

### 2.1.2.39. ПЕПТИДНОЕ КАРТИРОВАНИЕ

*Общая фармакопейная статья соответствует аналогичному тексту, гармонизированному в рамках Фармакопейной дискуссионной группы (PDG). Негармонизированный текст обозначен символами «♦♦».*

#### ВВЕДЕНИЕ

Белки могут существовать в виде больших сложных структур, при этом некоторые молекулы среди них демонстрируют неоднородность аминокислотной последовательности из-за неверной сборки, деградации или посттрансляционных модификаций. Высокая молекулярная масса белков в сочетании с их сложным строением делает химическую идентификацию интактного белкового продукта с помощью одной аналитической методики особенно затруднительной. Испытуемый белок можно расщепить на более мелкие фрагменты, которые могут быть идентифицированы с достаточным для определения аминокислотной последовательности белка разрешением по массе. Этот процесс лежит в основе метода идентификации белка, широко известного как «пептидное картирование». Метод включает в себя этап расщепления, в ходе которого белок селективно расщепляется по амидным связям между определенными аминокислотными остатками с образованием прогнозируемого набора пептидов. Аналитическое хроматографическое разделение, детектирование и идентификация пептидной смеси дает информацию об аминокислотной последовательности белка, которая может быть использована для его идентификации. Пептидное картирование представляет собой сравнительную методику, в ходе которой для определения подлинности сопоставляются результаты для испытуемого белка и аналогично обработанного стандартного образца. Такая сравнительная идентификация подтверждает, что первичная структура испытуемого белка совпадает с первичной структурой белка сравнения.

Способность пептидного картирования выявлять значительные изменения в первичной структуре привела к появлению множества способов его применения для определения качества белков, которые не входят в сферу применения данной общей фармакопейной статьи. Чистота испытуемого белка в отношении неправильного встраивания аминокислот или иного нарушения (например, образования случайных нефункциональных дисульфидных связей (скремблирование дисульфидных связей), посттрансляционных модификаций и деградации) может быть определена с помощью количественной пептидной карты. Сравнение результатов пептидного картирования при масштабировании или изменении процесса производства может способствовать изучению стабильности процесса. Кроме того, пептидное картирование может использоваться для определения степени и конкретного расположения аминокислотных модификаций, таких как гликозилирование и конъюгация (например, степень пэгилирования).

Данная общая фармакопейная статья посвящена использованию пептидного картирования для химической идентификации белка, где специфичность является основной характеристикой аналитической методики.

#### РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПЕПТИДНОГО КАРТИРОВАНИЯ (ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ) – РАССМАТРИВАЕМЫЕ ВОПРОСЫ

Перед разработкой методики пептидного картирования, используемой для подтверждения подлинности, важно понять ее предполагаемое применение и требуемый уровень специфичности, позволяющий отличить испытуемый белок от других продуктов, обрабатываемых на одном и том же объекте. В некоторых случаях для дифференциации образцов структурно родственных белков могут потребоваться ортогональные методы. Каждый белок обладает уникальными характеристиками, которые должны быть изучены

надлежащим образом, чтобы научный подход, используемый при разработке методики пептидного картирования, привел к созданию аналитической методики, которая может быть валидирована с достаточной степенью специфичности. Для выбора условий предварительной обработки и расщепления, обеспечивающих оптимальную для испытания длину пептида, следует оценить аминокислотную последовательность испытуемого белка. В зависимости от области применения важно обеспечить полный или почти полный охват аминокислотной последовательности, так как при разработке аналитической методики может отсутствовать предварительная информация об изменениях, произошедших в белке.

В ходе разработки аналитической методики пептидного картирования следует учитывать следующие моменты (см. также рисунок 2.1.2.39.-1).

