

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-4-400-412-annex1>

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

### Методика получения F(ab')<sub>2</sub> – фрагментов (отрицательный контроль для определения целостности Fc-фрагмента)

F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты молекулы иммуноглобулина представляют собой бивалентный протеолитический фрагмент молекулы IgG, образованный двумя Fab-участками, ковалентно связанными дисульфидными мостиками в шарнирной области.

Настоящая методика описывает получение F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов на основе ферментативного расщепления пепсином в условиях кислого pH с последующей очисткой методом аффинной хроматографии.

#### 1. Реагенты и оборудование

- **Исходный белок:** Иммуноглобулин человека нормальный 10% (основная фракция иммуноглобулина G должна составлять не менее 95% от общего содержания белка).

- **Фермент:** Пепсин из слизистой оболочки желудка свиньи (ЕС 3.4.23.1, например, Sigma-Aldrich (США)).

- **Буферные растворы.**

- Буферный раствор для протеолиза: 20 мМ ацетат натрия (pH 4,2).

- Буферный раствор для остановки реакции: 1,5 М Трис-НСl (pH 8,8).

- Буферные растворы для хроматографии: уравновешивающий буферный раствор (0,02 М фосфатный буферный раствор, 0,15 М NaCl, pH 7,4);

- элюирующий буферный раствор (0,1 М глицин-НСl, pH 2,7).

- Буферный раствор для конечной диафильтрации: 0,01 М фосфатный буферный раствор, pH 7,2–7,4.

- **Хроматографические носители:** Аффинный сорбент nProtein A Sepharose™ 4 Fast Flow (Cytiva, США).

- **Оборудование:** Система для жидкостной хроматографии с термостатируемой камерой АКТА™ PCC (Cytiva, США).

#### 2. Протокол ферментативного расщепления

1. **Подготовка исходного белка иммуноглобулина.** Проводят диафильтрацию с помощью центрифужных концентраторов с номинальной отсекающей молекулярной массой 50 кДа (материал

мембраны – полиэфирсульфон) против 6–7 объемов буферного раствора для протеолиза при температуре +4 °С. Концентрацию белка доводят до 5 мг/мл.

2. **Инкубация с пепсином.** К раствору IgG добавляют пепсин из расчета соотношения 1 мг кристаллического пепсина к 40 мг белка. Реакционную смесь инкубируют при температуре 37 °С в течение 4 ч при постоянном перемешивании.

3. **Остановка протеолиза.** По завершении инкубации расщепление останавливают, доводя pH реакционной смеси до 7,5–8,0 с помощью медленного добавления рассчитанного объема 1,5 М Трис-НСl (pH 8,8), при постоянном перемешивании на ледяной бане.

#### 3. Очистка F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов

Очистку проводят методом аффинной хроматографии на сорбенте nProtein A Sepharose™, специфически связывающем Fc-область IgG. Подготовка и очистка сорбента проводится в соответствии с инструкцией по применению. F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты антител, не обладающие сродством к лиганду, собирают в режиме фильтрации. Нерасщепленные молекулы IgG и Fc-фрагменты, прочно связанные с сорбентом, элюируют впоследствии с помощью 0,1 М глицин-НСl (pH 2,7).

#### 4. Концентрирование и диализ фракций

Фильтрат, содержащий целевые F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, концентрируют с использованием центрифужных концентраторов с номинальной отсекающей молекулярной массой 50 кДа (материал мембраны – полиэфирсульфон). Далее проводят диафильтрацию полученного концентрата против 6–7 объемов 0,01 М фосфатного буферного раствора с pH 7,2–7,4.

#### 5. Анализ полученного продукта

Детекцию продуктов реакции ферментативного гидролиза иммуноглобулина осуществляют помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ проводят на колонке Superdex 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, США), уравновешенной PBS. F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты (молекулярная масса ~100 кДа) элюируются в виде симметричного пика, соответствующего димерной форме, с временем удерживания, отличным от такового для интактного IgG (молекулярная масса ~150 кДа) и продуктов деградации.