

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

**Изоэлектрическое фокусирование**

**ОФС.1.7.2.0021.15**

**Вводится впервые**

---

Метод изоэлектрического фокусирования используется для оценки генно-инженерных препаратов, а также некоторых высокоочищенных биотехнологических препаратов (содержание основного компонента не менее 95 %), предназначенных для применения в качестве лекарственных средств.

Электрофоретическое разделение белков методом изоэлектрического фокусирования происходит под действием электрического поля в градиенте рН в соответствии с их изоэлектрической точкой (рI). Местоположение каждого белка определяется значением его изоэлектрической точки. При достижении белком изоэлектрической точки в градиенте рН его суммарный заряд становится равным нулю и он перестает перемещаться в электрическом поле. В результате электрофоретического разделения исследуемого вещества может происходить диффузия белковых молекул из зоны фокусирования, но, попадая в более кислую или щелочную среду, молекулы белка будут терять нейтральность и под действием электрического поля снова возвращаться в зону изоэлектрической точки. Для создания градиента рН применяют смеси синтетических полиаминополикарбоновых кислот (амфолиты) в диапазоне изоэлектрических точек (рI) от 3,0 до 10,0 единиц рН. Смесь амфолитов помещают в стабилизационную среду (полиакриламидный или агарозный гель) и подают напряжение, в результате чего создается градиент, в котором рН увеличивается в направлении от анода (+) к катоду (-).

Для ускорения процесса фракционирования белков используют максимально допустимую напряженность электрического поля. Ограничением служит невозможность эффективного отвода выделяемого тепла. Использование тонких гелей и эффективного охлаждения пластинки с помощью водяного термостата предотвращает перегревание геля и способствует хорошему разделению белков.

Максимальное различие между значениями  $rI$  ( $\Delta rI$ ) компонентов, определяют по формуле:

$$\Delta rI = 3 \times \sqrt{\frac{D \left( \frac{dpH}{dx} \right)}{E - \left( \frac{du}{dpH} \right)}}$$

где:  $D$  – коэффициент диффузии белка;

$dpH/dx$  – градиент рН;

$E$  – напряженность электрического поля, выраженное в вольтах на сантиметр;

$(-du/dpH)$  – изменение подвижности вещества при изменении рН в области, близкой к  $rI$ .

Формула показывает, что хорошее разрешение может быть получено для веществ с низким коэффициентом диффузии и достаточно большим значением изменения подвижности в точке, близкой к изоэлектрической. Хорошему разрешению способствует высокая напряженность поля и плавный градиент рН. Разрешающая способность изоэлектрического фокусирования при использовании геля, приготовленного с применением амфолитов, составляет 0,02 единицы рН, а при использовании иммобилизованных гелей (с химически фиксированным градиентом рН) – около 0,001 единицы рН.

Испытанию подлежат субстанция и очищенный белок до добавления стабилизаторов, наполнителей, консервантов и других компонентов, входящих в состав лекарственной формы. Методика также может использоваться для анализа готовой продукции в сравнении со стандартным

образцом (стандартные образцы указываются в фармакопейной статье и нормативной документации).

### **Практические аспекты**

Присутствие в генно-инженерных продуктах, а также некоторых высокоочищенных биотехнологических препаратах солей в высоких концентрациях (более 0,1М) может исказить градиент рН и форму сфокусированных белков. Для нейтрализации этого эффекта образцы лучше готовить в деионизованной воде, 1–2 % растворе глицина или амфолитов (амфолины, фармалиты, сервалиты, биолиты). При необходимости для пробоподготовки возможно использование специальных центрифужных концентраторов (фильтров), диализа или гель-фильтрации.

Время завершения процесса изофокусирования в полиакриламидных гелях, как правило, определяют по предварительно окрашенным стандартным белкам - маркерам (например, гемоглобину), нанесенным на гель в различные точки одновременно с исследуемыми образцами. Процесс считается завершенным в том случае, если все стандартные образцы образуют полосы в установленном месте. Если завершение процесса изофокусирования определяют по времени, прошедшему с момента нанесения образцов, установленное время должно быть обосновано.

### **Метод изоэлектрического фокусирования может быть применен:**

- для подтверждения подлинности, когда подвижность испытуемого образца сравнима с подвижностью стандартного образца или маркера рI;
- для оценки примесей по интенсивности окрашивания полос относительно основных компонентов по сравнению со стандартным образцом;
- для количественного определения по интенсивности окраски полос с помощью денситометра или аналогичного оборудования.

Допустимое различие подвижности испытуемого и стандартного образцов при оценке подлинности должно быть указано в нормативной документации. Для количественного определения примеси или основного компонента должно быть предусмотрено применение контрольных образцов с концентрацией, соответствующей пределу количественного определения примеси.

