



А.В. Попкова  

Пептидное картирование: современные подходы к разработке методик (обзор)

Акционерное общество «Биокад»,
ул. Связи, д. 38, стр. 1, вн. тер. г. поселок Стрельна, Санкт-Петербург,
198515, Российская Федерация

✉ Попкова Александра Владимировна; aleks.popkova@yandex.ru,
popkova@biocad.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Лекарственные средства, получаемые с использованием технологии рекомбинантной ДНК, широко применяются в терапии онкологических, иммуно-воспалительных и инфекционных заболеваний. Объем исследований по разработке новых белковых препаратов, в том числе моноклональных антител, а также методик контроля качества таких препаратов увеличивается. Пептидное картирование позволяет подтвердить подлинность, первичную структуру белка, генетическую стабильность и идентифицировать изменения в структуре.

ЦЕЛЬ. Систематизация современных методологических подходов к разработке методик пептидного картирования.

ОБСУЖДЕНИЕ. Одним из главных методов подтверждения подлинности белков является пептидное картирование, основанное на ферментативном гидролизе белка, с получением уникального набора пептидных фрагментов. Несмотря на уникальность каждой конкретной методики, все они базируются на общих принципах пробоподготовки и анализа, а также регуляторных требованиях. Разработка метода – сложный многостадийный процесс. В настоящее время для расщепления белка используются различные ферменты, однако «золотым стандартом» является трипсин. Все большее распространение имеют готовые решения для проведения реакции расщепления белков: высокоспецифичные и воспроизводимые наборы; способы пробоподготовки на основе иммобилизации ферментов на магнитных частицах, а также автоматизированные процедуры. Это позволяет минимизировать ошибки ручной пробоподготовки, повысить воспроизводимость результатов и сократить время анализа.

ВЫВОДЫ. Современная методология пептидного картирования эволюционирует в сторону повышения воспроизводимости и эффективности за счет внедрения стандартизированных и автоматизированных решений для пробоподготовки при сохранении трипсина в качестве основного гидролитического агента. Информация об используемых подходах позволит исследователям ориентироваться в многообразии доступных аналитических решений, ускорить разработку методов и обеспечить надежный контроль качества белковых препаратов.

Ключевые слова: пептидное картирование; подлинность белков; трипсин; Lys-C; ферментативное расщепление белков; ВЭЖХ; масс-спектрометрия; протеомика; регуляторные требования

Для цитирования: Попкова А.В. Пептидное картирование: современные подходы к разработке методик (обзор). *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2026;16(2):215–228. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2026-16-2-215-228>

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов. При написании рукописи автор руководствовалась соображениями научной ценности полученного материала и заявляет о беспристрастности оценки полученных данных. Упоминание в тексте конкретных торговых марок ферментных препаратов, готовых наборов, хроматографических колонок и их производителей приведено исключительно в информационных и научно-практических целях для иллюстрации текущего ассортимента продуктов и не является рекламной рекомендацией.

Aleksandra V. Popkova ✉ 

Review of Current Approaches to the Development of Peptide Mapping Methods

Joint-stock company "BIOCAD",
38/1 Svyazi St., Intracity Municipality the Settlement of Strelina,
Saint Petersburg 198515, Russian Federation

✉ Aleksandra V. Popkova; aleks.popkova@yandex.ru, popkova@biocad.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Medicines, based on recombinant DNA technology, are widely used in the treatment of cancer, immune-inflammatory, and infectious diseases. Research on the development of new protein-derived drugs, including monoclonal antibodies, as well as methods for quality control of such drugs, is ever increasing. Peptide mapping allows it to verify the primary protein structure, genetic stability, and identify structural changes.

AIM. Systematization of current methodological approaches to the development of peptide mapping methods.

DISCUSSION. One of the main methods for confirming protein authenticity is peptide mapping based on enzymatic hydrolysis of protein to produce a unique set of peptide fragments. Despite the uniqueness of each method, they all share common principles of sample preparation and analysis, as well as regulatory requirements. Method development is a complex, multi-step process. Currently, various enzymes are used for protein cleavage, but trypsin remains the "gold standard". Ready-made solutions for protein cleavage reactions are becoming increasingly common such as highly specific and reproducible kits, sample preparation approaches based on immobilized enzymes on magnetic particles, and automated procedures. These options minimize errors in manual sample preparation, improve the reproducibility of results, and reduce analysis time.

CONCLUSIONS. Current peptide mapping methodology is evolving towards increased reproducibility and efficiency through the introduction of standardized and automated sample preparation solutions while maintaining trypsin as the primary enzyme for protein cleavage. Information on approaches used will enable researchers to navigate the diversity of available analytical solutions, accelerate method development, and ensure reliable quality control of protein-based medicines.

Keywords: peptide mapping; protein identity; trypsin; Lys-C; enzymatic protein cleavage; HPLC; mass spectrometry; proteomics; regulatory requirements

For citation: Popkova A.V. Review of current approaches to the development of peptide mapping methods. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2026;16(2):215–228. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2026-16-2-215-228>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. Author declare no conflict of interest. The author was guided by considerations of the scientific value of the obtained material and declare the impartiality of the assessment of the obtained data. The mention in the text of specific brands of enzyme preparations, ready-made kits, chromatographic columns and their manufacturers is provided for informational as well as scientific and practical purposes to illustrate the current state of product range only and does not provide an advertising recommendation.

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные средства (ЛС), получаемые с использованием технологии рекомбинантной ДНК, занимают особое место в биологической терапии. Они находят широкое применение в терапии онкологических, иммуновоспалительных и инфекционных заболеваний, включая COVID-19 [1]. Объем исследований по разра-

ботке новых белковых препаратов, в том числе моноклональных антител (МАТ), а также методик контроля качества таких препаратов увеличивается [2]. Нормативные требования к производству и контролю качества ЛС, получаемых с использованием технологии рекомбинантной ДНК, установлены в Государственной фармакопее Российской Федерации¹. Описаны методы

¹ ОФС.1.7.1.0007 Лекарственные средства, получаемые с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025.

ОФС.1.7.1.0014 Моноклональные антитела для медицинского применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025.

анализа и идентификации, которые позволяют установить подлинность лекарственного препарата (ЛП), его чистоту, определить количественное содержание действующего вещества и вспомогательных компонентов, входящих в состав лекарственной формы. Для подтверждения подлинности белков, в том числе и МАТ, используют принцип ортогонального подхода, который предполагает применение комплекса физико-химических и биологических методов анализа.

Пептидное картирование является единственным методом подтверждения подлинности белков без необходимости идентификации дополнительными методами (специфической активности и иных физико-химических методов), поскольку позволяет подтвердить первичную структуру белка и выявить наличие изменений в сравнении со стандартным образцом². Метод основан на том, что белок при ферментативном гидролизе распадается на пептиды, и для каждого белка характерен уникальный набор пептидов, отличающихся последовательностью и молекулярной массой. Метод пептидного картирования должен быть включен в спецификацию активной фармацевтической субстанции и в спецификацию на ЛП в случае отсутствия высокоспецифичных методов идентификации³.