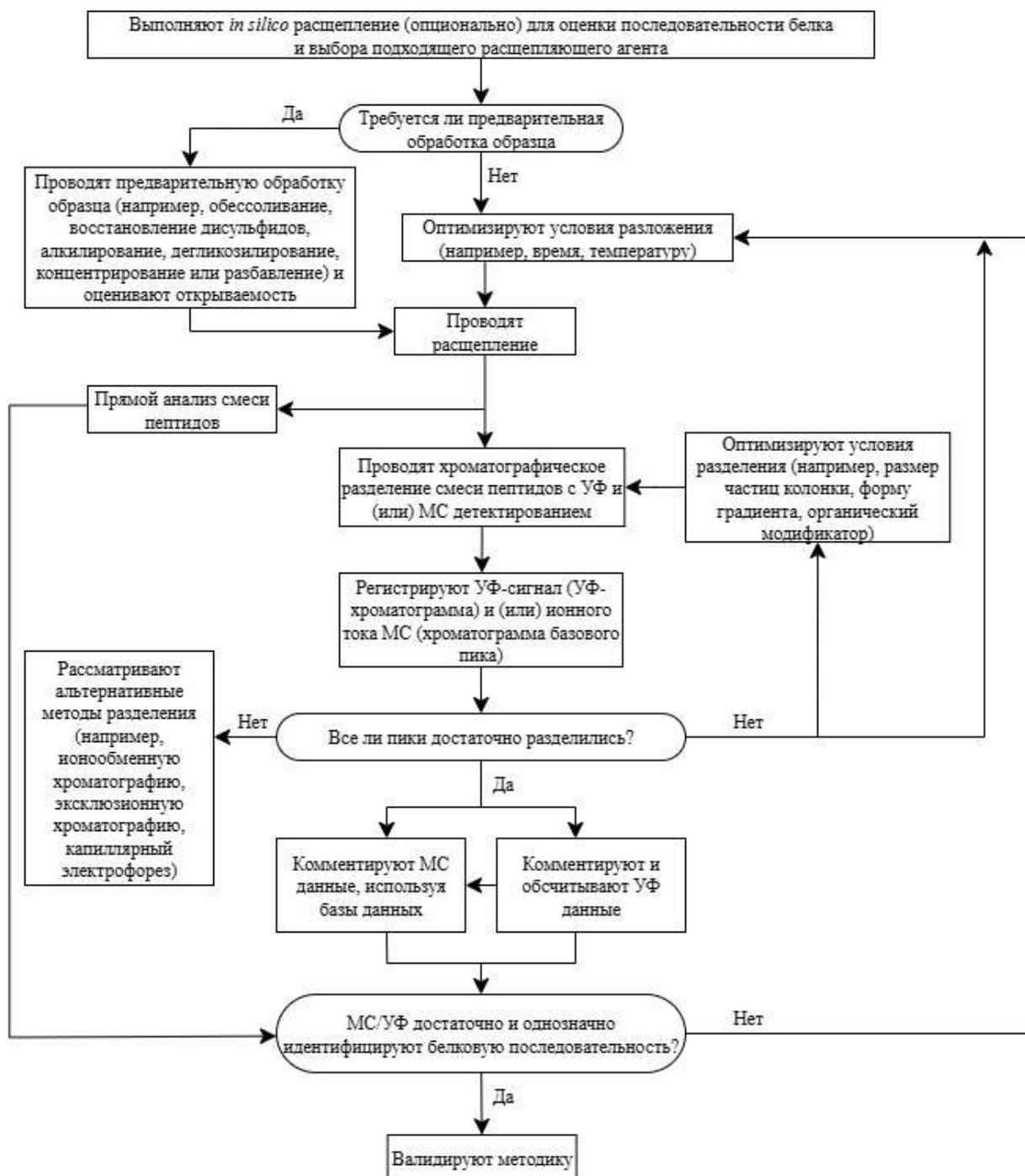


Рисунок 2.1.2.39.-1. Разработка аналитической методики пептидного картирования и целевые параметры функционирования

### ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА

Для анализа субстанций для фармацевтического применения, лекарственных препаратов или стандартных образцов, содержащих мешающие проведению анализа вспомогательные вещества или белки-носители, могут потребоваться стадии выделения и очистки. Остаточные количества таких веществ могут влиять на эффективность ферментативного расщепления и внешний вид пептидной карты. В процессе разработки следует оценить влияние остаточных веществ или процесса очистки образца на итоговый вид пептидной карты.

Третичная структура белков может препятствовать полному доступу расщепляющего агента ко всем сайтам расщепления, что приводит к неприемлемому охвату аминокислотной последовательности. Для разворачивания белка перед расщеплением может быть использована обработка белков хаотропными агентами (например, гуанидина гидрохлоридом, мочевиной) и поверхностно-активными веществами (например, додецилсульфатом натрия). Денатурирующие агенты могут влиять на ферментную активность, поэтому перед расщеплением может потребоваться дополнительная очистка (например, диафильтрация) или разбавление. Может потребоваться восстановление и алкилирование дисульфидных связей перед расщеплением, чтобы обеспечить ферменту полный доступ к сайтам расщепления, однако это приводит к потере информации о связях цистеин-цистеин. Общепринятыми реактивами для восстановления дисульфидных связей являются дитиотреитол и соединения триалкилфосфина, например, трис(2-карбоксиил)фосфин. Реактивы для алкилирования восстановленных цистеинов включают в себя йодацетамид, йодуксусную кислоту и 4-винилпиридин. Использование алкилирующих агентов может привести к образованию продуктов присоединения, влияющих на хроматографическое разделение и изменяющих молекулярную массу исследуемого пептида.