### **Оборудование**

Прибор для проведения изоэлектрофокусирования состоит из:

- высоковольтного источника питания с программой, специально разработанной для изоэлектрофокусирования в полиакриламидных гелях, с максимальным напряжением не менее 3000 В, током 300 мА и мощностью 300 Вт;
- электрофорезной камеры из жесткой пластмассы, содержащей охлаждающую пластину из соответствующего материала для поддержания геля;
- платиновых электродов, которые соединяются с гелем посредством электродных (бумажных или гелевых) полосок необходимой ширины, длины и толщины, пропитанных анодным и катодным буфером.

### **Изоэлектрофокусирование в полиакриламидных гелях**

Форма для приготовления полиакриламидного геля состоит из двух стеклянных пластин, пластикового листа, прокладок (спейсеров) и зажимов, скрепляющих всю конструкцию.

Для метода изоэлектрофокусирования используют гели с максимальной пористостью и достаточной механической прочностью. Эти свойства зависят от относительного содержания акриламида и бисакриламида (используемые для сшивки гелей).

Поскольку молекулярная масса большинства известных белков не превышает 200000 Да возможно использование 7,5% гелей.

Примечания.

1. Приготовление основного 30 % раствора акриламида. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 29,1 г акриламида и 0,9 г метиленбисакриламида, прибавляют 70 мл воды деионизованной, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора деионизованной водой до метки и вновь перемешивают. Далее раствор фильтруют (условия фильтрования указывают в нормативной документации). Раствор хранят при температуре от 2 до 8 °С в емкости из темного стекла в течение 1 мес.

2. Приготовление полиакриламидного геля. Смешивают основной 30 % раствор акриламида со смесью амфолитов в соотношении, указанном в нормативной документации, и осторожно перемешивают.

Подготовленный раствор акриламида с амфолитами помещают на магнитную мешалку, прибавляют 0,25 объема 10 % раствора аммония персульфата, 0,25 объема раствора ТЕМЕД (тетраметиленамина) и перемешивают. Заливают полученный раствор в подготовленную форму. Полимеризация геля происходит в течение 30-40 мин.

### **Сборка формы для полиакриламидного геля**

На нижнюю стеклянную пластину помещают пластиковый лист, на него помещают прокладки (спейсеры) и сверху помещают вторую стеклянную пластину, и всю конструкцию скрепляют зажимами.

### **Методика проведения изоэлектрофокусирования**

Охлаждающую пластину помещают в камеру для электрофореза, соединяют с термостатом, установленным на температуру от 8 до 10 °С. На охлаждающую пластину наносят 1,0 мл воды деионизованной или керосина.

Форму разбирают, гель на полиэфирной пленке (пластиковом листе) переносят на охлаждающую пластину таким образом, чтобы вода касалась всего края геля. Гель медленно и осторожно помещают на охлаждающую пластину, избегая появления пузырьков воздуха. Одну электродную полоску смачивают анодным буферным раствором и помещают на анодный конец геля (маркировка (+) на охлаждающей пластине). Вторую электродную полоску смачивают катодным буферным раствором и помещают на катодный конец геля (маркировка (-) на охлаждающей пластине). Составы катодного и

анодного буферных растворов приводят в нормативной документации. Аппликаторы для нанесения испытуемых и стандартных образцов помещают на поверхность геля, наносят необходимое количество испытуемых и стандартных образцов, указанное в нормативной документации (при использовании метода для оценки чистоты, количество наносимого образца должно обеспечивать выявление 1 % примеси). Для калибровки геля наносят растворы белков (маркеры) с известными величинами изоэлектрических точек (коммерческие наборы маркеров с диапазоном изоэлектрических точек 3–10; 2,5–6,5; 5–10,5 или с маркерами, указанными в фармакопейных статьях). Вместо бумажных аппликаторных полосок возможно использование геля с лунками для проб.

Держатель электродов помещают в электрофоретическую камеру и устанавливают электроды вдоль центров электродных полосок на поверхности геля. Соединяют электроды с основной частью камеры и закрывают ее крышкой. Подключают камеру к источнику питания (тока). Условия изоэлектрического фокусирования указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

После окончания электрофореза отключают источник питания, снимают крышку прибора, убирают электроды. Аккуратно, пинцетом удаляют электродные полоски и аппликаторы с геля. Гель немедленно переносят в емкость с фиксирующим раствором и выдерживают при покачивании, затем фиксирующий раствор удаляют. Гель промывают трижды деионизованной водой, прибавляют окрашивающий раствор Кумасси R-250 или G-250, состав и приготовление которых указывают в фармакопейной статье или нормативной документации. При окраске Кумасси R-250 гель отмывают в 25 % растворе этанола и 8 % растворе уксусной кислоты, а при окраске Кумасси G-250 – в деионизованной воде. Отмывку проводят до тех пор, пока на прозрачном фоне не станут четко видны полосы после изоэлектрофокусирования.

Для окраски геля возможно применение раствора серебра нитрата, приготовление которого, а также условия отмывания, описывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Время выдерживания геля в фиксирующем, окрашивающем растворах, время отмывания геля и регистрация положения и интенсивности полос должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

Примечания.

