**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Пептидное картирование** |  | **ОФС** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.7.2.0035.18** |

|  |
| --- |
|  |

Пептидное картирование представляет собой метод идентификации белков, в основном, получаемых методом рекомбинантных ДНК. Метод включает химическое или ферментативное расщепление белков до образования пептидных фрагментов с последующим их разделением и идентификацией в воспроизводимых условиях, после чего полученный результат сравнивают с результатом, полученным с обработанным таким же образом стандартным образцом. Этот метод позволяет подтвердить первичную структуру белка, идентифицировать замену практически любой отдельной аминокислоты, подтвердить соответствие технологического процесса и генетическую стабильность, а также определить наличие белков с изменениями в структуре.

Пептидное картирование не является методом, использующим одну общую методику испытаний для различных белков. Для каждого отдельного белка или групп родственных белков разрабатывается собственная методика испытаний, позволяющая получать специфичные пептидные карты, представляющие собой хроматограммы гидролизатов белков с уникальным для каждого белка профилем пиков пептидных фрагментов.

Составление пептидных карт может рассматриваться как метод «отпечатков пальцев» белка и представляет собой получаемую в результате ряда химических процессов полную расшифровку первичной структуры анализируемого белка. Метод включает четыре принципиальные стадии: выделение и очистка белка – в случае, если белок входит в состав какой-либо смеси; избирательное расщепление пептидных связей (гидролиз); хроматографическое разделение полученной смеси пептидных фрагментов и идентификацию пептидов. Полное расщепление пептидных связей более вероятно, когда вместо химических гидролизующих реагентов используются такие ферменты, как эндопептидазы (например, трипсин).

Первичная структура белка уникальна, поэтому для того, чтобы пептидная карта была информативной и специфичной, она должна содержать оптимальное число пептидов, что позволит однозначно подтвердить первичную структуру белка. В противном случае, если пептидных фрагментов будет слишком много или слишком мало, карта может утратить свою специфичность, поскольку в таком случае у пептидных карт родственных белков может быть максимально схожий профиль.

**Предварительная обработка белка: выделение и очистка**

Подготовка белка к гидролизу может включать этапы выделения и очистки. Это необходимо, поскольку лекарственные средства содержат вспомогательные вещества или белки-носители, мешающие испытанию. Полнота извлечения белка из лекарственного средства должна быть валидирована.

В определённых случаях может потребоваться концентрирование образца или отделение белка от используемых в лекарственном средстве вспомогательных веществ и стабилизаторов, если они могут приводить к искажению результатов картирования. Используемые для предварительной подготовки белка физические процедуры могут включать ультрафильтрацию, диализ, колоночную хроматографию и лиофилизацию. Данные процедуры могут быть проведены и как самостоятельные этапы обработки, и в сочетании с нижеприведёнными этапами денатурации.

С целью проведения денатурации белка до процедуры пептидного картирования возможно использование других методов подготовки, таких как добавление хаотропных агентов (например, гуанидина гидрохлорида или мочевины). Затем, как правило, для обеспечения полного доступа фермента к местам разрыва связей до проведения протеолитического расщепления, проводят восстановление дисульфидных связей (например, DL-дитиотреитолом) и алкилирование свободных цистеинов (например, йодацетамидом или йодуксусной кислотой).

Очистку белка от низкомолекулярных соединений проводят при необходимости на этапе замены буферного раствора (после проведения реакций восстановления и алкилирования на буферный раствор для проведения реакции ферментативного расщепления). Эту процедуру обычно выполняют, используя методы диализа или ультрафильтрации (разделение белка и низкомолекулярных соединений происходит за счёт селективных к размеру молекул пористых мембран), а также эксклюзионной хроматографии (обессоливающие колонки, заполненные неподвижной фазой для эксклюзионной хроматографии, например, на основе поперечно-сшитого декстрана). Степень извлечения белка, при правильном выборе расходных материалов для выполнения очистки от низкомолекулярных соединений, обычно составляет не менее 90 %.

Все вышеперечисленные этапы проводят, как правило, до этапа расщепления пептидных связей. Подробное описание процедур выделения и очистки должно быть приведено в методике испытаний.

