

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

---

**Определение подлинности и чистоты  
иммунобиологических лекарственных  
препаратов методом вестерн-блот**

---

**ОФС.1.7.2.0022.15**

**Вводится впервые**

---

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод вестерн-блот, один из вариантов иммуноблоттинга, который используют для оценки подлинности и чистоты иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) на основе высокоочищенных белков, в том числе, полученных по технологии рекомбинантной ДНК.

На первом этапе проводят электрофорез в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом (так называемый, SDS-PAGE электрофорез) для разделения белков. Затем белки переносят на нитроцеллюлозную мембрану или PVDF-мембрану (мембрана из поливинилденфторида). Детекцию проводят с помощью специфичных к определяемому белку антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена (прямой вариант ИФА), или последовательно с помощью первых антител к определяемому белку, и вторых антител (так называемой, антиглобулиновой сыворотки), специфичных к иммуноглобулину первых антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена (непрямой вариант ИФА).

В данной ОФС изложен метод детекции на основе цветной реакции, как один из наиболее широко применяемых в настоящее время. Для детекции также могут быть использованы хемилюминесцентный метод, в том числе, с

усилением хемилюминесценции, и методы радиоактивной или флуоресцентной меток (РИА или РИФ).

Испытание проводят с фармацевтическими субстанциями или с готовой продукцией.

При оценке подлинности, на этапе выполнения электрофореза, помимо испытываемых образцов, должно быть предусмотрено внесение в лунки геля следующих растворов: отрицательный контрольный образец (1-кратный буфер для приготовления образцов), смесь маркеров молекулярных масс (рекомендуется использование предварительно окрашенных маркеров молекулярных масс), стандартный образец испытываемого белка (при его наличии), аттестованный в установленном порядке. При оценке чистоты (примесей) дополнительно должно быть предусмотрено внесение образца с концентрацией белка, соответствующей пределу обнаружения или количественного определения примеси (в зависимости от назначения методики) и установленной на основании результатов валидации методики. При оценке чистоты необходимо сравнение результатов блота с результатами электрофореза в полиакриламидном геле; методика должна выявлять 1 % примеси.

#### Методика

Для разделения белков по их молекулярным массам предварительно проводят электрофорез в соответствии с методикой, изложенной в ОФС «Электрофорез» и ОФС «Электрофорез в полиакриламидных гелях».

Для проведения переноса белков используют прибор для переноса белков. Все работы проводят в резиновых перчатках. Объем всех используемых растворов должен быть достаточен для полного погружения мембраны, на которую переносят белки.

После проведения электрофореза для подготовки геля к иммуноблотингу, его заливают буферным раствором для переноса белков (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации), ставят на орбитальный шейкер и выдерживают в течение 10-

15 мин. Затем подготавливают лист нитроцеллюлозной или PVDF-мембраны, соответствующий размеру геля. При использовании нитроцеллюлозной мембраны лист выдерживают 5 мин в деионизованной воде, а затем 5 мин в буферном растворе для переноса белков (если нет иных указаний в фармакопейной статье или нормативной документации). При использовании PVDF-мембраны ее необходимо выдержать в растворе метанола или спирта в течение 10-15 мин, а затем произвести аналогичные действия, что и для нитроцеллюлозной мембраны.

Для переноса белков на нитроцеллюлозную или PVDF-мембрану собирают "сэндвич". Для этого специальную губку, входящую в комплект прибора для переноса белков, смачивают в буферном растворе для переноса белков и помещают на специальную пластиковую рамку, на которую затем помещают от одного до трех листов фильтровальной бумаги (например, Whatman 3MM), предварительно обрезанных в соответствии с размером мембраны и смоченных в растворе для переноса белков. Сверху помещают гель, на поверхность которого аккуратно (без пузырьков воздуха) помещают приготовленный лист нитроцеллюлозной или PVDF-мембраны. На мембрану помещают от одного до трех листов фильтровальной бумаги, предварительно смоченных в растворе для переноса белков, и сверху прикрывают второй специальной губкой, смоченной в растворе для переноса белков. Рамку скрепляют зажимами и медленно погружают в прибор для электрофореза, заполненный раствором для переноса белков, лист мембраны должен быть обращен к аноду. Включают прибор. Электрофоретический перенос белков осуществляют при комнатной температуре в течение 25 мин, выставив ограничение по току из расчета  $A_{\max} = 2 \text{ мА/см}^2$ , (например, для геля размером  $10 \times 10 \text{ см}^2$   $A_{\max} = 200 \text{ мА}$ ), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Допускается использование оборудования для полусухого переноса белков с геля на мембрану в соответствии с инструкцией по его применению.

