

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ SPR АНАЛИЗА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИГЕН-АНТИТЕЛО, ВЫПОЛНЕННОГО С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРОВ BIACORE X-100 («CYTIVA», США) И MI-S200D («INTER-BIO», КИТАЙ)

О.В. Гнеденко\*, Ю.В. Мезенцев, Е.О. Яблоков, Л.А. Калужский, П.В. Ершов, А.А. Гулен, А.С. Иванов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121 Москва, Погодинская ул., 10; \* e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com

В настоящее время в связи с ограничениями доступности западного научного оборудования растет актуальность перехода на использование научных приборов, произведенных в Китае. Сказанное в полной мере относится к оптическим биосенсорам, работающим на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR). При этом возникают вопросы о сопоставимости экспериментальных данных, полученных с помощью биосенсоров западного и китайского производства. В данной работе были сопоставлены результаты SPR-анализа кинетики и аффинности взаимодействия антител IgG2a и IgG1 с белком А, полученные с помощью биосенсоров Biacore X-100 («Cytiva», США) и MI-S200D («Inter-Bio», Китай). Было показано, что значения констант скорости ассоциации, полученных на обоих приборах для двух антител, близки в пределах одного порядка. Для антител IgG1 практически совпадают константы скорости диссоциации. Оба прибора дают высококачественные данные, которые хорошо описывались простой моделью 1:1 (Langmuir binding).

**Ключевые слова:** поверхностный плазмонный резонанс (SPR); оптические биосенсоры; взаимодействие антиген-антитело; константы скорости образования и распада комплекса ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ); равновесная константа диссоциации ( $K_d$ )

DOI: 10.18097/BMCRM00246

## ВВЕДЕНИЕ

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR от англ. surface plasmon resonance) — это признанный аналитический метод, позволяющий исследовать взаимодействие нативных молекул в реальном времени без использования меток и дополнительных сопряженных процессов. Из анализа сенсограмм получают данные о кинетике, аффинности, специфичности и термодинамике межмолекулярных взаимодействий. Метод позволяет выполнять исследования с меньшим расходом материалов и более высокой производительностью по сравнению со многими другими биофизическими методами. Общий принцип работы биосенсоров на эффекте SPR состоит в детекции взаимодействия молекул аналита, находящегося в растворе, с молекулами лиганда, иммобилизованными на поверхности сменного оптического чипа.

В настоящее время существуют различные коммерческие платформы SPR с разными уровнями автоматизации, производительности и чувствительности обнаружения, широко распространённые в фармацевтической и биотехнологической промышленности в качестве основных аналитических инструментов. В течение примерно трёх десятилетий SPR-биосенсоры использовали для характеристики взаимодействий антиген-антитело [1–4], что имеет важное значение для успешной разработки лекарств. SPR-биосенсоры — золотой стандарт для измерения аффинности связывания и кинетики межмолекулярных взаимодействий — используются на ее различных этапах [5–7]. К таким биосенсорам относятся биосенсоры Biacore («Cytiva», США).

В настоящее время из-за ограничения импорта западного высокотехнологичного оборудования исследователям в нашей стране стали не доступны как новые SPR биосенсоры,

так и запчасти и расходные материалы к ранее купленным. Поэтому крайне актуален вопрос перехода на научные приборы, произведенные в Китае. При этом возникает вопрос о сопоставимости экспериментальных данных, полученных с помощью SPR-биосенсоров, произведенных в Китае, с данными, полученными на приборах от американских или европейских брендов. В литературе есть публикации о сравнении технических характеристик биосенсоров от разных производителей из США [8, 9]. В то же время отсутствуют данные по сравнению Biacore X-100 («Cytiva», США) и MI-S200D («Inter-Bio», Китай).