Множество работ посвящено разработке методик пептидного картирования. Несмотря на высокую точность современных методов, разработка методик пептидного картирования остается трудоемким процессом, часто основанным на эмпирическом подборе условий. По мнению автора, стремительное расширение аналитического рынка — появление широкого спектра альтернативных специфичных протеаз и технологий ускоренной пробоподготовки — открывает новые возможности для получения высокоспецифичных пептидных карт белков и сокращения времени анализа. Однако отсутствие системного сравнительного анализа этих инструментов затрудняет их рациональное внедрение в практику. Систематизированные данные позволяют оптимизировать процесс разработки методик пептидного картирования, сократить количество итераций при подборе условий протеолиза и минимизировать риски возникновения артефактов при характеристике биофармацевтических препаратов.

Цель работы — систематизация современных методологических подходов к разработке методик пептидного картирования.

Информация о подходах позволит исследователям ориентироваться в многообразии доступных аналитических решений, ускорить разработку методов и обеспечить надежный контроль качества сложных биомолекул.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Метод пептидного картирования не является общим методом анализа и идентификации разных классов белков, так как ферментативный гидролиз каждого отдельного белка имеет свои характерные особенности. Любая методика идентификации белка включает четыре основных этапа: подготовку белка (обессоливание и денатурация целевого белка); специфичное расщепление пептидных связей; хроматографическое разделение полученной смеси пептидных фрагментов и идентификацию пептидов.

Перед проведением ферментативного гидролиза целевой белок должен быть выделен из смеси, в противном случае возможно образование пересекающихся «отпечатков пальцев», т.е. принадлежащих разным белкам пептидов с одинаковой или близкой аминокислотной последовательностью, что приводит к невозможности однозначной идентификации индивидуальных белков⁴.

Подготовка образца

Обессоливание. Подготовку образца белка путем очистки от компонентов матрицы, например солей, стабилизаторов и эмульгаторов, выполняют посредством диализа с использованием диализных мешков (например, ReadyLyzers, Serva или GebaFlex, Gene Bio-Application) на основе ультрачистой низкосвязывающей регенерированной целлюлозы или центрифугирования в ультрафильтрах (например, Amicon, Merck или Vivaspin, Sartorius) с отсекаемой массой от 10 до 50 кДа. Также возможно использование гравитационных обессоливающих колонок, наполненных, например, поперечно-сшитым декстраном или полиакриламидным гелем (например, Zeba Spin, Thermo Fisher Scientific или Econo-Pac 10DG Desalting Columns, BioRad) [3].

Денатурация белка. Нативный белок находится в свернутом состоянии третичной структуры, стабилизированной дисульфидными связями

² ОФС.1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

³ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

⁴ ОФС.1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

(S-S) [4]. Для обеспечения доступа протеолитического агента к пептидным связям необходимо развернуть глобулярную структуру белка, разрушив имеющиеся дисульфидные связи, а затем восстановив их для предотвращения ренатурации. Денатурацию белка выполняют с помощью хаотропных агентов, например гуанидина гидрохлорида [4, 5] или мочевины [6]. Денатурацию и восстановление можно проводить одновременно с помощью комбинации нагревания и химических реагентов, таких как 1,4-дителиотритол (ДТТ) [3], меркаптоэтанол, диоксихлорат натрия [7], трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (ТСЕР) [6]. Чаще всего используется ДТТ, так как он является сильным восстановителем, уменьшает количество дисульфидных связей и предотвращает образование меж- и внутримолекулярных дисульфидных мостиков между молекулами Cys в белке. J.T. Fang с соавт. [8] изучили восстанавливающий эффект цистеина в процессе определения аминокислотной последовательности МАТ при различных концентрациях цистеина (10–40 мМ) и значениях pH (pH 7,0–11,0) реакционной смеси. Установлено, что цистеин проявляет свойства восстановителя, сравнимые с таковыми у ДТТ, и обладает такими полезными характеристиками, как отсутствие токсичности и запаха, что делает его потенциальной альтернативой для восстановления дисульфидных связей при пептидном картировании белков и МАТ [8].

Современным решением для денатурации белков и увеличения скорости ферментативного расщепления являются готовые смеси детергентов, такие как запатентованные анионные сурфактанты RapiGest SF⁵ и ProteaseMAX⁶, которые повышают растворимость гидрофобных и мембранных белков, часто агрегирующих в обычных буферных растворах, и переводят белки в раствор в течение 1 ч при комнатной температуре. За счет мягкой денатурации сурфактанты разворачивают структуру белка, открывая доступ протеазам к сайтам расщепления. Это позволяет сократить время инкубации от нескольких часов до нескольких минут (например, полный гидролиз миоглобина лошади происходит за 15–60 мин вместо 9 ч)⁷. В отличие от мочевины или додецилсульфата натрия, RapiGest не подавляет ферментативную активность, а ProteaseMAX даже повышает

активность основных протеаз (трипсин, химо tripsин и эндопротеаза Lys-C), что позволяет использовать дорогостоящие ферменты в меньших количествах. Они снижают адсорбцию пептидов на пластиковых поверхностях пробирок, что является частой причиной потерь образца, особенно при работе с белками в малых концентрациях. Благодаря более полному расщеплению белка повышается доля покрытия аминокислотной последовательности. Эти реагенты разлагаются в кислотной среде; их можно использовать одновременно с масс-спектрометрическим анализом (МС-анализ). После завершения гидролиза достаточно добавить кислоту, например трифторуксусную (TFA) или муравьиную, чтобы сурфактант распался на нетоксичные побочные продукты, которые выпадают в осадок и удаляются из области реакции либо остаются в растворе, не мешая ионизации при МС-анализе [9].

После денатурации и восстановления сульфгидрильных групп выполняют алкилирование Cys для дальнейшего снижения потенциальной ренатурации. Наиболее часто используемыми агентами для алкилирования белковых образцов являются 10–50 мМ йодоацетамид [5, 10], 10–50 мМ йодоуксусная кислота [6], 10–20 мМ N-этилмалеимид [7].

Расщепление пептидных связей для хроматографического разделения

Следующей стадией подготовки образца является протеолиз. Все протеолитические агенты подразделяются на химические и ферментативные⁸. К химическим протеолитикам относятся цианобромид (отщепление C-концевого метионина), 2-нитро-5-тио-цианобензойная кислота (отщепление N-концевого цистеина), *o*-йодозобензойная кислота (отщепление C-концевых триптофана и тирозина), BNPS-скатол (отщепление триптофана) и разбавленные кислоты. Ферментативное расщепление более распространено в связи с высокой специфичностью и мягкими условиями пробоподготовки. Среди ферментов, используемых в картировании, известны трипсин, химо tripsин, пепсин, лизилэндопептидаза (Lys-C), глутамилэндопептидаза (Glu-C), пептидил-аспарагил-металлоэндопептидаза (Asp-N), клострипаин и др.