**Избирательное расщепление пептидных связей**

Выбор подхода, используемого для расщепления пептидных связей, будет зависеть от анализируемого белка. Процедура выбора включает определение типа расщепления (химического или ферментативного), а также типа протеолитического реагента в рамках выбранной категории. В табл. 1 приведён ряд протеолитических реагентов и их специфичность в отношении пептидных связей. Помимо указанных, могут быть использованы другие реагенты способные расщеплять пептидные связи.

Таблица 1 – Примеры реагентов, используемых для расщепления пептидных связей

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Тип** | **Реагент** | **Специфичность** |
| Ферментативные | Трипсин | *C*-концевые аргинин и лизин |
| Химотрипсин | *C*-концевые гидрофобные остатки (например, лейцин, метионин, аланин, ароматические аминокислоты) |
| Пепсин | Неспецифический реагент |
| Лизилэндопептидаза (Lys-C эндопептидаза) | *C*-концевой лизин |
| Глутамилэндопептидаза (из S. aureus, штамм V8) | *C*-концевые глутамин и аспарагин |
| Пептидил-Asp металлоэндопептидаза (эндопротеаза Asp-N) | *N*-концевой аспарагин |
| Клострипаин | *C*-концевой аргинин |
| Химические | Цианобромид | *C*-концевой метионин |
| 2-Нитро-5-тио-цианобензойная кислота | *N*-концевой цистеин |
| O-Йодозобензойная кислота | *C*-концевые триптофан и тирозин |
| Разбавленная кислота | Аспарагин и пролин |
| BNPS-скатол | Триптофан |

***Требования к расщепляющему агенту***

Для обеспечения требуемой специфичности, информативности и воспроизводимости профиля пептидной карты используют расщепляющие агенты, специально разработанные для пептидного картирования и секвенирования белков. Такие агенты отличаются высокой степенью чистоты и дополнительной обработкой, позволяющими минимизировать или исключить протекание побочных реакций, а также повышающими стабильность и селективность используемых агентов. Например, трипсин, используемый в качестве реагента для расщепления пептидных связей, обычно обработан N-*п*-тозил-L-фенилаланин хлорметилкетоном с целью инактивации химотрипсина. Успешно используются ферменты предварительно очищенные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или иммобилизованные на гелевом носителе, а также ферменты полученные методом рекомбинантных ДНК.

***Предварительная обработка испытуемого образца***

В зависимости от размера или конфигурации белка используют различные подходы к подготовке образца к гидролизу. В некоторых случаях для расщепления пептидных связей белка с молекулярной массой более 100 000 Да используют трипсин, остатки лизина могут быть защищены путём получения производных с цитраконовым или малеиновым ангидридами, так как в противном случае может образоваться слишком много пептидных фрагментов.

***Подбор оптимальных условий для расщепления пептидных связей***

Полнота и эффективность расщепления белков зависит от факторов, влияющих на химические и ферментативные реакции. Условия для оптимального протекания данных реакций определяются в процессе разработки и подтверждают при валидации. При этом проводится сравнение теоретического (эталонного) набора пептидных фрагментов, обусловленного селективностью используемого расщепляющего агента, и фактически полученного набора идентифицированных пептидных фрагментов. Эталонная пептидная карта составляется на основании первичной структуры белка, специфичности используемого реагента в части сайтов расщепления и получаемого эталонного набора пептидных фрагментов Отклонения от условий, указанных в методике, могут привести к её невоспроизводимости.

*Расщепляющий агент.* Использование трипсина и других ферментов (протеаз), для расщепления пептидных связей, связано с рисками побочных реакций (таких как неспецифическое расщепление, дезаминирование, дисульфидная изомеризация, окисление остатков метионина, образование пироглутаминовых групп при дезаминировании глутамина на *N*-концевой стороне пептида), протекающих параллельно с реакцией протеолитического расщепления и способных привести к отклонениям от «эталонной» пептидной карты, полученной в ходе разработки и валидации методики. Такие риски возрастают, когда вместо трипсина, использовавшегося при разработке и валидации методики пептидного картирования, применяют аналогичный по качеству трипсин других производителей, или трипсин, отличающийся происхождением (животного происхождения или рекомбинантный) или квалификацией (степень очистки и дополнительная обработка). Кроме того, вследствие автогидролиза протеаз могут появляться дополнительные пики на пептидной карте. Интенсивность их образования зависит от соотношения содержания протеаз к белку. Для предотвращения автогидролиза растворы протеаз могут быть приготовлены при рН, отличном от оптимального значения (например, при рН 5 для трипсина), благодаря чему фермент не переходит в активное состояние до момента разведения с буферным раствором.

