



Разработка и валидация методики пептидного картирования инновационного препарата ингибитора C1 эстеразы

Е.В. Зубарева[✉], М.Б. Дегтерев, М.Ю. Неронова, М.А. Смолов, Р.Р. Шукуров

Акционерное общество «Генериум», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Зубарева Екатерина Валерьевна; zubareva@ibcgenerium.ru

Резюме

Пептидное картирование является одним из ключевых методов изучения первичной структуры белка. Метод чувствителен даже к малейшим изменениям в ковалентной структуре белка, что позволяет использовать его для проверки подлинности препарата на стадии контроля и мониторинга стабильности производственного процесса.

Цель работы: разработка и валидация методики пептидного картирования для подтверждения подлинности инновационного высокогликозилированного рекомбинантного белка — ингибитора C1 эстеразы.

Материалы и методы: рекомбинантный ингибитор C1 эстеразы человека, трипсин. Исследование проводили методом пептидного картирования с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) и метода масс-спектрометрии высокого разрешения. Результаты оценивали с применением статистических методов расчета среднего арифметического, стандартного отклонения, коэффициента вариации. Методику валидировали по показателям: специфичность, прецизионность и устойчивость.

Результаты: апробированы разные варианты пробоподготовки трипсинолизатов, включая дополнительную обработку белка N-гликаназой и полное дегликозилирование. Подобраны условия пробоподготовки и хроматографического разделения пептидов ингибитора C1 эстеразы с получением стабильного профиля пептидной карты. Разработаны и определены реперные пики, а также диапазоны их относительных времен удерживания и относительной площади. Абсолютное время удерживания второго (референтного) пика составило 16,5–16,9 мин. Относительное время удерживания пика 9 — 2,14–2,21, пика 12 — 2,55–2,64, пика 14 — 2,97–3,14, пика 15 — 3,11–3,29 и пика 28 — 6,20–6,63.

Выводы: разработана методика пептидного картирования ингибитора C1 эстеразы. Оптимизация условий методики позволила сократить время пробоподготовки более чем на 18 ч. Разработанная методика по валидационным характеристикам специфичности, прецизионности и устойчивости соответствовала установленным критериям приемлемости.

Ключевые слова: ингибитор C1 эстеразы; рекомбинантный белок; валидация аналитической методики; пептидное картирование; ОФ ВЭЖХ

Для цитирования: Зубарева Е.В., Дегтерев М.Б., Неронова М.Ю., Смолов М.А., Шукуров Р.Р. Разработка и валидация методики пептидного картирования инновационного препарата ингибитора C1 эстеразы. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):203–218. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-203-218>

Development and validation of a peptide-mapping procedure for a novel C1 esterase inhibitor

E.V. Zubareva[✉], M.B. Degterev, M.Yu. Neronova, M.A. Smolov, R.R. Shukurov

Generium JSC, 14 Vladimirskaia St., Volginsky, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Ekaterina V. Zubareva; zubareva@ibcgenerium.ru

Abstract

Peptide mapping is a key method for studying the primary structure of proteins. With its sensitivity to the slightest changes in the covalent structure of a protein, this method is applicable both to medicinal product identification at the control stage and to production process stability monitoring. **The aim of the study** was to develop and validate a peptide-mapping procedure for the identification of a novel highly glycosylated recombinant C1 esterase inhibitor.

Materials and methods. The authors studied recombinant human C1 esterase inhibitor products and trypsin. The study involved peptide mapping using reverse-phase high-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry. The following statistics were calculated to evaluate the results: mean, standard deviation, and coefficient of variation. The validation parameters included specificity, precision, and robustness.

Results. The authors tested several variants of sample preparation for tryptic digests, including additional N-glycanase treatment and complete deglycosylation, and established the optimal conditions for sample preparation and chromatographic separation of C1 esterase inhibitor peptides to obtain consistent chromatographic profiles (peptide maps). The authors identified characteristic peaks and the corresponding relative retention time and area ranges. The absolute retention time of the second (characteristic) peak was approximately 16.5–16.9 minutes. The relative retention times were 2.14–2.21 for peak 9, 2.55–2.64 for peak 12, 2.97–3.14 for peak 14, 3.11–3.29 for peak 15, and 6.20–6.63 for peak 28.

Conclusions. The authors developed a peptide-mapping procedure for C1 esterase inhibitors and optimised the conditions to achieve an over 18-hour reduction in sample preparation time. This procedure met the established acceptance criteria for specificity, precision, and robustness.

Key words: C1 esterase inhibitor; recombinant protein; analytical method validation; peptide mapping; RP-HPLC

For citation: Zubareva E.V., Degterev M.B., Neronova M.Yu., Smolov M.A., Shukurov R.R. Development and validation of a peptide-mapping procedure for a novel C1 esterase inhibitor. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):203–218. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-203-218>

Введение

В настоящее время разработка биотерапевтических препаратов осуществляется все быстрее, причем более половины из них составляют моноклональные антитела [1]. С другой стороны, препараты для ферментозаместительной терапии, обладая не меньшей терапевтической значимостью, не так распространены в силу их большей, в сравнении с моноклональными антителами, сложностью и гетерогенностью. Этими же причинами определяется и некоторый недостаток публикаций о разработке и валидации аналитических методик контроля качества таких белков.

Оценка подлинности рекомбинантных лекарственных препаратов является необходимым критерием контроля их качества¹. Одним из вариантов методик, используемых для под-

тверждения подлинности, является пептидное картирование, позволяющее подтвердить первичную структуру белка и ее соответствие ожидаемой, что является фундаментальным требованием контроля качества². Ввиду многообразия получающихся вариантов молекулы эффективная идентификация, мониторинг и контроль первичной структуры имеют решающее значение при разработке биопрепаратов [2].

Типичный протокол подготовки образцов для пептидного картирования предусматривает денатурацию белка, восстановление дисульфидных связей и алкилирование свободных тиолов с последующим трипсинолизом. Полученные пептиды хроматографически разделяют и анализируют. После подбора условий пробоподготовки и последующего хроматографического разделения пики пептидов иденти-

¹ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0007.15 Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

ICH Q6B. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. EMA; 1999.

² Общая фармакопейная статья 1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

фицируют с помощью масс-спектрометрии (МС). Для дальнейшего рутинного контроля метод МС может не использоваться, а вместо него применяют детектор УФ-диапазона.

Основные проблемы разработки методики пептидного картирования — это вариативность процедур пробоподготовки, вариативность хроматографических условий разделения пептидов, включая выбор колонки, подвижной фазы, скорости потока и др., а также отличия между системами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) разных производителей, увеличивающие погрешность методики. Существует необходимость индивидуального подхода к подбору условий пробоподготовки, что обусловлено природой конкретного белка, притом что данный подход может быть основан на базе общих правил. Так, например, эффективное обессоливание образца перед трипсинолизом повышает эффективность последнего [3]. В этом случае особенно важно удалить ионы гуанидина, являющегося конкурентным ингибитором связывания трипсина. Другим примером является подбор буферного раствора для трипсинолиза: например, часто применяемый для этого бикарбонат аммония, который хоть и обладает оптимальным диапазоном pH для трипсина (7,0–8,5), не может обеспечить его максимальной активности, что требует увеличения времени инкубации и, как следствие, может приводить к появлению дополнительных дезамидированных форм [4]. С другой стороны, трис(гидроксиметил)-аминометан гидрохлоридный и другие буферные растворы [5–7] обеспечивают значительно более быстрый протеолиз, минимизируя появление артефактных модификаций.

В настоящей работе представлена разработка и валидация методики пептидного картирования инновационной молекулы — рекомбинантного ингибитора C1 эстеразы человека (rh-C1inh). Данная молекула была разработана российской фармацевтической компанией АО «Генериум» в качестве замены существующих препаратов ингибитора C1 эстеразы (C1 ингибитора) зарубежных производителей. Инновационность разработанного препарата заключается в способе получения белка — на рынке не существует аналогов C1 ингибитора, получаемых с применением культуры клеток яичника китайского хомячка (Chinese Hamster Ovary, CHO). Молекула имеет сложную двудоменную структуру. Молекула ингибитора C1 эстеразы человека представляет собой одноцепочечную линейную последовательность из 478 аминокислот,

включая С-концевой серпиновый домен и уникальный несерпиновый N-концевой домен, состоящий из 113 аминокислот. Теоретическая молекулярная масса составляет 52849 Да [8]. Четыре цистеина образуют две дисульфидные связи между серпиновым и несерпиновым доменами: Cys101–Cys406 и Cys108–Cys183. Другой посттрансляционной модификацией, обуславливающей высокую гетерогенность исследуемого белка, является гликозилирование, что связано с наличием большого количества сайтов и разнообразия гликанов. Всего было идентифицировано более двенадцати сайтов O-гликозилирования и шесть сайтов N-гликозилирования (рис. 1). В связи с этим выбор продуцента играет ключевую роль в правильном формировании гликопрофиля, непосредственно влияющего на терапевтическую эффективность и безопасность препарата.

