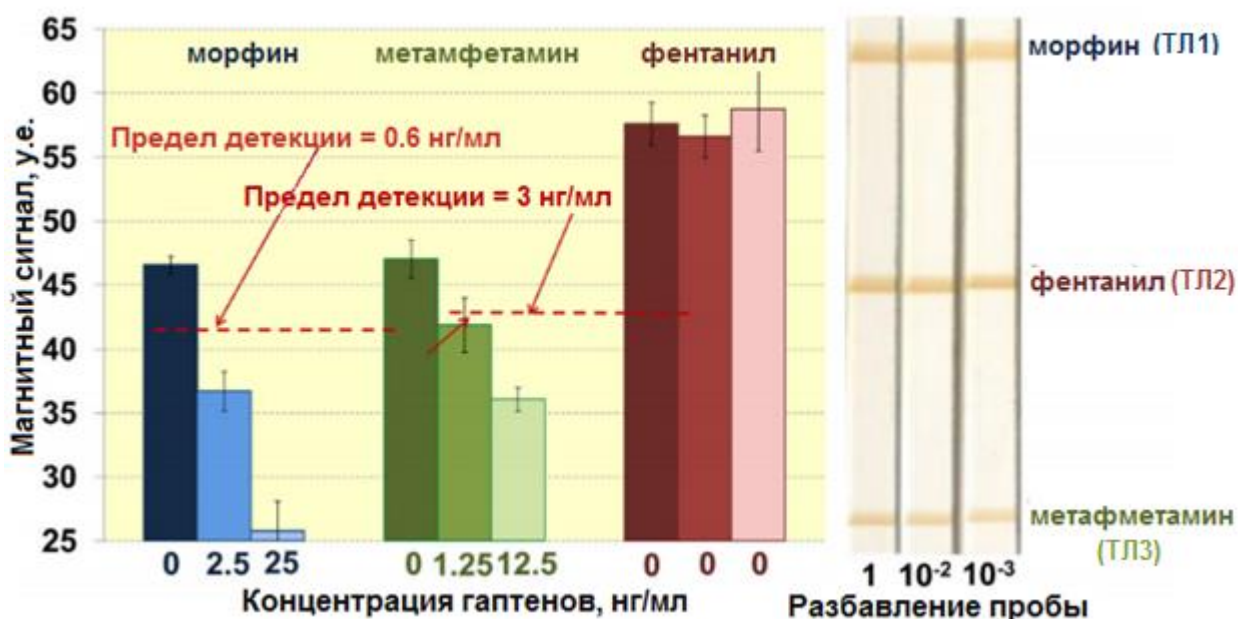


Рисунок 9 - Зависимости детектируемых магнитных сигналов от концентраций морфина, фентанила и метамфетамина в образцах в конкурентном формате иммунохроматографического анализа для одновременного определения трех наркотических соединений в моче. Красная пунктирная линия показывает пороговое значение, вычисленное по критерию 2σ (отрицательный контроль минус двойное относительное стандартное отклонение)

В третьем подразделе приведена валидация разработанных методов, проводившаяся на следующих социально значимых малых молекулах: морфине, метамфетамине, фолиевой кислоте и хлорамфениколе.

Типичные зависимости сигналов магнетометра от концентрации морфина, метамфетамина и фентанила показаны на рисунках 10, 11 и 7а, соответственно. Пределы детекции, полученные из таких зависимостей для морфина, фентанила и метамфетамина по критерию 2σ , составили 0,20 нг/мл, 1,30 нг/мл и 0,36 нг/мл, соответственно. Стандартное отклонение не превышало 7% для метамфетамина, 9% для морфина и 11% для фентанила.