1. Приготовление растворов. Описание приготовления растворов 10 % раствора аммония персульфата, раствора ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин); фиксирующего раствора, 25 % раствора спирта этилового и 8 % раствора уксусной кислоты указано в ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле».

2. Особенности методики, требующие внимания. Исследуемые образцы могут наноситься на любой участок поверхности геля, но для защиты белков от экстремальных величин рН пробы не должны наноситься в непосредственной близости от электродов. При валидации метода пробы могут быть нанесены на гель в трех позициях: посередине геля и на его концах. Следует не допускать слишком длительное фокусирование, т.к. в геле может возникнуть процесс, называемый катодным дрейфом, при котором с течением времени градиент рН разрушается. Причины данного явления не до конца изучены. Одними из факторов могут быть электроэндоосмос и абсорбция диоксида углерода. Катодный дрейф наблюдается в виде миграции сфокусированной белковой полосы от катодного конца геля. Для решения этой проблемы могут быть использованы иммобилизованные гели.

Во время фокусирования необходимо обеспечить эффективное охлаждение пластины, на которую помещен гель, при температуре от 8 до 10 °С. Высокое напряжение электрического поля, используемого при изоэлектрическом фокусировании, может привести к перегреванию и влиять на качество разделения.

Особенности методики, требующие внимания, должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации.

### **Возможные модификации методики**

Особенности некоторых исследуемых веществ могут потребовать внесения следующих изменений в методику:

– из-за снижения растворимости белков вблизи изоэлектрической точки и опасности их осаждения в состав геля вводят мочевины. Допускается добавление в гель от 3М до 9М растворов мочевины. Для предотвращения карбомоилирования белка следует добавлять только свежеприготовленные растворы мочевины;

– добавление в гель детергентов: неионных (например, октилглюкозид, Тритон X-100 или Nonidet P-40 (NP-40)) или цвиттерионных (например, 3-3((3-холамидопропил)диметиламмоний-1-пропансульфонат – CHAPS или 3-3((3-холамидопропил)диметиламмоний-2-гидрокси-1-пропансульфонат – CHAPSO);

– добавление амфолита к исследуемому образцу для предотвращения агрегации и преципитации белков;

– использование альтернативных методов детекции.

Модификации методики должны быть обоснованы и отражены в фармакопейной статье или нормативной документации.

### **Критерии пригодности системы**

Результаты изоэлектрического разделения могут учитываться, если электрофореграммы удовлетворяют следующим критериям:

– формирование стабильного градиента pH с необходимыми (требуемыми, заданными) характеристиками, оцениваемого, например, с использованием маркеров pI (стандартных образцов) с известными величинами изоэлектрических точек, в том числе, предварительно окрашенных;

– другие обоснованные критерии приемлемости результатов (например, разделение двух выбранных белков или компонентов одного белка).



### **Критерии приемлемости результатов**

– совпадение электрофореграммы исследуемого образца с электрофореграммой образца сравнения, например, соответствующего стандартного образца на основе очищенного белка (субстанции);

– выявление образца в минимально установленной концентрации.

Для оценки генно-инженерных продуктов, а также некоторых высокоочищенных биотехнологических препаратов, можно использовать методику изоэлектрического фокусирования с подтвержденными валидационными характеристиками.

### **Особенности валидации методики**

При использовании методики для оценки подлинности необходимо обосновать критерии приемлемости результатов. При использовании стандартного образца на основе очищенного белка аттестуемая характеристика должна быть научно обоснована, стандартный образец должен быть аттестован в установленном порядке.

При использовании методики для оценки чистоты препарата необходимо представить данные, обосновывающие предел обнаружения примеси, а также минимальную разницу в  $pI$  компонентов, которую выявляет методика (разрешающая способность). При количественном определении – представить данные, обосновывающие предел количественного определения примеси, минимальную разницу в  $pI$  компонентов, которую выявляет методика, линейный диапазон при определении основного компонента, воспроизводимость методики. Целесообразно использование стандартного образца на основе очищенного белка с научно обоснованной аттестуемой характеристикой.

При внесении изменений в методику изоэлектрического фокусирования должны быть подтверждены валидационные характеристики ранее утвержденной методики. Валидации подлежат следующие изменения:

- использование коммерческих готовых гелей (precast gels), наборов для окрашивания и обесцвечивающих растворов;
- использование гелей с иммобилизованным градиентом pH;
- использование гелей с пластиковыми аппликаторами для нанесения образцов;
- использование кассет с гелем различных размеров, включая ультратонкие (0,2 мм) гели;
- использование различных объемов проб, электродных полосок и аппликаторов, изготовленных не из бумаги;
- изменение условий проведения изоэлектрического фокусирования, включая изменения напряжения, размера геля и используемого оборудования, использование фиксированного времени разделения вместо слежения за достижением определенной точки выбранного маркера pI;
- использование автоматизированного оборудования;
- замена полиакриламидных гелей на агарозные.