Целью работы было сравнение кинетики и аффинности связывания антител с белком А с помощью двух современных платформ SPR: Biacore X-100 и MI-S200D. Для сравнения двух SPR-биосенсоров мы выбрали хорошо изученную высоко аффинную пару белков – белок А/IgG. Данная пара также широко используется в области биотехнологии, например, для ориентированной иммобилизации антител на носителе через белок А [10].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали белок А от фирмы «ИМТЕК» (Россия). Моноклональные антитела мыши к иммуноглобулинам G и G1 человека, изотипы IgG2a и IgG1 соответственно (кат. № 1G1cc клоны 5A9cc и 2C11cc), были получены от фирмы «Хайтест» (Россия).

Анализ взаимодействия антител (IgG2a и IgG1) с белком А выполняли на оптических биосенсорах Biacore X-100 и MI-S200D, работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Сигнал биосенсора Biacore X-100 регистрировали в резонансных единицах RU (1 RU соответствует связыванию 1 пг белка на поверхности оптического чипа). Сигнал биосенсора



Таблица 1. Сравнение параметров биосенсоров Biacore X-100 и MI-S200D.

Параметр	Biacore X-100	MI-S200D
Единицы измерения сигнала	RU (resonance units) 1000 RU ~ 1нг белка 1 RU ~ 1/10000 резонансного угла (0,1 m°) [11]	m° (millidegree) (1/1000 резонансного угла) 100 m° ~ 1 нг белка 1 m° ~ 10 RU
Число жидкостных каналов	2	2
Шум базовой линии	<0.1 RU (RMS)	<1m°(RMS)
Дрейф базовой линии	<0.3 RU/мин	<1m°/мин
Точность (концентрационный анализ)	<5% CV	<5% CV
Количество мест для проб в загрузочном отсеке	15 (1.5мл ×15)	20 (0.6 мл×8 и 1.5 мл×12)
Инъектируемый объём	5 - 90 мкл	25 - 350 мкл
Скорость инъекции	1 - 100 мкл/мин	5 - 1000 мкл/мин
Контроль температуры	4°C - 40°C	4°C - 45°C
Время автономной работы	24 ч	60 ч
Диапазон концентраций	10 <sup>-11</sup> - 2·10 <sup>-3</sup> М	10 <sup>-10</sup> – 10 <sup>-3</sup> М
Диапазон измерений константы скорости ассоциации ( $k_{on}$ )	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>8</sup> М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> Белки - до 10 <sup>8</sup> М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> Низкомолекулярные соединения - до 10 <sup>6</sup> М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>7</sup> М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
Диапазон измерений константы скорости диссоциации ( $k_{off}$ )	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
Диапазон измерений равновесной константы диссоциации ( $K_d$ )	10 <sup>-12</sup> – 10 <sup>-3</sup> М	10 <sup>-12</sup> – 10 <sup>-4</sup> М

MI-S200D регистрировали в градусах резонансного угла millidegree (m°).

Были использованы чипы CM5 («Cytiva») и IB CM5 («Inter-Bio»), покрытые карбоксиметилированным декстраном. Все измерения проводили при температуре 25°C.

В работе были использованы следующие реактивы от фирмы «Cytiva»: рабочий буфер HBS-EP+ (150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0.05% детергент P20, 10 mM HEPES, pH 7.4), набор реагентов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминогруппы (EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl), N-гидроксисукцинимид (NHS), 1 М этаноламин-HCl, pH 8.5)), набор 10 mM ацетатных буферов (pH 4.0, 4.5, 5.0), 10 mM глициновый буфер, pH 2.5. Для работы с китайским биосенсором были использованы аналогичные реагенты, полученные от фирмы «Inter-Bio».

