

Смелянская М. В.,

*кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник,
ведущий научный сотрудник лаборатории иммунореабилитологии
ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И. И. Мечникова
Национальной академии медицинских наук Украины»*

Кашпур Н. В.,

*кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории иммунореабилитологии
ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И. И. Мечникова
Национальной академии медицинских наук Украины»*

Перемот С. Д.,

*кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник,
ведущий научный сотрудник лаборатории иммунореабилитологии
ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И. И. Мечникова
Национальной академии медицинских наук Украины»*

Волянский А. Ю.,

*доктор медицинских наук,
заведующий лабораторией иммунореабилитологии
ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И. И. Мечникова
Национальной академии медицинских наук Украины»*

ПРИМЕНЕНИЕ БИОАНАЛИЗАТОРА AGILENT 2100 ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ВАКЦИН

Аннотация. Авторами предложен метод определения процента включения вирусного белка в липосомы с помощью биоанализатора Agilent 2100. Он позволяет быстро и с достаточно высоким разрешением разделять белки, а также автоматически проводит анализ полученных данных, фиксируя наличие различных белков и определяя их размер и концентрацию.

Ключевые слова: липосомальные вакцины, белки, биоанализатор Agilent 2100.

Постановка проблемы. К сожалению, в обеспечении эпидемического благополучия населения Украина не может опираться на собственное производство иммунобиологических препаратов [4]. Большая часть вакцинных препаратов импортируется из России (около 90%) и других стран Европы. Поэтому проблема разработки отечественного производства вакцин стоит очень остро и актуально [2]. На сегодня липосомальные формы лекарств заняли определенную нишу в клинической практике и вскоре будут широко востребованы на фармацевтическом рынке [3].

По мнению Марка Дж. Остро, вице-президента Liposome Company (USA) – лидера в развитии липосомной технологии, в ближайшее время найдут свое применение не менее 15 новых курсов терапии, основанных на липосомной технологии. По оценке американских специалистов продажа липосом на мировом рынке составит 20-25% средств доставки лекарственных препаратов [6]. Ведущие позиции в исследованиях и разработках липосомальных форм введения лекарственных средств принадлежат трем американским компаниям: The Liposome Company (TLC), Liposome Technology Inc. (LTI), Vestar. Благодаря их исследованиям на рынок уже введены липосомальный амфо-

терицин В (TLC) для лечения системных микозов, противоопухолевые липосомальные препараты даунорубицин (Vestar), доксорубицин (TLC – Dox 99), цисплатин (TLC). Завершающие стадии клинических испытаний проходят такие препараты, как липосомальные вакцины против гриппа и меланомы, противодиабетический комплекс инсулин-липосомы, противовирусные нуклеозиды для лечения СПИДа, серия липосомальных бронхорасширяющих препаратов и др. [7].

Разумеется, создателям липосомальных препаратов предстоят дальнейшие исследования в данной области. Необходимо совершенствовать технологию производства липосомальных препаратов, добиваться большей стабильности готовых лекарственных форм, удешевлять производство.

Анализ последних исследований и публикаций по данной теме. В настоящее время разработаны различные методы получения липосом: ручное встряхивание, выпаривание в обращенной фазе, озвучивание, этанольная инъекция, экструзия, спонтанная везикуляция липидов, микрофлюидизация, сушка распылением, замораживание-оттаивание, гомогенизация при высоком давлении, диализ [2]. Липосомы, полученные разными методами, имеют различные размеры. Так, в результате использования способа ручного встряхивания образуются наиболее крупные липосомы – от 250 до 1900 нм. Однородные по размеру и достаточно мелкие (от 8 до 15 нм) липосомы, обработанные ультразвуком. При использовании метода выпаривания в обращенной фазе удается инкапсулировать до 80% гидрофильных веществ и обеспечить включение во внутренний объем липосом значительного количества воды, а также максимально избежать загрязнения липид-

ных везикул посторонней микрофлорой. Везикулы, полученные таким методом, гетерогенные по размеру: 150 – 950 нм [3].

