

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО  
ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**  
**DEVELOPMENT OF THE HUMAN RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN PURIFICATION  
METHOD FROM MEDICAMENTS**

**В. Г. Вододохов<sup>1</sup>, А. М. Шингель<sup>2</sup>, Д. В. Бабарико<sup>1</sup>,  
В. Э. Сяхович<sup>1, 2</sup>, С. А. Беляев<sup>2</sup>**  
**U. Vadadokhau<sup>1</sup>, A. Shynhel<sup>2</sup>, D. Babaryko<sup>1</sup>, V. Syakhovich<sup>1, 2</sup>, S. Beliaev<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,  
г. Минск, Республика Беларусь  
info@iseu.by*

*<sup>2</sup>Учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория»,  
аг. Лесной, Республика Беларусь*

*<sup>1</sup>Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

*<sup>2</sup>National anti-doping laboratory, Lesnoy, Republic of Belarus*

Эритропоэтин представляет собой гормон гликопротеидной природы, который стимулирует пролиферацию эритроцитов из прогениторных клеток. В настоящее время генно-инженерный эритропоэтин является активным компонентом многих лекарственных препаратах. В связи с этим контроль качества препаратов эритропоэтина является насущной проблемой. В данной работе была разработана методика очистки эритропоэтина от сывороточного альбумина человека с использованием ионно-обменной хроматографии с последующим контролем степени очистки методом ВЭЖХ. В результате была получена фракция эритропоэтина с выходом белка более 90 %. Данная методика позволяет получить очищенную фракцию эритропоэтина с целью контроля качества лекарственных препаратов, а также для разработки методов детекции генно-инженерного эритропоэтина в биологических образцах.

Erythropoietin is a glycoprotein that stimulates proliferation of erythrocytes from progenitor cells. Today human recombinant erythropoietin is found in many medications. Thereby, quality control of erythropoietin drugs is an urgent problem. In this study erythropoietin purification from human serum albumin by ion-exchange chromatography was developed. Purity of received erythropoietin fraction was verified by HPLC. As a result, erythropoietin fraction was received. Yield of protein was more than 90 %. This method allows to get purified fraction of erythropoietin for drug quality control as well as for development of methods of human recombinant erythropoietin detection in biological samples.

**Ключевые слова:** генно-инженерный эритропоэтин, ионно-обменная хроматография, высокоеффективная жидкостная хроматография.

**Keywords:** human recombinant erythropoietin, ion-exchange chromatography, high performance liquid chromatography.

В настоящее время существует большое количество лекарственных препаратов, содержащих генно-инженерный эритропоэтин и используемых при лечении различных гемолитических и онкологических заболеваний, ВИЧ-инфекций, а также при послеоперационной терапии. В связи с этим контроль качества биоаналогов эритропоэтина человека является насущной проблемой. Наличие в лекарственных препаратах белковых примесей, является препятствующим фактором при проведении ряда испытаний. В частности, концентрация сывороточного альбумина человека может на один-два порядка превышать концентрацию основного соединения. Таким образом, необходимой становится разработка методов очистки генно-инженерного эритропоэтина человека от сопутствующих веществ белковой природы в лекарственных препаратах.

Цель данной работы – разработка эффективного метода выделения генно-инженерного эритропоэтина человека из лекарственных препаратов с использованием ионообменной хроматографии.

В качестве образца использовали лекарственный препарат, содержащий рекомбинантный эритропоэтин а и человеческий сывороточный альбумин.

Перед хроматографической очисткой эритропоэтина проводили диализ лекарственного препарата в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 0,02 % Tween 20.

Очистку эритропоэтина осуществляли методом ионообменной хроматографии на колонке XK 26/100 «GE Healthcare» (США), предварительно заполненной ионно-обменной смолой Q-Sepharose Fast Flow «GE Healthcare» (США) с использованием хроматографической системы низкого и среднего давления NGC Discover «Bio-Rad» (США). Колонка была предварительно уравновешена 20 мМ Tris-HCl буфером (pH 8,0). Элюция эритропоэтина производилась градиентом 1 М NaCl в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0) при скорости потока 10 мл/мин. Фракции

эритропоэтина, полученные при выделении, соединяли, концентрировали ультрафильтрацией, замораживали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . На рисунке изображена хроматограмма, полученная при выделении эритропоэтина из лекарственного препарата.