#### Иммобилизация белка А на чип CM5

Иммобилизацию белка А осуществляли путём формирования ковалентных связей между карбоксильными группами на поверхности оптического чипа CM5 и аминогруппами белка А. Карбоксильные группы чипа активировали инъекцией смеси 0.2 М EDC/0.05 М NHS в течение 7 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Инъекцию раствора белка А (100 мкг/мл) в 10 mM ацетатном буфере (pH 4.5) выполняли со скоростью 5 мкл/мин в течение 7 мин. Непрореагировавшие активированные группы блокировали 1 М этаноламином (pH 8.5) в течение 3 мин при скорости

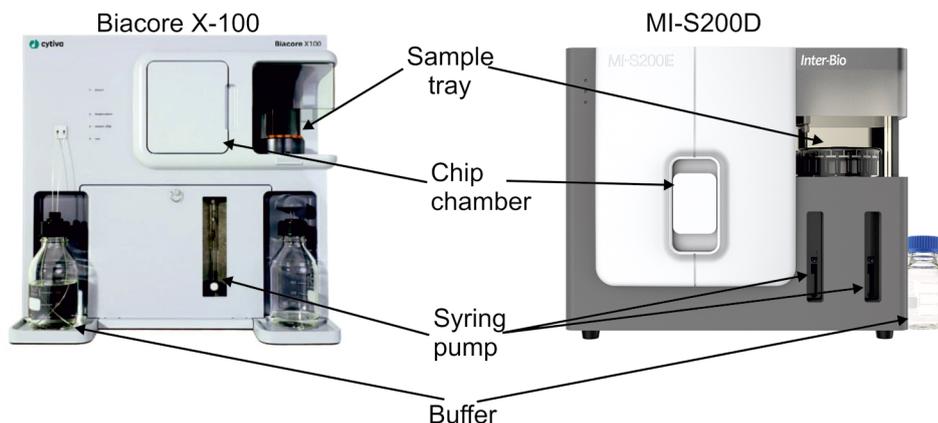
потока 10 мкл/мин. В качестве рабочего буфера использовали HBS-EP+. Уровень иммобилизации белка А составил порядка 3000 RU (равно примерно 3 нг белка-лиганда).

#### Иммобилизация белка А на чип IB CM5

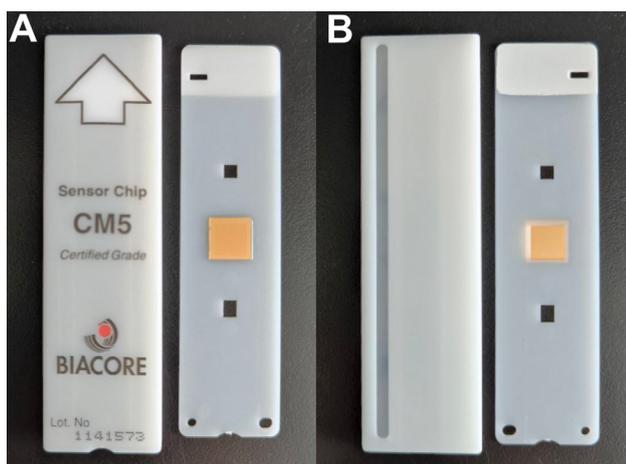
Иммобилизацию белка А на чип IB CM5 осуществляли по аналогичному протоколу путём формирования ковалентных связей между карбоксильными группами на поверхности чипа и аминогруппами белка А. Уровень иммобилизации белка А составил 375 m° (равно примерно 3.5 нг белка-лиганда).