Так как пептидное картирование является сравнительным методом, все этапы очистки или предварительной обработки испытуемого белка должны быть проведены и с стандартным образцом. При разработке методики следует изучить влияние остаточных веществ, процедуры очистки или предварительной обработки белка на специфичность и прецизионность аналитической методики, а также рассмотреть возможность оценки этого влияния при изучении устойчивости (робастности), проводимом при валидации аналитической методики.

### РАСЩЕПЛЕНИЕ

Выбор способа расщепления зависит от конкретного белка. Некоторые широко используемые ферментативные и химические агенты для расщепления пептидных связей и их специфичность приведены в таблице 2.1.2.39-1. В особых случаях могут использоваться другие расщепляющие агенты или комбинации методов.

Таблица 2.1.2.39.-1. Примеры расщепляющих агентов

Тип	Агент	Специфичность
Ферментативные	Трипсин (EC 3.4.21.4)	C-концевые остатки Arg и Lys
	Химотрипсин (EC 3.4.21.1)	C-концевые гидрофобные остатки (например, Leu, Met, Ala, ароматических аминокислот)
	Пепсин А (пепсин) (EC 3.4.23.1)	Расщепление с низкой специфичностью
	Лизилэндопептидаза (Lys-C эндопептидаза) (EC 3.4.21.50)	C-концевой остаток Lys
	Глутамилэндопептидаза (Glu-C эндопептидаза; V8-протеаза из	C-концевые остатки Glu или Asp

	<i>S.aureus</i> , штамм V8) (EC 3.4.21.19) Пептидил-Asp металло-эндопептидаза (Asp-N эндопротеиназа) (EC 3.4.24.33) Клострипаин (Arg-C эндопептидаза) (EC 3.4.22.8)	N-концевой остаток Asp C-концевой остаток Arg
Химические	Бромциан 2-Нитро-5-тиоцианобензойная кислота О-Йодозобензойная кислота Разбавленная кислота 3-Бром-3-метил-2-(2-нитрофенилтио)-3H-индол (BNPS-скатол)	C-концевой остаток Met N-концевой остаток Cys C-концевые остатки Trp и Tyr Остатки Asp и Pro Остатки Trp

К факторам, влияющим на эффективность и воспроизводимость расщепления белка, относятся pH, буферный раствор для расщепления, температура, время и соотношение расщепляющего фермента или химического агента и белка.

Оптимальное значение pH смеси, в которой осуществляется расщепление белка, обычно определяется ферментом или химическим агентом. Необходимо учитывать химическую стабильность пептидов, включая боковые цепи аминокислот, и модификации белка при выбранном значении pH. Например, при использовании в качестве расщепляющего агента бромциана необходимо создание сильноокислой среды (например, pH 2, муравьиная кислота), а при использовании в качестве расщепляющего агента трипсина оптимальной является слабощелочная среда (pH 8).

Оптимальная температура зависит от расщепляющего агента, например, большинство ферментов имеют оптимальную активность в диапазоне от 25 °C до 37 °C. Температура может в некоторой степени определять специфичность фермента. В таких случаях подбор температуры может быть использован для оптимизации условий расщепления конкретных белков. В идеальном случае температура расщепления должна минимизировать побочные химические реакции образца, такие как дезамидирование, и агрегацию белков, повышая при этом восприимчивость испытуемого белка к расщеплению и поддерживая активность расщепляющего агента.

Чтобы избежать варьирования состава получаемых продуктов расщепления, необходимо удостовериться, что время расщепления является достаточным для его целевого назначения. Следует провести простое исследование динамики процесса расщепления, чтобы свести к минимуму количество пептидных фрагментов, образовавшихся в результате неполного расщепления. Время расщепления варьируют от нескольких минут до нескольких суток, при этом аликвоты, отобранные после проведения конкретной реакции, могут быть соответствующим образом стабилизированы для определения времени, необходимого для полного расщепления белка.

