

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГИБРИДНОГО БЕЛКА ЭПО-Fc МЕТОДАМИ
ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА С ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИМ
ФОКУСИРОВАНИЕМ (IEF-PAGE) И В ПРИСУТСТВИИ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА
(SDS-PAGE)/ЛАУРИЛСАРКОЗИНАТА НАТРИЯ (SAR-PAGE)
С ЦЕЛЬЮ АНТИДОПИНГОВОГО КОНТРОЛЯ**

П.В. Постников^{1,@}, старший научный сотрудник отдела пептидного допинга и анализа крови, Г.И. Кротов¹, начальник отдела пептидного допинга и анализа крови, Ю.А. Ефимова², доцент, М.А. Дикунец¹, директор

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Антидопинговый Центр»,
Москва, 105005 Россия

²Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий),
Москва, 119571 Россия

@ Автор для переписки, e-mail: horemxeb-haos@mail.ru

Статья посвящена разработке подхода по идентификации нового стимулятора кроветворения, гибридного белка ЭПО-Fc, запрещенного Всемирным антидопинговым агентством (ВАДА) для употребления спортсменами и являющегося допингом. Существующие в рутинной практике антидопинговых лабораторий мира методы качественного определения данного вещества с помощью полиакриламидного гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата (SDS-PAGE) и лаурилсаркозината (SAR-PAGE) натрия недостаточно специфичны. В статье описана принципиальная возможность идентификации ЭПО-Fc методом изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле (IEF-PAGE) с градиентом pH 2–6 после удаления Fc-части молекулы посредством ферментативного гидролиза. Показано, что удаление кристаллизуемого фрагмента приводит к уменьшению молекулярной массы всей гибридной молекулы и увеличению ее электрофоретической подвижности, что позволяет специфично детектировать запрещенное вещество существующими методами. В ходе исследования выбран фермент для гидролитического расщепления ЭПО-Fc и подобраны оптимальные условия гидролиза в образцах сыворотки крови.

Ключевые слова: гибридный белок ЭПО-Fc, ферментативный гидролиз, электрофорез, фрагмент ЭПО-шарнир, антидопинговый контроль.

**IDENTIFICATION OF EPO-Fc FUSION PROTEIN BY MEANS OF POLYACRYLAMIDE
GEL-ELECTROPHORESIS WITH ISOELECTROFOCUSING (IEF-PAGE)
AND IN PRESENCE OF SODIUM DODECYLSULPHATE (SDS-PAGE)/
LAUROYLSARCOSINATE (SAR-PAGE) FOR THE PURPOSE OF ANTI-DOPING CONTROL**

P.V. Postnikov^{1,@}, G.I. Krotov¹, Yu.A. Efimova², M.A. Dikunets¹

¹Federal State Budgetary Institution "Antidoping Centre", Moscow, 105005 Russia

²Moscow Technological University (Institute of Fine Chemical Technologies),
Moscow, 119571 Russia

@Corresponding author e-mail: horemxeb-haos@mail.ru

The article is devoted to develop of an approach for the identification of new stimulator of hematopoiesis, EPO-Fc fusion protein, which is banned by the World Anti-doping Agency (WADA) to use by athletes since it has become doping. Existing methods of qualitative determination of this substances in routine practice of antidoping laboratories such as polyacrylamide gel-electrophoresis in presence of sodium dodecylsulphate (SDS-PAGE) or lauroylsarcosinate (SAR-PAGE) are insufficiently specific. The article shows the principal possibility of identification of

EPO-Fc fusion protein by means of IEF-PAGE in carrier ampholyte-based gels with a pH range 2–6 after Fc-fragment removal via fermentative hydrolysis. It has been shown that the removing of the crystallizable fragment leads to decrease of molecular weight of whole hybrid molecule and to increase its electrophoretic mobility that allows to detect this banned substances with high specificity by existing methods. During the study the enzyme for hydrolytic cleavage and optimum conditions of hydrolysis of EPO-Fc in serum samples were selected.

Keywords: *EPO-Fc fusion protein, fermentative hydrolysis, electrophoresis, EPO-hinge fragment, antidoping control.*

Введение

В последнее время все больше возрастает интерес к изучению гибридных белков ЭПО-Fc, новых стимуляторов кроветворения, как к потенциальным средствам для лечения людей, страдающих хронической почечной недостаточностью и различными формами анемий. Эти соединения обладают рядом улучшенных фармакокинетических и фармакодинамических свойств по сравнению с другими известными эритропоэз-стимулирующими агентами (ЭСА). В настоящее время они выпускаются рядом биотехнологических компаний только для исследовательских целей, однако доступны на «черном» рынке. Ввиду этого данные препараты могут употребляться спортсменами наряду с другими видами эритропоэтинов (ЭПО) в видах спорта на выносливость, для увеличения продукции эритроцитов и, как следствие, повышения кислородной емкости крови.

Гибридные белки ЭПО-Fc состоят из одной или двух молекул гормона ЭПО, конъюгированных с димерной Fc-частью человеческого IgG1, IgG2 или IgG4, включающей шарнирную область, СН2- и СН3-домены [1–3]. Их молекулярная масса составляет от 110 до 130 кДа [2], что превышает предел почечной фильтрации, поэтому сыворотка крови является предпочтительной матрицей для их детекции. ЭПО и Fc-часть могут быть соединены напрямую либо посредством гибкого пептидного линкера [4]. Полная аминокислотная последовательность таких белков является собственностью биотехнологических фирм-производителей и до конца неизвестна.

Применение белков ЭПО-Fc в спорте строго регламентируется Запрещенным списком ВАДА, в который они внесены с 2012 года в соответствии со статьей S2 «Пептидные гормоны, факторы роста, подобные им субстанции и миметики» [5]. В современном допинг-контроле для их определения в образцах сыворотки крови используются качественные методы анализа, такие как полиакриламидный гель-электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и лаурилсаркозината натрия (SAR-PAGE) [6–9]. Однако данные методы недостаточно специфичны, так как сыворотка является сложной матрицей и содержит большое количество белков со сходной с ЭПО-Fc молекулярной массой, что может приводить к появлению дополнительных

белковых полос в зоне детекции гибридного белка за счет неспецифического взаимодействия с антителами, используемыми в анализе. Для определения некоторых стимуляторов кроветворения, Дарбэпоэтина или Мирцера, используется метод IEF-PAGE (изоэлектрическое фокусирование в полиакриламидном геле) с градиентом pH 2–6 [6, 9], так как эти препараты имеют уникальные изоэлектрические профили, отличные от эндогенного ЭПО. Однако данный метод неприменим для детекции ЭПО-Fc из-за плохого разделения последнего на отдельные изоформы [10].

Настоящая работа посвящена оценке влияния ферментативного удаления Fc-части на электрофоретические характеристики ЭПО-Fc и является продолжением исследований, проведенных ранее [11]. Из наиболее часто используемых ферментов для фрагментации антител была отобрана IdeS-протеаза, специфичная к IgG человека. IdeS расщепляет аминокислотную последовательность после остатка Gly236 шарнирной области IgG всех подклассов. Показано, что удаление Fc-части может улучшить разделение ЭПО-Fc на дискретные изоформы методом IEF-PAGE с градиентом pH 2–6 и увеличить специфичность детекции существующими методами SDS/SAR-PAGE.

