

ные концентрации конъюгата вальнемулина с флуоресцентной меткой для связывания с анти-телами, было изучено оптимальное время для регистрации аналитического сигнала, изучена перекрестная активность с другими антибиотиками. Было показано, что наиболее высокая чувствительность тест-системы наблюдалась при использовании конъюгата вальнемулин-ДТАФ. Для анализа реальных образцов были рассмотрены различные подходы извлечения вальнемулина из пробы: варьировались растворители, время экстракции и фактор разведения. Раствор ацетонитрила был выбран в качестве экстрагирующего агента.

Список литературы

1. Novak R, Shlaes D. M. // *Curr Opin Investig Drugs.*, 2010. – V. 11. – № 2. – P. 182–191.
2. *Технический регламент таможенного союза ТР ТС 034/2013 «О безопасности мяса и мясной продукции»*. Утвержден Решением Комиссии Таможенного союза от 9 октября 2013 г. – № 68.
3. Zhang H., Mi T., Khan O. Yu., Sheng Y., Eremin S. A., Beier R.C., Zhang S., Shen J., Wang Z. // *Anal Bioanal Chem.*, 2015. – V. 407. – P. 7843–7848.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ НЕФРАКЦИОНИРОВАННОГО ГЕПАРИНА МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

И. Д. Угрюмова, Е. И. Сметанина

Научный руководитель – к.т.н., доцент ОХИ Е. И. Сметанина

Национальный исследовательский Томский политехнический университет
634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина 30, idu1@tpu.ru

Гепарин – это кислый серосодержащий гликозаминогликан, состоящий из сложных линейных полисахаридов, который применяется при лечении тромбоэмболических заболеваний. Наибольшей антикоагулянтной активностью обладают гепарины низкой молекулярной массы (НМГ) от 2000 до 8000 Да.

НМГ получают из нефракционированных гепаринов (НФГ), представляющих собой смесь мукополисахаридов с молекулярной массой от 2 до 30 кДа, путем химической или ферментативной деполимеризации. Деполимеризацию также используют для разделения и идентификации гепаринов [1].

В данной работе была поставлена цель: определить структурные различия гепаринов с помощью процесса химической деполимеризации.

Таким образом, была разработана методика определения вальнемулина на основе метода ПФИА. Линейный диапазон определяемых концентраций вальнемулина составил 1,5–50 нг/мл, а предел его обнаружения равен 1,2 нг/мл. Время проведения анализа составило 1 час с учетом пробоподготовки. Разработанная методика была апробирована на реальных образцах свинины. Степень извлечения вальнемулина варьировались от 80 до 110 %. Методика позволяет выявлять остаточные количества вальнемулина в концентрациях согласно установленным нормам, и может стать основой для производства отечественных тест-систем.

В качестве объекта исследования был использован НФГ, полученный методом ферментативного гидролиза мукозы и стандартный гепарин Sigma-Aldrich, молекулярный вес которого составляет 5 кДа. Образцы гепаринов подвергали окислительной деполимеризации концентрированным раствором (37 % мас.) пероксида водорода при температуре 70 °С в течение 120 минут. В процессе окисления пероксидом водорода генерируются кислородные радикалы, которые затем окисляют чувствительные к кислороду сахаридные остатки в полимере гепарина, модифицируя их до углеродных фрагментов [2].

Определение продуктов деполимеризации проводили с использованием метода капиллярного электрофореза, обладающего высокой степенью разделения, малым объемом проб, быстротой и низкой себестоимостью анализа.

Условия анализа на приборе «Капель-105М»: немодифицированный кварцевый капилляр с внутренним диаметром 75 мкм; фосфатный электролит с рН 3,5 и концентрацией 25 мМ; приложенное напряжение – 20 кВ при длине волны 192 нм, гидродинамический ввод пробы под давлением 50 мбар в течение 10 с.

Для определения структурного сходства между НФГ и стандартным гепарином проводили сравнение электрофореграмм (ЭФГ) продуктов окислительной деполимеризации гепаринов.