В мире представлено несколько препаратов C1 ингибитора, в том числе препарат Беринерт®, получаемый из плазмы крови, и рекомбинантный Руконест®, выделяемый из молока трансгенных кроликов. При помощи разработанной нами методики была оценена сопоставимость препаратов C1 ингибитора (инновационного и коммерчески доступных) с помощью пептидного картирования.

Цель работы — разработка и валидация методики пептидного картирования для подтверждения подлинности инновационного высокогликозилированного рекомбинантного белка — ингибитора C1 эстеразы.

Материалы и методы

Препараты:

- исследуемый образец — инновационный препарат, рекомбинантный ингибитор C1 эстеразы (C1 ингибитор, rh-C1inh), 150 МЕ/мл (18,0 мг/мл), производства АО «Генериум»;
- Руконест® (конестат альфа) производства Pharming Group N.V., Нидерланды; рекомбинантный препарат, получаемый из молока трансгенных кроликов⁴;
- Беринерт® производства CSL BEHRING, GmbH, Германия; плазменный препарат, получаемый из крови человека [9].

Реактивы и материалы

Для приготовления денатурирующих растворов использовали гуанидин гидрохлорид (PanReac, кат. № A3240), мочевины (Sigma-Aldrich, кат. № U5128), трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид (PanReac, кат. № A3452). Вос-

³ <https://www.uniprot.org/uniprot/P05155/protvista>

⁴ Rucnec. EMA; 2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rucnec>

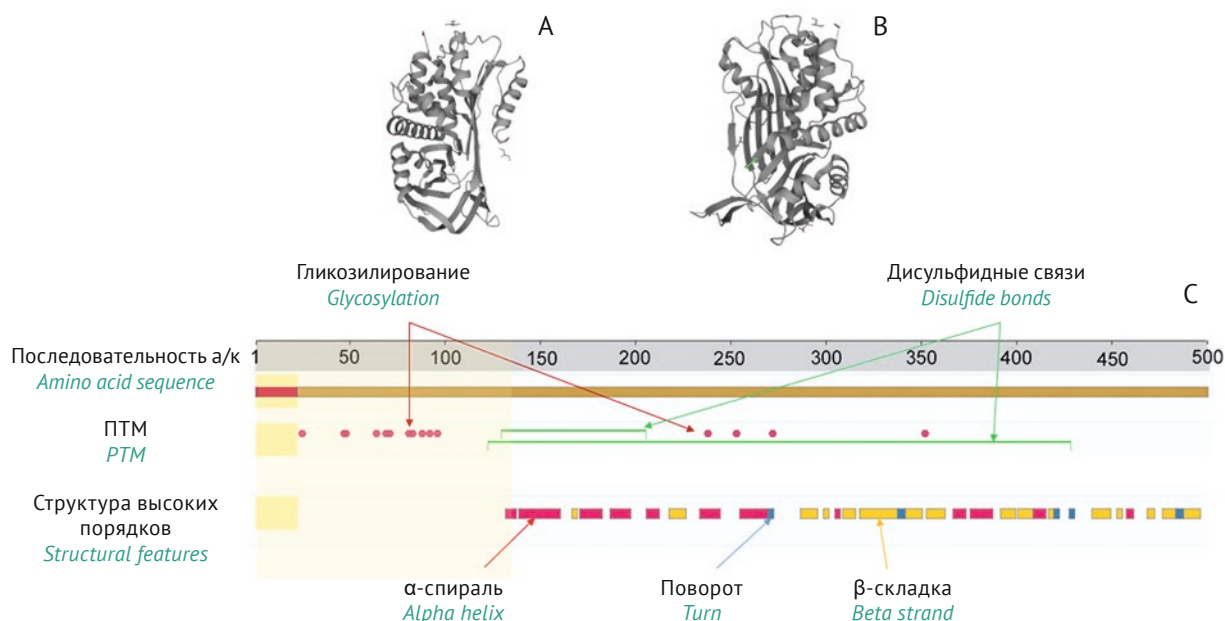


Рис. 1. Структура C1 ингибитора³: А и В — пространственная организация; С — схематическое изображение. Красным отрезком обозначен сигнальный пептид (1–22 аминокислоты, а/к), желтым полупрозрачным квадратом обозначен N-концевой домен. PTM — посттрансляционная модификация.

Fig. 1. C1 inhibitor structure: A and B, spatial organisation; C, schematic representation³. The red segment represents the signal peptide (amino acids 1–22), and transparent yellow rectangles mark the N-terminal domain. PTM, post-translational modification.

становление дисульфидных связей проводили дитиотреитолом (Sigma-Aldrich, кат. № D0632), алкилирование — йодацетамидом (PanReas, кат. № A1666,0025). Для перевода белка в другой буферный раствор использовали гель-филтрационные колонки для обессоливания Zeba Spin Desalting Column, 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific, B2162579). При подборе подвижных фаз использовали модификаторы: муравьиную кислоту (Acros Organics, кат. № 147930010) или дифторуксусную кислоту (Waters, США, кат. № 186009201) в комбинации с формиатом аммония (Fisher Chemical, кат. № A115) и ацетонитрилом (J.T. Baker, кат. № 9012; Merck, кат. № 1.00030.2500). При обработке белка использовали ферменты N-гликаназа (Sigma-Aldrich, кат. № P7367), трипсин (Promega, кат. № V5111), химотрипсин (Promega, кат. № V1062), эндопротеаза Lys-N (Promega, кат. № VA1180), эндопротеаза Glu-C (Promega, кат. № V1651), эндопротеаза Asp-N (Promega, кат. № V1621), OpeRATOR® (Genovis, Швеция, кат. № G2-OP1-020).

Оборудование

Разработку и валидацию методики ВЭЖХ проводили с использованием хроматографа Alliance e2695 (Waters, США), оснащенного детектором поглощения в УФ-области, с помощью программного обеспечения Empower (Waters). Идентификацию пептидов проводили с использованием хроматографа Nexera X2 (Shimadzu,

Япония), оснащенного масс-спектрометрическим детектором Q Exactive HF Biopharma (Thermo Fisher Scientific, США).

Методы

Пептидное картирование с использованием ОФ ВЭЖХ с УФ-детектором. Исследуемые образцы разбавляли денатурирующим буфером (100 мМ трис-гидрохлорид pH 7,8, 6 М гуанидин, 1 мМ ЭДТА) до расчетной концентрации целевого белка 1 мг/мл. Проводили восстановление дисульфидных связей в присутствии 5 мМ дитиотреитола в течение 1 ч при температуре 5 °С. После восстановления образцы алкилировали обработкой раствором 5 мМ йодацетамида в течение 1 ч при 5 °С в темноте. С помощью гель-филтрационных колонок Zeba Spin Desalting Column, 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific) образцы переводили в реакционный буфер (100 мМ трис-гидрохлорид pH 7,8). К образцам элюатов объемом 500 мкл добавляли по 20 мкг раствора трипсина, перемешивали и инкубировали при температуре 37 °С в течение 2 ч. Реакцию останавливали внесением 5 мкл муравьиной кислоты. Растворы центрифугировали в течение 3–5 мин при скорости 13500±50 g, после чего отбирали 300 мкл супернатанта и анализировали при помощи ОФ ВЭЖХ.

Хроматографические условия были подобраны индивидуально для каждого эксперимента и приведены в разделе «Результаты и обсуждение».

ВЭЖХ-МС/МС для анализа первичной структуры. Анализ проводили с помощью системы ВЭЖХ Nexera X2 (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектором Q Exactive HF Biopharma (Thermo Fisher Scientific, США), используя программное обеспечение Chromeleon v.7.2.10 (Thermo Fisher Scientific, США).

Восстановление и алкилирование дисульфидных связей 50 мкг rh-C1inh проводили в присутствии 0,025 М триэтиламмония бикарбоната, 0,01 М ТСЕР и хлорацетамида в соотношении 1:25. Полученную смесь инкубировали при температуре 80 °С при встряхивании в течение 30 мин. После инкубации образцы высушивали на вакуумном концентраторе CentriVar (Labconco, США). Сухой остаток растворяли в объеме 20 мкл 0,05 М раствора триэтиламмония бикарбоната. Далее полученный раствор разделяли на пять частей. Ферментативную обработку проводили по схеме, приведенной в таблице 1. Реакцию останавливали добавлением 1 мкл муравьиной кислоты.

Хроматографические условия приведены в разделе «Результаты и обсуждение» (программа градиента 3). Разделение пептидов проводили на колонке AdvanceBio Peptide Map (2,1×150 мм, с размером частиц 2,7 мкм, кат. № 653750-902, Agilent Technologies, США) с использованием подвижных фаз: фаза А — 0,1% дифторуксусная кислота в воде; фаза Б — 0,1% дифторуксусная кислота в ацетонитриле; элюирование в режиме линейного градиента (0–40% фазы Б за 95 мин и 40–60% фазы Б за 10 мин); регистрация сигналов — в режиме положительной ионизации и дата-зависимого тандемного сканирования. Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение Biopharma Finder v.3.2 (Thermo Fisher Scientific) и Peaks AB

v.2.0 (Bioinformatics Solutions). При этом учитывали химические (карбамидометилирование, образование аддуктов с ионами натрия, формилирование, отщепление воды) и посттрансляционные (гликозилирование, деградация аспарагина и деаминарование глутамин, гликирование, окисление метионина и триптофана) модификации.