⁵ <https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/standards-and-reagents/rapigest-sf-surfactant.html?srsltid=AfmBOooAz5SyNRjselxFlqlwTE6HksmYkbr7sMIF60CPvggrdnpl7An>

⁶ https://worldwide.promega.com/products/mass-spectrometry/proteases-and-surfactants/proteasemax-surfactant_-trypsin-enhancer/?catNum=V2071

⁷ <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2003/rapigest-sf-accelerated-tryptic-digestion-of-proteins.html>

⁸ <1055> Biotechnology-derived articles – Peptide mapping. USP 43–NF 38. Rockville; 2024.

Выбор расщепляющего агента. Благодаря высокой специфичности и эффективности чаще всего в пептидном картировании используется трипсин [3]. Он относится к сериновым протеазам и расщепляет пептидную связь с С-концевой стороны аминокислотных остатков (а.к.о) Lys и Arg за исключением случая, когда остаток Pro находится с карбоксильной стороны сайта расщепления. Образуются пептиды с длиной от 6 до 30 остатков, что является оптимальной для МС-анализа длиной цепи молекулы [6].

Существует множество коммерчески доступных источников этого фермента. Все трипсины можно классифицировать по происхождению (животного происхождения и рекомбинантные) и способу стабилизации. Трипсины животного происхождения (например, Roche Diagnostics, кат. № RTRYP-RO, или Trypsin Gold, Promega) высокоспецифичны, но они, как правило, загрязнены другими протеолитическими ферментами, например химоотрипсином.

Рекомбинантные трипсины для пептидного картирования (например, Trypsin Platinum, Promega, или SOLu-Trypsin, Sigma-Aldrich) представляют собой высокоочищенные ферменты, полученные методом геной инженерии, как правило, в экспрессионных системах *E. coli* или *Pichia pastoris*, не содержащие примеси контаминирующих белков. Использование рекомбинантного трипсина [5] значительно улучшает качество пептидного картирования благодаря высокой специфичности расщепления и сниженной аутопротеолитической активности.

Для трипсина может быть характерен аутолиз, который приводит к снижению активности фермента и вызывает образование аутопротеолитических триптических пептидов, которые могут мешать анализу интересующих пептидов. Для подавления аутолиза трипсин подвергают химической модификации. Наиболее часто применяется метилирование свободных аминогрупп в остатках лизина трипсина (например, Trypsin Gold, Promega Corporation, или SG-Trypsin, G-Biosciences), тем самым фермент перестает распознавать себя как субстрат. При восстановительном алкилировании свободные остатки Lys химически модифицируют. Такой модифицированный трипсин (например, New England Biolabs, кат. № P8101, или Trp-MS-RS, Molecta, Россия) можно инкубировать при 37 °С более 16–24 ч без потери активности и появления продуктов распада. Модифицированные трипсины являются универсальными реагентами для проведения быстрого, в том числе высокотемпературного

протеолиза и получения чистого (без продуктов неспецифического расщепления) и полного покрытия аминокислотной последовательности [3]. Добавление ионов кальция в состав реагентов для гидролиза белков способствует увеличению термостабильности трипсина и предотвращению аутолиза трипсина [3]. Ионы кальция связываются с Ca²⁺-связывающей петлей трипсина.

Для получения максимально точных и интерпретируемых МС-данных используют трипсины категории «для МС-анализа», содержащие ингибитор химоотрипсина N-*n*-тозил-L-фенилаланин хлорметилкетон (например, Trypsin, TPCK Treated, Worthington Biochemical Corporation, или Trypsin, TPCK Treated, Thermo Scientific), что позволяет снизить или исключить вероятность протекания побочных реакций, а также повысить стабильность и селективность используемых ферментов [3].

Неполный гидролиз происходит в случае, когда протеаза не разрушает связь между аминокислотами специфического сайта узнавания. Такие фрагменты полипептидной цепи называются протеолитически устойчивыми участками. Причин неполного гидролиза несколько. Доступ протеазы к своему сайту связывания может быть затруднен ввиду стерических факторов. Примерами могут быть плотная вторичная структура или ситуация, когда сайт связывания находится внутри гидрофобного ядра белка. Наличие остатка Pro с циклической структурой вблизи сайта связывания создает «излом» цепи, что затрудняет позиционирование протеазы. Например, гидролиз связи Lys-Pro или Arg-Pro трипсином практически невозможен. Близкое расположение сильно поляризованных или вторично модифицированных (фосфорилированных или гликозилированных) а.к.о. «экранирует» полипептидную цепь.

Для осуществления полного расщепления белков трипсин используют в комбинации с другими протеазами. Например, трипсин в сочетании с Lys-C (например, Trypsin/Lys-C, Promega, или EasyPerf MS Sample Prep Kits, Thermo Scientific) позволяет эффективно расщеплять белки или белковые домены, которые недоступны для трипсина из-за особенностей структуры белка [5]. Lys-C сохраняет ферментативную активность в 8 М мочеvine, которая позволяет денатурировать конформационно защищенные участки, что повышает эффективность картирования [11].

Химоотрипсин (например, Promega, кат. № V1062, или Pierce Chymotrypsin Protease, Thermo Scientific) используется для гидролиза

пептидных связей, но чаще в комбинации с трипсином в различных соотношениях [7, 10, 12]. В.С. Jakes и соавт. [13] показали, что полное покрытие последовательности достигается при использовании смесей протеаз, содержащих $\geq 50\%$ химотрипсина. С наибольшей скоростью химотрипсин гидролизует пептидные связи при ароматических аминокислотах (Phe, Tyr и Trp), отщепляет С-концевые остатки гидрофобных аминокислот (Leu, Met и Ala).

Белки, обогащенные ароматическими и гидрофобными остатками (Phe, Tyr, Trp и Leu), часто плохо растворимы в водных средах и устойчивы к трипсину. Для расщепления таких белков используется пепсин (например, Promega, кат. № V1959, или Pepsin from Porcine Stomach, Thermo Scientific), обладающий высокой активностью в кислой среде (pH 1–3) и при низкой температуре (4 °C), а также специфичностью в отношении участков полипептидной цепи с низкой полярностью. Одним из недостатков пробоподготовки белков с использованием трипсина в щелочной среде (pH 7,5–8,5) является возникновение новых дисульфидных связей, отличных от таковых в нативном белке. Механизм возникновения таких связей заключается в дегидратации сульфгидрильных групп в щелочной среде, что приводит к образованию «ложных» дисульфидных связей. При pH 1–2 тиоловые группы протонируются полностью, что исключает их взаимодействие и фиксирует нативную локализацию дисульфидных мостиков. Процедура пробоподготовки белков предполагает первичную обработку белка пепсином для получения крупных полипептидов, после чего обработка трипсином позволяет получить пептиды, длина которых оптимальна для идентификации [14]. E.G. Toole и соавт. показали, что пепсин был пригоден для пробоподготовки при идентификации белков вирусных капсидов, которые содержат большое количество гидрофобных аминокислот [15].