Следует использовать достаточное количество расщепляющего агента для обеспечения необходимого уровня расщепления в течение приемлемого периода времени (т.е. от 2 ч до 20 ч), однако его количество должно быть минимизировано для предотвращения влияния агента на вид пептидной карты. Для ферментативного расщепления, как правило, используют массовое соотношение белка к протеазе от 20:1 до 200:1. В случаях, когда расщепляющий агент нестабилен, эффективность расщепления можно повысить за счет многократного прибавления соответствующего расщепляющего

агента. Ферменты могут быть связаны с твердым носителем, что позволяет использовать более высокие относительные количества протеазы, избегая при этом контаминации из-за автолиза (т.е. протеолитического саморасщепления фермента) и вклада ферментных фрагментов в пептидную карту. Химические расщепляющие агенты, как правило, используются в значительном молярном избытке, и в конце процесса расщепления может потребоваться их удаление.

Следует определить эмпирически оптимальную концентрацию испытуемого белка для его расщепления, при этом по возможности она должна быть достаточно низкой для минимизации возможной агрегации интактных и частично расщепленных белков, но достаточной для достижения приемлемого предела обнаружения пептидов выбранным методом детектирования после хроматографического разделения. Может понадобиться разведение или концентрирование образца с помощью таких методик, как центробежная фильтрация. Все этапы разведения или концентрирования испытуемого белка также должны применяться и для стандартного образца. Следует оценить выход белка на любом этапе его концентрирования, а также изучить при разработке методики влияние разведения или концентрирования на специфичность и прецизионность аналитической методики и рассмотреть возможность оценки этого влияния при изучении устойчивости (робастности), проводимом при валидации аналитической методики.

Этап расщепления может вносить неопределенность в пептидную карту, вызванную побочными реакциями, такими как неспецифическое расщепление, дезамидирование, дисульфидная изомеризация, окисление остатков метионина, карбамоилирование остатков лизина или образование пироглутаминовых групп в результате дезамидирования *N*-концевого остатка глутамина. Автолиз также может приводить к возникновению посторонних пиков, интенсивность которых зависит от отношения фермента к субстрату, модификаций и качества используемого фермента. Во избежание автолиза растворы протеолитических ферментов, участвующие в реакции, следует готовить при значении pH, при котором активность фермента ингибируется, или непосредственно перед использованием. Могут быть использованы модифицированные ферменты, когда в протеазу внесены изменения, предотвращающие автолиз. В коммерчески доступном трипсине (часто обозначаемым «*proteomics grade*») ферментные остатки лизина метилированы или ацетилированы для уменьшения количества сайтов автолитического расщепления. Для идентификации несвойственных явлений или продуктов расщепления проводят контрольное определение с использованием контроля для расщепления, содержащего все реактивы, за исключением испытуемого белка.

### *РАЗДЕЛЕНИЕ*

Хроматографическое разделение смеси пептидов, полученной в результате расщепления, предназначено для упрощения ее анализа и получения валидной интерпретации данных, которые были бы значимы и воспроизводимы. В конечном счете сложность пептидной карты будет определять оптимальные хроматографические условия, колонку и подвижную фазу. Для получения воспроизводимых хроматограмм наилучшего качества потребуется проведение экспериментов по оптимизации методики. На сложность пептидной карты и оптимальное разделение пептидов также будет оказывать влияние молекулярная масса испытуемого белка.

Разделение пептидов для анализа пептидных карт проводят различными методами (например, ионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), ВЭЖХ гидрофобного взаимодействия, капиллярный электрофорез). Однако наиболее широко распространенным методом для этапа разделения при пептидном картировании является обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ), которая будет рассмотрена в данной общей фармакопейной статье.

Выбор хроматографической колонки осуществляют эмпирически для каждого белка. Установлено, что колонки с неподвижными фазами с различным размером пор (от

8 нм до 100 нм) или непористыми неподвижными фазами на основе силикагеля, полимерного или гибридного носителя обеспечивают приемлемое разделение. Доступны колонки с размером частиц менее 2 мкм, которые, как правило, более эффективны, чем колонки с размером частиц от 3 мкм до 5 мкм. Как правило, для пептидов наиболее подходящими являются октил- и октадецилсилильные привитые фазы. Наиболее распространенной привитой фазой для стадии разделения при пептидном картировании является октадецилсилан (C18) с размером пор 30 нм или менее.