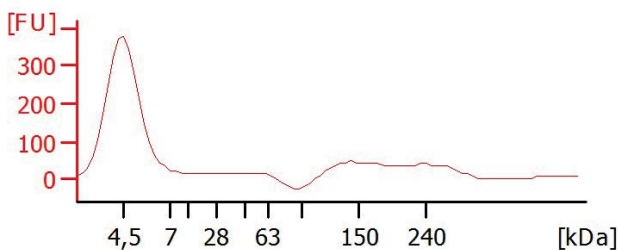
Определение процента включения белка в липосомы обычно проводят методом спектрофотометрии [1] при длине волны 260 нм и 280 нм. Разделение липосом с лизатом от невключившихся белков обычно проводят ультрацентрифугированием при 50 тыс. об/мин. в течение 15 мин. Супернатант, содержащий не включившийся антиген, декантируют, а осадок липосом ресуспенсируют в физиологическом растворе NaCl 0,9% и снова подвергают центрифугированию. Процесс промывания липосом повторяют до удаления остаточного количества белка в супернатанте, содержание которого необходимо контролировать на спектрофотометре. После последнего центрифугирования осадок липосом опять суспендируют в требуемом объеме физиологического раствора NaCl 0,9%, после чего разрушают 5% раствором Тритона X-100. После этого эффективность включения белка (В, %) рассчитывают по формуле: $V = C(100\%) / C_{исх}$, где С – концентрация белка, определенная после разрушения липосом; $C_{исх}$ – концентрация белка при включении в липосомы.

Формулирование цели статьи. Нами предложен метод определения процента включения белка в липосомы с помощью биоанализатора Agilent 2100.

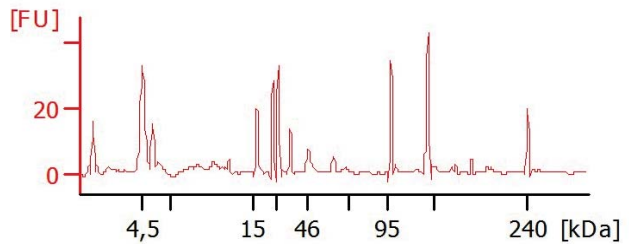
Изложение основного материала исследования. Электрофоретическое разделение белков с помощью биоанализатора происходит в специальных пластиковых чипах в системе капилляров, которые при подготовке чипа заполняются гелеобразующим раствором через соответствующие ячейки. Данный раствор содержит флуоресцентный краситель, который связывается с белками до застывания геля, что необходимо для последующей детекции. В каждую из двенадцати рабочих ячеек, кроме пробы, добавляется внутренний маркер – белки минимального и максимального размера (в случае использованного нами набора реактивов Protein 230 это белки от 4,5 до 240 kD). Это позволяет сравнивать результаты разделения в разных капиллярах. В отдельную ячейку добавляется внешний маркер – смесь белков различной массы, позволяющий определять массу белков в пробах. При работе прибора по очереди происходит электрофоретическое разделение фрагментов в каждом капилляре, начиная с внешнего маркера. Легкие белки быстрее проходят через капилляр и, соответственно, первыми проходят мимо детектора. При этом детектор фиксирует повышение уровня флуоресценции, что отображается в виде пика на электрофореграмме [5; 8].

В своей работе мы исследовали с помощью биоанализатора Agilent 2100 белковый состав опытных липосомальных гриппозных вакцин, полученных различными методами (рис. 1):

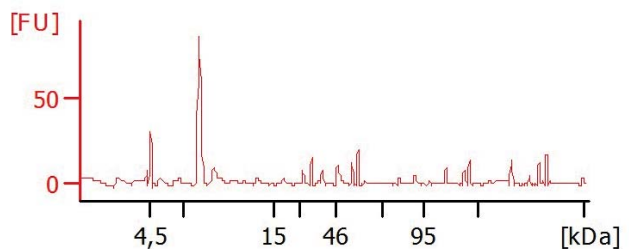
а) пустые липосомы



б) смесь вирусных белков



в) вирусные белки после включения в липосомы стандартным методом



г) вирусные белки, включенные в липосомы предложенным методом

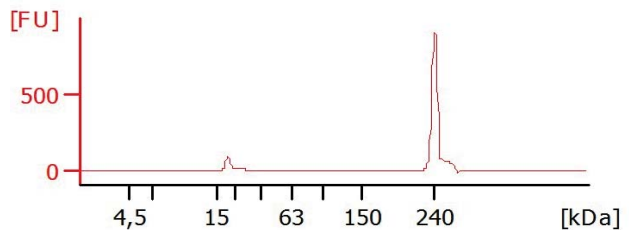


Рис. 1. Электрофореграммы опытных липосомальных гриппозных вакцин

Как видно на рисунке, с помощью прибора Agilent 2100 возможно контролировать процент включения вирусных белков (б) в липосомы (а), полученные различными методами: (в) – частичное включение белков в липосомы; (г) – полное включение белков в липосомы, отмечены только системные пики.

Время появления пика определяется массой белка, а высота пика зависит от концентрации данного белка в пробе. Одновременно на основе полученных электрофореграмм создается изображение, имитирующее электрофорез белков в агарозном или полиакриламидном геле (рис. 2). Таким образом, прибор позволяет получить электрофореграммы для каждого образца; изображение, имитирующее разделение в геле; а также таблицу, в которой приведены размер, массовая и молярная концентрации

для каждого из фиксируемых фрагментов. Использование внутренних маркеров позволяет легко сопоставлять результаты разделения разных проб и точно определять, имеются ли одинаковые белки и в какой концентрации в разных пробах [8]. При разделении же белков в геле с этим могут возникать определенные трудности, связанные с неоднородностью геля, разной напряженностью электрического поля в разных точках и другими факторами.