Сериновая протеаза Glu-C, также известная как V8 протеаза (например, Promega, кат. № PRV1651, или New England Biolabs, кат. № P8100S), широко используется для расщепления больших белков [7] и получения пептидной карты полипептидов [16]. Glu-C специфически отщепляет остатки Asp или Glu с С-конца, при этом специфичность гидролиза зависит от pH среды и состава буфера. При pH 4,0 фермент преимущественно отщепляет С-концевой Glu, тогда как при pH 8,0 дополнительно отщепляет остатки Asn. Комбинация Glu-C и трипсина

позволяет получить перекрывающиеся пептиды в тех зонах, где сайты трипсина расположены слишком редко или недоступны.

Asp-N (например, New England Biolabs, кат. № P8104S, или Endoproteinase Asp-N from *Pseudomonas quercus*, Roche) — это высокоспецифичная цинк-зависимая металлоэндопептидаза (флавастаин) [7]. Она высокоспецифично гидролизует пептидные связи остатков Asp и Cys на N-конце и неспецифично отщепляет остатки Glu. В присутствии ионов цинка Asp-N проявляет оптимальную активность в диапазоне pH от 4 до 9. Чаще всего Asp-N комбинируют с трипсином или эндопептидазой Glu-C.

Последовательная обработка белка трипсином и Asp-N повышает количество идентифицированных пептидов в ≥ 2 раза и позволяет более эффективно гидролизовать сложные глобулярные белки [17]. Комбинация Asp-N и Glu-C подходит для анализа белков, богатых остатками Asp и Glu, например казеина. Комбинация этих двух ферментов позволяет получать уникальные наборы пептидов, которые не перекрываются с продуктами трипсинолиза, что повышает общее покрытие белка на 24%⁹.

Для повышения качества идентификации пептидов и определения сайтов конъюгации в препаратах типа «конъюгат антитело — лекарственное средство» в качестве протеолитического фермента применяют папаин. Фрагментация и ионизация пептидов, конъюгированных с токсинами, чаще всего затруднена. Папаин (например, Papain from *papaya latex*, Merck, или Pierce Papain, Thermo Scientific) полностью отщепляет токсин от линкера. Такая обработка белка превращает конъюгаты гидрофобных пептидов с токсином в пептиды, содержащие лишь остаток линкера. Отщепление папаином гидрофобного токсина, например монометилауристатина E (ММАЕ), привело к значительному улучшению идентификации пептидов при проведении МС-анализа и позволило точно определить сайты конъюгации и рассчитать степень их заполняемости с высокой точностью, исключив погрешности ионизации, вызванные токсином [18].

При гидролизе белков также можно использовать металлоэндопептидазу Lys-N, эластазу, термоллизин, эндопротеиназу Arg-C, Lysarginase и др [7, 10].

Эластаза — это сериновая протеаза, гидролизующая пептидные связи Ala, Val, Ser, Gly,

⁹ <https://at.promega.com/resources/pubhub/using-endoproteinases-asp-n-and-glu-c-to-improve-protein-characterization/#:~:text=Conclusion,sequence%20coverage%20and%20PTM%20mapping>

Leu и Ile на С-конце белка. Продуктами такого расщепления являются многокомпонентные пептидные смеси, в которых многие пептиды имеют перекрывающиеся последовательности. T. Dau и соавт. [19] для протеомного анализа трансмембранных доменов с многочисленными кросс-сшивками и посттрансляционными модификациями использовали последовательное расщепление трипсином и эластазой. Такой подход позволил идентифицировать участки аминокислотной последовательности, где сайты узнавания трипсином отсутствуют.

Термолизин – бактериальная металлоэндопептидаза, получаемая из *Bacillus thermoproteolyticus*, которую возможно использовать для пептидного картирования из-за специфичности по отношению к пептидным связям гидрофобных аминокислот, например Leu, Phe, Ile и Val [7]. Он сохраняет ферментативную активность в широком диапазоне рН (рН 5,0–9,5).

Для пептидного картирования сложных О-гликозилированных биофармацевтических препаратов применяют высокоспецифичную эндопроотеазу, впервые выделенную из *Akkermansia muciniphila*. Например, эндопротеаза OPERATOR® (Genovis, Швеция) отщепляет Ser и Thr на N-конце О-гликанов; при этом фермент не гидролизует N-гликозилированные гликопротеины [10].

Протеаза Arg-C (например, Promega, кат. № V188A, или Endoproteinase Arg-C, Takara Bio) используется для количественного определения пептидоформ гистонов [20] и секвенирования белков, обладает высокой специфичностью по отношению к С-концевым остаткам Arg, что приводит к образованию ограниченного количества пептидных фрагментов.

Лизаргиназа, или LysargiNase (например, Sigma-Aldrich, кат. № EMS0008, или Promega, кат. № V1731), – «зеркальная» трипсину металлопротеиназа, обнаруженная в *Methanosarcina acetivorans*. Лизаргиназа специфически гидролизует белки по остаткам Lys и Arg. В результате образуются пептиды с молекулярной массой, аналогичной триптическим пептидам, но с остатками Lys и Arg на N-конце. Обработка лизаргиназой позволяет улучшать идентификацию С-концевых пептидов белков и определение богатых Arg фосфорилированных участков. H. Yang и соавт. [21] использовали комбинацию лизаргиназы и трипсина. Поскольку трипсин расщепляет полипептидную цепь после остатков Lys и Arg, а лизаргиназа – перед таковыми, в результате одна

из полипептидных цепей гидролизуется до пептидов, которые при МС-анализе образуют взаимодополняющие наборы ионов. Такой подход позволяет идентифицировать аминокислотную последовательность белка с высокой точностью. В лизиновых конъюгатах, таких как трастузумаб эмтанзин, молекула ЛС связана с Lys, таким образом гидролиз связей на участках полипептидной цепи вблизи линкерного фрагмента трипсином часто пространственно затруднен. E. Watts и соавт. [22] описали, что использование лизаргиназы позволяет преодолеть пространственные ограничения, поскольку лизаргиназа гидролизует пептидные связи лизина с N-конца, и получить пептид с сохранным сайтом конъюгации.

Применение ферментов, иммобилизованных на магнитных частицах, позволяет значительно ускорить пробоподготовку и повысить воспроизводимость результатов пептидного картирования. При использовании избытка термостабильного фермента (например, Mag-Trypsin, Takara Bio, или Smart Digest kits, Thermo Scientific) при повышенных температурах время гидролиза сокращается с 16–18 до 0,5–2 ч. Магнитная сепарация позволяет полностью удалить фермент из реакционной смеси, избежать аутолиза и остановить реакцию в точно заданный момент [13, 23]. Автоматизированный метод получения пептидных фрагментов показал высокую специфичность: содержание неспецифических пептидов в продукте реакции составило ≤1,3%; время пробоподготовки – 30–60 мин; риск ошибок оператора и возникновения артефактов (образования продуктов окисления или дезаминирования), характерных для более длительной процедуры ручного гидролиза, был снижен [13].

