

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОТЫ И ГЕТЕРОГЕННОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

ПУ 63-2017

ВВЕДЕНИЕ

Для определения чистоты и гетерогенности моноклональных антител (иммуноглобулина G, IgG) и других лекарственных средств, получаемых методами рекомбинантных ДНК, в ГФ РФ XIV и большинстве ведущих зарубежных Фармакопей рекомендовано использование метода капиллярного электрофореза (КЭ), в т.ч. капиллярного гель-электрофореза:

- ОФС.1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК»;
- Ph. Eur. 2013 «Monoclonal antibodies for human use»;
- Ph. Br. Vol. III. «Monoclonal antibodies for human use»;
- USP General chapter <129> «Analytical procedures for recombinant therapeutic monoclonal antibodies»;
- Ch. Ph. 2015. Vol. IV. General rules. <3127>. «Monoclonal antibodies – Determination of molecular size variants (CE-SDS)».

Специалистами ГК «ЛЮМЭК» разработаны практические указания по определению **чистоты и гетерогенности рекомбинантных моноклональных антител (иммуноглобулина G, IgG)** в редуцирующих и нередуцирующих условиях методом капиллярного гель-электрофореза с использованием системы КЭ «КАПЕЛЬ®». Практические указания включают как анализ в соответствии с фармакопейными статьями, так и экспресс-схему.

ПРИМЕРЫ АНАЛИЗА

УСЛОВИЯ РАЗДЕЛЕНИЯ (ЭКСПРЕСС СХЕМА):

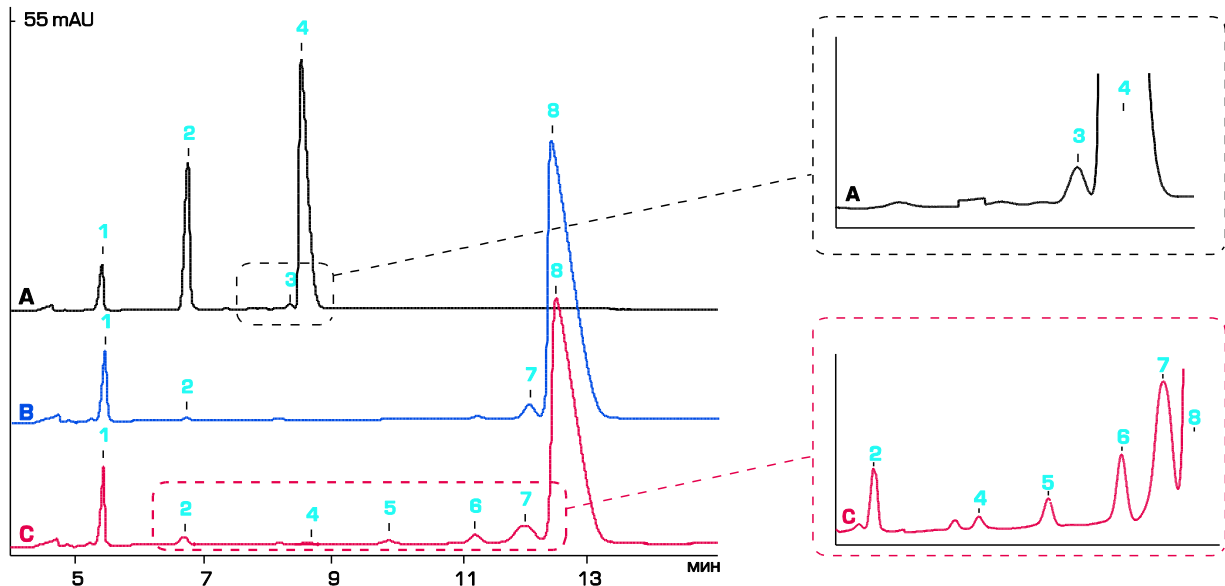
Фоновый электролит: гель для разделения комплексов «SDS-белок»

Капилляр: $L_{эфф} / L_{общ} = 10/42$ см, ID=50 мкм

Температура: 25 °С

Напряжение: 21 кВ

Детектирование: 220 нм



Пробы:

A – рекомбинантный IgG
(анализ в редуцирующих условиях)

B – рекомбинантный IgG
(анализ в нередуцирующих условиях)

C – рекомбинантный IgG, содержащий продукты разложения
(анализ в нередуцирующих условиях)

1 – внутренний стандарт (10 кДа)

2 – короткая цепь IgG

3 – негликозилированная длинная цепь IgG

4 – длинная цепь IgG

5, 6 – продукты разложения IgG

7 – негликозилированный IgG

8 – IgG



МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Метод измерений основан на разделении, идентификации и определении комплексов «SDS-белок» в кварцевом капилляре, заполненном гелем, под действием приложенного высокого напряжения. Разделение происходит за счет различной скорости миграции комплексов «SDS-белок» через матрицу геля (молекулярное сито). Пробу необходимо предварительно денатурировать в присутствии SDS, который всегда связывается с белками в стехиометрии 1:1,4. Возникающее при этом у комплексов «SDS-белок» постоянное соотношение заряда к массе позволяет проводить их разделение в соответствии с разницей в молекулярной массе белков.

ПРЕИМУЩЕСТВА МЕТОДА КЭ

По сравнению с разделением белков методом SDS-PAGE, метод капиллярного гель-электрофореза обладает несколькими преимуществами:

- полная автоматизация разделения,
- прямое количественное определение,
- отсутствие стадии окрашивания,
- низкая стоимость одного определения,
- короткое время анализа.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ

При выполнении измерений применяют следующие оборудование и реактивы:

- система капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ®-105М» с функцией ускоренной промывки капилляра или «КАПЕЛЬ®-205»;
- спецкассета;
- вода дистиллированная;
- соляная кислота, х.ч.;
- серная кислота, х.ч.;
- натрия гидроксид, ч.д.а.;
- гель для разделения;
- внутренний стандарт (10 кДа);
- контрольный стандарт IgG;
- 2-меркаптоэтанол, ≥99%;
- йодоацетамид, ≥99%;
- трис(гидроксиметил)аминометан (ТРИС, англ. THAM), ≥99,9%;
- додецилсульфат натрия (ДДСН, англ. SDS), ≥98%;
- концентраторы центрифужные, содержащие мембраны с пределом отсекаемой молекулярной массы не более 10 кДа;
- центрифуга лабораторная с относительным центробежным ускорением не менее 7000 g.

Сбор, обработку и вывод данных осуществляют с помощью персонального компьютера с ОС не ниже «Windows® 7/8/10», на котором установлено специализированное программное обеспечение.