Статистическая обработка результатов.

Для оценки результатов валидации (прецизионности) использовали статистические методы анализа⁵ с вычислением среднего арифметического, среднеквадратичного отклонения *SD* и относительного стандартного отклонения *RSD*, %.

Расчет интервала значений относительного времени удерживания и относительной площади проводили для каждого реперного пика. Для этого, используя статистику валидационных измерений, рассчитывали среднее арифметическое значение и среднеквадратичное отклонение. Интервал значений относительных величин представляет собой величину среднего арифметического значения с учетом отклонений в большую и меньшую сторону на величину *3SD*.

Результаты и обсуждение

Разработку и валидацию методики пептидного картирования C1 ингибитора для подтверждения подлинности выполняли с учетом требований регламентирующих документов: общей фармакопейной статьи (ОФС) 1.7.2.0035.18 Пептидное картирование Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV), монографий Европейской фармакопеи (10 изд.)⁶ и Фармакопеи США (USP 43–NF 38)⁷. Особое внимание было уделено следующим критериям:

- соответствию исследуемых образцов нормам существующей спецификации;
- контролю полноты проведения трипсинолиза;

Таблица 1. Схема ферментативной обработки образцов C1 ингибитора для масс-спектрометрической идентификации
Table 1. Enzyme treatment of C1 inhibitor samples for mass-spectrometry identification

Вариант обработки <i>Treatment variant</i>	Проба 1 <i>Sample 1</i>	Проба 2 <i>Sample 2</i>	Проба 3 <i>Sample 3</i>	Проба 4 <i>Sample 4</i>	Проба 5 <i>Sample 5</i>
Фермент <i>Enzyme</i>	химотрипсин <i>chymotrypsin</i>	трипсин <i>trypsin</i>	Asp-N	Glu-C	Lys-N
Вносимый объем, мкл <i>Added volume, µL</i>	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Температура, время <i>Temperature, time</i>	37 °C, 3 ч <i>37 °C, 3 h</i>	37 °C, 16 ч <i>37 °C, 16 h</i>	37 °C, 16 ч <i>37 °C, 16 h</i>	37 °C, 16 ч <i>37 °C, 16 h</i>	37 °C, 16 ч <i>37 °C, 16 h</i>

Примечание. Asp-N — эндопротеаза Asp-N; Glu-C — эндопротеаза Glu-C; Lys-N — эндопротеаза Lys-N. Концентрация для каждого фермента — 1 мг/мл.

Note. Asp-N, endoproteinase Asp-N; Glu-C, endoproteinase Glu-C; Lys-N, endoproteinase Lys-N. The concentration of each enzyme was 1 mg/mL.

⁵ Общая фармакопейная статья 1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁶ 2.2.55 Peptide mapping. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2021.

⁷ <1055> Biotechnology-derived articles — Peptide mapping. USP 43–NF 38; 2009.

- выбору реперных пиков для оценки пригодности системы (они должны быть интенсивными, хорошо отделимыми от соседних, наиболее стабильными среди независимых повторностей; при выборе реперных пиков отдавали предпочтение пикам фрагментов белка, отвечающих за каталитическую способность);
- идентификации не менее 95% аминокислотной последовательности молекулы⁸.

Критериями оценки профиля хроматографического разделения в процессе разработки методики являлись:

- количество критических пар/областей (неразделенных пиков) не более 30% от всех пиков;
- минимизация количества и интенсивности пиков холостой пробы;
- минимальная асимметричность пиков;
- перекрестное загрязнение не более 1% по суммарной площади пиков.

После выбора условий хроматографического разделения проводили масс-спектрометрическую идентификацию пиков пептидов.

Разработка методики

При разработке методики пептидного картирования С1 ингибитора проводили подбор условий пробоподготовки и хроматографирования. В качестве примера типичного протокола пробоподготовки использовали данные из работы Т. Mouchaioir и J.E. Schiel [4]. Однако ввиду того что исследуемая молекула rh-C1inh характеризуется крайне высокой гетерогенностью, достижение заданных хроматографических параметров потребовало снижения сложности смеси протеолитических пептидов. Самым простым способом достижения этого стало дополнение пробоподготовки стадией тотального отщепления N-гликанов. Для этого белок обрабатывали 50 Ед раствора N-гликаназы в течение 16 ч. Далее пробоподготовку осуществляли по схеме, приведенной в разделе «Пептидное картирование с использованием ОФ ВЭЖХ с УФ-детектором».

Таблица 2. Программа градиента 1

Table 2. Gradient programme 1

Интервал, мин <i>Interval, min</i>	Подвижная фаза Б, % <i>Mobile phase B, %</i>
0→60	1→40
60→61	40→99
61→65	99
65→70	99→1
70→80	1

На рисунке 2 представлена хроматограмма дегликозилированного образца С1 ингибитора (deN-Glc rh-C1inh), полученная при использовании программы градиента 1 (табл. 2). При проведении подбора хроматографических колонок начинали с колонки Delta Pack C18 (2,1×150 мм, с размером частиц 5 мкм, кат. № WAT023650, Waters, США). Использовали следующие хроматографические условия:

- подвижная фаза А: 0,1 % муравьиная кислота в воде;
- подвижная фаза Б: 0,1 % муравьиная кислота в ацетонитриле;
- скорость потока: 0,3 мл/мин;
- температура колонки: 45±2 °С;
- температура образцов: от 2 до 8 °С;
- УФ-детектор: 210 нм (с применением фильтра MBF);
- объем инъекции: 20 мкл.

Полученный хроматографический профиль (рис. 2) представлял собой набор плохо разделяемых компонентов, формирующих большое количество критических пар и затрудняющих выбор реперных пиков. Наблюдалось не более семи интенсивных пиков с высоким разрешением, причем два из них (с временами удерживания 50 и 60 мин) в случае незначительных изменений в условиях анализа могли либо сливаться с соседними пиками, либо элюироваться за пределами аналитического градиента — на стадии промывания колонки.

Предполагая, что пик, появляющийся на стадии отмычки колонки (рис. 2, пик указан красной стрелкой), содержит наиболее гидрофобные пептиды, далее были внесены изменения в программу градиента для увеличения его крутизны и финального содержания ацетонитрила (подвижная фаза Б) в системе до максимально возможного уровня (градиент 2, табл. 3).

Однако было показано, что на более крутом градиенте пика гидрофобные пептиды обнаружить не удалось (рис. 3). Кроме того, наблюдалось дальнейшее ожидаемое снижение хроматографического разрешения. Было отмечено наличие двух групп гидрофобных компонентов в виде крайне размытых хроматографических пиков на 54–66 мин хроматограммы (на рис. 3 указаны красной стрелкой). Дальнейшая коррекция хроматографических условий на данной колонке не привела к улучшению результатов.

Таким образом, наличие большого количества низкоинтенсивных пиков и неудовлетворительное хроматографическое разрешение (рис. 2, 3)

⁸ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2.; 2018.

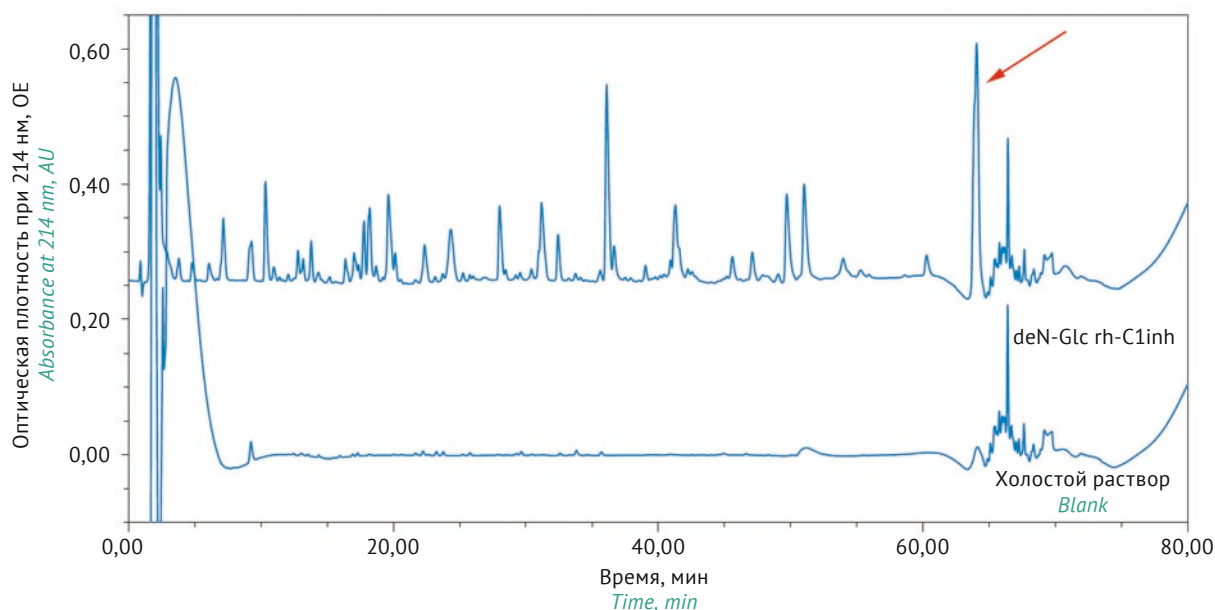


Рис. 2. Хроматограмма дегликозилированного при помощи N-гликаназы C1 ингибитора (deN-Glc rh-C1inh), полученная с использованием колонки Delta Pack C18 по программе градиента 1. Красной стрелкой отмечены сильно удерживаемые компоненты, элюирующиеся на стадии промывания колонки.

