

2.2.55. ПЕПТИДНЕ КАРТУВАННЯ ⁽¹⁾

▼ВСТУП▲ ■

▼ Білки можуть існувати як великі комплексні структури, проте деякі молекули з популяції мають відмінності в амінокислотній послідовності внаслідок помилок у процесі біосинтезу, деградації або посттрансляційних модифікацій. Висока молекулярна маса білків у поєднанні зі складністю їх структури робить хімічну ідентифікацію нативного білка за допомогою одного аналітичного методу доволі складною. Випробовуваний білок можна розщепити на менші фрагменти, які можуть бути ідентифіковані з достатньою розділювальною здатністю для визначення його амінокислотної послідовності. Цей процес є основою методики ідентифікації білка, широко відомої як «пептидне картування». Ця методика охоплює етап розщеплення білка, на якому розриваються амідні зв'язки між певними амінокислотними залишками з отриманням передбачуваного набору пептидів. Аналітичне хроматографічне розділення, виявлення та ідентифікація пептидної суміші надають інформацію про амінокислотну послідовність білка, яка може бути використана для його ідентифікації. Пептидне картування – це порівняльна процедура для ідентифікації, під час якої результати, що отримані для випробовуваного білка, порівнюються з результатами стандартного зразка, обробленого так само. Ця порівняльна ідентифікація підтверджує, що первинна структура випробовуваного білка відповідає структурі стандартного зразка.

Здатність пептидного картування виявляти значні зміни первинної структури білка призвела до багатьох застосувань цього методу для визначення якості білка, які виходять за межі цієї загальної статті. За допомогою кількісної пептидної карти можна оцінити чистоту випробовуваного білка, а саме відсутність помилкового включення амінокислоти або інших порушень синтезу білка, як, наприклад, утворення випадкових нефізіологічних дисульфідних зв'язків (сплутаність дисульфідних зв'язків), посттрансляційні модифікації та деградація. Порівняння пептидних карт під час масштабування або під час внесення змін до виробничого процесу може підтвердити узгодженість процесу. Крім того, пептидне картування може використовуватися для визначення ступеня та розташування модифікацій окремих амінокислот, таких як глікозування та кон'югація (наприклад, ступінь пегілювання).

Ця загальна стаття присвячена використанню пептидного картування для хімічної ідентифікації білка, де основною властивістю аналітичної методики є специфічність.

(1) Ця загальна стаття проходить фармакопейну гармонізацію. Див. статтю Ph.Eur. 5.8. *Pharmacopoeial harmonisation*

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ПЕПТИДНОГО КАРТУВАННЯ (ВИПРОБУВАННЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ) – ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Перед розробкою методики пептидного картування як випробування для ідентифікації білка важливо з'ясувати передбачуване застосування та рівень специфічності, необхідний для диференціації випробовуваного білка від інших продуктів, які виробляються на тому самому обладнанні. У деяких випадках для диференціації зразків структурно споріднених білків можуть знадобитися альтернативні методи. Кожен білок має унікальні властивості, які мають бути добре вивчені, щоб наукові підходи, використовувані під час розробки методу пептидного картування, дозволили розробити валідовану аналітичну методику, яка забезпечує достатню специфічність. Слід оцінити амінокислотну послідовність випробовуваного білка, щоб обрати умови його попередньої обробки й розщеплення, що забезпечить оптимальну для аналізу довжину пептиду. Залежно від застосування важливим є повний або майже повний аналіз послідовності білка, оскільки може бути відсутня попередня інформація про зміни його структури під час розробки. Під час розробки аналітичної методики пептидного картування слід враховувати такі моменти (див. також Рис. 2.2.55.-1).

ПОПЕРЕДНЯ ОБРОБКА

Для аналізу субстанцій для фармацевтичного застосування, дозованих форм або стандартних зразків, які містять допоміжні речовини й білки-носії, що заважають визначенню, можуть бути необхідні виділення та очищення. Залишкові заважаючі речовини можуть впливати на ефективність ферментативного розщеплення та вигляд пептидної карти. У процесі розробки слід оцінити вплив залишкових речовин або процесу очищення зразка на остаточну пептидну карту.

Третинна структура білка може перешкоджати повному доступу розщеплювального агента до всіх місць розщеплення, що призводить до неадекватного оцінювання його послідовності. Для розгортання білка перед розщепленням використовують його обробку хаотропними агентами (наприклад, гуанідин гідрохлоридом, сечовиною) і поверхнево-активними речовинами (наприклад, додецилсульфатом натрію). Денатурувальні агенти можуть впливати на активність ферментів, тому перед розщепленням може знадобитися додаткове очищення (наприклад, діалізація) або розведення. Перед розщепленням може знадобитися відновлення і алкілування дисульфідних зв'язків для надання ферменту вільного доступу до місць розщеплення, хоча це призводить до втрати інформації про розташування зв'язків між двома молекулами цистеїну. Найпоширеніші реагенти для відновлення дисульфідів містять дитіотреїтол і триалкілфосфінові сполуки, такі як трис(2-карбоксіетил)фосфін. Реаген-