Иммобилизация фермента термолизина на силикатных дендримерах (полиамидамин и карбосилан) [24] позволяет получить стабильный биокатализатор, пригодный для многократного промышленного применения. В исследованиях было показано, что после трех каталитических циклов не наблюдалось потери ферментативной активности в процессе гидролиза белков.

Известен набор¹⁰, состоящий из оптимизированных ферментов – рекомбинантной Lys-C и модифицированного трипсина, которые сохраняют высокую каталитическую активность в буферном растворе (рН 5,4) с добавлением антиоксидлителя и трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорида (ТСЕФ). Пробоподготовка занимает 4,5–5 ч. Слабокислая среда предотвращает

¹⁰ <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/accumap-low-ph-protein-digestion-kits-protocol.pdf>

химическую модификацию а.к.о. во время подготовки образца, например дезамидирование Asn и возникновение меж- и внутримолекулярных дисульфидных связей [5].

Для сокращения времени пробоподготовки и уменьшения количества ошибок оператора разрабатываются автоматизированные системы фрагментации белков. Автоматизированные протоколы включают использование жидкостной платформы Hamilton Star со стандартными 96-луночными микродиализными планшетами (10 кДа) [25], а также микроколонок для эксклюзионной хроматографии, подходящих для полностью автоматизированной и быстрой замены буфера [26].

Y.D. Liu и соавт. [27] продемонстрировали более высокую эффективность и воспроизводимость автоматизированной системы пробоподготовки TECAN (Tecan Group Ltd., Меннедорф, Швейцария) по сравнению с ручной пробоподготовкой, что следовало из сопоставления как хроматографических профилей, так и результатов количественного определения посттрансляционных модификаций.

Поскольку первичная структура белка уникальна, для построения пептидной карты необходимо получение оптимального количества пептидов из нативного белка. Если количество образовавшихся пептидных фрагментов слишком мало или велико, то карта утрачивает специфичность к конкретному белку, поскольку повышается вероятность обнаружения схожего профиля у родственных белков.

На этапе протеолиза могут образовываться короткие пептиды, содержащие от 2 до 4 а.к.о., которые не удерживаются на неподвижном сорбенте при обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ). Короткие пептиды часто гидрофильны; плохо сорбируются на гидрофобном сорбенте колонки C18; элюируются в «мертвом объеме» вместе с солями и растворителями; плохо ионизируются при МС-анализе. Поэтому предпочтительно выбирать протеазы, при обработке которыми не образуется большое количество ди- или трипептидов. Полипептиды длиной ≥ 25 –30 а.к.о. из-за высокой гидрофобности и большого количества сайтов взаимодействия с сорбентом C18/C8 могут длительно удерживаться в колонке при стандартном градиенте. Пептид, конъюгированный с молекулой небелковой природы, может вызывать уширение пика на хроматограмме из-за микрогетерогенности линкера. Полипептиды длиной более 25–30 а.к.о. плохо переходят в газовую фазу

при МС-анализе, поскольку содержат большое количество заряженных групп, что усложняет расшифровку спектра. Однако пептидные карты, составленные с использованием крупных фрагментов белка, проще интерпретировать, нежели карту, содержащую большое количество хроматографических пиков [18].

Вследствие аутолиза протеаз на пептидной карте могут определяться дополнительные пики, интенсивность которых зависит от массового соотношения количества протеаз к белку. Количество фермента для одного реакционного цикла подбирают индивидуально, в диапазоне соотношений белок:фермент от 10:1 до 500:1 [5, 10, 20]. В ряде случаев количество фермента может быть увеличено [28]. Количество фермента должно быть оптимальным: с одной стороны, количество фермента должно обеспечивать полное расщепление денатурированного белка; с другой – необходимо использовать минимальное количество фермента для снижения стоимости анализа и предотвращения появления артефактных пиков, обусловленных аутолизом протеазы.

Выбор протеолитического фермента является компромиссом между покрытием аминокислотной последовательности (>95%), возможностью обнаружения небольших структурных изменений, надежностью гидролиза и рентабельностью применения методики, которая в большой степени влияет на ее включение в стандартные операционные процедуры (табл. 1).

Выбор условий ферментативного расщепления.

Выбор температуры, pH и времени обработки протеазой для фрагментации денатурированных белков обусловлен активностью фермента и химической стабильностью самого белка. Значение pH должно соответствовать оптимуму каталитической активности, например трипсин – 7,5–8,5; пепсин – 1,0–3,0; лизаргиназа – 6,0–9,0. Важно, чтобы значение pH реакционной среды не изменяло структуру белка для предотвращения агрегации, выпадения в осадок, изменения поверхностного заряда, и модификацию а.к.о. Выбор температуры проведения гидролиза обусловлен оптимальной температурой работы большинства ферментов – в диапазоне 25–37 °C [6, 7, 11].

Время проведения протеолиза варьируется от 30 мин до 30 ч [5, 7, 20]. Сокращение времени увеличивает скорость анализа, однако должно быть достаточным для полного гидролиза. Длительная инкубация с ферментом обеспечивает полное расщепление полипептидной цепи, но увеличивает количество пиков продуктов

Таблица 1. Сравнительная характеристика современных ферментативных инструментов для пептидного картирования**Table 1.** Comparative characteristics of modern enzymatic tools for peptide mapping

Критерий сравнения <i>Comparison criterion</i>	Классический трипсин (Trypsin Gold/MS Grade) <i>Classic trypsin (Trypsin Gold/MS Grade)</i>	Альтернативные протеазы (Lys-C, Glu-C, Asp-N) <i>Alternative proteases (Lys-C, Glu-C, Asp-N)</i>	Смеси протеаз (например, Tryp/Lys-C) <i>Protease mixtures (e.g., Tryp/Lys-C)</i>	«Быстрые» ферменты <i>Rapid digestion kits</i>
Специфичность <i>Specificity</i>	Высокая (по Lys, Arg) <i>High (by Lys, Arg)</i>	Высокая, но для конкретных а.к.о. <i>High, but specific to a.a.r.</i>	Максимальная (минимизация пропусков гидролиза) <i>Maximum (minimization of hydrolysis gaps)</i>	Высокая <i>High</i>
Время гидролиза <i>Hydrolysis time</i>	4–18 ч (стандарт) <i>4–18 hours (standard)</i>	4–16 ч <i>4–16 hours</i>	2–12 ч <i>2–12 hours</i>	15–60 мин <i>15–60 min</i>
Покрытие последовательности <i>Sequence coverage</i>	Высокое, но возможны «слепые зоны» <i>High, but there may be “blind spots”</i>	Высокое. Используются для устранения «слепых зон» <i>High. Used to eliminate blind spots</i>	Очень высокое (покрытие >95%) <i>Very high (coverage >95%)</i>	Высокое, сопоставимо с классическим подходом <i>High, comparable to the classical approach</i>
Устойчивость к денатурирующим агентам <i>Resistance to denaturants</i>	Низкая, требует разбавления мочевины / гуанидина гидрохлорида <i>Low, requires dilution with urea / guanidine hydrochloride</i>	Высокая (особенно Lys-C) <i>High, especially Lys-C</i>	Средняя/Высокая <i>Medium/High</i>	Очень высокая в присутствии сурфактантов / хаотропных соединений <i>Very high in the presence of surfactants/ chaotropes</i>
Риск артефактов <i>Risk of artifacts</i>	Средний (риск деамидирования при длительной инкубации) <i>Medium (risk of deamidation during prolonged incubation)</i>	Средний <i>Medium</i>	Пониженный за счет сокращения времени <i>Reduced due to time reduction</i>	Минимальный за счет экспресс-протокола <i>Minimum due to express protocol</i>