#### Исследование белок-белковых взаимодействий

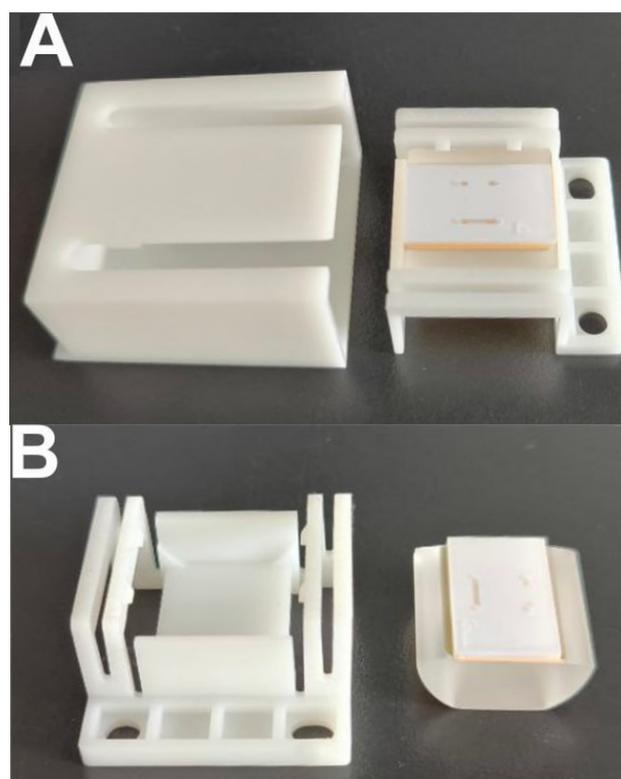
Регистрацию взаимодействий антител с иммобилизованным белком А выполняли в режиме реального времени путём последовательных инъекций растворов антител в диапазоне концентраций от 10 нМ до 1 мкМ через контрольный (без белка) и рабочий (с белком) каналы оптических биосенсоров в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. После каждого измерения поверхности оптических чипов регенерировали инъекциями 10 mM глицинового буфера (pH 2.5) в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. В качестве рабочего буфера использовали HBS-EP+. Полученные наборы сенсограмм были обработаны с помощью программы Biaevaluation 4.1.1 (модель взаимодействия 1:1 Langmuir binding) и программного обеспечения Inter-Bio MI-S200D.



**Рисунок 1.** Внешний вид и конструктивные особенности биосенсоров Biacore X-100 и MI-S200D. Объяснения приведены в тексте.



**Рисунок 2.** Устройство оптического чипа Biacore CM5. А - пенал для хранения чипа (слева) и оптический чип (справа). В - обратная сторона.



**Рисунок 3.** Устройство оптического чипа IB-CM5. А - пенал для хранения чипа (слева) и оптический чип (справа). В - элементы оптического чипа - держатель призмы (слева) и рабочая часть чипа (справа), состоящая из оптической призмы с золотым напылением, слоем карбоксиметилированного декстрана и пластиковой пластиной с проточными микрофлюидными каналами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Техническое сравнение биосенсоров и получаемых данных

Для корректного сравнения Biacore X-100 и MI-S200D необходимо иметь представление о некоторых основных характеристиках биосенсоров: объем пробы, базовый уровень шума (для обеспечения наилучшего соотношения сигнал/шум), рабочий диапазон температур (для измерений термодинамических параметров), диапазон скоростей потока (важно для оценки кинетических констант взаимодействия). Основные подобные характеристики представлены в таблице 1.

Из таблицы видно, что SPR-биосенсоры Biacore X-100 и MI-S200D относятся к одному классу приборов (проточные двухканальные биосенсоры) и имеют очень близкие характеристики.

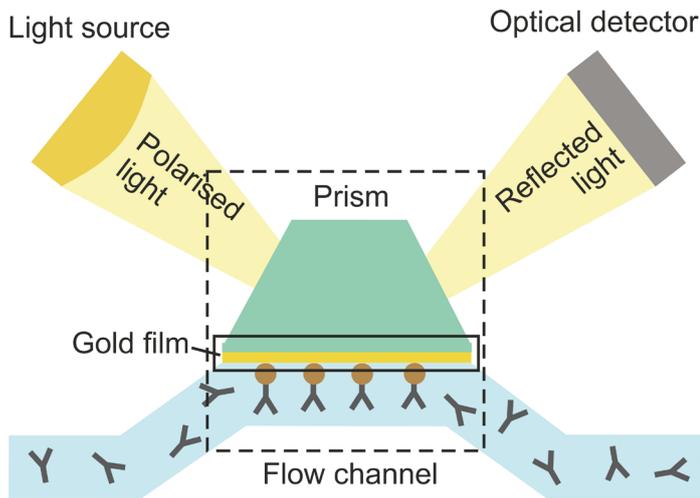
### Сравнение технических и конструктивных особенностей биосенсоров Biacore X-100 и MI-S200