Наиболее распространенной подвижной фазой для ОФ-ВЭЖХ разделения пептидов является вода с ацетонитрилом в качестве органического модификатора, хотя могут быть использованы и другие органические модификаторы, такие как метанол, пропанол или 2-пропанол. Подвижные фазы, содержащие такие растворители, как пропиловые спирты, могут быть использованы для разделения образцов, содержащих большое количество сильно гидрофобных пептидов, однако, следует отметить, что существует вероятность элюирования пептидов небольшого размера или гидрофильных пептидов в свободном объеме колонки. Как правило, для получения высококачественного разделения пептидов требуется внесение в подвижную фазу добавок, таких как кислоты, основания, буферные соли и ион-парные реактивы. Наиболее часто используемой добавкой к подвижной фазе является трифторуксусная кислота (ТФУК) в концентрации обычно от 0,05 % до 0,2 %. Фосфат является менее распространенной добавкой, но может использоваться в случаях УФ-детектирования. Летучие кислоты и соли могут использоваться в подвижной фазе для повышения совместимости с масс-спектрометрическим детектированием. Несмотря на то что ТФУК оказывает значительное положительное влияние на качество разделения пептидов, при ее использовании может снижаться чувствительность при масс-спектрометрическом детектировании из-за подавления ионов. Муравьиная кислота, уксусная кислота или их смеси с ТФУК могут увеличивать масс-спектрометрическую чувствительность благодаря уменьшению подавления ионов. Для достижения надлежащей воспроизводимости необходим контроль температуры хроматографической колонки. Температура колонки может быть использована для оптимизации разделения пептидов или улучшения удерживания или элюирования определенных пептидов, так как для обращенно-фазовой колонки разрешение обычно возрастает с увеличением температуры.

### *ДЕТЕКТИРОВАНИЕ*

В то время как наиболее часто используемым методом разделения в испытании на подлинность методом пептидного картирования является ОФ-ВЭЖХ, наиболее распространенным способом детектирования является абсорбция ультрафиолетового излучения (УФ-детектирование) при длине волны 214 нм. Пептиды, образующиеся при расщеплении белка, могут не содержать аминокислот с ароматическими боковыми цепями, абсорбирующими излучение с большей длиной волны (например, 280 нм), таким образом, детектирование при 214 нм (то есть при длине волны, на которой поглощает излучение пептидная связь) необходимо для того, чтобы обеспечить полноту охвата аминокислотной последовательности белка, при этом следует стремиться минимизировать фоновый сигнал, обусловленный подвижной фазой. Могут использоваться и другие методы детектирования.

Ограничением УФ-детектирования является то, что оно не позволяет получить информацию о структуре пептида. В то же время удобство использования масс-спектрометрического (МС) детектирования заключается в том, что оно предоставляет необходимую при идентификации пептидов информацию о массе, а также обеспечивает селективность в случаях, если пептиды элюируются совместно. В большинстве случаев элюат после ОФ-ВЭЖХ может напрямую вводиться в масс-спектрометр, при условии использования подходящей подвижной фазы. Конкретные требования к подвижной фазе зависят от выбранного метода ионизации. Электрораспылительная ионизация (*ESI, electrospray ionisation*) является наиболее распространенным методом для ввода белков и пептидов в масс-анализатор, а летучие смеси «вода-растворитель» обеспечивает

наибольшую эффективность ионизации. Пептидное картирование с помощью масс-спектрометрии с *ESI* наиболее часто выполняется в режиме генерации положительно заряженных ионов. К подвижной фазе обычно прибавляют муравьиную или уксусную кислоту для снижения рН и, следовательно, увеличения протонирования пептидов. Следует минимизировать содержание буферов и солей, так как они могут ослаблять сигнал, а нелетучие соли могут оседать в источнике. Как было указано выше, следует избегать использования ТФУК, так как ее присутствие может привести к подавлению ионов, то есть виду матричных помех, способному снижать сигнал некоторых пептидов, особенно при использовании *ESI*. Подавление ионов может также снижать эффективность ионизации гликозилированных пептидов, приводя к ухудшению чувствительности. Поэтому важно оптимизировать условия для получения оптимальных результатов как при УФ-детектировании, так и при МС-детектировании.