По окончании переноса "сэндвич" разбирают. Мембрану промывают фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ).

Оценивают полноту переноса белков визуально по переносу окрашенных маркеров молекулярных масс, все основные белковые полосы которого должны быть выявлены на мембране.

#### Детекция

Для детекции результатов метода вестерн-блот проводят обработку (гибридизацию) исследуемого препарата антителами. Для этого мембрану с перенесенными на нее белками помещают в контейнер с блокирующим буферным раствором и инкубируют на орбитальном шейкере в течение 30 – 60 мин (если не предусмотрено иное в фармакопейной статье или нормативной документации) для предотвращения неспецифической сорбции антител на мембране.

После этого промывают мембрану в буферном растворе для отмывки трижды по 5 мин, если не указано иное в фармакопейной статье или нормативной документации.

Затем мембрану обрабатывают раствором первых антител к анализируемому белку, приготовленным с использованием буферного раствора для антител (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации) непосредственно перед использованием в соответствии с инструкцией по применению. Обработку антителами проводят при комнатной температуре в течение 30 – 60 мин (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации).

Далее трижды по 5 мин проводят отмывку мембраны буферным раствором от несвязавшихся антител на орбитальном шейкере при комнатной температуре, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

После отмывки мембраны, проводят обработку (гибридизацию) раствором вторых антител. В качестве вторых антител используют поликлональные антитела к иммуноглобулинам того вида животного,

которое использовалось для получения первых антител. Данные антитела конъюгированы с ферментом (пероксидаза из корней хрена или щелочная фосфатаза). Для выполнения этого этапа повторяют процедуру, описанную выше, заменив раствор первых антител раствором вторых антител. Затем проводят аналогичную первой отмывку мембраны от несвязавшихся вторых антител.

Проявление картины иммуоблота на мембране проводят раствором тетраметилбензидинового субстрата (ТМВ) для антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, или раствором для проявления щелочной фосфатазы – при использовании антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой (если нет иных указаний в фармакопейной статье или нормативной документации).

Реакцию останавливают, промывая блот деионизованной водой. С поверхности мембраны удаляют излишек воды фильтровальной бумагой и высушивают на воздухе в темном месте.

#### Оценка результатов

При оценке подлинности основные окрашенные полосы на проявленной мембране должны соответствовать основным окрашенным полосам на электрофореграмме.

Количество анализируемого вещества и содержание примесей, а также их соотношение оценивают денситометрически.

Содержание примеси, не выявляемой в блоте, не должно превышать величины, установленной в фармакопейной статье или нормативной документации.

#### Критерии пригодности системы

Результаты метода вестер-блот могут учитываться, если:

– маркеры молекулярных масс распределены равномерно по всей длине соответствующей дорожки геля;

- на блоте видны все основные полосы, выявленные при окрашивании геля Кумасси ярко-голубым R-250 или G-250;
- выявляется образец с минимальной концентрацией, установленной в фармакопейной статье или нормативной документации

#### Критерии приемлемости результатов

- Совпадение блота исследуемого образца с блотом образца сравнения, например, соответствующего стандартного образца на основе очищенного белка (субстанции);
  - соответствие молекулярной массы основного выявленного компонента требованиям спецификации;
  - соответствие содержания выявляемой примеси в стандартном образце диапазону, установленному в свидетельстве на стандартный образец.

Методику определения подлинности и чистоты методом вестерн – блот следует использовать с подтвержденными валидационными характеристиками в отношении специфичности и предела обнаружения примеси.