Внешний вид биосенсоров представлен на рисунке 1. По внешнему виду видно, что биосенсоры Biacore X-100 и MI-S200D имеют сходную конструкцию и компоновку: у обоих биосенсоров присутствуют турель для загрузки образцов, шприцевой насос, люк для установки оптического чипа («чипоприемник») и прочее. В то же время, конструкции оптических чипов принципиально отличаются.

### Сравнение оптических чипов биосенсоров Biacore X-100 и MI-S200D

На рисунках 2 и 3 представлены фотографии чипов к биосенсорам Biacore X-100 и MI-S200D соответственно.

Чип Biacore CM5 представляет собой стеклянную пластинку размером 1 см<sup>2</sup> с золотым напылением и карбоксиметилдекстрановым покрытием, вклеенную в пластиковый держатель, который размещается в пластмассовом пенале (рис. 2). При докировании чипа в биосенсоре к свободной стороне стеклянной пластинки прижимается оптический интерфейс призмы, а к другой стороне с золотым напылением и декстрановым покрытием прижимается интегральный жидкостной картридж, формирующий проточные микрофлюидные каналы. В



**Рисунок 4.** Принципиальная схема устройства проточных оптических биосенсоров, работающих на эффекте SPR [12]. Рамками выделены сменные части системы (оптические чипы) Biacore CM5 (сплошная линия) и IB-CM5 (пунктирная линия).

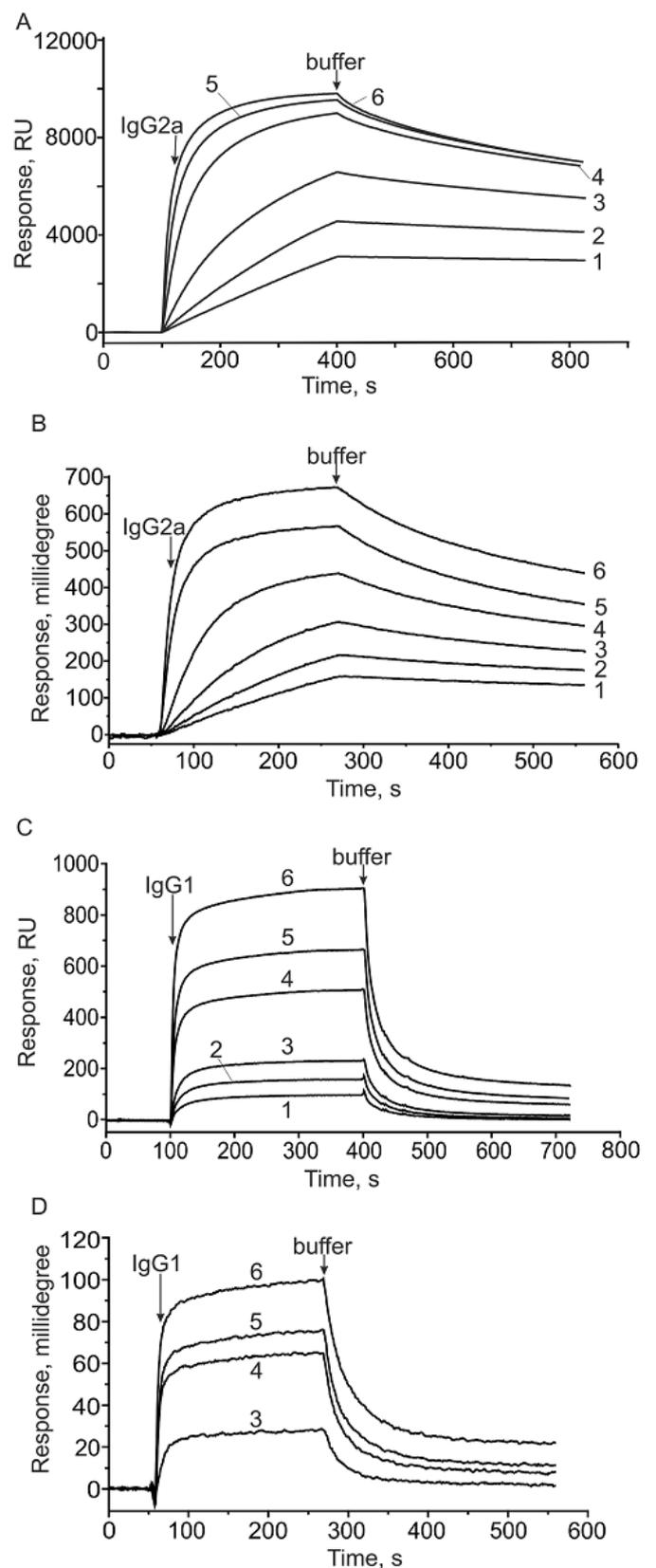
отличие от чипа Biacore CM5, чип IB-CM5 имеет более сложную конструкцию, содержащую уже сформированные проточные микрофлюидные каналы. Вся конструкция базируется на использовании одноразовой стеклянной призмы, на грани которой нанесено золотое напыление и приклеена пластиковая микрофлюидная система с двумя проточными каналами (рис. 3). Чип устанавливается в прибор без пенала. На рисунке 4 представлено схематическое объяснение принципиальных отличий конструкций оптических чипов двух SPR биосенсоров.