*рН реакционной среды.* Значение рН смеси, в которой осуществляется расщепление белка, зависит от того, какая среда требуется для оптимизации состояния используемого расщепляющего агента. Например, при использовании бромциана в качестве расщепляющего реагента необходимым является создание сильнокислой среды (например, рН 2, муравьиная кислота); однако при использовании трипсина в качестве расщепляющего агента оптимальной является слабощелочная среда (рН 8). Важным является требование, чтобы значение рН реакционной среды не изменяло структуру белка в ходе реакции расщепления и значение рН не изменялось само в ходе проведения гидролиза.

*Температура.* Для большинства реакций расщепления наиболее подходящей является температура в интервале от 25 до 37 °С. Создаваемая температура должна способствовать минимизации побочных химических реакций. Тип испытуемого белка определяет выбор температуры реакционной среды, поскольку некоторые белки с повышением температуры склонны к денатурации. Например, расщепление рекомбинантного бычьего соматропина проводится при температуре 4 °С, поскольку при более высокой температуре он осаждается в ходе проведения реакции гидролиза.

*Время.* Время проведения гидролиза оказывает существенное влияние на получаемую пептидную карту, поэтому необходимо установить время, оптимальное для получения воспроизводимой карты и достаточное для проведения полного расщепления. Продолжительность расщепления обычно варьируется от 2 до 30 ч. Реакция гидролиза прекращается либо изменением pH реакционной среды, которое не оказывает влияния на полученную пептидную карту, либо добавлением специфических ингибиторов или денатурирующих агентов, либо температурной инактивацией (нагревом до высокой температуры (100 °C) или, наоборот, замораживанием).

*Количество используемого расщепляющего реагента.* Для обеспечения достаточного быстрого расщепления используется избыточное количество расщепляющего реагента; тем не менее, его количество должно быть минимизировано, чтобы предотвратить вклад реагента в структуру пептидной карты. Обычно анализируемый белок и реагент берут в соотношении от 10:1 до 500:1. Для оптимизации процедуры расщепления рекомендуется добавлять расщепляющий агент в два или более этапов. При этом конечный объём реагирующей смеси должен оставаться достаточно небольшим для обеспечения следующего этапа пептидного картирования – разделения. Для того, чтобы исключить возможное влияние искажающих продуктов расщепления (артефактов) на результаты последующего анализа, проводится контрольный опыт со всеми реагентами, за исключением анализируемого белка.

**Хроматографическое разделение пептидных фрагментов**

Для разделения пептидных фрагментов используют различные методы. Выбор метода зависит от белка, для которого составляется пептидная карта.

Методы, наиболее часто используемые для разделения смеси пептидных фрагментов:

- обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;

- ионообменная хроматография;

- хроматография гидрофобного взаимодействия;

- капиллярный электрофорез.

В данном разделе приведено описание метода обращённо-фазовой ВЭЖХ, одного из наиболее часто используемых методов хроматографического разделения.

***Хроматографическая колонка***. Для каждого белка выбор колонки осуществляется эмпирически, исходя из возможности должного разделения требуемого числа пептидных фрагментов. Особое внимание при выборе уделяется разделению характеристических пептидных фрагментов, отвечающих за специфичность пептидной карты, от остальных фрагментов.

Наиболее часто хроматографическое разделение осуществляется на колонках, заполненных сорбентами на основе гидрофобных силикагелей с привитыми группами, с размером частиц 3–10 мкм или 1,7–2,5 мкм (при использовании СВЭЖХ) и размером пор от 130 до 300 А (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

***Способ элюирования*.** В большинстве случаев применяется градиентное элюирование, поскольку оно позволяет достичь эффективного и быстрого разделения смеси пептидных фрагментов, обладающих разными свойствами. При элюировании рекомендуется низкая скорость изменения состава подвижных фаз. Градиент оптимизируют, добиваясь чёткого разделения между всеми пиками, выбранными в качестве характеристических пиков для проводимого испытания.

***Подвижная фаза***. Наиболее часто в качестве компонентов подвижной фазы используются растворы трифторуксусной или муравьиной кислоты (≤ 0,5 % (об/об)) в воде и ацетонитриле. При необходимости для повышения растворимости компонентов вводимой пробы добавляют 1-пропанол,
2-пропанол или другие модификаторы при условии, что их добавление не приведёт к чрезмерному повышению вязкости элюента. Скорость подвижной фазы варьируется от 0,1 мл/мин до 2,0 мл/мин.