Экспериментальная часть

Материалы

Все растворы и буферы готовили с использованием деионизированной воды. 30% раствор акриламида/бис, метиловый красный, морфолин-4-пропансульфоновая кислота (МОПС), феноловый красный, трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид (Трис гидрохлорид), ЭДТА (кислота), D,L-дитиотреитол (ДТТ), сахараза, 85% ортофосфорная кислота, керосин, бычий сывороточный альбумин (БСА), N-лаурилсаркозинат натрия (саркозил) и человеческая нулевая сыворотка были приобретены у Sigma-Aldrich (США).

Мочевина, подложки GelBond для полиакриламидного геля, зажимы, рамки и стекла для заливки геля (125×260×1.0 мм), трис(гидроксиметил)аминометан (Трис основание), глицин, электродные стрипы, бумага для блоттинга (IEF), додецилсульфат натрия (SDS), персульфат аммония, электродная бумага, система для проведения электрофореза (Multiphor II) и источник тока к ней (EPS 3500 XL) закуплены у фирмы GE Healthcare (Швеция).

N,N,N',N'-Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), 12% Bis-Tris предзалитые гели (18 лунок), Criterion® ячейка для электрофореза, бумага для блоттинга экстра (формат Criterion, 86×135 мм), реагент CoomassieBio-SafeR-250 для окрашивания белков, ХТ буфер образца, ХТ редуцирующий агент, ХТ MOPS буфер для электрофореза, устройство для полусухого переноса белков (TransBlot SD), источник тока (PowerPac HC) для всех Вестерн блотов, обезжиренное сухое молоко (ОМ), Precision Plus Protein™ Dual Color предокрашенные стандарты молекулярных масс и система гель-документирования ChemiDoc MP для получения изображений были заказаны у Bio-Rad (США).

Оборудование для ультрафильтрации (Amicon Ultra-0.5, предел значений молекулярной массы 30 кДа), HPF Millex-HV фильтрующие элементы, шприцы полипропиленовые (20 мл), поливинилидендифторидные (PVDF) мембраны для Вестерн блоттинга Immobilon-P и Durapore, Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP субстрат, пластиковые шприцы (50 мл) и вакуумный насос были приобретены у корпорации Millipore (США).

Система QIAvac Plus 24 System приобретена у фирмы Qiagen (Германия).

Моноклональные антитела приобретены у R&DSYSTEMS (анти-ЭПО, клон АЕ7А5; США). Биотинилированные козы антимышинные антитела (Н+L), стрептавидин конъюгированный с пероксидазой хрена, стабилизатор пероксидазного конъюгата, 10% раствор Tween-80, Super Signal® West Femto Maximum sensitivity хемилуминесцентный субстрат, NanoDrop 2000cUV-Vis спектрофотометр получены от компании ThermoScientific/Pierce (США).

IdeS-протеаза (5000 Ед.) приобретена у корпорации Promega (США). Папаин получен от компании Ferak (Германия). Амфолиты для изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле (Servalyt 2–4, 4–6, и 6–8) и пепсин (30 Ед./мг) приобретен у компании Serva (Германия).

Ледяная уксусная кислота и метанол закуплены у Merck (Германия). Метабисульфит натрия приобретен у Acros Organics (Бельгия). Безводный глицерин у Appli Chem GmbH (Германия). Набор для иммуноаффинной очистки на основе анти-ЭПО антител закуплен у МАПА Diagnostics (Швеция). Таблетки для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБ) были заказаны у Amresco (США).

Стандарт человеческого эндогенного эритропоэтина (международный эталонный препарат) получен из Национального Института биологических стандартов и контролей (NIBSC, Великобритания). Рекомбинантный человеческий эритропоэтин (BRP-EPO, batch 3.3) приобретен в Европейском директорате по качеству лекарственных препаратов (Council of Europe, Франция). В работе использова-

ны препараты рекомбинантного ЭПО (рЭПО) дарбэпоэтин-альфа (NESP, Аранесп™) и Мирцера™ (CERA) фармацевтических компаний Amgen (США) и Хоффманн-Ля Рош (Швейцария), соответственно.

Рекомбинантные человеческие ЭПО-альфа/Fc гибридные белки приобретены у фармацевтических компаний Gen Script (США) и Cell Science Technology (США).

Методы

Формирование полиакриламидного геля для IEF-PAGE

Для приготовления геля к навескам мочевины 14.71 г и сахарозы 1.75 г добавляли 1.9 мл амфолита Servalyt 2–4, 1.9 мл амфолита Servalyt 4–6, 6.32 мл 30% раствора акриламида/бис, 14.17 мл деионизированной воды и перемешивали в стакане под вакуумом в течение 15 мин. Затем к смеси приливали 31 мкл ТЕМЕД и 310 мкл 10% раствора персульфата аммония и немедленно заливали в предварительно собранную рамку, как было описано ранее [12].

IEF-PAGE ЭПО-Fc до и после ферментативного гидролиза

В качестве анолида и католида для нанесения на электродные стрипы использовали 0.5 М ортофосфорную кислоту и 2% раствор (w/v) амфолита Servalyt 6–8, соответственно. Для контакта между гелем и охлаждающей платформой ячейки Multiphor II применяли керосин. Для сравнения изоэлектрического профиля до и после гидролиза ЭПО-Fc IdeS-протеазой с профилями иных препаратов рекомбинантного ЭПО 1 мкг препарата гибридного белка инкубировали с IdeS в 50 мкл 0.1% раствора БСА/ФБ в течение 1 ч (37°C, 450 rpm) в термомиксере Eppendorf Comfort (Германия) в соотношении протеаза/белок, рекомендованном производителем [13]. Далее образец разбавляли тем же раствором до концентрации 0.1 нг/мкл (1 мкг негидролизованного препарата также доводили до концентрации 0.1 нг/мкл), отбирали в пробирки объемом 0.5 мл по 12 мкл, добавляли 10% раствор детергента Tween-80 по 1.2 мкл и наносили в лунки полиакриламидного геля рядом с образцами других препаратов рЭПО, используемых в качестве положительных контролей (0.2 нг на трек в 0.1% БСА/ФБ) и эндогенного ЭПО. После стадии префокусирования при постоянном напряжении (250 В, 30 мин, 8°C, расстояние между электродами: 10 см) гель подвергали изоэлектрическому фокусированию при 8°C, постоянной мощности электрического тока 25 Вт по достижении значения суммарных 3600 вольт-часов (3–3.5 ч). Во все образцы препаратов рЭПО также добавляли 10% раствор Tween-80 в отношении 1:10. Для приготовления всех разведений препаратов использовали 0.1% раствор БСА/ФБ. После изоэлектрического фокусирования белки переносили на PVDF-мембрану Immobilon-P.

