

II Международная научно-практическая конференция  
«Современная химико-токсикологическая экспертиза»

## Стратегии идентификации EPO-Fc гибридных белков посредством методов IEF-/SAR-/SDS-PAGE

Григорий Кротов\*, Павел Постников\*, Наталия Месонжник\*, Юлия Ефимова\*\*  
и Григорий Родченков\*

\*Антидопинговый Центр (ФГУП АДЦ), Москва

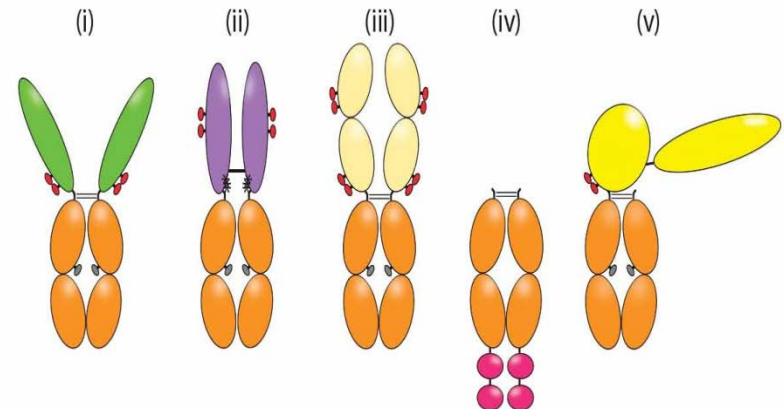
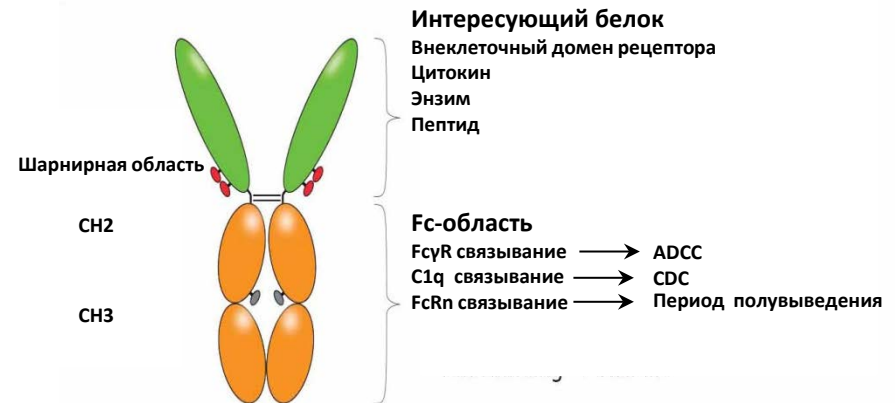
\*\*Московский государственный университет тонких химических технологий  
им. М.В. Ломоносова

# Гибридные белки на основе Fc фрагмента IgG

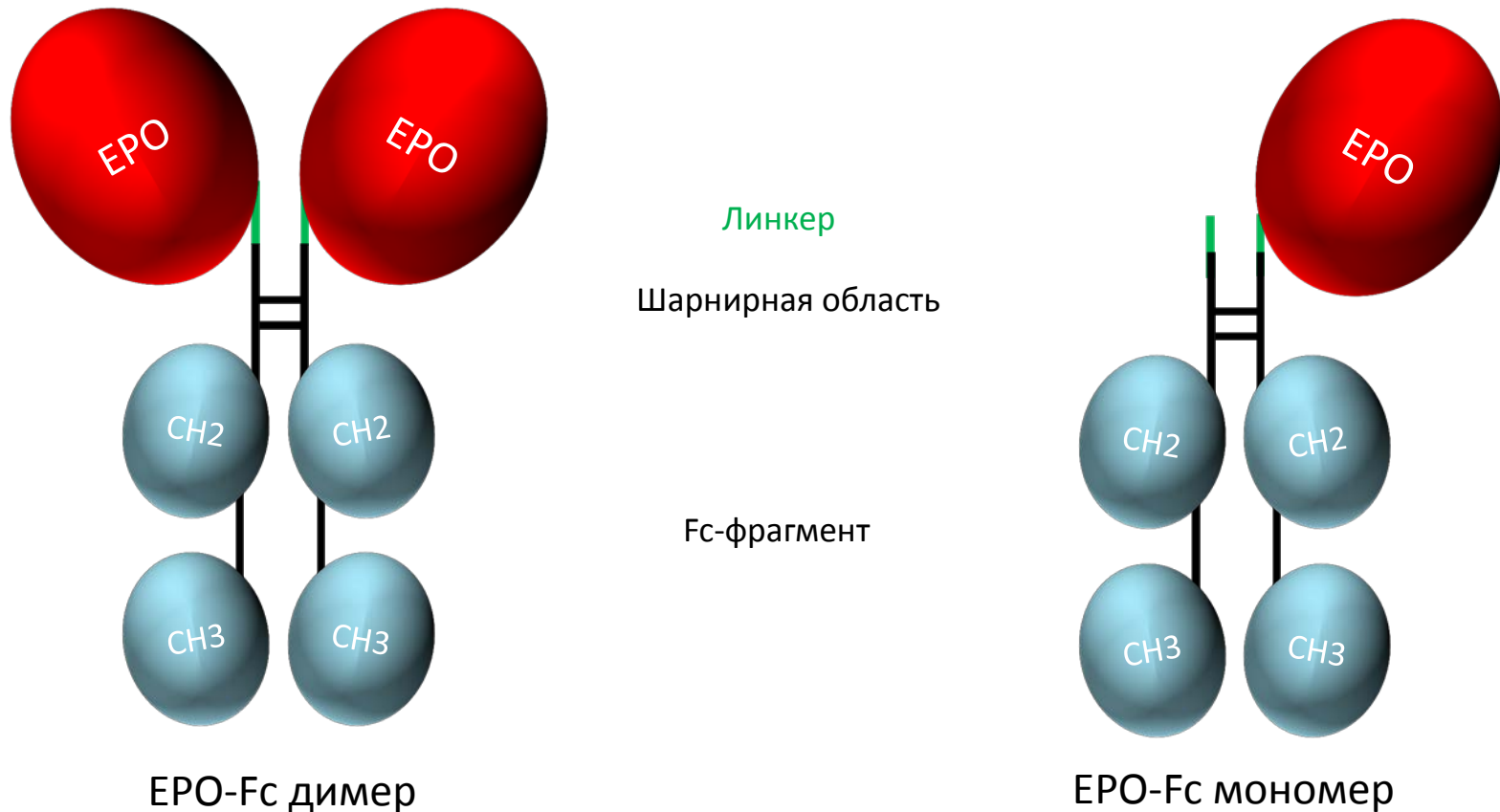
2014	Alprolix				
2013	Kadcyla <sup>2</sup>	Entyvio <sup>3</sup>	Gazyva		
2012	Perjeta	Raxibacumab <sup>3</sup>	Zaltrap	ABthrax	
2011	Benlysta	Yervoy	Adcetris <sup>2</sup>	Eylea	Nulogix
2010	Prolia/Xgeva	Actemra			
2009	Arzerra	Stelara	Ilaris	Simponi	
2008	Nplate	Arcalyst			
2007	Soliris				
2006	Vectibix	Lucentis <sup>1</sup>			
2005	Orencia				
2004	Erbixut	Avastin	Tysabri		
2003	Xolair	Bexxar <sup>2</sup>	Raptiva	Amevive	
2002	Zevalin <sup>2</sup>	Humira			
2001	Campath				
2000	Mylotarg <sup>1,2</sup>				
1998	Simulect	Synagis	Remicade	Herceptin	Enbrel
1997	Rituxan	Zenapax			
1994	ReoPro <sup>1</sup>				
1984	Orthoclone OKT3				