В случаях, когда необходимо повысить разделительную способность системы, в качестве водного компонента подвижной фазы используют буферный раствор (фосфатный, формиатный, ацетатный или иной), поскольку при значении рН в интервале от 3,0 до 5,0 улучшается разделение пептидов, содержащих кислотные остатки (например, остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот).

***Другие параметры***. Для достижения хорошей воспроизводимости, как правило, требуется контроль температуры колонки. Детектирование пептидов наиболее часто осуществляется спектрофотометрическим детектором при длине волны от 200 до 230 нм. Допустимо использование других типов детектирования для повышения информативности, к примеру, флуориметрического и масс-спектрометрического.

**Анализ первичной структуры и идентификация пептидов**

Использование пептидной карты как инструмента первичной качественной оценки производимого белка не требует полной характеристики индивидуальных пептидных пиков. Однако разработка методики пептидного картирования требует точной характеристики каждого из индивидуальных пиков пептидной карты.

В ходе разработки методики пептидного картирования осуществляется подбор условий подготовки белка к гидролизу и описываются последовательности аминокислот для каждого пептидного фрагмента, получаемого в результате гидролиза.

Установление первичной структуры (последовательности аминокислот) пептидных фрагментов, образованных в ходе гидролиза, необходимо, поскольку пептидное картирование обеспечивает как подтверждение известной первичной структуры белка, так и идентификацию структуры отличающихся по составу белков (в случае их наличия) при сравнении с пептидной картой стандартного образца белка, структура которого установлена.

Для характеристики индивидуальных пиков могут быть использованы как метод N-концевого секвенирования с последующим анализом аминокислот, так и метод с использованием масс-спектроскопии.

Для установления первичной аминокислотной последовательности с использованием N-концевого секвенирования с последующим аминокислотным анализом проводят масштабирование стадии аналитического разделения для целей препаративного разделения. Необходимо убедиться на основании эмпирических данных, что ухудшения разрешения между пиками вследствие проведения масштабирования не происходит. Элюаты, соответствующие пикам определённых пептидных фрагментов, собирают, концентрируют и, при необходимости, повторно хроматографируют. Аминокислотный анализ фрагментов может быть ограничен размером пептидов. В случае, если *N*-концевая аминокислота заблокирована, может потребоваться её высвобождение до секвенирования. С целью получения характеристики может также использоваться *С*-концевое секвенирование белков в комбинации с карбоксипептидазой и методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролётным масс-анализатором (MALDI-TOF).

Использование масс-спектроскопии для характеристики пептидных фрагментов осуществляют либо путём прямого ввода образцов выделенных пептидов в масс-спектрометр, либо с использованием *on-line* ВЭЖХ системы, сопряжённой с масс-спектрометром. В большинстве случаев для ионизации образца используют электрораспылительную ионизацию, матрично-активированную лазерную десорбцию/ионизацию, а также ионизацию бомбардировкой быстрыми атомами. Тандемная масс-спектроскопия используется как для подтверждения структуры пептидных фрагментов, так и для идентификации обнаруженных в составе аминокислотной последовательности белка модификаций.

Сравнение профилей продуктов гидролиза до и после восстановления с последующей МС-идентификацией полученных пиков позволяет определить расположение дисульфидных связей в различных пептидах. Если некоторые части первичной структуры не могут быть достаточно чётко отражены пептидной картой, может потребоваться составление вторичной пептидной карты.

Получение вторичной пептидной карты заключается в выделении полученных при гидролизе пептидных фрагментов с последующим их вторым расщеплением в выбранных условиях, хроматографическим разделением, обнаружением и идентификацией. Выделение пептидных фрагментов после первого гидролиза проводится, как правило, методами колоночной хроматографии. Условия гидролиза, разделения и идентификации при получении вторичной пептидной карты отличаются от условий при получении первичной пептидной карты.

Целью валидированной методики пептидного картирования является подтверждение как минимум 95 % теоретической структуры белка.

***Оценка результатов и идентификация пептидных фрагментов***

Для каждого из белков характерна совокупность уникальных свойств, обусловленных его первичной структурой и структурами более высокого порядка. Пики пептидных фрагментов, наиболее характерных для данного пептида и/или отражающих наиболее важные свойства испытуемого белка, например, области, определяющие комплементарность, выбираются в качестве характеристических пиков. Перечень пиков должен быть приведён в методике испытаний.