Таблица подготовлена автором с использованием источников [3, 5, 7, 10, 11, 17], приведенных в списке литературы / The table was prepared by the author using the sources [3, 5, 7, 10, 11, 17], which are given in the references list

Примечание. а.к.о. – аминокислотные остатки.

Note. a.a.r., amino acid residues.

аутолиза. Уменьшение продолжительности инкубации снижает вероятность их образования, но вызывает образование ненативных модификаций, таких как дезамидирование и изомеризация; однако в условиях короткой инкубации есть риск образования слишком длинных гидрофобных пептидов. При проведении фрагментации белков трипсином при циклическом изменении давления [29] в течение 30 мин с чередованием циклов 10-секундного периода атмосферного давления и 50-секундного периода высокого давления снижалось количество модифицированных фрагментов и обеспечилась воспроизводимость хроматографического профиля в сравнении со стандартным подходом (16–18 ч при 37 °С). Сверхбыстрое расщепление аминокислотной цепи трипсином может быть достигнуто в микрокаплях при 25 °С в условиях атмосферы азота в течение 250 мкс [30]. По сравнению с расщеплением в течение 16–18 ч использование такого метода приводило к снижению количества продуктов дезамидирования Asn и Glu.

Реакция гидролиза останавливается либо изменением pH реакционной среды [3, 5, 6, 9, 13], которое не оказывает влияния на полученную пептидную карту, либо добавлением специфических ингибиторов или денатурирующих агентов, либо температурной инактивацией путем нагрева до высокой температуры (100 °С) или замораживания [15, 16, 23].

Хроматографическое разделение пептидных лизатов

Для разделения пептидных фрагментов могут быть использованы различные аналитические методы, такие как ОФ ВЭЖХ, ионообменная ВЭЖХ, гидрофобная хроматография и капиллярный электрофорез¹¹. Выбор метода разделения зависит от особенностей анализируемого белка, но наиболее часто используемым методом является ОФ ВЭЖХ [3, 8–10] со спектрофотометрическим детектором при длинах волн 200–230 нм. Для повышения достоверности идентификации пептидов, содержащих Trp, Tug и Cys, детектирование может проводиться при длине

¹¹ ОФС.1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

волны 280 нм, однако более информативным является флуориметрическое детектирование и МС-анализ [5–7, 12, 13]. Для эффективно-го разрешения пептидной смеси необходимо тщательно подобрать хроматографическую колонку [28]. Наиболее часто используют хроматографические колонки с фазой C18 таких производителей, как Waters (например, ACQUITY Premier BSM [3] или Acquity Premier BEH130 C18 [5]); Thermo (например, Vanquish Acclaim C18 [13] или MAbPac™ RP [21]); Agilent (например, Poroshell 120 EC C18 [7] или AdvanceBio Peptide Map [12]).

Разделение пептидной смеси проводят на колонках, заполненных сорбентами на основе силикагелей, модифицированных гидрофобными группами с диаметром частиц 1,7–5 мкм [5, 27, 10] и размером пор 100–130 Å [6, 28]. Длина аналитических колонок варьируется в пределах 50–250 мм [7, 13]. ОФ ВЭЖХ на фазе C18 гидрофобных полипептидов обычно затруднена, поэтому в таких случаях используют колонки с меньшей длиной углеродной цепи связанной фазы (C8, C4) [13].

В качестве компонентов подвижной фазы наиболее часто используются разбавленная TFA [3, 5] и муравьиная кислоты (FA) [6, 12], смеси дифторуксусной (ДФУ) [10] или уксусной кислоты (AcOH)¹² с водой и ацетонитрилом. TFA, FA и AcOH используются в качестве ион-парного реагента, увеличивающего гидрофобность пептидов за счет образования ионных пар с их заряженными группами. Происходит увеличение сорбции пептидов на гидрофобной стационарной фазе и, следовательно, улучшается разделение за счет более длительного времени удерживания пептидов. Таким образом, на хроматограмме регистрируются симметричные пики без уширения, соответствующие элюируемому пептиду. Наиболее часто для разделения белков используется TFA ввиду высокой летучести, возможности использования при проведении МС-анализа и средства к заряженному пептиду [28].

Для улучшения элюирования гидрофобных пептидов в подвижную фазу добавляют пропанол, изопропанол или другие модификаторы [10]. Однако спирты характеризуются более высокой вязкостью, чем ацетонитрил, поэтому их

добавление может привести к повышению давления и уширению пиков. Такие спирты характеризуются собственным оптическим поглощением и требуют детектирования при длинах волн >220 нм, что приводит к снижению чувствительности детекции вследствие наложения сигналов аналитов и растворителей. Для повышения разрешающей способности системы в качестве водного компонента подвижной фазы используют буферный раствор (pH 3,0–5,0), что улучшает разделение пептидов, содержащих отрицательно заряженные а.к.о., например остатки Glu и Asp [31].

Градиентное элюирование позволяет достичь эффективного и быстрого разделения смеси пептидных фрагментов¹³. Разделение проводят при скорости подвижной фазы от 0,2–0,6 мл/мин [3, 5] с низкой скоростью изменения состава подвижных фаз и при температуре от 25 до 65 °C [5, 10, 13], что приводит к снижению противодавления в колонке и уменьшает ширину регистрируемого хроматографического пика. В случаях высокой гидрофобности пептидов для максимального извлечения требуется нагрев до 80 °C [23].