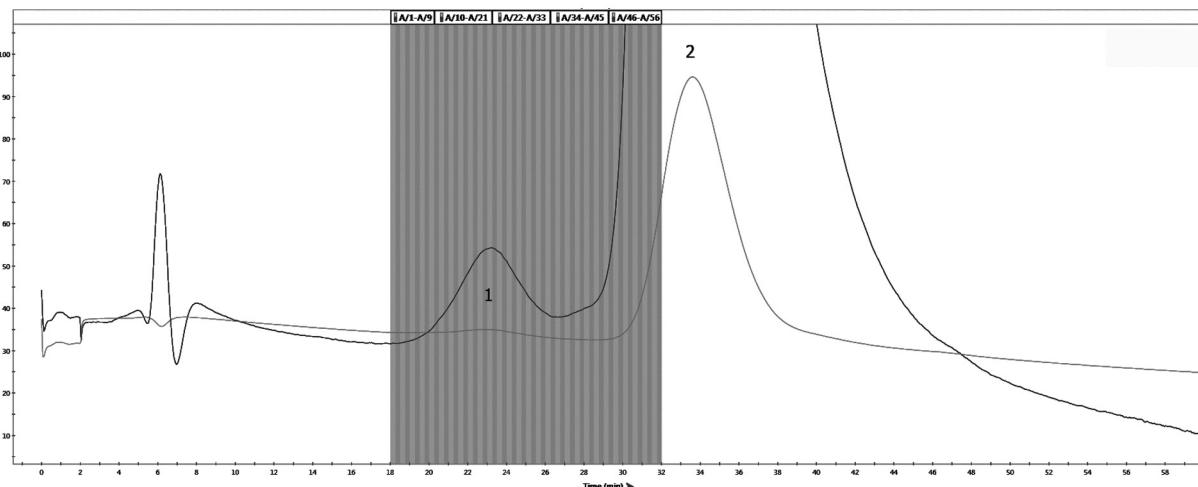


Рисунок – Хроматограмма выделения эритропоэтина из лекарственного препарата. Пик 1 – эритропоэтин человека, пик 2 – человеческий сывороточный альбумин

Контроль чистоты эритропоэтина проводили методом ВЭЖХ на сверхвысокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity LC System (Agilent Technologies, Inc., США) с использованием обращенно-фазной колонки BioBasic C8 2,1×150 мм «Thermo» (США). Детекция соединений осуществлялась с помощью диодноматричного (DAD) детектора на длинах волн 214 и 280 нм.

В настоящей работе с использованием ионообменной хроматографии был разработан метод выделения эритропоэтина из лекарственного препарата, который содержит в качестве вспомогательного вещества значительное количество альбумина. Данный метод позволяет получить фракцию эритропоэтина из лекарственных препаратов с целью контроля его качества, а также может быть использован для дальнейших разработок подходов детекции генно-инженерного эритропоэтина в биологических образцах.

## МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧНОГО И РЕГУЛЯТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ЦИНКА НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

## MECHANISMS OF THE TOXIC AND REGULATORY ACTION OF ZINC IONS ON HUMAN ERYTHROCYTES

Ю. М. Гармаза

Y. Harmaza

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларусь»

г. Минск, Республика Беларусь

garmaza@yandex.ru

Institute of biophysics and cell engineering of National academy of sciences of Belarus,

Minsk, Republic of Belarus

Изучены механизмы действия ионов цинка в физиологических, фармакологических и токсичных концентрациях на функционирование эритроцитов человека (редокс-баланс, жизнеспособность, перераспределение фосфатидилсерина в липидном бислое). Продемонстрирована связь цинкового гомеостаза с индукцией программируемой гибели эритроцитов и выявлено участие внутриклеточного лабильного пула  $\text{Zn}^{2+}$  в формировании защитных механизмов клеток при окислительном стрессе в норме и при развитии сахарного диабета II типа.

The mechanisms of zinc ions action in physiological, pharmacological and toxic concentrations on human erythrocytes functioning (redox-balance, viability, phosphatidylserine redistribution in lipid bilayer) were studied. The relationship of zinc homeostasis with the programmed erythrocytes death induction was demonstrated and the role of the intracellular labile zinc pool  $\text{Zn}^{2+}$  in the formation of protective mechanisms of cells under oxidative stress in the norm and under the development of diabetes mellitus type II was revealed.

**Ключевые слова:** ионы цинка, эритроциты человека, эритротоз, сахарный диабет, лабильный пул цинка, жизнеспособность клеток, окислительный стресс, металлотионеины.