SDS-PAGE и SAR-PAGE ЭПО-Fc до и после ферментативного гидролиза

Электрофорез в присутствии додецилсульфата и лаурилсаркозината натрия проводили, как было описано в [14, 15], с небольшими изменениями. Для определения электрофоретической подвижности и молекулярной массы ЭПО-Fc, гидролизованного IdeS-протеазой, 1 мкг препарата вносили в 50 мкл фосфатного буферного раствора в соотношении, рекомендованном производителем [13], и инкубировали в течение 1 ч (37°C, 450 rpm). Далее образец разбавляли деионизированной водой до концентрации 0.1 нг/мкл и наносили на гель (0.4 нг на лунку) вместе с другими препаратами рЭПО (0.2 нг на лунку, приготовлены на деионизированной воде). В образцы вносили 4-кратный буферный раствор образца [14] до получения 1-кратного (в случае анализа методом SAR-PAGE) или готового ХТ-буферного раствора образца (в случае SDS-PAGE) и нагревали в редуцирующих условиях (95°C, 5 мин, 450 rpm, 100 mM ДТТ в случае SAR-PAGE и ХТ-редуцирующий агент в случае SDS-PAGE) в пробирках типа эппендорф объемом 0.5 мл [14, 15]. Буферные растворы для электрофореза готовили на основе МОПС (SAR-PAGE: 50 mM МОПС, 50 mM Трис основание, 0.1% саркозил и 1 mM ЭДТА; SDS-PAGE: готовый 20-кратный коммерческий ХТ MOPS буферный раствор). В качестве антиоксиданта в катодлит добавляли раствор метабисульфата натрия в воде до конечной концентрации 5 mM (метод SAR-PAGE). Гель-электрофорез проводили с использованием электрофоретической ячейки Criterion™ и источника тока PowerPac (Bio-Rad, США) при постоянной величине напряжения (200 В) в течение 50 и 55 мин для анализа SAR-PAGE и SDS-PAGE, соответственно. Во всех экспериментах использовали готовые предзалитые 12% Bis-Tris полиакриламидные гели.

Двойной Вестерн-блоттинг и визуализация

После электрофореза в присутствии додецилсульфата и лаурилсаркозината гель уравнивали буферным раствором Бьеррума (инкубировали 3×10 мин) на шейкере Promax 1020 с нагреваемым блоком Incubator 1000 (Heidolph, Германия) [16]. После анализа методом IEF-PAGE для этих целей использовали модифицированный Товбин буферный раствор (50 mM Трис-глициновый буферный раствор, pH 8.3, без метанола), в котором гель выдерживали не менее 3 мин, мембраны, отрезанные по размеру геля, и бумагу для блоттинга вымачивали в 25 mM Трис-глициновом буферном растворе, pH 8.3, без метанола. Далее белки переносили на PVDF-мембрану Immobilon-P при постоянной силе тока (1 mA/cm², в течение 1 ч в случае SDS/SAR-PAGE и 30 мин – IEF-PAGE). Один блок бумаги Criterion для блоттинга и 4 слоя тонкой электродной бумаги помещали с каждой стороны «сэндвича» – Immobilon-P/Durapore/

гель. После электропереноса мембрану Immobilon-P (блот-I) инкубировали в 5 mM растворе ДТТ в ФБ (37°C, 60 мин). Затем блот в течение 1 ч блокировали в 5% растворе ОМ/ФБ, инкубировали в 1% растворе ОМ/ФБ, содержащем анти-ЭПО мышинные антитела (R&D Systems, клон АЕ7А5, титр 1:1000 (v/v), 37°C, 1 ч), промывали в ФБ (3×1 мин, 3×10 мин) и проводили электроперенос связавшихся анти-ЭПО мышинных антител на другую PVDF-мембрану (блот-II) в кислых условиях (0.8 mA/cm², 10 мин) так, как описывала Lasne с соавт. [17]. Далее блот-II промывали в ФБ (3×1 мин), блокировали 1 ч в 5% растворе ОМ/ФБ, инкубировали в 1% растворе ОМ/ФБ, содержащем козы биотинилированные анти-мышинные антитела (титр 1:12500 (v/v), 2-8°C, в течение ночи), промывали в ФБ (3×1 мин, 3×10 мин) и инкубировали в 1% растворе ОМ/ФБ, содержащем стрептавидиновый конъюгат пероксидазы хрена (титр 1:256 (v/v), 1 ч, 37°C). В заключение, мембрану промывали в ФБ (3×1 мин, 3×10 мин) и в течение 5 мин инкубировали в хемилюминесцентном субстрате (Super Signal® West Femto Thermo Scientific и Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP substrate для методов SDS/SAR-PAGE и IEF-PAGE, соответственно). Для визуализации и регистрации хемилюминесцентного сигнала использовали систему гель-документирования ChemiDoc MP (Bio-Rad, США).

Подбор оптимального фермента для удаления Fc-части

С целью выбора наиболее специфичного фермента для гидролиза гибридного белка проводили SDS-PAGE с последующим окрашиванием раствором Кумасси R-250. Для приготовления 4 модельных образцов в 7 мкл 50 mM Трис-HCl буферного раствора вносили по 3 мкл сток-раствора ЭПО-Fc (3 мкг), в три из которых добавляли IdeS-протеазу (в соотношении, рекомендованном производителем), папаин (5 Ед.) и пепсин (5 Ед.). В образец с пепсином добавляли 1 мкл ледяной уксусной кислоты, т. к. фермент активен только в кислой среде. Отдельно готовили образцы IdeS-протеазы, папаина и пепсина, для этого в 9 мкл 50 mM Трис-HCl буферного раствора вносили 20 Ед. IdeS, 10 Ед. папаина и 10 Ед. пепсина. Далее в каждый из образцов добавляли 4-кратный ХТ-буферный раствор образца до получения 1-кратного и нагревали при восстанавливающих условиях (95°C, 5 мин, 450 rpm, ХТ-редуцирующий агент до получения 1-кратного раствора). Все образцы вносили в лунки предзалитого 12% геля Bis-Tris вместе с образцами предокрашенных стандартов молекулярных масс (7 мкл на лунку геля). В качестве электродного буферного раствора для SDS-PAGE использовали готовый 20-кратный ХТ MOPS буферный раствор (разбавляли до 1-кратного). Процесс электрофореза проводили при постоянном напряжении (200 В) в течение 55 мин.

Затем гель промывали 3×5 мин деионизированной водой и инкубировали в растворе Кумасси R-250 в течение 45 мин. Далее гель отмывали 5×10 мин деионизированной водой и визуализировали окрашенные белковые полосы при помощи геля-документирующей системы ChemiDoc MP (Bio-Rad, США).

Подбор оптимальных условий гидролиза ЭПО-Fc в образцах сыворотки крови

Ввиду того, что сыворотка крови содержит эндогенные иммуноглобулины, являющиеся объектом гидролиза IdeS-протеазы, которые могут конкурировать с ЭПО-Fc и снижать эффективность реакции, требуется добавлять протеазу в избытке и измерять концентрацию общего белка в образце после стадии иммуноочистки. Для определения оптимального соотношения IdeS/общий белок, в 500 мкл образцов сыворотки крови (9 образцов) вносили 0.3 нг препарата ЭПО-Fc и проводили иммуноаффинную очистку при помощи наборов EPO Purification Detection kit фирмы MAPIA Diagnostics (Швеция) и вакуумной системы QIAvac 24 (Германия) [18, 19]. Для элюции использовали буфер, прилагающийся к набору. После образцы нейтрализовывали буфером А, подвергали концентрированию при помощи устройств Amicon 0.5 Ultra (20 мин, 20000 g) и измеряли общее количество белка в элюате посредством микрообъемного спектрофотометра NanoDrop 2000 в режиме Protein A280 при поглощении света с длиной волны 280 нм (УФ-область). После добавляли IdeS-протеазу из расчета 1, 2.5 и 5 Ед. на 1 мкг общего белка и инкубировали в термомиксере (37°C, 450 rpm) в течение 30, 60 и 120 мин. Затем элюаты анализировали методом SAR-PAGE с последующим двойным Вестерн-блоттингом и хемилюминесцентной детекцией, как описано выше.