Fig. 2. Chromatogram of a de-N-glycosylated C1 inhibitor (deN-Glc rh-C1inh) obtained on a Delta Pack C18 column using gradient programme 1. The red arrow indicates highly retained components eluting during the column wash step.

привели к решению исключить колонку Delta Pack C18 из разработки методики.

Для дальнейших испытаний была выбрана колонка AdvanceBio Peptide Map. Учитывая большое количество пиков пептидов и гидрофобные варианты, изменили программу градиента (градиент 3, табл. 4).

Полученная хроматограмма характеризовалась более подходящим профилем разделения пиков по сравнению с предыдущими результатами (рис. 2). Среди пиков можно было выбрать семь потенциальных реперных (рис. 4). Удалось сфокусировать пики гидрофобных пептидов (на рис. 4 указаны красной стрелкой). Однако проблема большого количества малоинтенсивных пиков все еще не была разрешена. Более того, на хроматограмме холостого раствора были детектированы пики, коэлюирующие с пиками пептидов исследуемого белка (на рис. 4 обозначены серой стрелкой), возможно, являющиеся фрагментами N-гликаназы или результатами автолиза трипсина.

Принимая во внимание, что исследуемая молекула rh-C1inh гликозилирована и по N-, и по O-типу, было сделано предположение о том, что причиной большого количества пиков могут быть гликоформы не только N-типа, но и O-типа гликанов. Чтобы проверить эту гипотезу, для дальнейшего снижения гетерогенности образец rh-C1inh был полностью дегликозилирован (deN/O-Glc rh-C1inh) с помощью набора OPERATOR®. Кроме этого,

для дополнительного повышения хроматографического разрешения в состав подвижной фазы А был введен дополнительный компонент в виде 20 мМ формиата аммония (рис. 5).

Результаты анализа показали, что изменение состава подвижной фазы А не привело к улучшению разрешения пиков дегликозилированного образца. Пептидная карта белка даже после полного дегликозилирования не имела существенных преимуществ перед предыдущими картами. В связи с этим следующим шагом в разработке стала оценка необходимости дегликозилирования rh-C1inh перед трипсинолизом.

Среди представленных хроматограмм наиболее приемлемой оказалась карта гликозилированного rh-C1inh. Этот факт опроверг предыдущую гипотезу вклада гликопептидов в многообразие пиков. Поскольку само присутствие модификации гликозилирования C1 ингибитора является важным для ингибирующей

Таблица 3. Программа градиента 2
Table 3. Gradient programme 2

Интервал, мин <i>Interval, min</i>	Подвижная фаза Б, % <i>Mobile phase B, %</i>
0→120	1→99
120→125	99
125→130	1→99
130→135	1

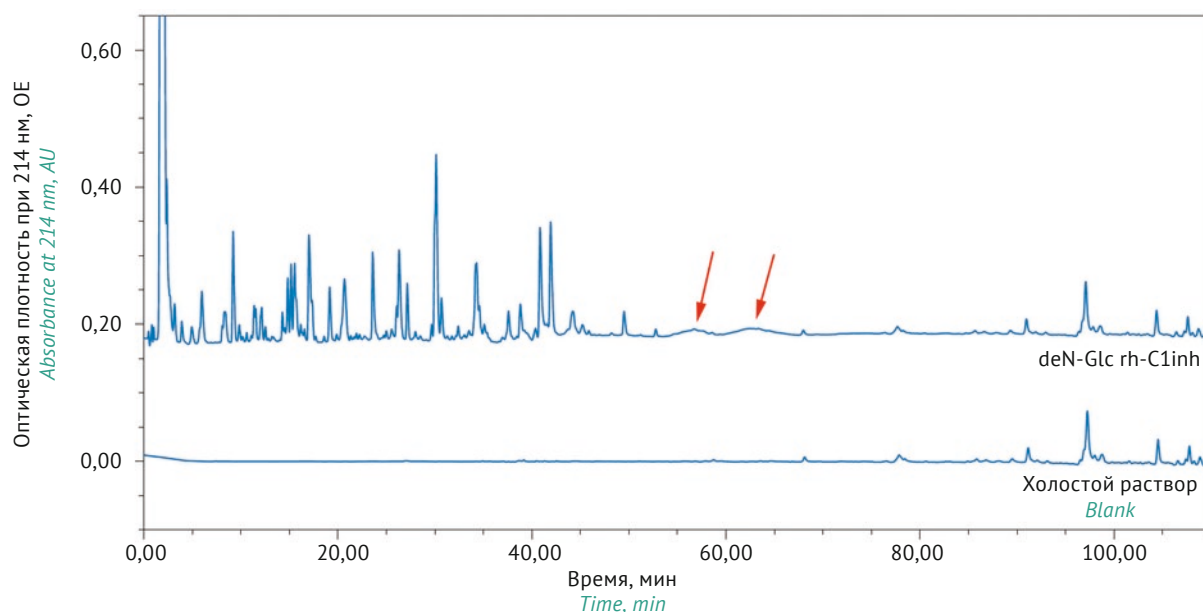


Рис. 3. Хроматограмма N-дегликозилированного C1 ингибитора (deN-Glc rh-C1inh), полученная с использованием колонки Delta Pack C18 по программе градиента 2. Красной стрелкой обозначена область элюирования наиболее гидрофобных пептидов.

Fig. 3. Chromatogram of an N-deglycosylated C1 inhibitor (deN-Glc rh-C1inh) obtained on a Delta Pack C18 column using gradient programme 2. Red arrows indicate the elution region of the most hydrophobic peptides.

активности, то наличие характеристических областей (рис. 5) является показательным. Так, области 1, 2 и 3 (рис. 5), очевидно, содержат гликопептиды, так как после последовательной обработки N-гликаназой, сиалидазой и O-гликаназой наблюдали значительное снижение интенсивности соответствующих пиков. То есть, несмотря на наличие зон неразделенных пиков, пептидная карта гликозилированного rh-C1inh оказалась наиболее информативной.

На хроматограмме гликозилированного rh-C1inh можно отметить восемь потенциальных реперных пиков преимущественно с высокой интенсивностью и хорошо отделяемых от соседних на всем диапазоне градиента. Количество низкоинтенсивных пиков при введении в водную фазу буферного агента формиата аммония су-

щественно сократилось. Проблема присутствия «шума» была решена.

Исходя из результатов эксперимента, стадия дегликозилирования rh-C1inh перед трипсинолизом была исключена из протокола пробоподготовки методики пептидного картирования, что сократило его время более чем на 18 ч.

Для разделения критических пар пиков можно изменять как длительность, так и наклон градиента. Однако в данном случае увеличение длительности градиента привело бы к неоправданному увеличению времени анализа. С другой стороны, изменение наклона градиента могло непредсказуемо повлиять на разрешение уже хорошо разделенных пиков и интенсивность пиков гидрофобных пептидов, как это было в начале исследования (рис. 2). Исходя из этих ограничений, далее проводили варьирование других параметров: состав подвижных фаз, скорость потока и температура колонки. Муравьиная кислота была заменена другим ион-парным реагентом – дифторуксусной кислотой (ДФА), обладающей большей ионной силой и при этом не подавляющей ионизацию аналитов при использовании масс-спектрометрического детектора. Скорость потока фазы была снижена с 0,3 до 0,25 мл/мин. Температура колонки для усиления массообмена была увеличена с 45 до 65 °С. Крутизну градиента тоже скорректировали, чтобы улучшить разделение

Таблица 4. Программа градиента 3

Table 4. Gradient programme 3

Интервал, мин <i>Interval, min</i>	Подвижная фаза Б, % <i>Mobile phase B, %</i>
0→3	0
3→120	0→59
120→125	59→100
125→135	100→0
135→140	0