Fc-Fusion Protein	Human	Humanized	Chimeric	Mouse
-------------------	-------	-----------	----------	-------

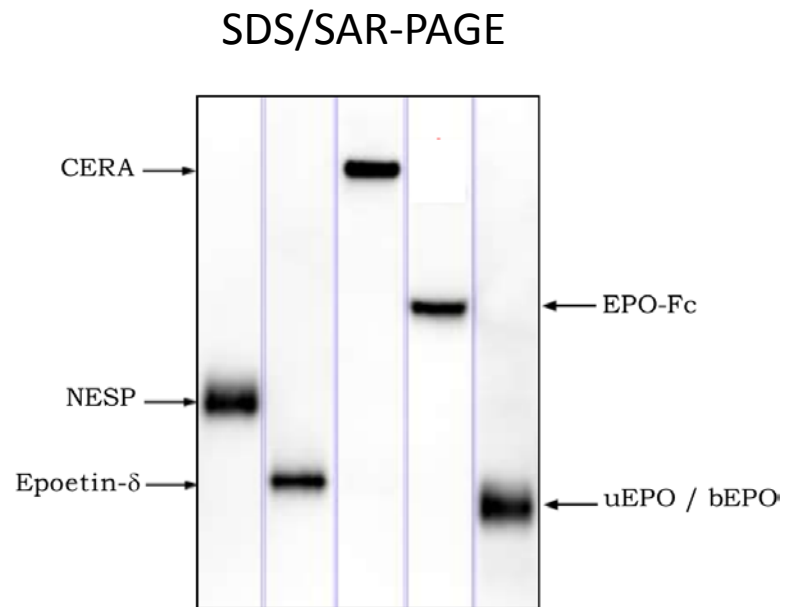


# ЕРО-Fc гибридные белки – новые эритропоэз-стимулирующие агенты

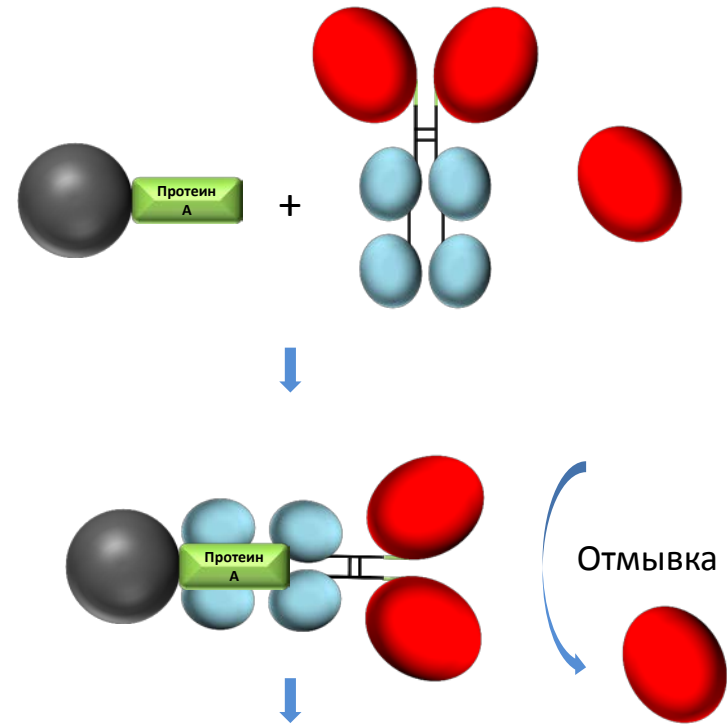


Некоторые биотехнологические компании производят ЕРО-Fc белки только «для исследовательских целей»  
(CellScience, GenWay Biotech, Chimerigen, Genscript, BioBasic, Neuromics, Goldbio, Nivus Biologicals, Hölzel Diagnostika, ProSpec)