Результаты и их обсуждение

Выбор фермента для гидролиза ЭПО-Fc

В настоящее время в научной практике для фрагментации антител и получения стабильных F(ab')₂- и Fc-фрагментов наиболее часто используются стрептококковый пирогенный эндотоксин В (SpeB-протеиназа) [20–22], папаин [23], пепсин [24] и IdeS-протеаза [25–28]. Далее подробнее остановимся на возможностях каждого из вышеприведенных ферментов.

Цистеиновая протеиназа стрептококков серологической группы В (SpeB) – возбудителей различных инфекций кожи, мягких тканей и слизистых оболочек человека – была первой протеиназой, использованной для гидролиза моноклональных антител [29] и применяется для протеолитического расщепления тяжелых цепей IgG на F(ab')₂- и Fc-фрагменты [20, 21]. Ранее считалось, что SpeB расщепляет IgG между аминокислотными остатками Gly236–Gly237 шарнирной области, распознавая специфический мотив 237GPSVFLFP244 [20, 21], однако в более поздних работах [22] доказано, что SpeB гидролизует связь между аминокислотными остатками Thr225–Cys226 и только подкласса IgG1 (рис. 1, синяя рамка), что приводит к образованию двух Fab- и Fc-фрагмента. Помимо этого, не известен сайт расщепления для IgG2 и IgG3, а IgG4 вовсе не гидролизуются. SpeB расщепляет иммуноглобулины всех остальных классов IgM, IgA, IgD, IgE [20, 25] и некоторые белки – витронектин, фибрин, фибриноген и др. [20]. Таким образом, SpeB не обладает строгой специфичностью к IgG и не может использоваться для расщепления ЭПО-Fc, в структуру которого входит Fc-часть IgG2 или IgG4.

Другими протеолитическими ферментами, широко используемыми для структурного анализа антител, являются пепсин и папаин [23, 30]. Пепсин эффективно

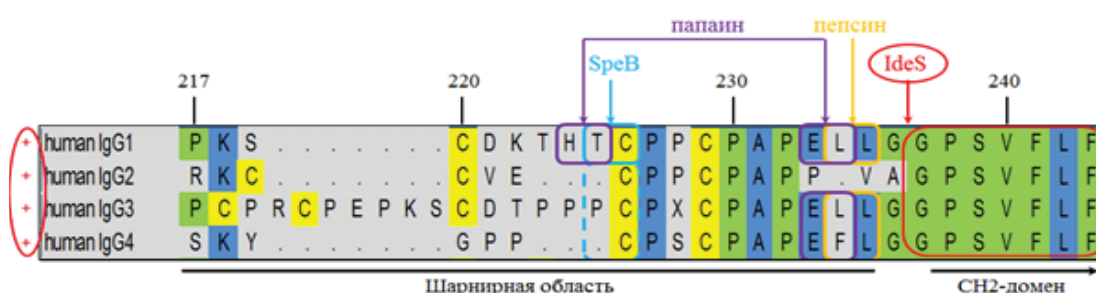


Рис. 1. Аминокислотный состав шарнирных областей IgG человека различных подклассов и сайты расщепления SpeB, пепсина, папаина и IdeS. Красной рамкой выделен сайт распознавания IdeS-протеазы, имеющийся у всех подклассов человеческого IgG. Синей рамкой отмечен разрыв пептидной связи между аминокислотными остатками при гидролизе SpeB, желтой – при гидролизе пепсином, фиолетовой – папаином.

гидролизует пептидные связи между гидрофобными и ароматическими аминокислотами Phe, Trp, Leu, реже Met, Glu и обладает широкой специфичностью.

Пепсин расщепляет пептидные связи в положениях Phe234–Leu235 и Leu234–Leu235 молекул IgG1 и IgG4 [30], но не IgG2 с заменами аминокислот в тех же поло-

жениях Val234 и Ala235 (рис. 1, желтая рамка). Пепсин активен в кислых условиях и чувствителен к изменению pH среды. Папаин действует на пептидные связи между Gly233 и Leu234, а также аминокислотами, проявляющими основные свойства. По данным нескольких работ [23, 30], фермент расщепляет IgG по двум сайтам –

вначале между His224–Thr225, приводя к образованию двух Fab и Fc-фрагмента, затем в положениях Glu233–Leu234 (рис. 1, фиолетовая рамка). Исследования проводили только в отношении мышиных антител [31] и IgG1 человека [23, 30], кроме того, данные сайты гидролиза не являются единственными, и с увеличением времени гидролитического воздействия расщепление может происходить по другим участкам. Установлено, что IgG1 расщепляется по двум сайтам, IgG3 и IgG4 только по сайту Glu233–Leu234, а гидролиз IgG2 проходит крайне неэффективно [32]. Также следует контролировать и оптимизировать условия гидролиза для каждого подкласса IgG в отдельности для обеспечения высокого выхода продуктов реакции. Пепсин и папаин в зависимости от длительности гидролитического воздействия дают различные продукты реакции и могут расщеплять ЭПО-Fc на пептиды с низкой мо-

лекулярной массой. Несмотря на некоторые положительные стороны использования данных ферментов, такие как доступность и низкая цена, они не обладают требуемой избирательностью и специфичностью, расщепляют многие иные белки сыворотки крови. Принимая во внимание то, что структура гибридного белка может содержать Fc-части разных подклассов IgG, данные ферменты не могут использоваться для гидролиза ЭПО-Fc.

Цистеиновая протеаза IdeS, выделенная из *Streptococcus pyogenes*, обладает строгой специфичностью к IgG человека [25, 27]. Она избирательно расщепляет молекулы всех подклассов IgG на стабильные F(ab')₂- и Fc-фрагменты, распознавая в структуре гибридного белка специфический мотив 237GPSVFLFP244 шарнирной области (рис. 1, красная рамка). Схематично процесс гидролиза показан на рис. 2.

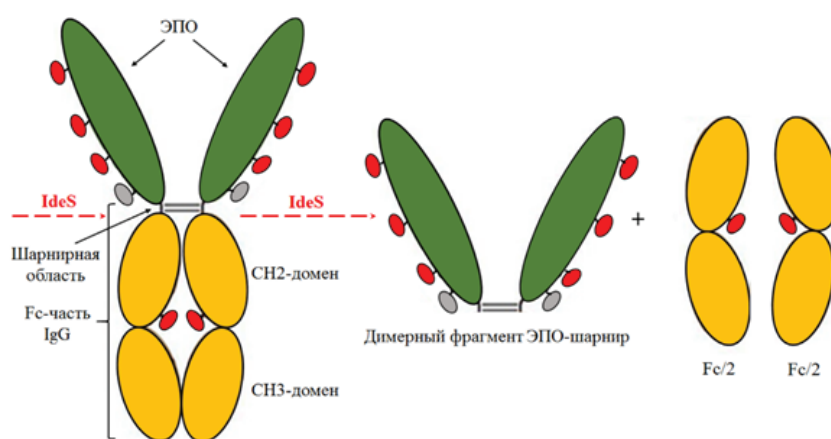


Рис. 2. Схема гидролиза ЭПО-Fc IdeS-протеазой.