Обнаружение и идентификация пептидных фрагментов проводятся с использованием внутренних и внешних стандартов, либо с помощью МС-детектирования.

Способ обнаружения и идентификации пиков пептидных фрагментов приводится в методике испытания.

Небольшие отличия в числе обнаруженных пиков пептидных фрагментов, степени их разрешения, интенсивности, а также других характеристик прецизионности, по сравнению с валидированными значениями, является ожидаемым явлением при воспроизведении методик пептидного картирования. Поэтому важно включение в методику испытания чётких критериев соответствия, а также пределов допустимого отклонения для указанных параметров пригодности системы и оценки соответствия анализирумого белка стандартному образцу.

Идентификация пептидов включает в себя визуальную оценку полученных пептидных карт испытуемого и стандартных образцов, а также количественную оценку. Оценке могут подлежать как полная пептидная карта, так и выбранные характеристические участки хроматограмм испытуемого и стандартного образцов. Выбор участков должен быть обоснован в ходе разработки методики и подтверждён при валидации.

Визуальной оценке, в сравнении со стандартным образцом, подлежат: общая картина элюирования, выражаемая общим числом пиков, их относительной интенсивностью, наличием характеристических пиков.

Количественной оценке подлежат: абсолютное или относительное время удерживания пиков (обычно характеристических), параметры интенсивности пиков (площадь или высота) или их относительные значения. Эта оценка может проводиться как по сравнению с внешним, так и по сравнению с внутренним стандартом.

Проводится сравнение времени удерживания и интенсивностей (площадей или высот) для выбранной группы характеристических пиков. Значения для характеристических пиков рассчитываются относительно одного пика, с наименьшей вариабельностью. Альтернативно, при оценке интенсивностей может быть рассчитан процент площади (высоты) пика каждого пептида относительно суммы площадей (высот) всех пиков. Затем полученный процент сравнивается со значением аналогичного параметра соответствующего пика стандартного образца. Идентификация пептида и соблюдение специфичности методики, кроме сравнения с пептидной картой стандартного образца, могут дополнительно подтверждаться анализом хроматографического профиля и параметров пиков смеси 1:1 (об\об) продуктов гидролиза испытуемого образца и стандартного образца.

Учитывая возможную вариабельность пептидных карт, методику дополняют рисунками хроматограмм типичных пептидных карт стандартного и испытуемого образцов с указанием пиков (групп пиков) характеристических пептидных фрагментов (реперных пиков).

Возможность присутствия на пептидной карте испытуемого образца пиков, несопоставимых с пептидной картой стандартного образца (кроме областей выхода реперных пиков), их количество, время выхода и интенсивность (относительная интенсивность) должны быть обоснованы.

Количество параллельных испытаний анализируемого и стандартного образцов указывается в методике испытаний.

**Валидация методики**

Критерии оценки пригодности системы зависят от определения критических параметров испытания, влияющих на интерпретацию данных и их приемлемость. К критическим параметрам методики пептидного картирования, подлежащим валидации, относятся специфичность, разделительная способность, прецизионность, устойчивость, а также полнота проведённого гидролиза.

Для контроля полноты требуемого расщепления используется сравнение со стандартным образцом, который был подвергнут такому же воздействию, как и испытуемый белок. Степень гидролиза может подтверждаться сопоставлением эталонной пептидной карты и фактической пептидной карты, оценкой степени инверсии белка, воспроизводимостью пептидной карты в части количества и интенсивности (относительной интенсивности) пиков и другими способами. Использование стандартного образца параллельно с испытуемым белком является критическим условием при разработке и валидации методики пептидного картирования и установления значений для критериев оценки пригодности системы.

Сопоставление эталонной и фактически полученных пептидных карт осуществляется как в ходе разработки, так и валидации методики. Эталонная и фактически полученная пептидные карты должны соответствовать друг другу. При этом не всегда возможно достичь полного соответствия фактической пептидной карты теоретической.

На фактической пептидной карте возможно присутствие сдвоенных пиков пептидных фрагментов, т.е. пиков, получаемых элюированием двух пептидных фрагментов. Наличие отдельных сдвоенных (неразделённых) пиков на пептидной карте допускается, если это не снижает надёжности подтверждения первичной структуры белка. Сдвоенные пики не должны включать пептидные фрагменты, обеспечивающие фармакологическое действие или активность лекарственного средства, т.е. критичные для свойств анализируемого белка.