# Идентификация EPO-Fc в допинг контроле

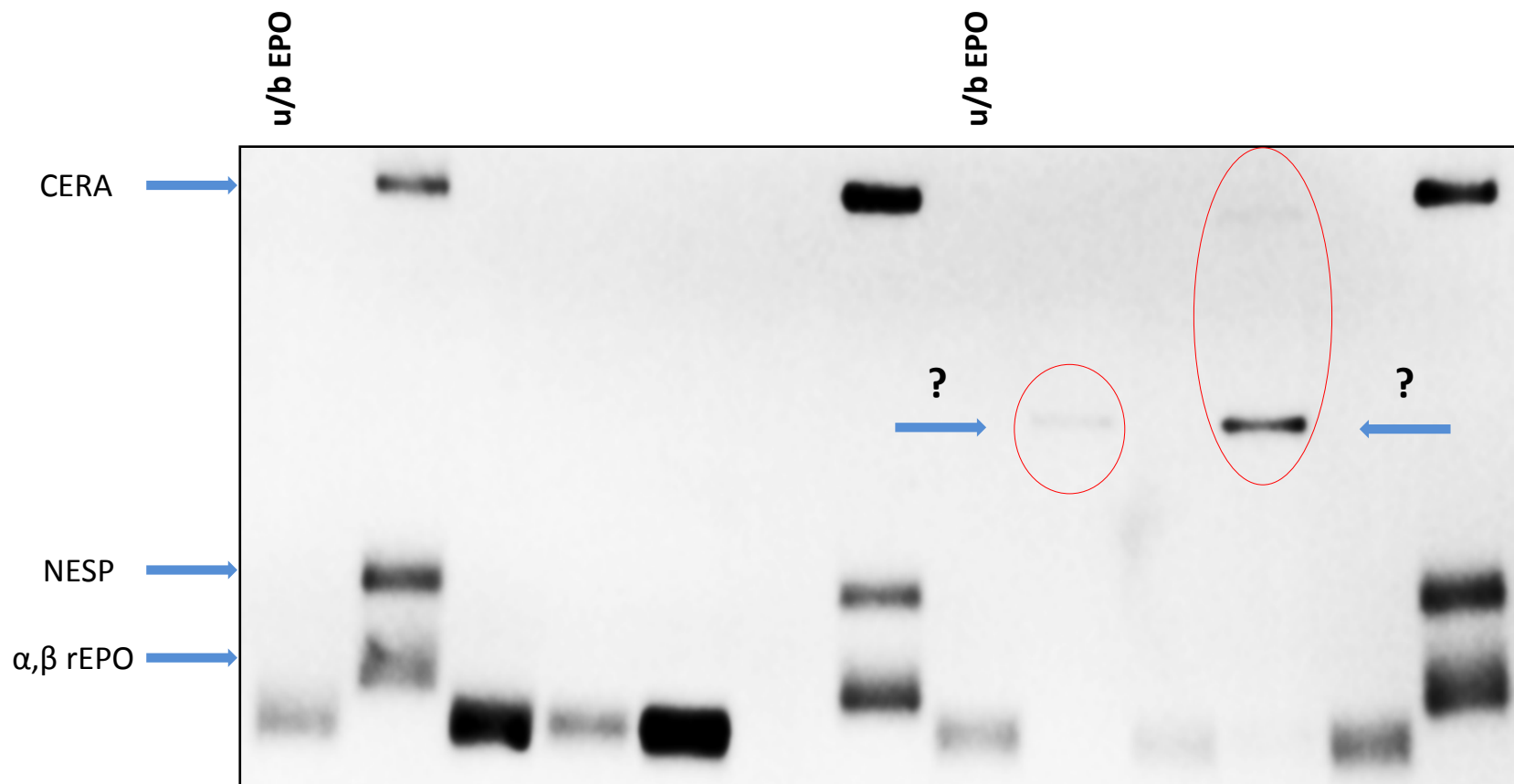


Технический документ WADA– TD2014EPO

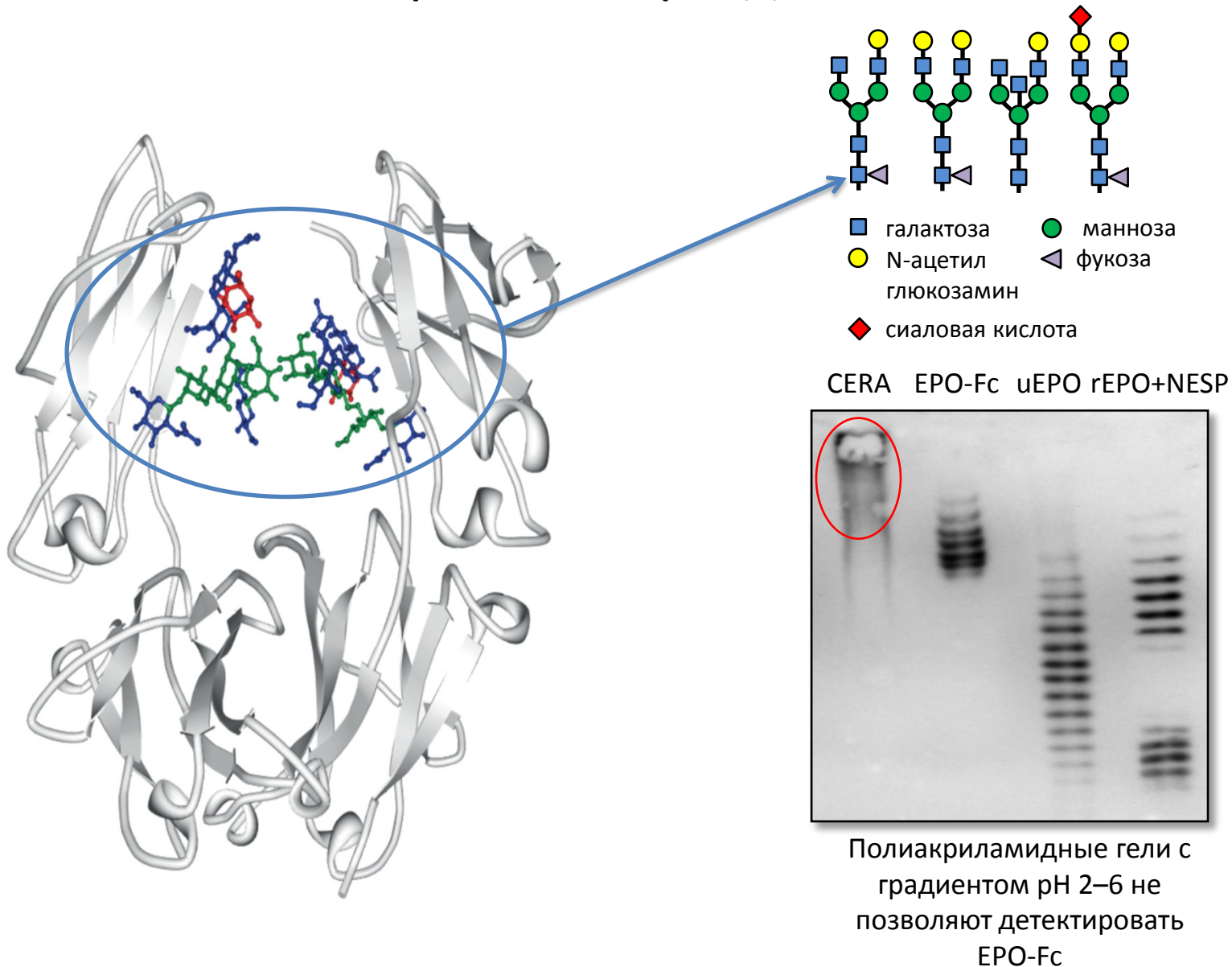


ELISA

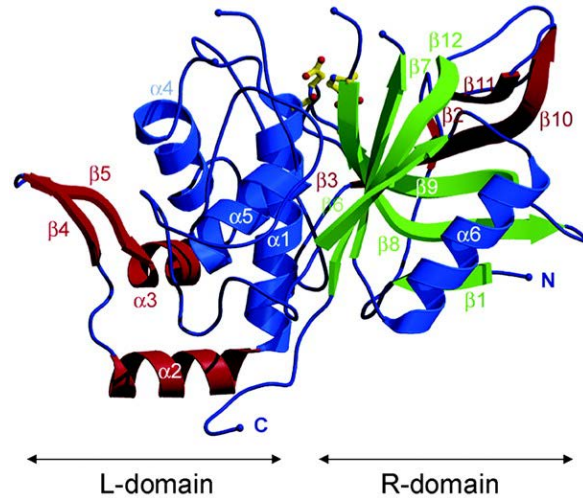
# Контаминирующие белки со схожими с EPO-Fc молекулярными массами при анализе SAR-PAGE



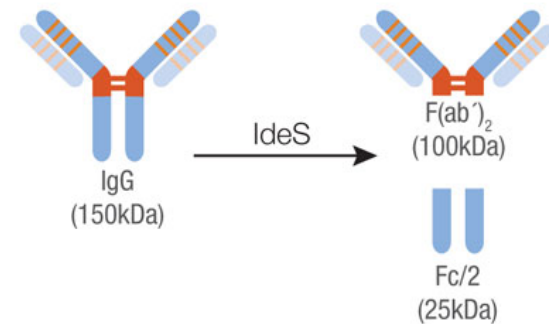
# Fc-фрагмент оказывает влияние на изоэлектрическое разделение EPO-Fc