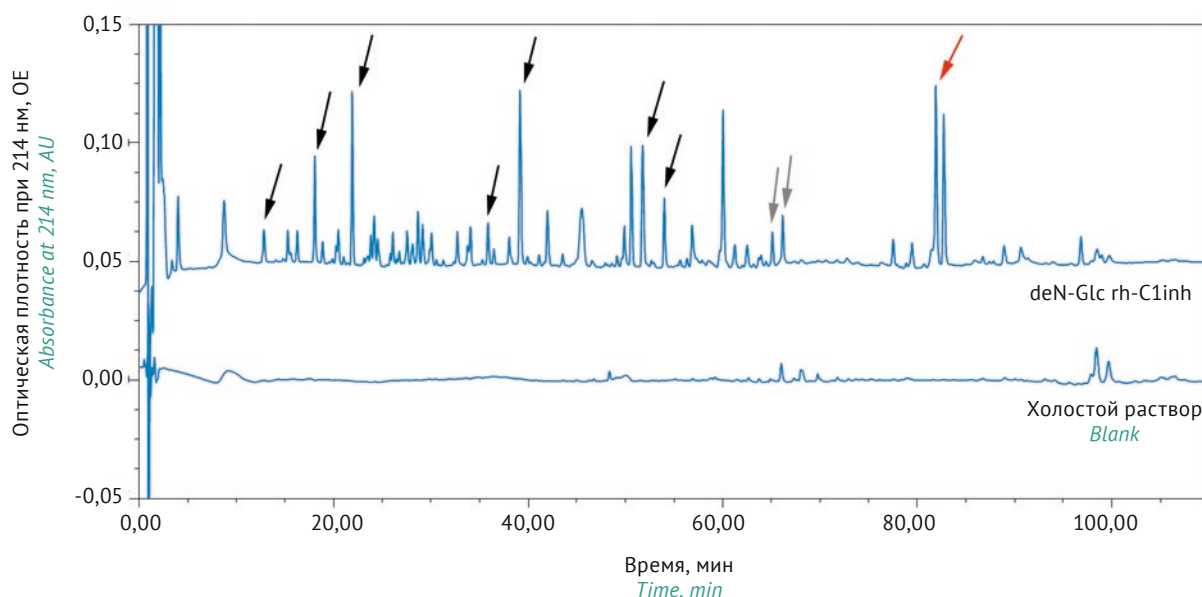


Рис. 4. Хроматограмма N-дегликозилированного C1 ингибитора (deGlc rh-C1inh), полученная с использованием колонки AdvanceBio Peptide Map по программе градиента 3. Черная стрелка — потенциальные реперные пики; серая стрелка — пики пептидов C1 ингибитора, коэлюирующие с примесными пиками холостого раствора; красная стрелка — пики гидрофобных пептидов.

Fig. 4. Chromatogram of an N-deglycosylated C1 inhibitor (deGlc rh-C1inh) obtained on an AdvanceBio Peptide Map column using gradient programme 3. Black arrows show potential characteristic peaks. Grey arrows indicate the peaks of C1 inhibitor peptides co-eluting with the impurity peaks in the blank chromatogram. The red arrow marks the most hydrophobic peptides.

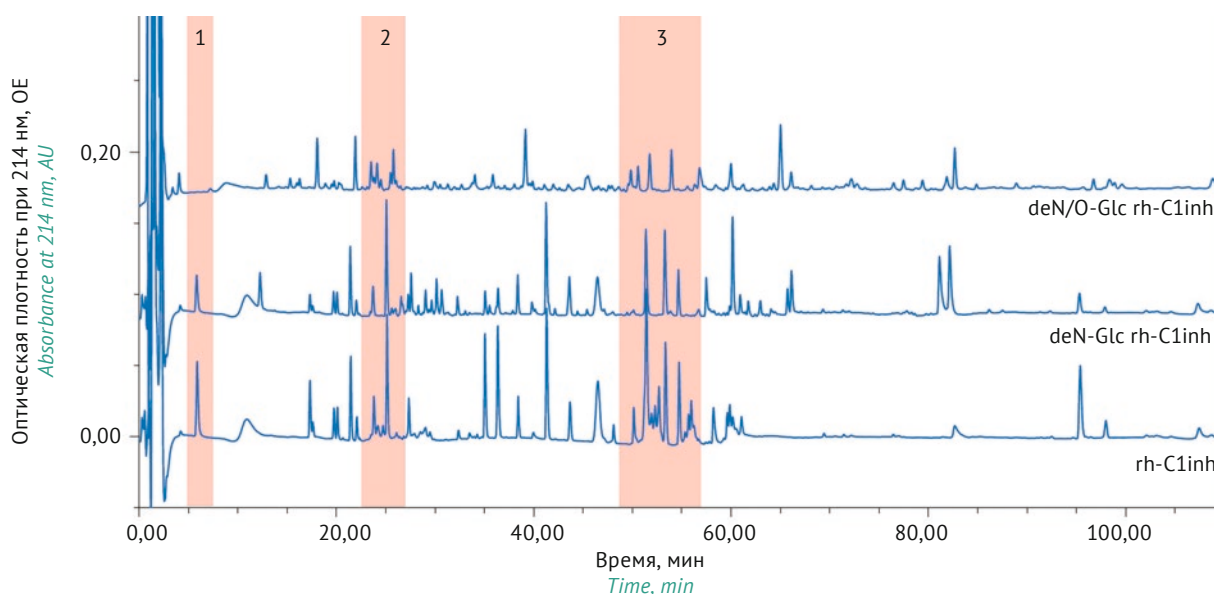


Рис. 5. Сравнение хроматограмм интактного C1 ингибитора (rh-C1inh), N-дегликозилированного (deN-Glc rh-C1inh) и полностью дегликозилированного rh-C1inh (deN/O-Glc rh-C1inh), полученных с использованием колонки AdvanceBio Peptide Map по программе градиента 3. Красным цветом выделены наиболее вариативные области.

Fig. 5. Comparison of chromatograms of intact (rh-C1inh), N-deglycosylated (deN-Glc rh-C1inh), and fully deglycosylated (deN/O-Glc rh-C1inh) C1 inhibitor forms obtained on an AdvanceBio Peptide Map column using gradient programme 3. The most variable regions are highlighted in red.

пиков (градиент 4, табл. 5). Использовали следующие хроматографические условия:

- подвижная фаза А: 0,1% ДФА в воде;
- подвижная фаза Б: 0,1% ДФА в ацетонитриле;
- скорость потока: 0,25 мл/мин;
- температура колонки: 65±2 °С.

Полученные результаты (рис. 6) соответствовали требованиям приемлемости к оценке пептидной карты. Разработанные условия хроматографирования подходили для рутинного анализа. Таким образом, благодаря оптимизации условий хроматографирования и пробоподготовки уда-

лось не только улучшить хроматографическое разделение пиков высокогликозилированного белка rh-C1inh, но и сократить длительность пробоподготовки с одних суток до 5–6 ч.

На следующем этапе проводили выбор реперных пиков. Для их обоснования, помимо стабильности, интенсивности и удовлетворительного разрешения, необходима идентификация пептидов⁹. Наиболее информативным исследованием в данном случае является определение аминокислотной последовательности пептидов методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения с последующим сопоставлением результатов с известной первичной структурой белка. В таблице 6 приведена расшифровка пептидных фрагментов.

Суммарно идентифицированные пептидные фрагменты составили 82,5% аминокислотной последовательности rh-C1inh [10]. Необходимо отметить, что использование только трипсина для получения пептидных фрагментов с целью 100% покрытия аминокислотной последовательности rh-C1inh на ВЭЖХ-МС/МС проблематично. Это связано, во-первых, с наличием более 12 сайтов О-гликозилирования (рис. 1, 7), одной из функций которых является защита от протеолитической деградации С1 ингибитора [11], а во-вторых – с отсутствием специфических сайтов рестрикции трипсином (лизин, К, и аргинин, R) на довольно протяженном участке (рис. 7, последовательность аминокислот 59–96). Это придает данному фрагменту высокую гетерогенность, выражающуюся в наличии множества частично коэлюирующих пептидных вариантов, не формирующих интенсивного хроматографического пика, трудно детектируемых даже при помощи масс-спектрометрии, а также вызывает сложности с масс-спектрометрической идентификацией как по значениям молекулярных масс, так и по спектрам фрагментных ионов.

Для полного покрытия первичной последовательности был проведен анализ с использованием разных ферментов (рис. 7). Благодаря такой пробоподготовке было обеспечено 100% покрытия. Данные результаты могут быть исполь-

зованы при аттестации анализируемого образца как стандартного образца для подтверждения подлинности первичной структуры [12].

В отдельном эксперименте со стадией восстановления дисульфидных связей и алкилирования цистеинов методом Элмана [13–15] было подтверждено наличие дисульфидных связей между цистеинами, находящимися в положениях 101 и 406, а также 108 и 183. Было также подтверждено, что пики 7, 19–21 и 24 включают сайты гликозилирования N3, N231, N47 и N330 соответственно, что обуславливает наличие нескольких пиков у каждого из этих пептидов на хроматограммах. О разнообразии гликоформ более подробно описано в публикации Е. Zubareva с соавт. [16]. Каталитически важные аминокислоты входят в состав пептидов, элюирующихся в составе пиков 7, 9, 12, 24, 25, 26 и 28 (рис. 6).

Для выбора реперных пиков были проанализированы экспериментальные данные трипсинолизатов трех серий препарата С1 ингибитора по три инъекции каждой. Среди всех пиков по их соответствию описанным ранее требованиям к реперным пикам и хроматографическому разделению были выбраны кандидаты (табл. 6, выделены оранжевой заливкой).