На полученных ЭФГ (Рис. 1) пик 1 соответствует ионам хлора, а пик 2 свидетельствует о наличии гепарина.

На рисунке 2 представлены результаты сравнения ЭФГ продуктов окислительной деполимеризации НФГ и стандартного гепарина. Нефракционированный гепарин разложился практически полностью, в отличие от стандартного. Различия в электрофоретических профилях свидетельствуют о большей устойчивости стандартного гепарина к действию окислителя

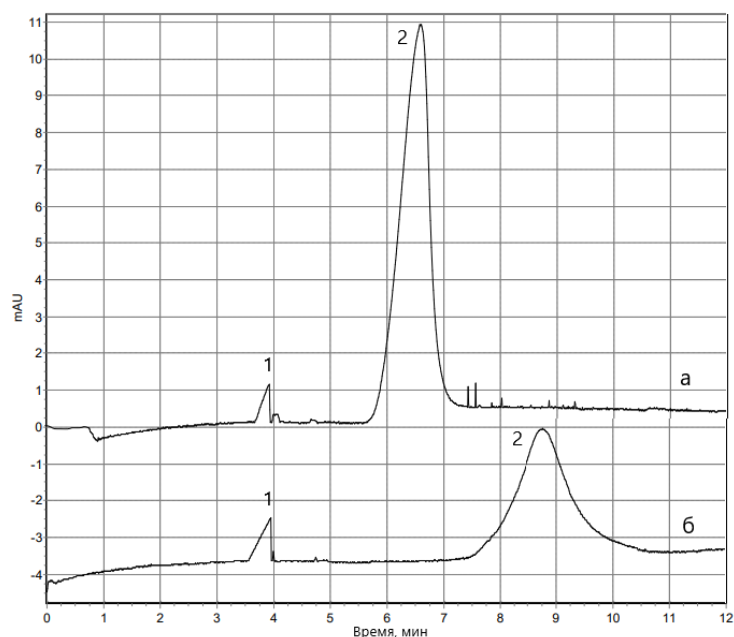


Рис. 1. ЭФГ стандартного гепарина (а) и НФГ (б), $C = 8,96$ г/л

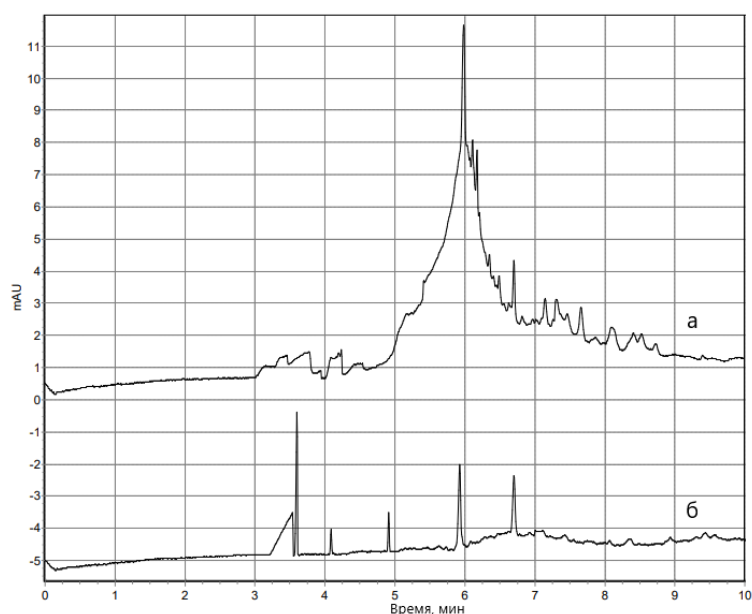


Рис. 2. ЭФГ продуктов деполимеризации стандартного гепарина (а) и исследуемого НФГ (б), полученных при нагревании с пероксидом водорода в течение 2 часов, $C = 8,96$ г/л

вероятно за счет меньшего количества участков, чувствительных к кислородным радикалам.