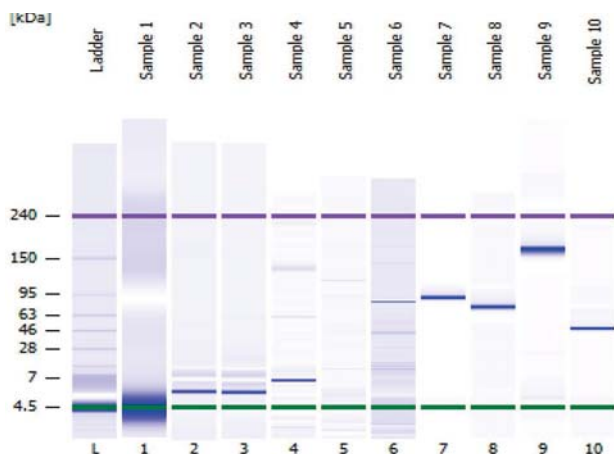


Рис. 2. Электрофореграммы полученных липосомальных гриппозных вакцин

Выводы. Биоанализатор Agilent 2100 является очень удобным инструментом при проведении работ по изучению белкового состава вакцинных препаратов, в том числе и липосомальных. Он позволяет быстро и с достаточно высоким разрешением разделять белки, а также автоматически проводит анализ полученных данных, фиксируя наличие различных белков и определяя их размер и концентрацию. К тому же, программа позволяет сравнивать электрофореграммы для разных образцов путем наложения, а также автоматически рассчитывает размер и концентрацию всех имеющихся белков. Все это в значительной мере облегчает и ускоряет анализ полученных данных. Мы считаем целесообразным использование биоанализатора Agilent 2100 в комплексной оценке качества липосомальных гриппозных вакцин.

Литература:

1. Бектимиров Т.А. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа : Методические указания [Текст] / Т.А. Бектимиров, Н.И. Лонская, Н.А. Агафонова и др. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 32 с.
2. Бажутин Н.Б. Перспективы применения липосомальных препаратов в медицинской практике / Н.Б. Бажутин, В.В. Золин, А.А. Колокольцов, С.Н. Таргонский // Terra Medica. – 2003. – № 3. – С. 4-5.
3. Варпаховская И. Липосомальные формы лекарственных средств // Ремедиум. – 1999. – № 5. – С. 68-70.
4. Лавров В.Ф. Основы иммунологии, эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней [Текст] / В.Ф. Лавров, Е.В. Русакова, А.А. Шапошников и др. – М.: ЗАО «МП Гигиена», 2007. – 311 с.
5. Панкратов В.С. Применение биоанализатора Agilent 2100 в работах по молекулярно-генетической паспортизации биологических объектов [Текст] / В.С. Панкратов, А.Н. Юхимук, В.Л. Філіпеня, Е.В. Спірідович // ISSN 18107834. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2008. – Т. 6, № 2. – С. 269-274.
6. Muggia F. PEGylated liposomes with downorubicine / F. Muggia // From Research to Practice. – 2001. – V. 3, № 1. – P. 1-3.
7. Spooner D., van Treuren R. and de Vicente M.C. Molecular markers for gene bank management // IPGRI technical bulletin. – 2005 – №. 10. – P. 136. Режим доступа: www.agilent.com/chem/labonachip.

Смілянська М. В., Кашпур Н. В., Перемот С. Д., Волянський А. Ю. Застосування біоаналізатора AGILENT 2100 для визначення білкового складу ліпосомальних вакцин

Анотація. Авторами запропонований метод визначення відсотка включення вірусного білка в ліпосоми за допомогою біоаналізатора Agilent 2100. Він дозволяє швидко і з досить високою роздільною здатністю розділяти білки, а також автоматично проводить аналіз отриманих даних, фіксуючи наявність різних білків і визначаючи їх розмір і концентрацію.

Ключові слова: ліпосомальні вакцини, білки, біоаналізатор Agilent 2100.

Smelyanskaya M., Kashpur N., Peremot S., Volyansky A. AGILENT 2100 Bioanalyzer application to determine the protein composition of the liposome vaccine

Summary. The authors propose a method for determining the percent inclusion of viral protein into liposomes using an Agilent 2100. It lets you quickly and with a high enough resolution to share proteins, and automatically analyzes the data obtained by fixing the presence of various proteins and determining their size and concentration.

Key words: liposomal vaccine, proteins, Agilent 2100.