Идентификация пептидов

Определение молекулярной массы каждого продукта ферментативного расщепления белка с помощью масс-спектрометрии является наиболее простым методом идентификации белков. В большинстве случаев для ионизации образца используют ионизацию электрораспылением (ESI) [3, 13, 25], а также матрично-активированную лазерную десорбцию/ионизацию (MALDI). Затем полученные молекулярные массы пептидов сравниваются с теоретически рассчитанными молекулярными массами пептидов, которые должны образоваться при полном гидролизе белка определенной протеазой¹⁴. Для анализа данных пептидного картирования существует большое количество доступных компьютерных программ свободного доступа (табл. 2). Специализированные сайты, например база данных пептидных последовательностей нематод¹⁵ и база данных по ЛП DrugBank¹⁶, позволяют проводить поиск по белковым профилям отдельных организмов. Наиболее часто используемым средством интерпретации данных

¹² Беккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика. Методы хроматографии и капиллярного электрофореза. М.: Технофера; 2023.

¹³ Там же.

¹⁴ Hunter C, De Souza L, Seto C, et al. Single source solution for low flow chromatography. AB Sciex. 2019. <https://sciex.com/tech-notes/technology/single-source-solution-for-low-flow-chromatography>

¹⁵ www.nematodes.org

¹⁶ <https://www.drugbank.com>

Таблица 2. Доступное программное обеспечение для идентификации белков с помощью масс-фингерпринтинга пептидов**Table 2.** Available software for protein identification by peptide mass fingerprinting

Наименование программы <i>Software Program</i>	Ссылка <i>URL</i>
Multident	http://web.expasy.org
Mascot	http://www.matrixscience.com
MS-Fit	http://prospector.ucsf.edu
ProteoMapper (PeptideAtlas)	https://peptideatlas.org/map/
MassWiz	http://sourceforge.net/projects/masswiz
Protein Lynx Global SERVER	http://waters.com
MassMatrix	http://cloud.massmatrix.bio
MaxQuant	http://maxquant.org
Skyline	http://skyline.ms
FragPipe (MSFragger)	http://fragpipe.nesvilab.org
Proteome Discoverer	https://www.thermofisher.com

Таблица составлена автором на основе данных [32] с дополнениями / The table was prepared by the author based on the data [32] with additions

пептидного картирования является программа Mascot¹⁷ [14, 18]. Для корректного определения пептидов, содержащих остатки Cys, которые образуют дисульфидные мостики в нативном белке, а также для картирования положения этих мостиков целесообразно применять современные биоинформатические программы, включая MassMatrix [14].

Экспериментально полученные молекулярные массы пептидов сопоставляются с аминокислотными последовательностями белков, представленными в базах данных. Для сопоставления необходимо задать граничные значения: тип используемого молекулярного иона, предел погрешности при сопоставлении масс, тип используемой протеазы и количество допустимых негидролизированных сайтов расщепления, таксономическую принадлежность анализируемого белка и *in vitro* модификации полученных пептидов. Для каждого найденного по этим параметрам белка генерируется теоретический набор протеолитических пептидов и проводится сопоставление рассчитанных и полученных в эксперименте масс, на основании чего рассчитывается индекс достоверности, а также величина покрытия последовательности¹⁸.

Идентификация белка основана на анализе количества совпадений между экспериментально определенной массой и массой пептидов,

полученной из базы данных. Важно измерять молекулярные массы пептидов с высокой точностью, поскольку погрешности при определении массы повышают процент ложных идентификаций. Для высокоточного определения массы пептидов следует использовать времяпролетные масс-спектрометры с высокой разрешающей способностью [3, 16] или масс-спектрометры с орбитальной ионной ловушкой [6, 7, 21, 23, 28]. Масс-спектрометры нового поколения сверхвысокого разрешения с ESI обеспечивают точность определения массы с погрешностью <0,0005%, например: TripleTOF 6600, SCIEX – <0,0002%; Orbitrap Exploris 240, Thermo Fisher Scientific – <0,0003%; TripleTOF 7600, SCIEX – <0,0001%, что позволяет однозначно определять массы пептидов.

Регуляторные требования к методикам пептидного картирования

Несмотря на вариативность условий анализа, все методики пептидного картирования должны соответствовать регуляторным требованиям. Государственная фармакопея Российской Федерации, Европейская фармакопея¹⁹, Фармакопея США²⁰ и Фармакопея Китайской Народной Республики²¹ содержат гармонизированные требования к разработке и валидации методик пептидного картирования. Критерием надежности методики является покрытие

¹⁷ Лебедев А, Артеменко К, Самгина Т. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. М.: Техносфера; 2012.

¹⁸ Там же.

¹⁹ 2.2.55 Peptide mapping. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2021.

²⁰ <1055> Biotechnology-derived articles – Peptide mapping. USP 43–NF 38. Rockville; 2009.

²¹ B05 – Peptide mapping. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing; 2020.

аминокислотной последовательности белков по ВЭЖХ с УФ-спектроскопическим детектированием $\geq 95\%$. На пептидной карте должны присутствовать пики всех пептидных фрагментов, содержащих участки, обеспечивающие фармакологическую активность индивидуального белка или ЛС. Отсутствие отдельных пиков обосновывают при разработке и валидации методики испытания и указывают в нормативной документации на ЛС. Характеристические пики выбирают среди наиболее интенсивных и хорошо воспроизводимых сигналов, соответствующих гипервариабельным участкам белка (CDR участки). Разработку и аннотирование пептидного картирования допускается проводить на охарактеризованном внутреннем стандартном образце белка²².

Важно включение в методику испытания четких критериев соответствия, а также пределов допустимого отклонения от них системы и оценки соответствия анализируемого белка стандартному образцу. Общие требования к критериям соответствия, предъявляемым к методикам пептидного картирования, описаны в статье [31] и в фармакопее²³. Необходимо оценивать соответствие полученной пептидной карты стандартного образца пептидной карте, прилагаемой к указанному стандартному образцу, а именно: общее число и последовательность пиков, их относительная интенсивность, наличие всех характеристических пиков²⁴.

При разработке условий проведения хроматографии минимизируют коэлюирование и неполное разрешение пиков, которые могут привести к снижению воспроизводимости хроматографического профиля белка в рамках рутинного контроля ЛС. Особенно это важно для критических пар пиков, относящихся к гипервариабельным сайтам, сайтам конъюгации или другим характеристическим последовательностям. Для критических пар устанавливают критерий к разрешению пиков, который будет обеспечивать достоверную воспроизводимость площадей или высот пиков в установленном диапазоне.

Прецизионность хроматографической системы оценивается по числовым показателям характеристических пиков – времени удерживания или относительного времени удерживания, интенсивности или относительной интенсивности характеристических пиков (высота или площадь пика), величине относительного стандартного

отклонения. Отсутствие пиков в интервале, соответствующем времени выхода пиков пептидных фрагментов идентифицируемого белка, на хроматограмме образца без исследуемого белка также необходимо подтверждать.