Таким образом, метод деполимеризации в сочетании с капиллярным электрофорезом по-

зволяет выявить различия в составе и структуре гепаринов с разным молекулярным весом, разделять продукты деполимеризации и определять стабильность НМГ и НФГ.

Список литературы

1. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2012. – 304 с.
2. Rahul P. P. Enoxaparin: Physicochemical Investigations into the Effects of Freezing and Heating. B. Pharm, 2007. – 167 p.

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧНОСТИ И ПРОЦЕССИНГА ТАРГЕТНОГО АГЕНТА НА ОСНОВЕ ^{99m}Tc И ВАРИАНТА DARPin G3 НА ОПУХОЛЕВЫХ КУЛЬТУРАХ IN VITRO

А. С. Фоминых, Ф. Ш. Юлдашева

Научный руководитель – к.х.н., доцент ИШХБМТ ТПУ Е. В. Плотников

Национальный исследовательский Томский политехнический университет
634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина 30, tpu@tpu.ru

Рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа HER2 играет критическую роль в качестве ведущего онкопротеина при многих злокачественных новообразованиях, который сверхэкспрессируется во многих случаях рака молочной железы, яичников и других видов. Рекombинантные таргетные молекулы неиммунноглобулиновой природы с анкириновыми повторами DARPins имеют пикомолярную аффинность к HER2, тогда как наиболее доступным методом радионуклидной диагностики являются методы с использованием технеция- 99m [1].

Целью данной работы являлась оценка специфичности и процессинга таргетного агента на основе ^{99m}Tc и варианта DARPin G3 с хелатной группой триглицид-серил-цистеин ($((\text{G}_3\text{S})_3\text{C})$) на опухолевых культурах линий SKOV-3, SK-BR-3, PC-3.

Клеточные линии SKOV-3, SK-BR-3 и PC-3 выращивали на среде RPMI-1640 с добавлением антибиотиков, глутамина и эмбриональной бычьей сыворотки. Линии инкубировали при 37 °C в атмосфере CO_2 (5 %). Для оценки специфичности связывания с рецептором клетки засеивали в 6-луночные планшеты плотностью $6 \cdot 10^5$ клеток на лунку за 24 ч до эксперимента. Для блокирования HER2 в контрольных группах клеток (в трех лунках) использовали немеченный технецием- 99m белок DARPin-G₃-(G₃S)₃C (500 мкл), в остальные лунки добавляли меченный технецием- 99m DARPin-G₃-(G₃S)₃C до достижения концентрации 1 нМ в каждой лунке.

Клеточный процессинг и интернализацию оценивали на клетках линии SKOV-3. Клетки (3 чашки Петри на точку, 10^6 клеток на чашку) непрерывно инкубировали с 1 нМ белка, меченного ^{99m}Tc , при 37 °C.

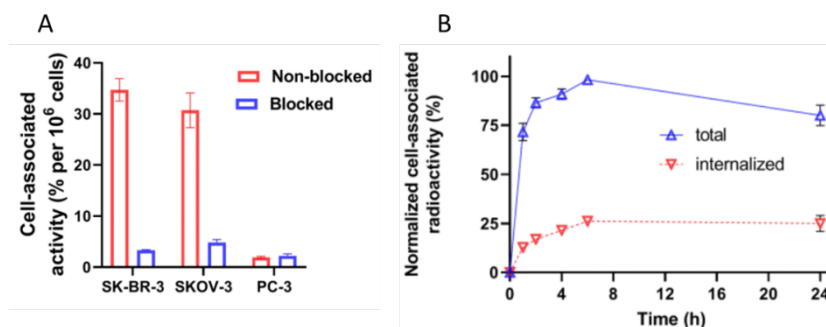


Рис. 1. Результаты оценки специфичности связывания на клеточных линиях SKOV-3, SK-BR-3, PC-3 (A) и интернализации на клеточной линии SKOV-3 (B)