#### Экспериментальное сравнение полученных данных

На основе анализа серий сенсограмм, полученных на обоих приборах при инъекции растворов антител в разных концентрациях были определены кинетические константы взаимодействия антител с иммобилизованным на чипах белком А. Типичные сенсограммы показаны на рисунке 5.

Полученные величины кинетических констант и равновесной константы диссоциации молекулярных комплексов приведены в таблице 2. Значения  $K_d$ , полученные на обоих приборах, при взаимодействии IgG2a с белком А существенно ниже по сравнению с IgG1. Это полностью согласуется с литературными данными [13]. Можно видеть, что значения константы скорости ассоциации ( $k_{on}$ ), полученные на разных приборах, для IgG2a различаются всего на 2%, в то время как значения константы скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) значительно различаются (на 51%). Соответственно и значения равновесной константы диссоциации ( $K_d$ ) различаются на 52%. В случае IgG1 значения  $k_{on}$  различаются на 20%, а значения  $k_{off}$  различаются незначительно (на 1.3%). Соответственно и значения  $K_d$  в этом случае различаются на 21%.

Сравнение работы биосенсоров на основе оценки характеристик взаимодействия антиген-антитело, является традиционным для данного оборудования. Знание кинетических параметров межмолекулярных взаимодействий крайне важно для разработки лекарств. Например, в статье [9] сравнивали четыре биосенсора: Biacore T100 («Cytiva», США), ProteOn XPR36 («Bio-Rad», США), Octet RED 384 («ForteBio», США) и IBIS MX96



**Рисунок 5.** Сенсограммы взаимодействия IgG2a с иммобилизованным белком А на чипе CM5 к Biacore X-100 (А) и чипе IB CM5 к MI-S200D (В) в диапазоне концентраций от 10 до 1000 нМ: 1 - 10 нМ, 2 - 25 нМ, 3 - 50 нМ, 4 - 100 нМ, 5 - 500 нМ, 6 - 1000 нМ. Сенсограммы взаимодействия IgG1 с иммобилизованным белком А на чипе CM5 к Biacore X-100 (С) и чипе IB CM5 к MI-S200D (D) в диапазоне концентраций от 10 до 1000 нМ: 1 - 10 нМ, 2 - 25 нМ, 3 - 50 нМ, 4 - 100 нМ, 5 - 500 нМ, 6 - 1000 нМ.