В исследовании анализировали серии препарата С1 ингибитора, соответствующие нормам спецификации. На основании масс-спектрометрических данных (табл. 6) было показано, что все пики пептидов не содержат дополнительных сайтов, специфических для трипсина (аминокислоты R и K). Полнота проведения трипсинолиза была подтверждена. Идентификация аминокислотной последовательности составила не менее 95%.

В качестве кандидатов реперных пиков, в первую очередь, рассматривались наиболее воспроизводимые и интенсивные пики. Для этого выбрали такие варианты, где показатель *RSD* выборки по значению абсолютной площади трех серий не превышал 8%, а содержание пика (относительная площадь) было не менее 2% ($n=9$). Разрешение между пиками (*Rs*) выбрали не менее 4,0 (табл. 7, опубликована на сайте журнала¹⁰). Также в кандидаты реперных пиков не рассматривали пики, являющиеся частью критической пары, как, например, пики 7, 17–24. Пик 1, несмотря на подходящие требованиям результаты, не выбрали реперным ввиду наличия в нем очень короткого пептида (ISR), а следовательно, данный пик не может являться характеристичным.

Кандидатами реперных пиков были выбраны 2, 9, 12, 14, 15 и 28.

Таблица 5. Программа градиента 4

Table 5. Gradient programme 4

Интервал, мин <i>Interval, min</i>	Подвижная фаза Б, % <i>Mobile phase B, %</i>
0→5	0
5→100	0→40
100→110	40→60
110→115	60→100
115→120	100→0
120→130	0

⁹ 2.2.55 Peptide mapping. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2021.

¹⁰ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-461-tabl7910>

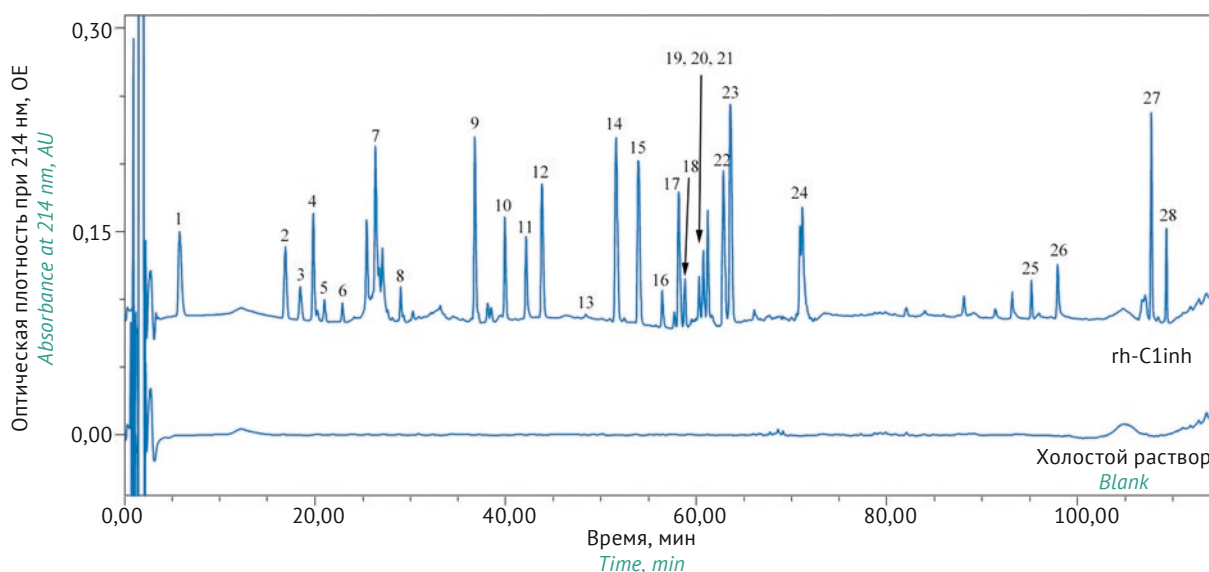


Рис. 6. Хроматограммы C1 ингибитора (rh-C1inh) и холостого раствора, полученные с использованием колонки AdvanceBio Peptide Map по программе градиента 4.

Fig. 6. Chromatograms of a C1 inhibitor (rh-C1inh) and a blank solution obtained on an AdvanceBio Peptide Map column using gradient programme 4.

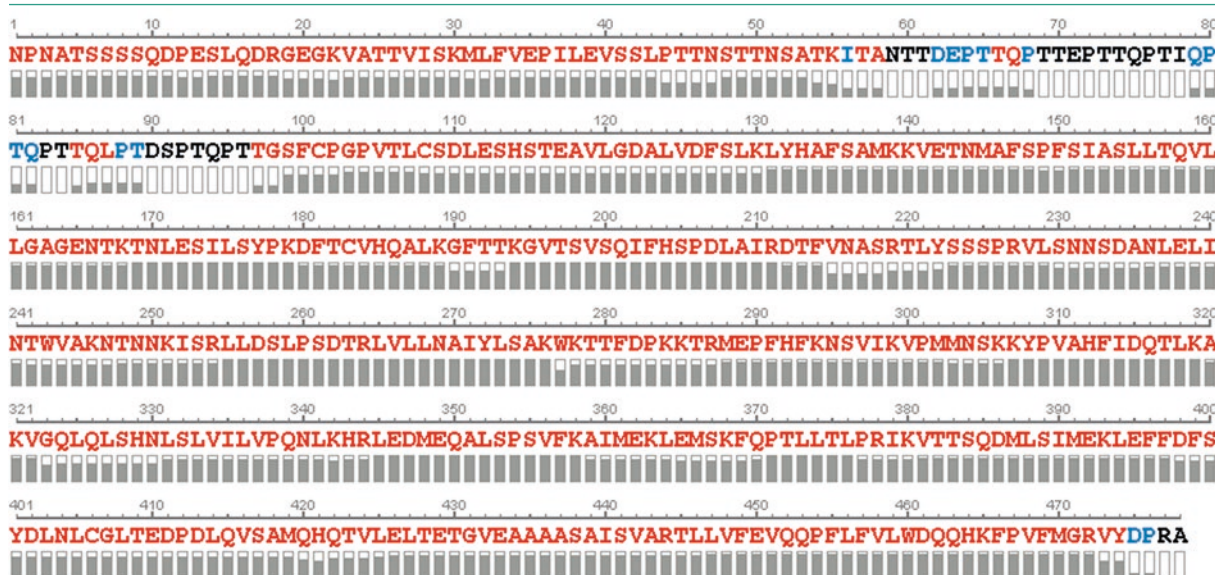


Рис. 7. Карта первичной структуры C1 ингибитора (rh-C1inh). Идентифицированные аминокислоты выделены жирным шрифтом; красным цветом отмечены аминокислоты с *b*- и *y*-ионами; синим — аминокислоты с одним *b*- или *y*-ионом; черным — аминокислоты без отдельных осколочных ионов (последние располагаются преимущественно в гипергликозилированной части). Серые прямоугольники являются графическим представлением надежности идентификации конкретного аминокислотного остатка, включая количество ионов-фрагментов и их интенсивность.

Fig. 7. Map of the primary structure of a C1 inhibitor (rh-C1inh). The identified amino acids are highlighted in bold; amino acids with both *b*- and *y*-ions in red; amino acids with one *b*- or *y*-ion in blue; amino acids with no individual fragment ions (the latter are located preferably at the hyperglycosylated part) in black. Grey rectangles are a graphical representation of the identification reliability for a particular amino acid residue, including the number of fragment ions and their intensities.

Пик 2 был выбран в качестве референтного для расчета относительных значений ввиду его приемлемой интенсивности и удобства расположения — в начале хроматограммы (для вычисления целых относительных величин). Пики 9, 12 и 28 выбраны не только из-за

соответствия требованиям к реперным пикам, но и из-за присутствия каталитически важных аминокислот. Пики 14 и 15 характеризуются высокой интенсивностью и разрешением с соседними пиками по сравнению с другими вариантами.