В отличие от вышеупомянутых ферментов, IdeS-протеаза имеет несколько несомненных преимуществ: она не проявляет активность в отношении иммуноглобулинов других классов (IgM, IgA, IgD, IgE), как SpeB, дает высокий выход продуктов реакции ($\geq 95\%$) за короткий промежуток времени, пик активности проявляет в средах с нейтральным pH и имеет простой протокол гидролиза. Помимо этого, IdeS-протеаза уже на протяжении нескольких лет успешно используется для фрагментации как IgG [28, 33, 34], так и Fc-гибридных белков [35, 36].

Для выбора оптимального фермента проводили SDS-PAGE образцов ЭПО-Fc, гидролизованного IdeS-протеазой, папаином и пепсином, с последующим окрашиванием реагентом Кумасси R-250. Результаты приведены на рис. 3.

При гидролизе гибридного белка IdeS-протеазой ЭПО-Fc специфично расщепляется на две мономерных Fc-части, с молекулярной массой около 27 кДа (рис. 3, линия 6, нижняя полоса выделена овалом), и фрагмент ЭПО, объединенный с шарнирной областью IgG, с молекулярной массой 36–37 кДа (рис. 3, линия 6, верхняя полоса выделена овалом).

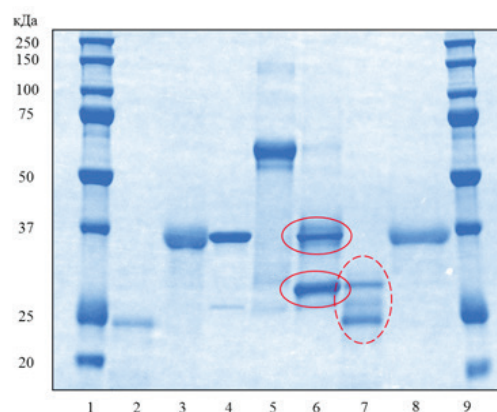


Рис. 3. Электрофореграмма SDS-PAGE геля с образцами ЭПО-Fc, гидролизованного IdeS, папаином и пепсином, окрашенного раствором Кумасси R-250 (в денатурирующих условиях): 1, 9 – предокрашенные стандарты молекулярных масс; 2 – папаин; 3 – пепсин; 4 – IdeS-протеаза; 5 – чистый препарат ЭПО-Fc; 6 – ЭПО-Fc, гидролизованный IdeS-протеазой; 7 – ЭПО-Fc, гидролизованный папаином; 8 – ЭПО-Fc, гидролизованный пепсином.

Папаин расщепляет ЭПО-Fc менее специфично (линия 7). Видна белковая полоса меньшей интенсивности, соответствующая Fc-части IgG, и белковая полоса с молекулярной массой около 25 кДа (пунктир), явно несоответствующая фрагменту, содержащему ЭПО и часть IgG. Пепсин, по сравнению с двумя вышеприведенными ферментами, и вовсе не обладает четкой специфичностью и, по всей видимости, расщепляет ЭПО-Fc на пептиды с низкими молекулярными массами. Никаких белковых полос в образце, содержащем смесь гибридного белка и фермента, кроме самого пепсина не детектировалось.

Основываясь на перечисленных выше аргументах и выводах, для гидролиза ЭПО-Fc была выбрана IdeS-протеаза.

Характеризация электрофоретических свойств ЭПО-Fc до и после гидролиза методами SDS/SAR/IEF-PAGE

В соответствии с инструкцией производителя [13], для гидролиза ЭПО-Fc к раствору, содержащему гибридный белок, добавляли протеазу в соотношении 1:1 и инкубировали в фосфатном буфере (1 ч, 37°C). После изоэлектрического фокусирования продуктов гидролиза в полиакриламидном геле с диапазоном pH 2–6, последующим двойным Вестерн-блоттингом и хемилюминесцентной детекцией визуализировался уникальный изоэлектрический профиль димерного фрагмента (ЭПО-шарнир)₂, отличающийся от всех известных аналогов ЭПО (рис. 4). Изопрофиль каждого индивидуального препарата рЭПО определяется суммарным зарядом молекулы и, как правило, является уникальным, что используется в современном допинг-контроле для анализа неизвестных образцов мочи и сыворотки крови на наличие эритропоэтинов рекомбинантной природы.

На рис. 4 представлен результат анализа методом IEF-PAGE препаратов ЭСА, используемых в качестве положительных стандартов, и эндогенного человеческого эритропоэтина (эЭПО), слева направо: изопрофили ЭПО-Fc, Мирцера, эндогенного ЭПО, биологического эталонного препарата α -, β -рЭПО (BRP, Biological Reference Preparation, эквимоллярная смесь эпоэтина- α и - β , 4 трек, верхние 6 полос) и Аранесп (NESP, 4 трек, 4 полосы снизу) и ЭПО-Fc после IdeS-гидролиза. Изопрофили α -, β -рЭПО, Мирцера и продукта IdeS-гидролиза ЭПО-Fc димерного фрагмента (ЭПО-шарнир)₂ определяется в основной области полиакриламидного геля. Изоэлектрический профиль препарата рЭПО Аранесп при изоэлектрофокусировании определяется в кислой области геля. Основная и кислая области геля разделяются согласно позициям первой интенсивной белковой полосы α -, β -рЭПО и наиболее интенсивной белковой полосы препарата Аранесп. Эндогенная область находится между этими областями.

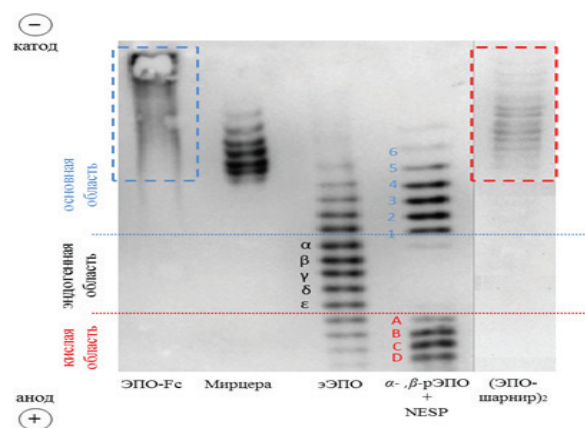


Рис. 4. Изоэлектрические профили различных ЭСА (слева направо): ЭПО-Fc (выделен синим пунктиром, левый верхний угол), Мирцера, эндогенного ЭПО, смеси α -, β -рЭПО + Аранесп и ЭПО-Fc, обработанного IdeS-протеазой (димерный фрагмент (ЭПО-шарнир)₂, профиль гликоформ выделен красным пунктиром, правый верхний угол).

В соответствии с компьютерной программой для аннотирования и оценки изоэлектрических профилей GAsero [37], используемой при обработке результатов, гликоформы, детектируемые в основной области геля, должны обозначаться арабскими цифрами, кислой области – заглавными буквами латинского алфавита. Изоформы профиля ЭПО эндогенной области обозначаются буквами греческого алфавита.

Изопрофиль димерного фрагмента ЭПО, конъюгированного с шарнирной областью IgG, существенно отличается как характером распределения гликоформ, так и их количеством, относительно других ЭСА. Он состоит из 10-12 дискретных гликоформ, наиболее интенсивные из которых детектируются в области между изопрофилями α -, β -рЭПО и Мирцера. Установлено, что расстояние между гликоформами изопрофиля димерного фрагмента (ЭПО-шарнир)₂ меньше, чем между таковыми Мирцера.