# Цистеиновая протеиназа IdeS (The Immunoglobulin-degrading enzyme from *Streptococcus pyogenes*)



Katja Wenig et al. PNAS 2004;101:17371-17376



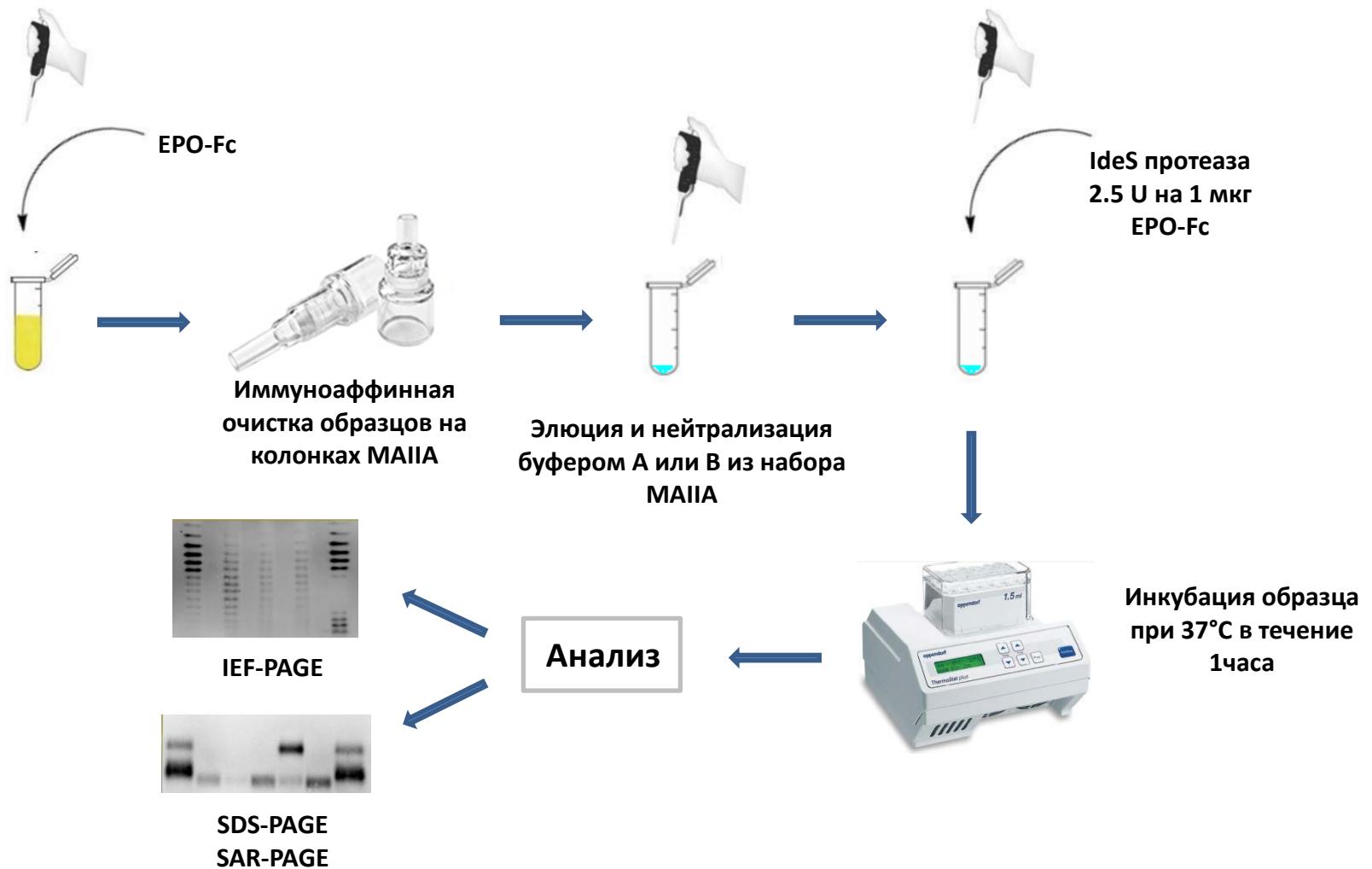
Hinge sequence: S-C-D-K-T-H-T-C-P-P-C-P-A-P-E-L-L-G-G-P-S-V