**Таблица 2.** Кинетические параметры ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) и равновесная константа диссоциации  $K_d$  комплексов антител с иммобилизованным белком А.

Биосенсор, тип чипа	Антитела	$k_{on}$ , $M^{-1}c^{-1}$	$k_{off}$ , $c^{-1}$	$K_d$ , $M$
Biacore X-100, CM5	IgG2a	$1.69 \cdot 10^5$	$0.52 \cdot 10^{-3}$	$3.08 \cdot 10^{-9}$
Inter-Bio MI-S200D, IB-CM5		$1.65 \cdot 10^5$	$1.05 \cdot 10^{-3}$	$6.36 \cdot 10^{-9}$
Biacore X-100, CM5	IgG1	$1.56 \cdot 10^5$	$2.32 \cdot 10^{-2}$	$1.49 \cdot 10^{-7}$
Inter-Bio MI-S200D, IB-CM5		$1.95 \cdot 10^5$	$2.29 \cdot 10^{-2}$	$1.17 \cdot 10^{-7}$

(«Wasatch Microfluidics», США). Кинетика связывания десяти высоко аффинных моноклональных антител с одним и тем же антигеном была одновременно оценена на этих биосенсорных платформах. Порядки констант скорости ассоциации и диссоциации хорошо коррелировали между этими инструментами. В статье [8] было выполнено сравнение кинетики связывания антигена с 23 антителами на Biacore 8K («Cytiva», США) и Catterra LSA («Catterra», США). Две платформы давали почти идентичные результаты, что делает их надежными инструментами для ускорения характеристики библиотек антител.