Также образцы ЭПО-Fc до и после IdeS-гидролиза были проанализированы методами SDS/SAR-PAGE. Данные методы не обладают достаточной специфичностью для определения ЭПО-Fc. Дело в том, что сыворотка крови содержит большое количество белков, имеющих молекулярную массу, сходную с таковой у мономера ЭПО-Fc, которые могут уменьшать селективность определения (рис. 5). Это происходит, например, за счет неспецифического связывания вторичных антител с альбуминами или тяжелыми цепями антител и проявляется в виде дополнительных белковых полос, визуализируемых в зоне детекции ЭПО-Fc. При повторном анализе таких «подозрительных» образцов присутствие в них гибридного белка не подтверждается.

После IdeS-гидролиза Fc-гибрида с последующим анализом методами SAR-PAGE (рис. 6а) и SDS-PAGE (рис. 6б) отмечалось уменьшение молекулярной массы целой молекулы и регистрировалась белковая полоса не димерного (ЭПО-шарнир)₂, а мономерного фрагмента ЭПО-шарнир, так как электрофорез проводили в денатурирующих условиях [11]. После удаления Fc-фрагмента, электрофоретическая подвижность молекулы гибридного белка увеличивалась, и белковая полоса ЭПО-Fc-мономера определялась в области между полосами α -, β -рЭПО и NESP (рис. 6, внизу, красная рам-

ка) с меньшим содержанием сывороточных белков, что позволит специфично дифференцировать гибридный белок от иных белков со сходной молекулярной массой, которые могут взаимодействовать со вторичными антителами в процессе анализа. Итак, мы показали, что IdeS-гидролиз может использоваться для детекции ЭПО-Fc существующими методами SDS/SAR-PAGE, рекомендованными ВАДА. Изменение положения белковой полосы вследствие гидролиза позволит специфично отличать гибридный белок от полос других белков биологических жидкостей человека.

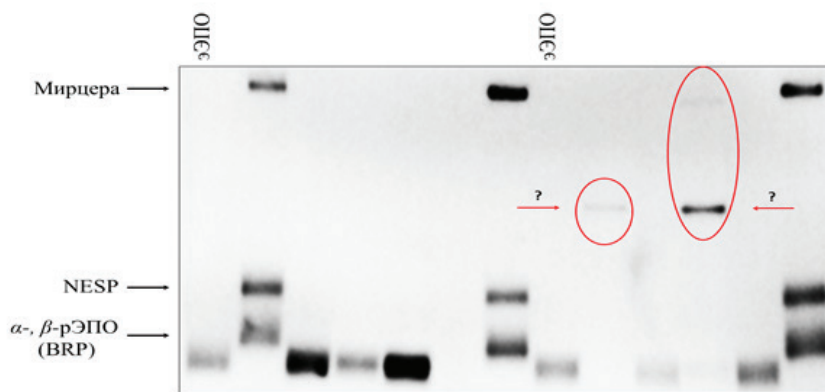


Рис. 5. Результаты SAR-PAGE реальных образцов сыворотки крови спортсменов. Овалами выделены полосы посторонних белков.

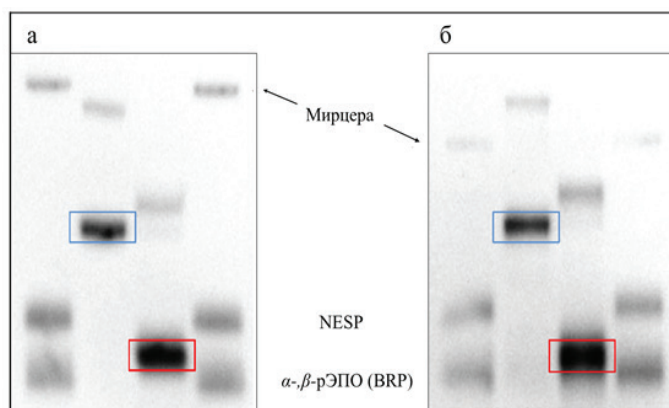


Рис. 6. Исследование электрофоретической подвижности ЭПО-Fc-мономера до (вверху, в синей рамке) и после (внизу, в красной рамке, фрагмент ЭПО-шарнир) IdeS-гидролиза ЭПО-Fc относительно положения белковых полос α -, β -рЭПО, NESP и Мирцера [11].

Определение оптимальных условий гидролиза ЭПО-Fc, выделенного из образцов сыворотки крови

Возможность использования иммуноаффинных колонок фирмы МАПА для выделения ЭПО-Fc уже изучалась ранее [10]. В настоящее время это единственный широко используемый в рутинной практике антидопинговых лабораторий мира подход для выделения аналогов ЭПО из образцов сыворотки крови. Колонки имеют высокую степень извлечения, и пробоподготовка не занимает много времени [19].

Исходя из информации, предоставленной производителем, 1 Ед. протеазы достаточно для гидролиза 1 мкг

IgG [13]. Учитывая то, что сыворотка крови содержит эндогенные иммуноглобулины, которые могут оставаться в элюате после стадии иммуноочистки и конкурировать в процессе гидролиза с ЭПО-Fc, снижая его эффективность, решено добавлять большее количество IdeS. Для определения оптимального соотношения IdeS/общий белок готовили 9 образцов сыворотки объемом 500 мкл, содержащие 0.3 нг ЭПО-Fc, и подвергали пробоподготовке с использованием иммуноаффинных колонок из набора EPO Purification kit фирмы МАПА Diagnostics (Швеция) в соответствии с инструкцией. Далее в элюатах измеряли концентрацию общего белка при помо-

щи спектрофотометра Nanodrop 2000 (ThermoScientific, Германия), вносили 1, 2.5 и 5 Ед. IdeS-протеазы на 1 мкг общего белка и инкубировали в течение 30 мин, 1 и 2 ч

при температуре 37°C, как рекомендовано производителем [13]. Влияние температуры на гидролиз не изучалось. Результаты приведены на рис. 7.

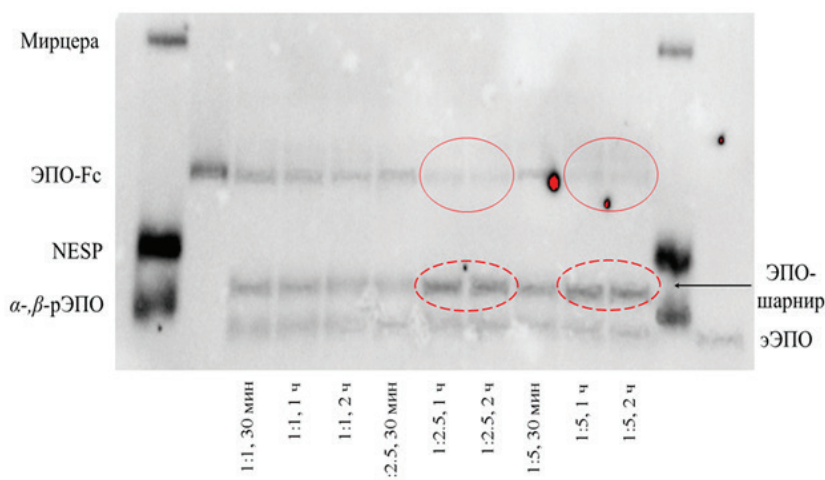


Рис. 7. Подбор оптимального соотношения IdeS/общий белок для гидролиза ЭПО-Fc, выделенного из образцов сыворотки.