IdeS  
cleavage  
site

12335MA

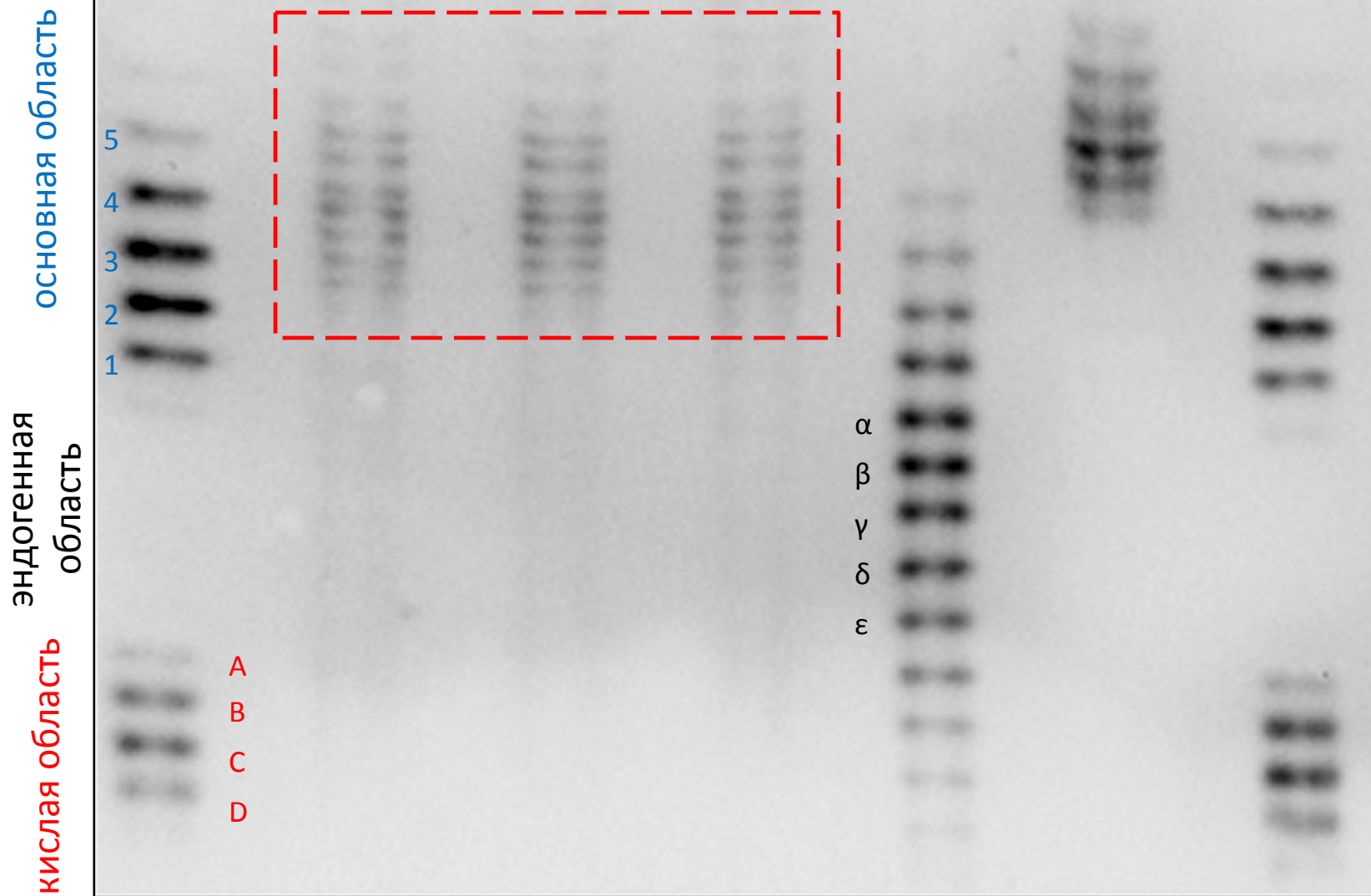
P01857	IGHG1_HUMAN	100	-----PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT	133	Да
P01859	IGHG2_HUMAN	102	-----CCVECPPCPAPPV-AGPSVFLFPPKPKDT	129	Да
P01860	IGHG3_HUMAN	121	DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT	180	Да
P01861	IGHG4_HUMAN	102	-----YGPCCPSCPAPFELGGPSVFLFPPKPKDT	130	Да
P01868	IGHG1_MOUSE	103	-----GCKP-----ICTVP---EVSSVFIFFPKPKDV	127	Нет
P01863	GCAA_MOUSE	105	-----KPCPP-----C---KCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDV	133	Да
P01864	GCAB_MOUSE	105	-----QNPCPP-----HQRVPPCAAPDLLGGPSVFIFFPKIKDV	138	Нет
P03987	IGHG3_MOUSE	104	-----STP-----PGSSCPPGNILGGPSVFIFFPKPKDA	132	Да
P01870	IGHG_RABIT	97	-----PSTC-----SKPTCPPPELLGGPSVFIFFPKPKDT	126	Да
			*                 ***:**** **		