В нашем случае порядок констант скорости ассоциации, полученных на обоих приборах для двух антител, совпадает. Для антител IgG1 практически совпадают константы скорости диссоциации. Оба прибора дают высококачественные данные, которые хорошо описывались простой моделью 1:1 (Langmuir binding).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было выполнено сравнительное исследование межмолекулярных взаимодействий с использованием оптических биосенсоров Biacore X-100 и MI-S200D. Это исследование будет полезно исследователям, работающим в условиях санкций.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что оба прибора дают высококачественные данные. Равновесные константы диссоциации  $K_d$  комплексов антител с иммобилизованным белком А, как для антител IgG2a, так и для антител IgG1, имеют одинаковый порядок. Данное исследование подтвердило практически полную взаимозаменяемость биосенсоров Biacore X-100 и MI-S200D.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Myszkab D.G. (2000) Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIACORE. В Methods in Enzymology (T. 323, pp. 325–340). Elsevier. DOI: 10.1016/S0076-6879(00)23372-7
2. Gnedenko O.V., Mezentsev, Y.V., Molnar, A.A., Lisitsa, A.V., Ivanov, A.S., Archakov, A.I. (2013) Highly sensitive detection of human cardiac myoglobin using a reverse sandwich immunoassay with a gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor. Analytica Chimica Acta, **759**, 105–109. DOI: 10.1016/j.aca.2012.10.053
3. Davidoff, S.N., Ditto, N.T., Brooks, A.E., Eckman, J., Brooks, B.D. (2015) Surface plasmon resonance for therapeutic antibody characterization. B Y. Fang (Ред.), Label-Free Biosensor Methods in Drug Discovery (pp. 35–76). New York, NY: Springer New York. DOI: 10.1007/978-1-4939-2617-6\_3
4. Regenmortel, M.H.V.V., Altschuh, D., Chatellier, J., Christensen, L., Rauffer-Bruyere, N., Richalet-Secordel, P., Witz, J., Zeder-Lutz, G. (1998) Measurement of antigen-antibody interactions with biosensors. Journal of Molecular Recognition, **11**(1–6), 163–167. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1352(199812)11:1/6<163::AID-JMR414>3.0.CO;2-U
5. Myszka, D.G. (1997) Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. Current Opinion in Biotechnology, **8**(1), 50–57. DOI: 10.1016/S0958-1669(97)80157-7
6. McDonnell, J.M. (2001) Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. Current Opinion in Chemical Biology, **5**(5), 572–577. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00251-9
7. Cooper, M.A. (2002) Optical biosensors in drug discovery. Nature Reviews Drug Discovery, **1**(7), 515–528. DOI: 10.1038/nrd838
8. Knowling, S., Clark, J., Sjuts, H., Abdiche, Y.N. (2020) Direct comparison of label-free biosensor binding kinetics obtained on the Biacore 8K and the Catterra LSA. SLAS Discovery, **25**(9), 977–984. DOI: 10.1177/2472555220934814
9. Yang D., Singh A., Wu H., Kroe-Barrett R. (2016) Comparison of biosensor platforms in the evaluation of high affinity antibody-antigen binding kinetics. Analytical Biochemistry, **508**, 78–96. DOI: 10.1016/j.ab.2016.06.024
10. Bright, R.A., Carter, D.M., Crevar, C.J., Toapanta, F.R., Steckbeck, J.D., Cole, K.S., Kumar, N.M., Pushko, P., Smith, G., Tumpey, T.M., Ross, T.M. (2008) Cross-Clade Protective Immune Responses to Influenza Viruses with H5N1 HA and NA Elicited by an Influenza Virus-Like Particle. PLoS ONE, **3**(1), e1501. DOI: 10.1371/journal.pone.0001501
11. Fägerstam, L.G., Frostell-Karlsson, Å., Karlsson, R., Persson, B., Rönnberg, I. (1992) Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. Journal of Chromatography A, **597**(1–2), 397–410. DOI: 10.1016/0021-9673(92)80137-J
12. Schuck, P. (1997) Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, **26**, 541–566. DOI: 10.1146/annurev.biophys.26.1.541
13. Hober, S., Nord, K., Linhult, M. (2007) Protein A chromatography for antibody purification. Journal of Chromatography B, **848**(1), 40–47. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.09.030

Поступила: 09.09.2024

После доработки: 15.11.2024

Принята к публикации: 18.11.2024

## COMPARISON OF THE RESULTS OF SPR ANALYSIS OF ANTIGEN-ANTIBODY INTERACTIONS PERFORMED USING OPTICAL BIOSENSORS BIACORE X-100 (“CYTIVA”, USA) AND MI-S200D (“INTER-BIO”, CHINA)

*O.V. Gnedenko\*, Y.V. Mezentsev, E.O. Yablokov, L.A. Kaluzhskiy, P.V. Ershov, A.A. Gilep, A.S. Ivanov*

Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com

Limited availability of Western scientific equipment, explains a growing need to switch to using scientific instruments made in China. This is especially true in the case of optical biosensors operating on the surface plasmon resonance (SPR) effect. However, comparability of experimental data obtained using Western and Chinese biosensors has not been investigated yet. In this work we have compared results of SPR analysis of the kinetics and affinity of interaction of IgG2a and IgG1 antibodies with protein A. Two biosensors Biacore X-100 (“Cytiva”, USA) and MI-S200D (“Inter-Bio”, China) have been used. It was shown that the values of the association rate constants obtained on both devices for two antibodies were close within one order of magnitude. For IgG1 antibodies, the dissociation rate constants were almost identical. Both devices provide high-quality data that are well described by a simple 1:1 model (Langmuir binding).

**Key words:** surface plasmon resonance (SPR), optical biosensors, antigen-antibody interaction; rate constants of association and dissociation of the complex ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ); equilibrium dissociation constant ( $K_d$ )

### FUNDING

The work was carried out within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2).

Received: 09.09.2024, revised: 15.11.2024, accepted: 18.11.2024