Обнаружено, что гидролиз проходил полностью в образцах с соотношением общий белок/IdeS 1:2.5 и временем инкубации 1 ч и более, а также в образцах с соотношением 1:5 и тем же временем инкубации – 1 ч и более. В образцах с данными соотношениями белковая полоса мономера ЭПО-Fc практически не детектировалась (рис. 7, отмечено красным овалом, сверху) и выход продукта гидролиза – фрагмента ЭПО-шарнир был выше (детектируется белковая полоса большей интенсивности, выделено красным пунктиром, внизу). Для образца с соотношением общий белок/протеаза 1:2.5 и временем инкубации 30 мин данного времени, по-видимому, оказалось недостаточно для полного гидролиза гибридного белка. Для гидролиза образцов с соотношением 1:1 требуется более 2 часов для полного удаления Fc-части. В итоге, в качестве оптимальных условий гидролиза ЭПО-Fc после стадии иммуноочистки образцов сыворотки выбрано соотношение общий белок/IdeS 1:2.5 при времени инкубации 1 ч.

Выводы

В ходе проведенного исследования подобран оптимальный фермент, позволяющий специфично и эффективно удалять Fc-часть молекулы гибридного белка.

Установлено, что продукт IdeS-гидролиза ЭПО-

Fc – димерный фрагмент ЭПО, конъюгированный с шарнирной областью IgG человека – (ЭПО-шарнир)₂, обладает уникальным изоэлектрическим профилем при анализе методом IEF-PAGE, не сопоставимым ни с одним из изопротипов известных ЭСА и эндогенного ЭПО, что может использоваться в современном допинг-контроле для его идентификации.

При анализе гидролизованного ЭПО-Fc существующими методами SDS/SAR-PAGE показано, что молекула гибридного белка теряет часть молекулярной массы, вследствие чего белковая полоса продукта гидролиза, фрагмента ЭПО-шарнир, смещается в область между белковыми полосами препаратов α-, β-рЭПО и Аранесп и ее положение также является уникальным, что может быть использовано в качестве дополнительного доказательства присутствия Fc-гибридов в образцах сыворотки крови.

Также в результате проведенной работы подобраны оптимальные условия гидролиза гибридного белка в образцах сыворотки крови после стадии иммуноаффинной очистки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства спорта Российской Федерации в рамках государственного контракта № 295 от 21.06.2016 г. «Разработка методики определения стимулятора эритропоэза следующего поколения ЭПО-Fc в крови».

Список литературы:

1. Bitonti A.J., Dumont J.A., Low S.C., Peters R.T., Kropp K.E., Palombella V. J., Stattel J. M., Lu Y., Tan C.A., Song J.J., Garcia A.M., Simister N.E., Spiekermann G.M., Lencer W.I., Blumberg R.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. Is. 26. P. 9763–9768.

References:

1. Bitonti A.J., Dumont J.A., Low S.C., Peters R.T., Kropp K.E., Palombella V. J., Stattel J. M., Lu Y., Tan C.A., Song J.J., Garcia A.M., Simister N.E., Spiekermann G.M., Lencer W.I., Blumberg R.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. Is. 26. P. 9763–9768.

2. Патент 7250493 США, B2 / патентообладатель L.H.K. Sun, B.N.C. Sun, C.R.Y. Sun; заявл. 17.12.2004; опубл. 31.07.2007.
3. Патент 20050202538 США, A1 / S. Gillies, J. Way, K.M. Lo; патентообладатель Merck Patent GmbH; заявл. 30.12.2004; опубл. 15.09.2005.
4. Патент 8431132 США, B2 / H. Wang, D.U. Yong, R. Zhang, J. Hu, L. Liu; патентообладатель Novagen Holding Corporation; опубл. 30.04.2013.
5. Запрещенный список ВАДА 2016 года [Электронный ресурс] – Режим доступа: [http://www.rusada.ru/sites/default/files/content/files/Запрещенный%20список%202016%20года\(1\).pdf](http://www.rusada.ru/sites/default/files/content/files/Запрещенный%20список%202016%20года(1).pdf). (дата обращения 16.08.2016).
6. Postnikov P.V., Krotov G.I., Efimova Yu.A., Rodchenkov G.M. // Russ. Chem. Rev. 2016. V. 85. № 2. P. 99–114. DOI: 10.1070/RCR4563.
7. Reichel C., Kulovics R., Jordan V., Watzinger M., Geisendorfer T. // Drug Test. Anal. 2009. V. 1. Is. 1. P. 43–50.
8. Reichel C., Abzieher F., Geisendorfer T. // Drug Test. Anal. 2009. V. 1. P. 494–504.
9. Технический документ ВАДА [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-TD2014EPO-v1-Harmonization-of-Analysis-and-Reporting-of-ESAs-by-Electrophoretic-Techniques-EN.pdf> (Дата обращения 11.06.2016).
10. Reichel C., Thevis M. // Drug Test. Anal. 2012. V. 4. Is. 11. P. 818–829.
11. Postnikov P., Krotov G., Mesonzhnik N., Efimova Y., Rodchenkov G. // Drug Test. Anal. 2015. V. 7. № 11-12. P. 999–1008.
12. Reichel C. // Drug Test. Anal. 2014. V. 2. P. 603–619.
13. Promega Corporation. IdeS protease protocol. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/n/ides%20protease%20protocol.pdf> (дата обращения 18.05.2016)
14. Reichel C., Abzieher F., Geisendorfer T. // Drug Test. Anal. 2009. V. 1. P. 494–504.
15. Reichel C., Kulovics R., Jordan V., Watzinger M., Geisendorfer T. // Drug Test. Anal. 2009. V. 1. № 1. P. 43–50.
16. Dunn M.J. Electrophoresis / Editor M.J. Dunn. Wiley-VCH, Weinheim, 1986. P. 687.
17. Lasne F. // J. Immunol. Methods. 2003. V. 276. № 1–2. P. 223–226.
18. МАИА Diagnostics EPO Purification kit. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://maiadiagnostics.com/products/epo_purification_kit/ (дата обращения 15.02.2016)
19. Lönnberg M., Dehnes Y., Drevin M., Garle M.,
2. Patent 7250493 USA, B2 / patent holder L.H.K. Sun, B.N.C. Sun, C.R.Y. Sun; appl. 17.12.2004; publ. 31.07.2007.
3. Patent 20050202538 USA, A1 / S. Gillies, J. Way, K.M. Lo; patent holder Merck Patent GmbH; appl. 30.12.2004; publ. 15.09.2005.
4. Patent 8431132 USA, B2 / H. Wang, D.U. Yong, R. Zhang, J. Hu, L. Liu; patent holder Novagen Holding Corporation; publ. 30.04.2013.
5. Zapreshchennyi spisok WADA 2016 goda [The Prohibit List of WADA 2016] [Electronic resource] – Access mode: [http://www.rusada.ru/sites/default/files/content/files/Запрещенный%20список%202016%20года\(1\).pdf](http://www.rusada.ru/sites/default/files/content/files/Запрещенный%20список%202016%20года(1).pdf). (16.08.2016).
6. Postnikov P.V., Krotov G.I., Efimova Yu.A., Rodchenkov G.M. // Russ. Chem. Rev. 2016. V. 85. № 2. P. 99–114. DOI: 10.1070/RCR4563.
7. Reichel C., Kulovics R., Jordan V., Watzinger M., Geisendorfer T. // Drug Test. Anal. 2009. V. 1. Is. 1. P. 43–50.
8. Reichel C., Abzieher F., Geisendorfer T. // Drug Test. Anal. 2009. V. 1. P. 494–504.
9. Tekhnicheskyyi document WADA [Technical Document of WADA] [Electronic resource]. — Access mode: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-TD2014EPO-v1-Harmonization-of-Analysis-and-Reporting-of-ESAs-by-Electrophoretic-Techniques-EN.pdf> (Access date 11.06.2016).
10. Reichel C., Thevis M. // Drug Test. Anal. 2012. V. 4. Is. 11. P. 818–829.
11. Postnikov P., Krotov G., Mesonzhnik N., Efimova Y., Rodchenkov G. // Drug Test. Anal. 2015. V. 7. № 11-12. P. 999–1008.
12. Reichel C. // Drug Test. Anal. 2014. V. 2. P. 603–619.
13. Promega Corporation. IdeS protease protocol. [Electronic resource]. Access mode: <http://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/n/ides%20protease%20protocol.pdf> (Access date 18.05.2016)
14. Reichel C., Abzieher F., Geisendorfer T. // Drug Test. Anal. 2009. V. 1. P. 494–504.
15. Reichel C., Kulovics R., Jordan V., Watzinger M., Geisendorfer T. // Drug Test. Anal. 2009. V. 1. № 1. P. 43–50.
16. Dunn M.J. Electrophoresis / Editor M.J. Dunn. Wiley-VCH, Weinheim, 1986. P. 687.
17. Lasne F. // J. Immunol. Methods. 2003. V. 276. № 1–2. P. 223–226.
18. МАИА Diagnostics EPO Purification kit. [Electronic resource]. Access mode: http://maiadiagnostics.com/products/epo_purification_kit/ (Access date 15.02.2016)