# Стратегия пробоподготовки

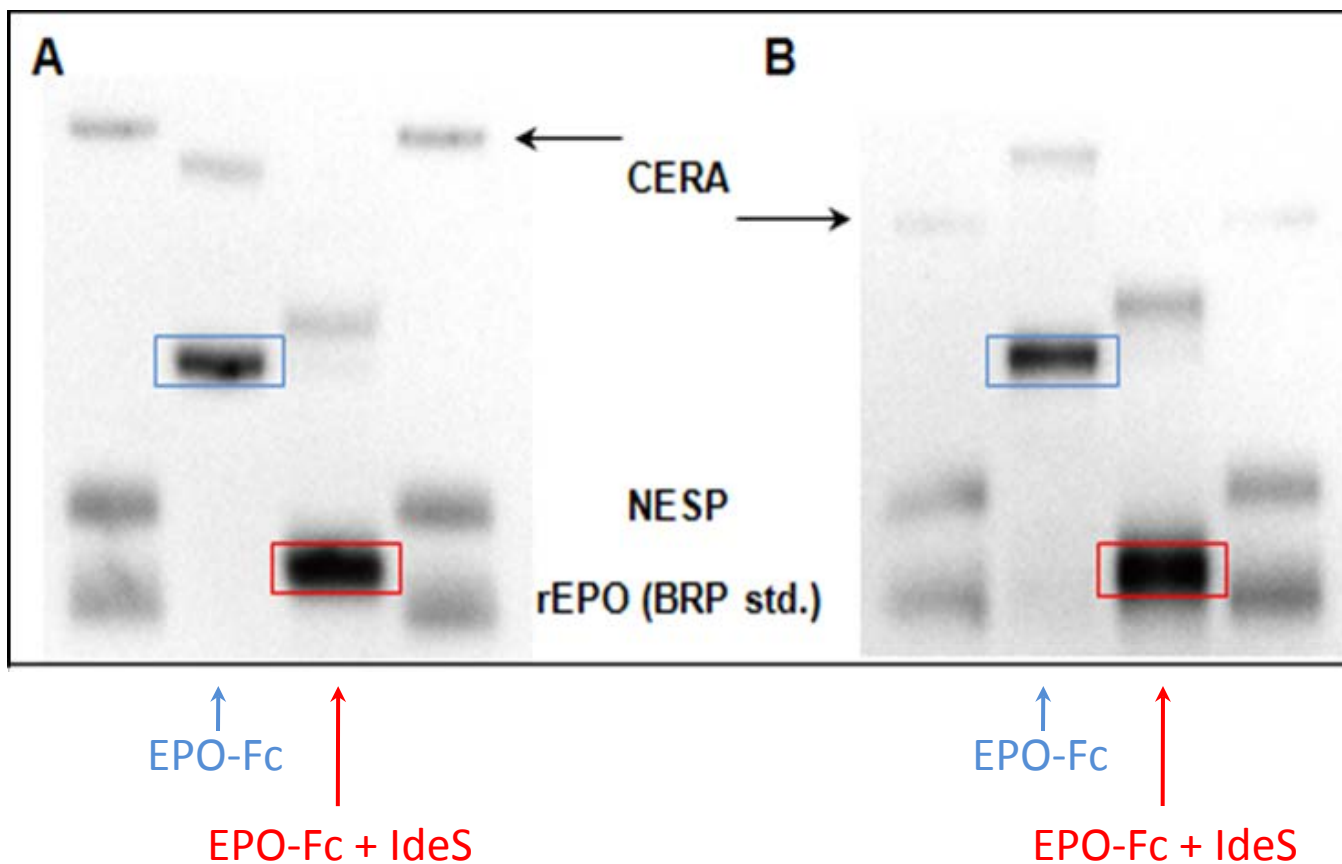




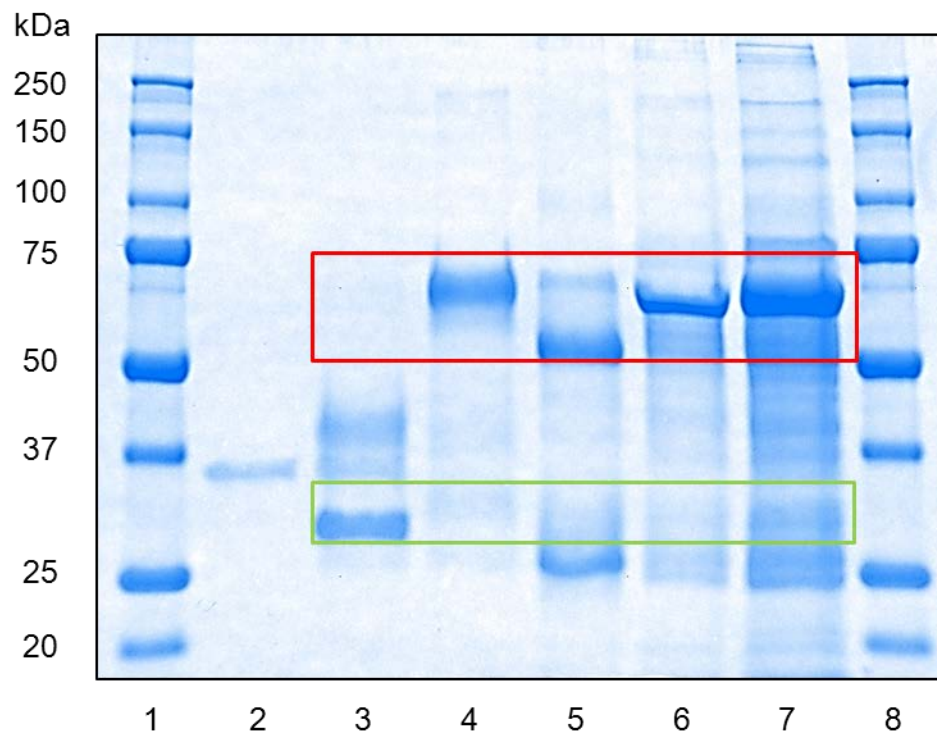
# IEF-профиль EPO-Fc после IdeS протеолиза