### АНАЛИЗ ДАННЫХ

Пептидное картирование является сравнительной методикой. Для того, чтобы определить, является ли испытуемый белок искомым интересующим белком, следует сравнить пептидные карты испытуемого белка и стандартного образца, используя идентичные процедуры предварительной обработки, разделения и детектирования. Первым этапом испытания является визуальное сравнение времен удерживания, откликов пиков (площади или высоты пика), числа пиков и общего профиля элюирования. Оптимальным подходом принято считать проведение дополнительного несубъективного анализа отношений откликов критичных пиков и времен удерживания пиков. Подлинность испытуемого белка подтверждается, если все критичные пики при расщеплении испытуемого белка и стандартного образца имеют одинаковые времена удерживания и отношения откликов пиков. Например, испытания по пептидному картированию образцов моноклональных антител часто включают в себя общий *Fc*-пептид, который используется в качестве пика сравнения. К расщепленному испытуемому образцу может быть добавлен пептид сравнения, тогда отношения откликов основных пиков и времена удерживания можно сравнить с предустановленными критериями приемлемости. Метод сравнения следует выбирать в зависимости от сложности получаемой пептидной карты и специфичности, необходимой для конкретного применения испытания идентификации (например, установление различий между различными белковыми продуктами, производимыми на одном и том же объекте, или вариантами одного и того же белкового продукта).

Если требуется высокая специфичность, для рутинных анализов может быть использован масс-спектрометр для получения информации о пептидных модификациях, укорочениях, пропущенных расщеплениях, примесях и неразделяемых пиках, элюирующихся совместно.

### ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ ПЕРЕД ВАЛИДАЦИЕЙ

При разработке методики пептидного картирования приобретаются знания и практические навыки, позволяющие выбрать критерии пригодности системы и критерии приемлемости для валидации аналитической методики. Окончательная проверка методики перед валидацией может гарантировать, что методика готова к валидации, и таким образом снизить риск несоответствия требуемым критериям. Метод пептидного картирования, как общий метод, может охватывать значительный диапазон экспериментальных схем, областей применений и требований к функционированию, вследствие чего в общей фармакопейной статье невозможно указать конкретные критерии пригодности системы или валидации. Ниже приведены параметры, которые рекомендуется оценить перед началом валидации.

Следует отметить, что в область применения данной общей фармакопейной статьи не входит рутинное использование пептидного картирования с масс-спектрометрическим

детектированием. Однако, применение МС для структурной идентификации пептидов при разработке методик пептидного картирования является наилучшей практикой и может также использоваться для оценки параметров эффективности, указанных ниже.

**Охват.** Охват определяется в процентах аминокислотной последовательности, идентифицируемой на пептидной карте, по отношению к последовательности целевого белка. Хотя невозможно определить конкретные значения для всех применений, во многих случаях приемлемым показателем эффективности для методики пептидного картирования может считаться охват, приближающийся к 95 %.

**Избирательное расщепление связей.** Следует идентифицировать и перечислить специфические связи, расщепляемые с помощью выбранной методики ферментного или химического расщепления.

**Основные пики.** Следует идентифицировать и перечислить основные пептиды, образующиеся в результате расщепления специфических связей.

**Частичное расщепление.** Следует идентифицировать пептидные связи, подверженные частичному или неполному расщеплению, и связанные с ними хроматографические пики или сигналы.

**Неспецифическое (побочное) расщепление.** Следует определить и контролировать степень расщепления неспецифических связей.

**Пики, обусловленные протеазой.** Если для расщепления испытуемого белка используется протеаза, то следует идентифицировать и при необходимости ограничить все пики, находящиеся выше базовой линии и обусловленные протеазой.

**Нерасщепленный «основной» белок.** Следует идентифицировать нерасщепленный или частично расщепленный белок (часто называемый «основной» белок) и его содержание должно быть ограничено.

**Средняя длина пептидов.** Она характеризует совокупность пептидов, получаемую в результате комбинации выбранной протеазы и (или) химического расщепляющего агента и испытуемого белка. Средняя длина пептидов представляет собой компромисс между выбором более коротких пептидов, которые обеспечивают более высокий уровень структурной селективности при пептидном картировании, но дают более сложную карту с большим количеством пиков, и более длинных пептидов, которые дают более простые карты, но с меньшей разрешающей способностью для структурных вариантов. Не существует конкретной длины пептидов, подходящей для любого случая, но зачастую таковой считается средняя длина пептидов из 10-20 остатков.

**Разрешающая способность.** Параметр относится к способности системы разделять смесь пептидов, образованную в результате действия протеазы или химического расщепляющего агента. Например, при расщеплении может образоваться 30 пептидов, но обнаруживаются только 20 пиков из-за совместного элюирования или отсутствия разделения. Проблемы разделения следует выявлять и устранять с помощью соответствующих хроматографических методик и при необходимости контролировать с использованием пептидного стандартного образца или критериев пригодности системы.