Рисунок 10 - Зависимость сигнала магнетометра от концентрации морфина. Красная пунктирная линия показывает пороговое значение, вычисленное по критерию 2σ (отрицательный контроль минус двойное относительное стандартное отклонение)



Рисунок 11 - Зависимость сигнала магнетометра от концентрации метамфетамина. Красная пунктирная линия показывает пороговое значение, вычисленное по критерию 2σ (отрицательный контроль минус двойное относительное стандартное отклонение)

Разработанные биосенсоры для высокочувствительной экспресс-регистрации хлорамфеникола и фолиевой кислоты также основаны на конкурентном формате иммунохроматографического анализа с использованием магнитных частиц в качестве детектируемых меток. Типичная калибровочная кривая, на которой показана зависимость относительных магнитных сигналов магнетометра от концентрации хлорамфеникола в пробе, приведена на рисунке 12.

Пределы детекции иммунохроматографического анализа составили 0,40 нг/мл и 0,1 нг/мл для хлорамфеникола и фолиевой кислоты, а динамический диапазон составил 3 и 4 порядка, соответственно. Во всем диапазоне измеренных концентраций, выше предела детекции, стандартное отклонение не превышало 5%. Время анализа не превышало 20 мин, включая инкубацию.

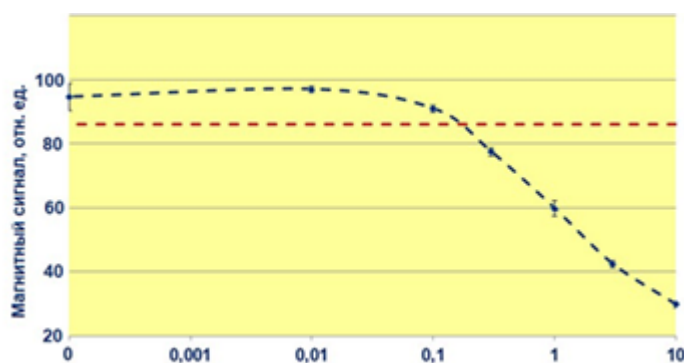


Рисунок 12 – Зависимость сигнала магнетометра от концентрации хлорамфеникола. Красная пунктирная линия показывает пороговое значение, вычисленное по критерию 2σ (отрицательный контроль минус двойное относительное стандартное отклонение)

Для валидации разработанной биосенсорной системы для высокочувствительной регистрации хлорамфеникола был проведен твердофазный иммуноферментный анализ с использованием тех же иммунореагентов.

Предел детекции иммуноферментного анализа, полученный по критерию 2σ , составил 10 нг/мл, а динамический диапазон - 2 порядка. Суммарное время анализа составило 6 ч с учетом времени инкубации.

Таким образом, разработанный экспресс-метод для высокочувствительной регистрации показал в 25 раз лучшую чувствительность, более широкий динамический диапазон и значительно меньшую продолжительность, по сравнению с твердофазным иммуноферментным анализом.

Приведенные аналитические характеристики были экспериментально получены в оптимизированных условиях. Для оптимизации иммунохроматографических магнитометрических биосенсорных систем в конкурентном формате был предложен метод, основанный на подсчете количества магнитных частиц во всем объеме тест-полоски и картировании их распределения (Рисунок 13) по всем составляющим иммунохроматографической тест-полоски.

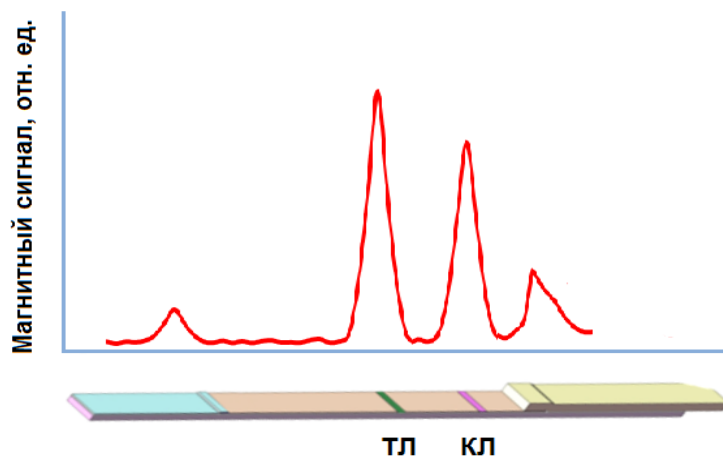


Рисунок 13 - Распределение магнитных частиц вдоль тест-полоски, измеренное при помощи магнетометра. Сигнал пропорционален количеству магнитных частиц