Таблица 6. Перечень идентифицированных пиков C1 ингибитора

Table 6. List of identified C1 inhibitor peaks

Номер пика <i>Peak number</i>	Номер аминокислот <i>Amino acid position</i>	Аминокислотная последовательность <i>Amino acid sequence</i>	Модификация <i>Modification</i>
1	252–254	ISR	Нет <i>No</i>
2	190–194	GFTTK	Нет <i>No</i>
3	295–299	NSVIK	Нет <i>No</i>
4	473–477 364–368	VYDPR LEMSK	Нет <i>No</i> Окисление <i>Oxidation</i>
5	364–368	LEMSK	Нет <i>No</i>
6	279–285	TTFDPKK	Нет <i>No</i>
7	279–284 220–227 19–30 212–219 300–306	TTFDPK TLYSSSPR GEGKVATTVISK DTFVNASR VPMMSK	Нет <i>No</i> Нет <i>No</i> Нет <i>No</i> Гликозилирование <i>Glycosylation</i> Нет <i>No</i>
8	23–30	VATTVISK	Нет <i>No</i>
9	180–189	DFTCVHQALK	Карбамидометилирование <i>Carbamidomethylation</i>
10	131–139	LYHAFSAMK	Нет <i>No</i>
11	255–264	LLDSLPSDTR	Нет <i>No</i>
12	288–294	MEPFHFK	Нет <i>No</i>
13	295–306	NSVIKVPMMNSK	Нет <i>No</i>
14	307–319	KYPVAHFIDQTLK	Нет <i>No</i>
15	343–358	HRLEDMEQALSPSVFK	Нет <i>No</i>
16	379–393	IKVTTSQDMLSIMEK	Нет <i>No</i>
17	169–179	TNLESILSYPK	Нет <i>No</i>
18	345–358	LEDMEQALSPSVFK	Нет <i>No</i>
19	228–246	VLSNNSDANLELINTWVAK	Гликозилирование <i>Glycosylation</i>
20	228–246	VLSNNSDANLELINTWVAK	Гликозилирование <i>Glycosylation</i>
21	228–246	VLSNNSDANLELINTWVAK	Гликозилирование <i>Glycosylation</i>
22	369–378	FQPTLLTLPR	Нет <i>No</i>
23	195–211	GVTSVSQIFHSPDLAIR	Нет <i>No</i>
24	265–276 322–342	LVLLNAIYLSAK VGQLQLSHNLSLVLPQNLK	Нет <i>No</i> Гликозилирование <i>Glycosylation</i>
25	445–472	TLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGR	Нет <i>No</i>
26	394–444	LEFFDFSVDLNLCLGTEDPDLQVSAMQHQTIVLELTETG VEAAAASISVAR	Карбамидометилирование <i>Carbamidomethylation</i>
27	140–168	KVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTK	Нет <i>No</i>
28	141–168	VETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTK	Нет <i>No</i>

Примечание. Оранжевым выделены потенциальные реперные пики.

Note. Potential characteristic peaks are highlighted in orange.

Валидация методики

Валидацию методики пептидного картирования C1 ингибитора проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.7.2.0035.18 Пептидное картирование и ОФС 1.1.0012.15 Валидация

аналитических методик ГФ РФ XIV¹¹. Согласно требованиям отечественных регуляторных органов, для подтверждения валидности методики по показателю подлинности достаточно подтвердить специфичность, однако, обращаясь

¹¹ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2.; 2018.

Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

к опыту зарубежных регуляторных органов¹², в работе также проводилась оценка методики по показателям прецизионности и устойчивости. Данное решение не противоречит ГФ РФ XIV, так как ОФС 1.7.2.0035.18 подчеркивает важность воспроизводимости методики.

Специфичность. Оценку специфичности проводили путем визуального сравнения хроматограмм при анализе препаратов C1 ингибитора. Для этого были проанализированы препараты C1 ингибитора, получаемые разными производителями, отличающиеся технологией получения (рис. 8, опубликован на сайте журнала¹³). Хроматографические профили гидролизированных растворов rh-C1inh, препаратов Руконост® и Беринерт®, должны были отличаться в интервале времени удерживания пептидов от 5 до 110 мин. На хроматограмме раствора плацебо с трипсином (холостой раствор) должны были отсутствовать значимые пики, соответствующие пикам 1–28 на хроматограммах гидролизированных растворов.

Несмотря на то что у сравниваемых препаратов C1 ингибитора аминокислотная последовательность одинакова, визуальное сравнение хроматограмм (рис. 8)¹³ выявило ряд отличий, очевидно, обусловленных разными профилями посттрансляционных модификаций, в первую очередь — гликозилирования [16]. Пики гликопептидов были подтверждены результатами масс-спектрометрической идентификации (табл. 6). На хроматограмме холостого раствора не было обнаружено пиков с временами удерживания, совпадающими с таковыми для пиков исследуемого белка.

Таким образом, специфичность методики была подтверждена.

Прецизионность. Прецизионность методики характеризуется сходимостью, воспроизводимостью и точностью. Методики пептидного картирования относятся к качественному анализу, поэтому их прецизионность оценивали по сходимости и воспроизводимости.

Оценка сходимости проводилась путем визуального сравнения хроматограмм и с расчетом значения *RSD* абсолютных и относительных значений площадей и времен удерживания реперных пиков, выбранных ранее при разработке методики. Статистическую обработку проводили по результатам измерения шести независимых проб одной серии препарата с индивидуальной

пробоподготовкой в один день одним аналитиком в одних условиях хроматографирования (рис. 9, опубликован на сайте журнала¹⁴).

Значение показателя *RSD* при оценке сходимости работы аналитика 1 ($n=6$) составило:

- по абсолютной площади — не более 6,9%;
- по абсолютному времени удерживания — не более 0,4%;
- по относительным значениям площадей — не более 4,5%;
- по относительным значениям времен удерживания — не более 0,5%.

Оценка воспроизводимости проводилась путем визуального сравнения хроматограмм и с расчетом значения *RSD* абсолютной и относительной площадей и времен удерживания реперных пиков и референтного. Измерения выполнялись вторым аналитиком в другой день на другой единице оборудования с выполнением девяти независимых опытов по проведению процедуры пробоподготовки. Таким образом, воспроизводимость оценивали по результатам пятнадцати независимых опытов по проведению процедуры пробоподготовки (рис. 10, опубликован на сайте журнала¹⁵).

Значение показателя *RSD* при оценке сходимости работы аналитика 2 ($n=9$) составило:

- по абсолютной площади — не более 8,1%;
- по абсолютному времени удерживания — не более 0,9%;
- по относительным значениям площадей — не более 6,0%;
- по относительным значениям времен удерживания — не более 0,1%.

Значения *RSD* относительных площадей и времен удерживания реперных пиков составили во всех случаях не более 5,0%, что соответствует ожидаемому допустимому разбросу значений (рис. 11, 12 опубликованы на сайте журнала¹⁶).

Таким образом, прецизионность методики была подтверждена.

Рассматривая в совокупности результаты, полученные при оценке валидационных характеристик специфичности и прецизионности, были выбраны диапазоны и критерии приемлемости реперных пиков для оценки пептидных карт рутиного анализа (табл. 8) [17, 18].

Устойчивость. Устойчивость методики оценивали путем варьирования времени

¹² Bioanalytical method validation. Guidance for Industry. HHS, FDA, CDER, CVM; 2018.

ICH Topic Q 2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology (CPMP/ICH/381/95). EMA; 1995.

Ederveen J. A practical approach to biological assay validation. Progress. Project Management and Engineering; 2010.

Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2). EMA; 2011.

¹³ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-461-fig8-14>

¹⁴ Там же.

¹⁵ Там же.

¹⁶ Там же.

инкубирования C1 ингибитора с трипсином (60, 90, 180 мин и при номинальном времени 120 мин, *рис. 13*, опубликован на сайте журнала¹⁷⁾ и использования разных колонок (*рис. 14*, опубликован на сайте журнала¹⁸⁾ для хроматографического разделения пептидов C1 ингибитора: AdvanceBio Peptide Map разных лотов и аналогичной по параметрам колонки Aeris Peptide XB-C18, 2,1×150 мм, размер частиц 2,6 мкм (кат. № 00F-4506-AN, Phenomenex, США). Устойчивость оценивали по соответствию относительных площадей и времен удерживания допустимому диапазону, установленному по результатам валидации (*табл. 8*). Результаты оценки устойчивости представлены в *таблицах 9, 10* (опубликованы на сайте журнала¹⁹⁾).

Было показано отклонение по абсолютной площади реперного пика 9 только при инкубации с трипсином в течение 60 мин. В других вариантах инкубации значимых отклонений не было. Также методика оказалась устойчива при использовании колонок разных лотов одного производителя.

Хроматограмма пептидной карты, полученная с использованием колонки Aeris Peptide XB-C18, визуально схожа с эталонной хроматограммой (AdvanceBio Peptide Map). Потенциально такая колонка может быть использована в качестве альтернативной при условии определения новых диапазонов приемлемости и ревалидации методики.

Таким образом, была показана устойчивость методики при варьировании времени инкубирования с трипсином от 90 до 180 мин, а также при использовании разных лотов идентичных колонок.

Заключение

Разработана методика пептидного картирования высокогликозилированного белка — препарата рекомбинантного ингибитора C1 эстеразы rh-C1inh, содержащая как подбор приемлемых условий разделения и обоснование выбора хроматографической колонки, так и оптимизацию этапа пробоподготовки. Экспериментально показана возможность оптимизации традиционного протокола пробоподготовки гликозилированных белков за счет исключения стадии дегликозилирования, что позволило сократить время анализа, снизить его стоимость и зависимость от поставок коммерческих реагентов зарубежных производителей. Кроме того, длительность анализа была сокращена благодаря оптимизации условий хроматографирования.