**Выбор критериев пригодности системы.** Следует разработать критерии пригодности системы, гарантирующие, что этапы по расщеплению белка, разделению и детектированию, описанные в методике, должным образом обеспечивают однозначную структурную идентификацию испытуемого белка, необходимую для предполагаемого применения методики. Критерии пригодности системы, определяемые в рутинном анализе в испытаниях идентификации, обычно включают в себя оценку хроматограммы расщепленного белка сравнения и могут включать следующие характеристики эффективности:

- качественное сходство с хроматограммой сравнения;
- степень расщепления;
- частичные расщепления;
- неспецифические расщепления;

- высота пика (отношение сигнал/шум);
- форма пика;
- время удерживания пика;
- разрешение определенных пиков.

Для методик испытаний, требующих выделения, очистки или концентрирования образца, следует определить и включить в оценку пригодности системы критерии извлечения образца. В случаях, когда могут присутствовать нехарактерные явления или продукты расщепления, для подтверждения отсутствия мешающего влияния может потребоваться проведение и оценка контрольного опыта.

## ВАЛИДАЦИЯ

До проведения валидации следует полностью разработать и задокументировать методику пептидного картирования с указанием критериев пригодности системы. Каждый раз после выполнения методики результаты оценивают относительно критериев пригодности системы для определения сопоставимости воспроизводимых результатов с предыдущим испытанием. Предварительно утвержденные критерии приемлемости часто меняются в зависимости от критериев пригодности системы данной методики. Элементы плана аналитической валидации указаны ниже.

### *СПЕЦИФИЧНОСТЬ*

Требования к эффективности функционирования метода могут изменяться в зависимости от предполагаемого использования метода определения подлинности подлинность, при этом может потребоваться оценка рисков для определения степени специфичности, необходимой для установления отличий между испытуемым белком и другими продуктами, производимыми на том же объекте. Пептидное картирование является сравнительной методикой, подтверждающей, что первичные структуры испытуемого белка и белка сравнения совпадают. Специфичность устанавливают сравнением пептидных карт подходящего стандартного образца и образцов структурно родственных белков. Выбор образцов для сравнения следует проводить с учетом оценки риска присутствия других продуктов, которые обрабатываются на том же объекте, и задокументировать в протоколе валидации. Чтобы минимизировать вариабельность методики, ее проводят с использованием стандартного образца и испытуемого белка в течение одного и того же цикла. Для валидации специфичности методики целесообразным является проведение испытания пептидного картирования, предусматривающего анализ растворов расщепленного испытуемого белка, стандартного образца и их смеси в соотношении 50:50 (*об/об*). На пептидной карте испытуемого белка иногда может появляться пик, элюирующийся со временем удерживания, незначительно отличающимся от времени удерживания соответствующего пика на пептидной карте стандартного образца, ведя к заключению о неидентичности пиков. Испытание смеси образца и стандартного образца при валидации на специфичность может продемонстрировать, что оба пика являются идентичными, если они элюируются совместно на итоговой пептидной карте и, следовательно, подтвердить подлинность. Под воздействием pH, температуры или химических агентов, вызывающих изменение первичной структуры, могут образовываться химически модифицированные формы стандартного образца. Эти изменения обычно включают дезамидирование остатков аспарагина и глутамина, окисление остатков метионина, гистидина или триптофана и кислотное расщепление пептидных связей. На основании заранее установленных критериев приемлемости можно сравнить пептидные карты химически модифицированного стандартного образца и немодифицированного стандартного образца для демонстрации влияния модификации боковых цепей аминокислот на специфичность методики пептидного картирования.

### *ПРЕЦИЗИОННОСТЬ*

Для облегчения определения прецизионности (повторяемость и промежуточная прецизионность) методики пептидного картирования следует использовать эмпирический метод количественной оценки откликов пиков (площади пиков или высоты пиков) и коэффициента удерживания пика. Один из подходов заключается в сравнении отклика пика и времени удерживания пика с таковыми для точно воспроизводимого пика сравнения на одной хроматограмме. Результаты прецизионности, полученные при валидации аналитической методики, следует представить в отчете и по возможности они должны удовлетворять критериям приемлемости. Несоответствие результатов прецизионности критериям приемлемости может привести к повторной оценке этапов расщепления и (или) разделения в методике.