Картирование распределения магнитных частиц использовалось для оптимизации таких параметров анализа, как количество антител, иммобилизованных на них, pH буферных растворов, объем исследуемой пробы, количество конъюгата на тестовой линии. Этот метод также применялся для количественного мониторинга общей массы магнитных частиц путем расчета площади под кривой их распределения вдоль тест-полоски. Согласно экспериментам, этот параметр не зависел от концентрации антигена и оставался постоянным для каждой партии тест-полосок.

Выводы

1. Разработаны иммунохроматографические биосенсорные системы для высокочувствительной экспресс-детекции в конкурентном формате различных низкомолекулярных соединений (фентанила, метамфетамина, морфина, хлорамфеникола и фолиевой кислоты), основанные на использовании магнитных наночастиц в качестве меток, детектируемых по нелинейному переманчиванию. Показано, что полученные пределы детекции в 5-25 раз лучше пределов детекции иммуноферментного анализа для определения соответствующих малых молекул.
2. Разработан магнитометрический экспресс-метод одновременного количественного измерения концентраций нескольких наркотических соединений в моче, пределы детекции которого составили 0,60 нг/мл и 3,0 нг/мл для морфина и метамфетамина, соответственно.
3. С помощью оптических методов спектрально-фазовой интерферометрии и спектрально-корреляционной интерферометрии проведена характеристика кинетики реакций межмолекулярного взаимодействия между моноклональными антителами к тироксину и конъюгатом тироксина с биотином. Показана стерическая доступность двух малых молекул в составе использованного конъюгата (тироксина и биотина) для одновременного взаимодействия с двумя большими молекулами (антитела и стрептавидина). Определены численные значения равновесной константы диссоциации для взаимодействия «тироксин (в составе конъюгата) / антитело» $K_d = (6.0 \pm 0,8) \cdot 10^{-8} \text{ М}$.
4. Предложен экспресс-метод высокочувствительного количественного определения малых молекул с использованием универсальных иммунохроматографических полосок с тестовой линией из стрептавидина, стандартных иммунореагентов и магнитных нанометок. На основе данного метода разработана биосенсорная система для определения фентанила в образцах мочи. Предел детекции разработанного биосенсора составляет 148 пМ или 50 пг/мл и находится на уровне наиболее чувствительных лабораторных аналитических методов.
5. Разработан экспресс-метод высокочувствительной детекции свободного тироксина в сыворотке крови человека на основе применения конъюгата тироксина с биотином, высокоаффинного взаимодействия «биотин-стрептавидин» и магнитных нанометок. Предел детекции составляет 20 фМ или 16 фг/мл. Показано, что разработанный метод в 100 раз чувствительнее стандартного иммуноферментного анализа, выполненного на аналогичных реагентах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus:

1. **Natalia V Guteneva**, Sergey L Znoyko, Alexey V Orlov, Maxim P. Nikitin, Petr I Nikitin. Rapid lateral flow assays based on the quantification of magnetic nanoparticle labels for multiplexed immunodetection of small molecules: application to the determination of drugs of abuse // *Microchimica Acta*. 2019. T. 21, C. 1603-1611.
2. Sergey L Znoyko, Alexey V Orlov, Averyan V Pushkarev, Elizaveta N Mochalova, **Natalia V Guteneva**, Afanasy V. Lunin, Maxim P Nikitin, Petr I Nikitin. Ultrasensitive quantitative detection of small molecules with rapid lateral-flow assay based on high-affinity bifunctional ligand and magnetic nanolabels // *Analytica Chimica Acta*. 2018. T. 1034. C. 161-167.
3. Alexey V Orlov, Sergey L Znoyko, Averyan V Pushkarev, Elizaveta N Mochalova, **Natalia V Guteneva**, Afanasy V. Lunin, Maxim P Nikitin, Petr I Nikitin. Data on characterization and validation of assays for ultrasensitive quantitative detection of small molecules: Determination of free thyroxine with magnetic and interferometric methods // *Data in Brief*. 2018. T. 21. C. 1603-1611.
4. **Natalia V. Guteneva**, Sergey L. Znoyko, Alexey V. Orlov, Maxim P. Nikitin and Petr I. Nikitin. Volumetric registration of magnetic nanoparticles for optimization of quantitative immunochromatographic assays for detection of small molecules // *Book Series: The European Physical Journal Web of Conferences*. № 10006. T. 185. 2018.