Методом масс-спектрометрии высокого разрешения проведена идентификация (расшифровка) пептидных фрагментов с суммарным покрытием 82,5% аминокислотной последовательности rh-C1inh, при этом все пептидные фрагменты содержали пять и более аминокислотных остатков (за исключением пика 1), что является дополнительным подтверждением специфичности выбранного протокола пробоподготовки. Проведена верификация аминокислотной последовательности исследуемого белка с покрытием около 100% и подтверждено наличие дисульфидных связей между цистеинами 103–108 и 183–406.

Проведено сравнение пептидной карты исследуемого белка с пептидными картами существующих препаратов ингибитора C1 эстеразы человека: Беринерт® и Руконост®, получаемых

Таблица 8. Реперные пики C1 ингибитора и критерии приемлемости для оценки пептидных карт

Table 8. C1 inhibitor characteristic peaks and acceptance criteria for peptide maps

Реперные пики и соответствующие им фрагменты молекулы <i>Characteristic peaks and corresponding molecule fragments</i>	Интервал значений относительного времени удерживания <i>Relative retention time range</i>	Интервал значений относительной площади пика <i>Relative peak area range</i>
2 GFTTK (190–194) Референтный пик <i>Characteristic peak</i>	1,0 RT≈17 мин <i>RT ≈17 min</i>	1,0
9 DFTCVHQALK (180–189)	2,14–2,21	1,74–2,18
12 MEPFHFK (288–294)	2,55–2,64	1,59–2,15
14 KYPVAFIDQTLK (307–319)	2,97–3,14	2,52–2,84
15 HRLEDMEQALSPSVFK (343–358)	3,11–3,29	2,20–2,80
28 VETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTK (141–168)	6,20–6,63	2,35–2,92

Примечание. RT — время удерживания.

Note. RT, retention time.

¹⁷⁾ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-461-fig8-14>

¹⁸⁾ Там же.

¹⁹⁾ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-461-tabl7910>

из разных источников. Выявленные различия могут быть предметом дальнейшего исследования особенностей посттрансляционных модификаций рекомбинантных терапевтических белков одной заявленной активности, но полученных различными производителями и с использованием разных технологий.

Валидационные характеристики разработанной методики (специфичность, прецизионность,

устойчивость) соответствовали установленным критериям приемлемости.

Разработанную методику с учетом ее валидационных характеристик возможно рассматривать как основу для аттестации стандартного образца и для последующего применения в комплексе с данным образцом для контроля качества rh-C1inh по показателю подлинности.

Литература/References

1. Lalonde ME, Durocher Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J Biotechnol*. 2017;251:128–40.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.028>
2. Qian C, Niu B, Jimenez R, Wang J, Albarghouthi M. Fully automated peptide mapping multi-attribute method by liquid chromatography-mass spectrometry with robotic liquid handling system. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;198:113988.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113988>
3. Bongers J, Cummings JJ, Ebert MB, Federici MM, Gledhill L, Gulati D, et al. Validation of a peptide mapping method for a therapeutic monoclonal antibody: what could we possibly learn about a method we have run 100 times? *J Pharm Biomed Anal*. 2000;21(6):1099–128.
[https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(99\)00181-8](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(99)00181-8)
4. Mouchahoir T, Schiel JE. Development of an LC-MS/MS peptide mapping protocol for the NISTmAb. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(8):2111–26.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-0848-6>
5. Allen D, Baffi R, Bausch J, Bongers J, Costello M, Dougherty J Jr, et al. Validation of peptide mapping for protein identity and genetic stability. Biologics and Biotechnology Section, Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. *Biologicals*. 1996;24(3):255–74.
<https://doi.org/10.1006/biol.1996.0034>
6. Andersen N, Vampola L, Jain R, Alvarez M, Chamberlain S, Hilderbrand A, et al. Rapid UHPLC-HRMS peptide mapping for monoclonal antibodies. *American Pharmaceutical review*. 2014.
7. Xu CF, Wang Y, Bryngelson P, Sosic Z, Zang L. Sequence variant and posttranslational modification analysis during cell line selection via high-throughput peptide mapping. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1140:225–36.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-15950-4_12
8. Beinrohr L, Harmat V, Dobó J, Loörincz Z, Gál P, Závodszky P. C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease. *J Biol Chem*. 2007;282(29):21100–9.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700841200>
9. Keating GM. Human C1-esterase inhibitor concentrate (Berinert). *BioDrugs*. 2009;23(6):399–406.
<https://doi.org/10.2165/11201100-000000000-00000>
10. Ruddy S, Manning MC, Holcomb RE. C1-INH compositions and methods for the prevention and treatment of disorders associated with C1 esterase inhibitor deficiency. Patent of the USA US9616111B2; 2015.
11. Stavenhagen K, Kayili HM, Holst S, Koeleman CAM, Engel R, Wouters D, et al. N- and O-glycosylation analysis of human C1-inhibitor reveals extensive mucin-type O-glycosylation. *Mol Cell Proteomics*. 2018;17(6):1225–38.
<https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000240>
12. Устинникова ОБ, Волкова РА, Мовсисянц АА, Меркулов ВА, Бондарев ВП. Рекомендации по аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):218–25.
Ustinnikova OB, Volkova RA, Movsesyants AA, Merkulov VA, Bondarev VP. Recommendations on the certification of reference standards for structure identification of recombinant therapeutic proteins. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):218–25 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-218-225>
13. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70–7.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
14. Riener CK, Kada G, Gruber HJ. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem*. 2002;373(4–5):266–76.
<https://doi.org/10.1007/s00216-002-1347-2>
15. Winther JR, Thorpe C. Quantification of thiols and disulfides. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(2):838–46.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.031>
16. Zubareva E, Degterev M, Kazarov A, Zhiliaeva M, Ulyanova K, Simonov V, et al. Physicochemical and biological characterization of rhC1INH expressed in CHO cells. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(11):1180.
<https://doi.org/10.3390/ph14111180>
17. Голощапова ЕО, Минеро АС, Рунова ОБ, Устинникова ОБ. Разработка методики пептидного картирования для оценки подлинности рекомбинантного интерферона бета-1b. *Биофармацевтический журнал*. 2021;13(1):21–6.
Goloshchapova EO, Minero AS, Rounova OB, Ustinnikova OB. Development of a peptide mapping technique to evaluate the authenticity of recombinant interferon beta-1b. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2021;13(1):21–6 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30906/2073-8099-2021-13-1-21-26>

18. Устинникова ОБ, Голощапова ЕО, Рунова ОБ, Коротков МГ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартного образца метионин-ной формы интерферона альфа-2b для подтверждения подлинности методом пептидного картирования. *Медицинская иммунология*. 2018;20(4):543–50.

Ustinnikova OB, Goloshchapova EO, Runova OB, Korotkov MG, Volkova RA. Development of a qualification procedure for methionine form of interferon alfa-2b standard to confirm its authenticity by means of a peptide mapping method. *Medical Immunology (Russia)*. 2018;20(4):543–50 (In Russ.).

<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-4-543-550>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Зубарева** — планирование экспериментов, выполнение экспериментальных работ и статистическая обработка данных, обсуждение результатов исследования, написание текста рукописи; **М.Б. Дегтерев** — хромато-масс-спектрометрические исследования, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; **М.Ю. Неронова** — выполнение экспериментальных работ; **М.А. Смолов** и **Р.Р. Шукуров** — обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи.

Благодарности. АО «Генериум» является спонсором разработок инновационного терапевтического белка C1 ингибитора. Работа выполнена на базе лаборатории физико-химических методов Департамента фармацевтического анализа АО «Генериум». Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории, принимавшим участие в работе.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Zubareva** planned and performed the experiments, carried out statistical analysis of the data, discussed the study results, and drafted the manuscript. **M.B. Degterev** conducted liquid chromatography–mass-spectrometry measurements, discussed the study results, and edited the manuscript. **M.Yu. Neronova** performed the experiments. **M.A. Smolov** and **R.R. Shukurov** discussed the study results and edited the manuscript.

Acknowledgements. Generium JSC sponsored the development of the novel C1 inhibitor therapeutic protein. This study was conducted in the laboratory of physico-chemical methods of the Pharmaceutical Analysis Department of Generium JSC. The authors express their gratitude to the colleagues in the laboratory who took part in the study.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Зубарева Екатерина Валерьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6178-0050>
zubareva@ibcgenerium.ru

Дегтерев Максим Борисович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5541-5575>
degterev@ibcgenerium.ru

Неронова Мария Юрьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6029-4563>
myneronova@ibcgenerium.ru

Смолов Максим Александрович, канд. хим. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2935-7655>
smolov@ibcgenerium.ru

Шукуров Рахим Рахманкулович, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>
shukurov@ibcgenerium.ru

Ekaterina V. Zubareva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6178-0050>
zubareva@ibcgenerium.ru

Maksim B. Degterev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5541-5575>
degterev@ibcgenerium.ru

Maria Yu. Neronova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6029-4563>
myneronova@ibcgenerium.ru

Maksim A. Smolov, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2935-7655>
smolov@ibcgenerium.ru

Rakhim R. Shukurov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>
shukurov@ibcgenerium.ru

Поступила 23.09.2022

После доработки 10.02.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Received 23 September 2022

Revised 10 February 2023

Accepted 13 March 2023