#### Особенности валидации методики

При использовании методики для оценки подлинности необходимо обосновать критерии приемлемости результатов; целесообразно использование стандартного образца на основе очищенного белка, аттестованного в установленном порядке.

При использовании методики для оценки чистоты необходимо обосновывать предел обнаружения примеси. При количественном определении необходимо обосновать предел количественного определения примеси, указать линейный диапазон при определении основного компонента и примесей, прецизионность и правильность методики. Для этого целесообразно использование стандартного образца на основе очищенного белка. При внесении изменений в методику, указанную в фармакопейной статье или нормативной документации, должны быть подтверждены

валидационные характеристики ранее утвержденной методики. Валидации подлежат следующие изменения:

- использование различного количества наносимых на гель проб;
- изменение условий переноса белков с геля на мембрану, включая изменение используемого оборудования;
- изменения состава буферных растворов;
- изменение способа детекции исследуемого вещества.

Примечания.

1. Буферный раствор для переноса белков рН 8,3. Если нет иных указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, используют один из описанных ниже способов приготовления растворов (см. Вариант 1 и Вариант 2). Раствор для переноса можно использовать 2-3 раза. Раствор хранят в течение 6 мес при температуре от 4 до 8 °С.

*Вариант 1.* В градуированный химический стакан вместимостью 3000 мл помещают 7,86 г трис(гидроксиметил)аминометана, 33,75 г глицина, добавляют до 2400,0 мл деионизованной воды и перемешивают на магнитной мешалке до полного растворения. Измеряют рН, который должен быть равен 8,3 – 8,4 (доводить рН раствора кислотой или щелочью не допускается). Добавляют 600,0 мл спирта и перемешивают.

*Вариант 2.* В градуированный химический стакан вместимостью 1000 мл помещают 5,8 г трис(гидроксиметил)аминометана, 2,9 г глицина, 11,55 мл 10 % раствора натрия додецилсульфата, добавляют 800,0 мл деионизованной воды и перемешивают на магнитной мешалке до полного растворения, измеряют рН (8,3-8,4). Добавляют 200,0 мл 100 % метанола и перемешивают. Если используется PVDF-мембрана, то натрия додецилсульфат из буферного раствора исключают, а количество спирта уменьшают до 100,0 мл, увеличивая тем самым объем добавляемой воды до 900,0 мл.

2. Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), рН 7,2 (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации). В градуированную емкость наливают 4500,0 мл деионизованной воды и последовательно прибавляют: 40,0 г натрия хлорида, 1,0 г калия хлорида 5,75 г натрия фосфорнокислого двузамещенного 2х-водного, 1,0 г калия фосфорнокислого однозамещенного (каждую следующую соль прибавляют после полного растворения предыдущей). Устанавливают рН до 7,2 раствором 70 % ортофосфорной кислоты или раствором 45% натрия гидроксида. Доводят объем до 5000,0 мл деионизованной водой. Раствор фильтруют и хранят в течение 3 мес при температуре 4 - 8 °С.

3. Буферный раствор для отмывки. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносят 5,0 мл 10 % раствора твин-20, доводят объем раствора до метки с помощью ФСБ и перемешивают. Раствор хранят в течение 1 мес при температуре от 4 °С до 8 °С.

4. Блокирующий буферный раствор. К 100,0 мл буферного раствора для отмывки прибавляют 5,0 мг бычьего сывороточного альбумина (или другого белка), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, и перемешивают до полного растворения. Раствор готовят перед использованием.

5. Буферный раствор для антител. К 100,0 мл буферного раствора для отмывки прибавляют 2,0 мг бычьего сывороточного альбумина (или других белков), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, и перемешивают до полного растворения. Раствор готовят перед использованием.

6. Раствор ТМВ – раствор для проявления пероксидазы хрена. Используют ТМВ-субстрат, готовый к применению.

7. Раствор для проявления щелочной фосфатазы. Растворяют 1 таблетку субстрата ВСIP/NBT в 10,0 мл деионизованной воды. Раствор готовят непосредственно перед использованием.