# Анализ EPO-Fc методами SDS/SAR-PAGE после протеолиза IdeS

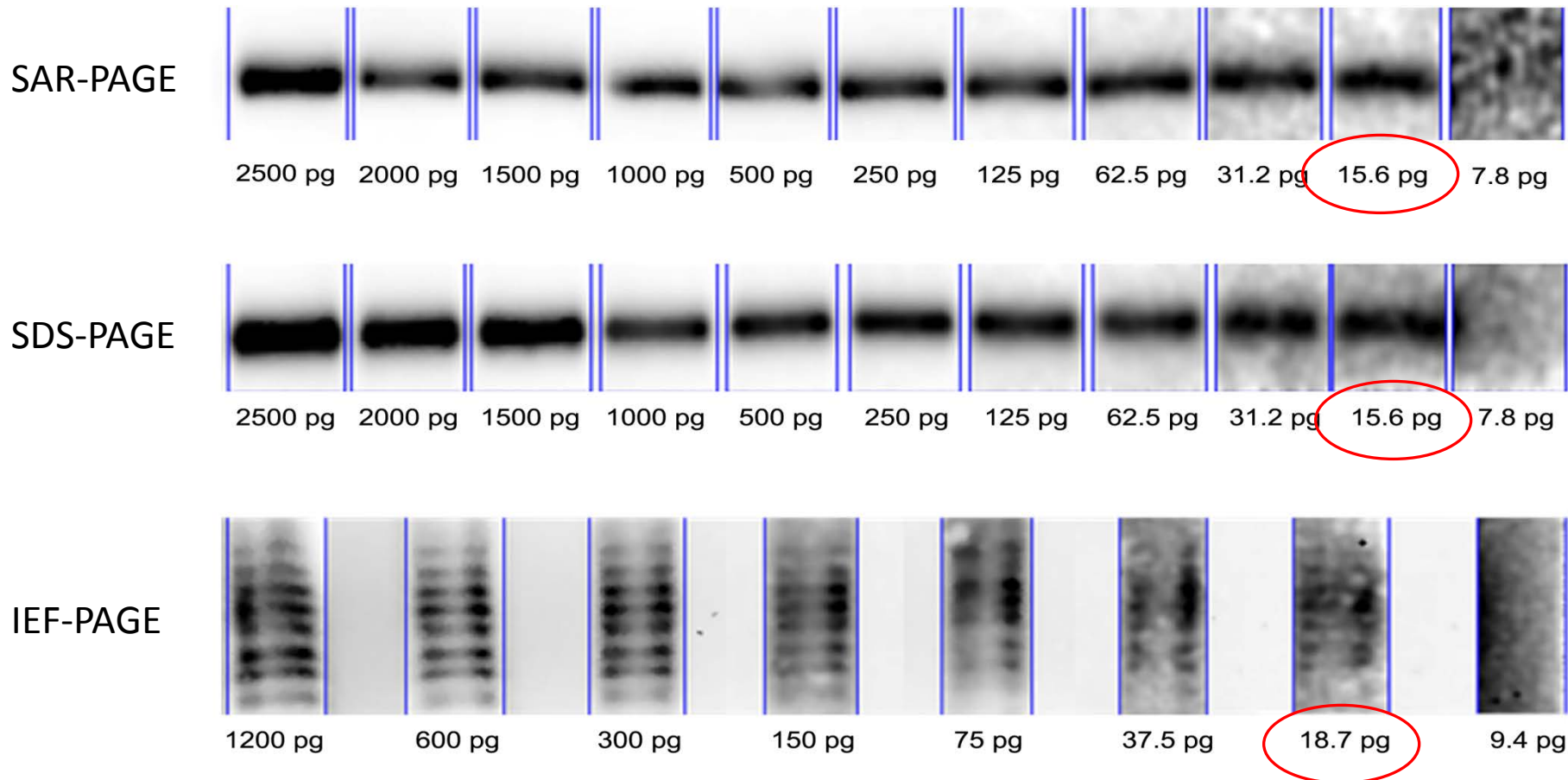


## SDS-PAGE образцов сыворотки крови с последующим окрашиванием Кумасси.



1, 8 – предокрашенные стандарты молекулярных масс; 2 – IdeS протеаза; 3 – EPO-Fc, обработанный IdeS протеазой; 4 – EPO-Fc; 5 – сыворотка крови человека, очищенная при помощи магнитных частиц с протеином G (бэнды тяжелых цепей иммуноглобулинов и альбумина отмечены красной рамкой); 6 – белки сыворотки (5  $\mu$ l элюата) после иммуноочистки на колонках MAlIA; 7 – сыворотка крови человека (5  $\mu$ l), 10-кратное разведение в воде. Область с низким содержанием белков сыворотки крови отмечена зеленой рамкой.

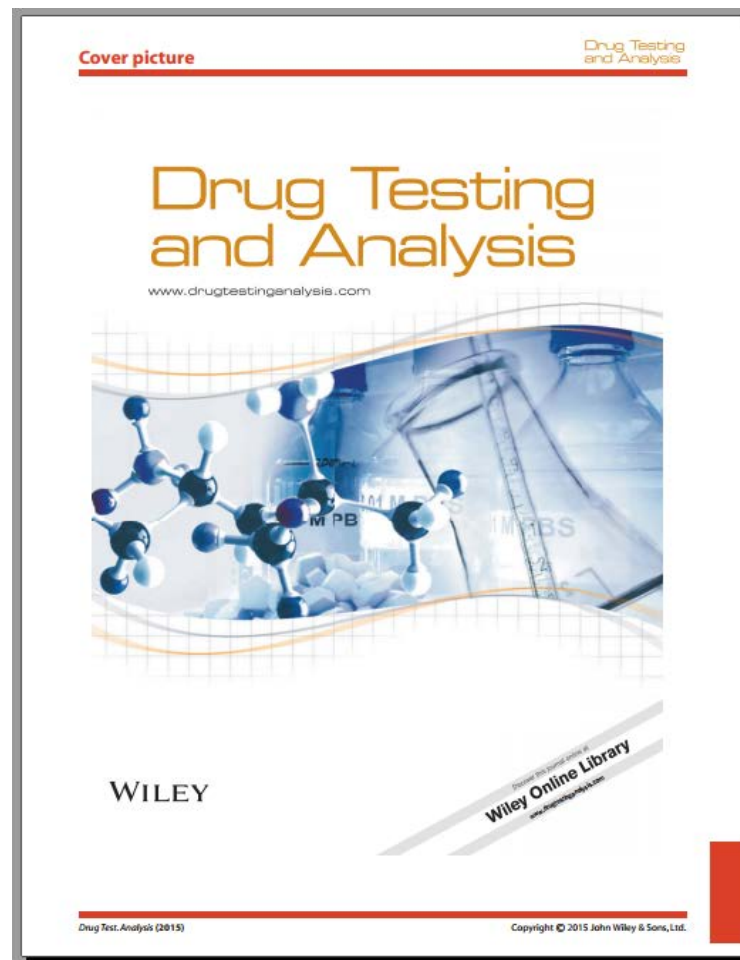
# Предел обнаружения ЕРО-Fc в образцах сыворотки



# Выводы

- Разработан простой подход, представляющий комбинацию IdeS-протеолиза и электрофоретических методов анализа для однозначной детекции EPO-Fc из образцов сыворотки крови
- После IdeS-протеолиза EPO-Fc надежно идентифицируется методом IEF-PAGE в полиакриламидных гелях с градиентом pH 2-6.
- После IdeS-протеолиза становится возможным отличие EPO-Fc от иных белков сыворотки, дающих неспецифический сигнал при визуализации.

Результаты исследования опубликованы в  
журнале  
Drug Testing and Analysis (DTA)



Спасибо за внимание!