Наличие сдвоенных пиков должно быть подтверждено и обосновано при разработке и валидации и указано в методике испытания.

На пептидной карте должны присутствовать пики пептидных фрагментов, содержащих участки пептида, обеспечивающих фармакологическое действие или активность лекарственного средства, т.е. критичные для свойств анализируемого белка. Возможно отсутствие отдельных пиков пептидных фрагментов, обладающих низкой интенсивностью. Отсутствие на пептидной карте отдельных пиков коротких пептидных фрагментов, обладающих низкой интенсивностью, допускается, если это не снижает надёжности подтверждения первичной структуры белка. Возможность отсутствия отдельных пиков должна быть подтверждена и обоснована при разработке и валидации методики испытания и указана в методике испытания.

Оценку пригодности хроматографической системы проводят с использованием стандартного образца.

Другие валидируемые характеристики могут включать визуальный контроль растворимости белка или пептидов, чувствительность системы, оценку откликов трудно расщепляемых пептидов, степень расщепления белка, оценку мешающего влияния плацебо, возможность автогидролиза фермента и т. д. Степень расщепления белка оценивают, определяя наличие интактного белка и измеряя его количество, используя значения интенсивности откликов пиков интактного белка.

Включение в методику испытания и валидация оценки чувствительности системы необходимы в том случае, если пики, содержащие критичные для свойств анализируемого белка пептидные фрагменты, обладают низкой интенсивностью.

При валидации специфичности методики проводится сопоставление эталонной и фактической пептидных карт изучаемого белка, а также подтверждение наличия выраженных отличий в пептидных картах изучаемого белка и белков, отличающихся от него по аминокислотной последовательности, путём сопоставления пептидных карт каждого из анализируемых белков.

Для подтверждения специфичности методики и возможности определения отличающихся по аминокислотной последовательности белков подтверждением наличия выраженных отличий в пептидных картах может быть использована охарактеризованная по составу смесь, включающая стандартный образец изучаемого белка и белка, отличного , от него по структуре. Использование охарактеризованных по составу смесей наиболее показательно в случае, если пики отличных по последовательности белков элюируются в зоне худшего разрешения на пептидной карте.

В качестве белка, отличного по структуре от испытуемого образца, может быть использован белок принципиально иной структуры, например, производимый на той же производственной площадке и сходный по молекулярной массе с испытуемым белком, или вариант испытуемого белка, отличный от него в определённых участках аминокислотной последовательности, или белок близкой структуры, но имеющий выраженные отличия в небелковой части молекулы (например, пегилированный и непегелированный варианты белка).

Критерием выбора хроматографических условий для определения структуры белка может являться число основных определяемых пептидов и её разделительная способность системы. В зависимости от испытуемого белка и используемого метода разделения могут устанавливаться требования к разрешению двух или более пептидных фрагментов. Наиболее информативной является проверка разрешения между пиками характеристичных пептидных фрагментов, и другими близко элюирущимися пиками.

Испытания продуктов гидролиза стандартного образца исследуемого белка позволяет установить количественные характеристики прецизионности валидируемой методики.

Валидируется воспроизводимость таких характеристик пептидной карты, как количество реперных пиков, интенсивность или относительная интенсивность реперных пиков (площадь или высота) и их относительное время удерживания, разрешение между пиками. Прецизионность интенсивности пиков выражается как относительное стандартное отклонение. Вариабельность методики в части извлечения белка и воспроизводимости пептидной карты идентифицируемого белка является ожидаемой. Критерии допуска для оценки пригодности системы должны быть установлены как для извлечения, так и для воспроизводимости идентифицируемых пептидных фрагментов. Установленные диапазоны приемлемых значений являются специфическими для данного белка и указываются в методике испытания.

Первоначальная оценка пептидных карт на предмет соответствия их профилей подразумевает визуальное сопоставление: оценивается наличие, относительное положение и относительные интенсивности реперных и иных пиков пептидных фрагментов. Оно дополняется и подтверждается статистической обработкой соотношений анализируемых параметров пиков и хроматографического профиля смеси 1:1 (об/об)продуктов гидролиза испытуемого образца и стандартного образца. Идентичность анализируемого образца и специфичность методики подтверждается, если все пики продуктов гидролиза анализируемого белка и стандартного образца имеют аналогичные время удерживания и соотношения оцениваемых параметров пиков.