#### *УСТОЙЧИВОСТЬ (РОБАСТНОСТЬ)*

Устойчивость может быть оценена при разработке аналитических методик. Ее необязательно проверять повторно, но она может быть включена в валидацию аналитической методики. Такие факторы, как состав подвижной фазы, качество протеазы или чистота химического расщепляющего агента, вариации и срок службы колонки, температура расщепления и стабильность продукта расщепления могут повлиять на общую эффективность испытания и его воспроизводимость. Если испытание используется для целей рутинного выпуска серий, оценивают допустимые отклонения для всех ключевых параметров и устанавливают основные пределы.

Вариации методик очистки, предварительной обработки, разведения или концентрирования образца белка может оказывать влияние на открываемость, испытательную систему и хроматограмму. Вариации и их влияние следует выявлять в процессе разработки и контролировать. Следует принять во внимание влияние остаточных веществ, оставшихся после пробоподготовки, на специфичность и прецизионность методик. Критические параметры, выявленные при разработке, следует включать в исследования устойчивости (робастности), проводимое при валидации аналитической методики.

Большинство методик фрагментации белков использует протеолитические ферменты. В результате этого часть методики пептидного картирования, связанная с расщеплением белка, является по своей природе более чувствительной к минимальным вариациям в параметрах испытания. Эти параметры могут включать все или часть из нижеперечисленных: рН, буферный раствор, концентрация буферного раствора, ионная сила, температура расщепления, кинетика расщепления, концентрация испытуемого белка, содержание протеазы, качество протеазы и стабильность продукта расщепления. С использованием подхода планирования экспериментов систематически изучаются идентифицированные критические параметры для понимания их влияния на вариабельность методики. Параметры расщепления, незначительные изменения которых влияют на прецизионность методики пептидного картирования, следует тщательно контролировать в ходе испытания, используя рабочие диапазоны, установленные и валидированные с помощью этих исследований.

Для оценки качества протеазы или чистоты химического расщепляющего агента стандартный образец готовят и расщепляют с помощью различных партий расщепляющих агентов. Хроматограммы каждого продукта расщепления сравнивают по площади пика, форме пика и числу пиков. Аналогичная процедура может применяться к другим важным химическим веществам или методикам предварительной обработки, используемым в процессе пробоподготовки, например, восстанавливающим агентам и реактивам для S-карбоксиметилирования.

Определяют допустимый период времени хранения продукта расщепления до перехода к этапу разделения, а также условия, при которых продукт расщепления хранят перед разделением. Несколько аликвот одного продукта расщепления хранят при

различных условиях хранения и разделяют с помощью хроматографического метода. Затем определяют существенные различия на полученных картах.

На этапе разделения вариабельность между колонками, даже в пределах одной партии колонок, может влиять на эффективность методики пептидного картирования. Для оценки различий в партиях колонок стандартный образец испытуемого белка расщепляют и продукты расщепления разделяют с использованием колонок различных партий одного производителя. Изучают полученные пептидные карты, оценивая общий профиль элюирования, времена удерживания и разрешение относительно предварительно установленных критериев приемлемости.

Для оценки срока эксплуатации колонки с точки зрения устойчивости (робастности) можно проанализировать один и тот же продукт расщепления стандартного образца с помощью методики пептидного картирования, используя колонки, отличающиеся по суммарному количеству выполненных вводов (например, 10-250 вводов в одну колонку). Полученные пептидные карты можно затем сравнить на наличие существенных различий в уширении пиков и общем разрешении. По мере старения колонки может наблюдаться возрастание обратного давления, что может повлиять на пептидную карту. Для того, чтобы выявлять старение колонки или другие факторы, потенциально влияющие на результаты пептидного картирования, могут быть разработаны критерии пригодности системы или критерии для валидации аналитической методики.

## ОБОБЩЕНИЕ

Методика пептидного картирования состоит из нескольких этапов, включая выделение белка, денатурацию, при необходимости химическую модификацию (например, блокирование сульфгидрильных групп), расщепление белка, разделение и детектирование пептидов и анализ данных. Для идентификации методом пептидного картирования каждый этап следует оптимизировать при разработке для получения пригодной аналитической методики. В сочетании с использованием подходящего стандартного образца следует выбрать критерии пригодности системы для оценки того, что все этапы методики приводят к созданию пептидной карты стандартного образца, которая соответствует критериям валидации аналитической методики. Надлежащим образом разработанная, валидированная и выполненная аналитическая методика пептидного картирования может быть использована для идентификации испытуемого белка, являющейся важнейшим показателем качества продукта.