- Lamon S., Leuenberger N., Quach T., Carlsson J. // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. № 45. P. 7031–7037.
20. Collin M., Olsen A. // EMBO J. 2001. V. 20. № 12 P. 3046–3055.
21. Collin M., Olsen A. // Infect. Immun. 2001. V. 69. № 11. P. 7187–7189.
22. Zhang Z., Perrault R., Zhao Y., Ping J. // J. Chromatogr. B. 2016. V. 1020. P. 148–157.
23. Wang A. C., Wang I. Y. // Immunochemistry. 1976. V. 14. P. 197–200.
24. An Y., Zhang Y., Mueller H.-M., Shameem M., Chen X. // MAbs. 2014. V. 6. № 4. P. 879–893.
25. von Pawel-Rammingen U., Johansson B.P., Björck L. // EMBO J. 2002. V. 21. № 7. P. 1607–1615.
26. Chevreux G., Tilly N., Bihoreau N. // Anal. Biochem. 2011. V. 415. P. 212–214.
27. Wenig K., Chatwell L., von Pawel-Rammingen U., Björck L., Huber R., Sonderrmann P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 17371–17376.
28. Wagner-Rousset E., Janin-Bussat M.-C., Colas O., Excoffier M., Ayoub D., Haeuw J.-F., Rilatt I., Perez M. // MAbs. 2014. V. 6. P. 1–12.
29. Elliott S.D. // J. Exp. Med. 1945. V.81. № 6. P. 573–592.
30. Burton D.R. // Mol. Immunol. 1985. V. 22. P. 161–206.
31. Adamczyk M., Gebler J.C., Wu J. // J. Immunol. Methods. 2000. V. 237. P. 95–104.
32. Jefferis R. // Expert Opin. Biol. Ther. 2007. V. 7. № 9. P. 1401–1413.
33. Goetze A.M., Zhang Z., Liu L., Jacobsen F.W., Flynn G.C. // Mol. Immunol. 2011. V. 49. P. 338–352.
34. Goetze A.M., Liu L., Arroll T., Chu L., Flynn G.C. // Glycobiology. 2012. V. 22. P. 221–234.
35. Strand J., Huang C.-T., Xu J. // J. Pharm. Sci. 2013. V. 102. P. 441–453.
36. Lynaugh H., Li H., Gong B. // MAbs. 2013. V. 5. P. 641–645.
37. Bajla I., Holländer I., Minichmayer M., Gmeiner G., Reichel C. // Comput. Meth. Programs Biomed. 2005. V. 80. P. 246–270.
19. Lönnberg M., Dehnes Y., Drevin M., Garle M., Lamon S., Leuenberger N., Quach T., Carlsson J. // J. Chromatogr. A. 2010. V. 1217. № 45. P. 7031–7037.
20. Collin M., Olsen A. // EMBO J. 2001. V. 20. № 12 P. 3046–3055.
21. Collin M., Olsen A. // Infect. Immun. 2001. V. 69. № 11. P. 7187–7189.
22. Zhang Z., Perrault R., Zhao Y., Ping J. // J. Chromatogr. B. 2016. V. 1020. P. 148–157.
23. Wang A. C., Wang I. Y. // Immunochemistry. 1976. V. 14. P. 197–200.
24. An Y., Zhang Y., Mueller H.-M., Shameem M., Chen X. // MAbs. 2014. V. 6. № 4. P. 879–893.
25. von Pawel-Rammingen U., Johansson B.P., Björck L. // EMBO J. 2002. V. 21. № 7. P. 1607–1615.
26. Chevreux G., Tilly N., Bihoreau N. // Anal. Biochem. 2011. V. 415. P. 212–214.
27. Wenig K., Chatwell L., von Pawel-Rammingen U., Björck L., Huber R., Sonderrmann P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 17371–17376.
28. Wagner-Rousset E., Janin-Bussat M.-C., Colas O., Excoffier M., Ayoub D., Haeuw J.-F., Rilatt I., Perez M. // MAbs. 2014. V. 6. P. 1–12.
29. Elliott S.D. // J. Exp. Med. 1945. V.81. № 6. P. 573–592.
30. Burton D.R. // Mol. Immunol. 1985. V. 22. P. 161–206.
31. Adamczyk M., Gebler J.C., Wu J. // J. Immunol. Methods. 2000. V. 237. P. 95–104.
32. Jefferis R. // Expert Opin. Biol. Ther. 2007. V. 7. № 9. P. 1401–1413.
33. Goetze A.M., Zhang Z., Liu L., Jacobsen F.W., Flynn G.C. // Mol. Immunol. 2011. V. 49. P. 338–352.
34. Goetze A.M., Liu L., Arroll T., Chu L., Flynn G.C. // Glycobiology. 2012. V. 22. P. 221–234.
35. Strand J., Huang C.-T., Xu J. // J. Pharm. Sci. 2013. V. 102. P. 441–453.
36. Lynaugh H., Li H., Gong B. // MAbs. 2013. V. 5. P. 641–645.
37. Bajla I., Holländer I., Minichmayer M., Gmeiner G., Reichel C. // Comput. Meth. Programs Biomed. 2005. V. 80. P. 246–270.