Тезисы докладов конференций:

1. **N.V. Guteneva**, A.V. Orlov, V.A. Bragina, B.G. Gorshkov, S.L. Znoyko. High-Sensitive Analytical Systems for Rapid On-site Detection of Haptens // *Proceedings - International Conference Laser Optics 2018, ICLO 2018.*, - 2018.
2. V.A. Bragina, **N.V. Guteneva**, S.L. Znoyko, B.G. Gorshkov, A.V. Orlov. Detection of Autoimmune Disease Markers by Optical Label-Free Immunosensors // *Proceedings - International Conference Laser Optics 2018, ICLO 2018.*, - 2018.
3. P.I. Nikitin, **N.V. Guteneva**, A.V. Lunin, V.A. Bragina, S.L. Znoyko, A.V. Orlov, B.G. Gorshkov and M.P. Nikitin. Multiplex Express In Vitro Diagnostics based on Magnetic Nanoparticles // *TechConnect Briefs*. 2018. T. 3. C. 102-105.
4. **Guteneva, N.V.**, Znoyko S.L., Nikitin M.P., Orlov A.V., Nikitin P.I. Rapid and ultrasensitive detection of small molecules with immunosensors based on registration of magnetic nanolabels // *Moscow International Symposium on Magnetism MISM-2017. Book of Abstracts*. 2017. C. 76.

5. A.V. Orlov, A.G. Burenin, **N.V. Guteneva**, B.G. Gorshkov. Real-time sensitive detection of low molecular weight compounds by optical immunosensors // Proceedings - 2016 International Conference Laser Optics, LO 2016, 2016.
6. Брагина В.А., Орлов А.В., Знойко С.Л., **Гутенева Н.В.**, Новичихин Д.О., Горшков Б.Г., Никитин П.И. Разработка высокочувствительных биосенсорных подходов для быстрого количественного детектирования биомолекул в сложных матриксах // Конференции «Наука будущего» и Форум «Наука будущего – наука молодых», Сочи, Россия. 14-17 мая 2019 г.
7. Nikitin P.I., **Guteneva N.V.**, Bragina V.A., Znoyko S.L., Orlov A.V., Gorshkov B.G., Nikitin M.P. Multiplex Express In Vitro Diagnostics based on Magnetic Nanoparticles // Proceedings - TechConnect World Innovation Conference and Expo, Anaheim, California, USA, 13-16 May 2018, № 421.
8. Nikitin P.I., Orlov A.V., Bragina V. A., **Guteneva N.V.**, Znoyko S.L., Kolychev E.L., Nikitin M.P. Advanced magnetic nanoagents for in vitro diagnostics and biomedical research in vivo // Proceedings - 12th European Magnetic Sensors and Actuators Conference (EMSA), Athens, Greece, 1-4 July 2018, OM01.
9. Znoyko S.L., Pushkarev A.V., Orlov A.V., **Guteneva N.V.**, Bragina V.A., Gorshkov B.G., Nikitin P.I. Ultrasensitive In Vitro Diagnostics Platform Based on High-Affinity Magnetic Nanoprobes for Simultaneous Detection of Multiple Biomarkers // Proceedings - 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (MagMeet 2018), Copenhagen, Denmark, 22-26 May 2018.