Если один и тот же пик в профиле пептидных карт стандартного и испытуемого образцов имеет значительно отличающиеся значения относительного времени удерживания, но элюируется в смеси 1:1 единым пиком, то изначально выявленное различие является показателем нестабильности выбранной системы разделения. Однако, если в смеси 1:1 вместо одного ожидаемого пика в узкой области пептидной карты наблюдаются два разделённых или не полностью разделённых пика, или один нехарактерно уширенный пик, то это говорит о том, что в профиле пептидных карт стандартного и испытуемого образцов за пик одного и того же пептидного фрагмента ошибочно принимаю два отличных друг от друга пептидных фрагмента, обладающих близкими характеристиками удерживания.

Можно произвести множественное сравнение значений времени удерживания и площадей или высот пиков для выбранной группы соответствующих пиков, которые однозначно идентифицируются на пептидной карте. Для нивелирования влияния условий пробоподготовки и хроматографического разделения, выражающегося в вариабельности времени удерживания и интенсивностей пиков, для характеризации пиков пептидных фрагментов предпочтительно использовать относительные величины (относительное время удерживания и относительные интенсивности пиков), рассчитанные относительно одного пика, выбранного в качестве внутреннего стандарта и демонстрирующего наименьшую вариабельность или внутри группы пиков.

Использование внутреннего стандарта при оценке интенсивности пиков позволяет исключить влияние возможного неполного гидролиза пептида, воспроизводимости этапов пробоподготовки (выделение и очистки белка). Выбор внутреннего стандарта должен быть обоснован в ходе разработки методики и подтверждён при валидации. Как альтернативный вариант для испытуемого образца может быть рассчитан процент площади (высоты) пика каждого пептида относительно суммы площадей (высоты) всех пиков. Затем полученный процент сравнивается со значением аналогичного параметра соответствующего пика стандартного образца. Возможность автогидролиза фермента контролируется при помощи создания пептидной карты плацебо, получаемой при обработке ферментом раствора без определяемого белка.

В качестве внешнего стандарта используют стандартный образец идентифицируемого белка. В качестве внутреннего стандарта используется один из пиков пептидной карты, демонстрирующий наименьшую вариабельность в части своего времени удерживания и интенсивности (высоты или площади).

Устойчивость (робастность) выбранных хроматографических условий и системы должна быть оценена на достаточном уровне. При этом проводится оценка использования аналогичных реактивов, в том числе ферментов разных производителей; хроматографических колонок, рассматриваемых как аналогичные; возможности проведения анализа на оборудовании разных производителей и пр.

**Критерии пригодности системы разделения пептидных фрагментов**

Пригодность системы разделения пептидных фрагментов должна быть разработана и включена в методику испытаний.

Нормы к каждому из критериев пригодности системы разделения, рассмотренных ниже, а также иные критерии, специфичные для каждого идентифицируемого пептида, необходимые для подтверждения соблюдения валидированного уровня специфичности, воспроизводимости и чувствительности системы, должны быть установлены при разработке методики и подтверждены в ходе валидации.

В оценку пригодности системы в методике испытания на лекарственное средство включают:

- соответствие фактически полученной пептидной карты гидролизата стандартного образца пептидной карте, прилагаемой к указанному стандартному образцу в части общей картины элюирования, выражаемая общим числом пиков, их относительной интенсивностью, наличием всех характеристических пиков;

- соответствие фактической разделительной способности системы установленным валидированным требованиям. Оценка разделительной способности проводится путём оценки разрешения или соотношения пик/долина между критичной парой пиков;

- прецизионность времени удерживания или относительного времени удерживания пиков пептидных фрагментов или характеристических пиков;

- прецизионность интенсивности или относительной интенсивности характеристических пиков (высоты или площади). Прецизионность оценивается величиной относительного стандартного отклонения;

- отсутствие на пептидной карте раствора плацебо (холостого образца) пиков в интервале, соответствующем времени выхода пиков пептидных фрагментов идентифицируемого белка.

Наряду с перечисленными критериями могут оцениваться и другие параметры (например, ширина пиков у основания, фактор асимметрии) в случае, если контроль этих параметров необходим для подтверждения пригодности системы и прецизионности получаемых результатов.