Все методики должны быть валидированы²⁵. К критическим параметрам методики пептидного картирования, подлежащим валидации, относятся специфичность, разрешающая способность, прецизионность, устойчивость, а также полнота проведенного гидролиза. Учитывая вариабельность пептидных карт, методика должна содержать все возможные примеры хроматограмм типичных пептидных карт стандартного и испытываемого образцов с указанием пиков (групп пиков) характеристических пептидных фрагментов (реперных пиков). Присутствие на пептидной карте испытываемого образца пиков, несопоставимых с пептидной картой стандартного образца, кроме областей выхода реперных пиков, их количество, время выхода и интенсивность (относительная интенсивность) должны быть обоснованы. Оценка подлинности ЛС должна включать сравнение полученных пептидных карт испытываемого и стандартного образцов [31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пептидное картирование остается ключевым инструментом подтверждения подлинности и качества современных биофармацевтических препаратов в полном соответствии с требованиями руководств ICH и ведущих мировых фармакопейных статей. Несмотря на появление новых подходов к проведению пептидного картирования, методика остается сложной, многостадийной и достаточно вариативной процедурой, которая должна соответствовать регуляторным требованиям.

Несмотря на доминирующую роль модифицированного рекомбинантного трипсина, развитие методологии смещается в сторону использования альтернативных протеаз и их комбинаций, что является критическим условием для достижения полного покрытия аминокислотной последовательности. Систематизация современных подходов показала, что внедрение коммерческих экспресс-систем и автоматизированных платформ на основе иммобилизованных ферментов наиболее перспективно для преодоления методологической гетерогенности. Это позволяет сократить время пробоподготовки

²² ОФС.1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

²³ Там же.

²⁴ Там же.

²⁵ ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

и минимизировать риски возникновения аналитических артефактов (таких как деамидирование или окисление), а также значительно повысить межлабораторную воспроизводимость результатов, что напрямую отвечает запросам регуляторных органов к валидации высокотехнологичных методов анализа.

Дальнейшее развитие области, вероятно, будет связано с интеграцией автоматизированных систем online-протеолиза и алгоритмов глубокого обучения для интерпретации масс-спектрометрических данных, что окончательно закрепит статус пептидного картирования как высокопроизводительного промышленного стандарта.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Климов НА, Симбирцев АС. *Терапевтические моноклональные антитела*. СПб: Фолиант; 2021.
2. Халимова АА, Орлов АС, Таубэ АА. Анализ локализации производства биотехнологических лекарственных препаратов в России с учетом происхождения активных фармацевтических субстанций. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(1):53–61. Khalimova AA, Orlov AS, Taube AA. Analysis of biopharmaceutical manufacturing localisation in Russia considering the country of origin of active pharmaceutical ingredients. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(1):53–61 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-1-53-61>
3. Muriithi B, Ippoliti S, Finny A, et al. Clean and complete protein digestion with an autolysis resistant trypsin for peptide mapping. *J Proteome Res*. 2024;23(11):5221–8. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c00598>
4. Gogesch P, Dudek S, van Zandbergen G, et al. The role of Fc receptors on the effectiveness of therapeutic monoclonal antibodies. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8947. <https://doi.org/10.3390/ijms22168947>
5. Menneteau T, Saveliev S, Butre C, et al. Addressing common challenges of biotherapeutic protein peptide mapping using recombinant trypsin. *J Pharm Biomed Anal*. 2024;243:116124. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.116124>
6. Dong Q, Yan X, Liang Y, et al. Comprehensive analysis of tryptic peptides arising from disulfide linkages in NISTmAb and their use for developing a mass spectral library. *J Proteome Res*. 2021;20(3):1612–29. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00823>
7. Peng W, Pronker MF, Snijder J. Mass spectrometry-based de novo sequencing of monoclonal antibodies using multiple proteases and a dual fragmentation scheme. *J Proteome Res*. 2021;20(7):3559–66. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00169>
8. Fang JT, Wang ST, Wang H, Fang WJ. A novel peptide mapping method utilizing cysteine as a reducing agent. *Pharm Res*. 2025;42(1):173–84. <https://doi.org/10.1007/s11095-024-03805-z>
9. Ren Y, Shi Z, Zhang C, et al. Evaluation and minimization of over-alkylation in proteomic sample preparation. *Int J Mass Spectrom*. 2022;481:116919. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2022.116919>
10. Зубарева ЕВ, Дегтерев МБ, Неронова МЮ и др. Разработка и валидация методики пептидного картирования инновационного препарата ингибитора С1 эстеразы. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(2):203–18. Zubareva EV, Degterev MD, Neronova MYu, et al. Development and validation of a peptide-mapping procedure for a novel C1 esterase inhibitor. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(2):203–18 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-2-203-218>
11. Li X, Rawal B, Rivera S, et al. Improvements on sample preparation and peptide separation for reduced peptide mapping based multi-attribute method analysis of therapeutic monoclonal antibodies using lysyl endopeptidase digestion. *J Chromatogr A*. 2022;1675:463161. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463161>
12. Lam AK, Zhang J, Frabutt D, et al. Fast and high-throughput LC-MS characterization, and peptide mapping of engineered AAV capsids using LC-MS/MS. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2022;27:185–94. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.09.008>
13. Jakes BC, Millán-Martín S, Kristensen DB, et al. Enhancing peptide mapping sequence coverage through an automated dual protease digest. *LC GC Europe*. 2023;36(7):246–54. <https://doi.org/10.56530/lcgc.eu.zq5389j9>
14. Cui C, Liu T, Chen T, et al. Comprehensive identification of protein disulfide bonds with pepsin/trypsin digestion, Orbitrap HCD and Spectrum Identification Machine. *J Proteomics*. 2019;198:78–86. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.010>
15. Toole EG, Dufresne C, Ray S, et al. Rapid highly-efficient digestion and peptide mapping of adeno-associated viruses. *Anal Chem*. 2021;93(30):10403–10. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02117>
16. Kim SH, Kim SS, Kim HJ, et al. Peptide mapping analysis of synthetic semaglutide and liraglutide for generic development of drugs originating from recombinant DNA technology. *J Pharm Biomed Anal*. 2025;256:116682. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2025.116682>
17. Dau T, Bartolomucci G, Rappsilber J. Proteomics using protease alternatives to trypsin benefits from sequential digestion with trypsin. *Anal Chem*. 2020;92(14):9523–7. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00478>
18. Wang T, Huang ZA, Zhou M, et al. Drug deconjugation-assisted peptide mapping by LC–MS/MS to identify conjugation sites and quantify site occupancy for antibody-drug conjugates. *J Pharm Biomed Anal*. 2024;243:116098. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.116098>
19. Dau T, Gupta K, Berger I, Rappsilber J. Sequential digestion with trypsin and elastase in cross-linking mass spectrometry. *Anal Chem*. 2019;91(7):4472–8. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05222>
20. Ryzhaya P, Pírek P, Zdráhal Z, Lochmanová G. Arg-C ultra simplifies histone preparation for LC-MS/MS. *Anal Chem*. 2025;97(24):12486–92. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5c02238>
21. Yang H, Li YC, Zhao MZ, et al. Precision de novo peptide sequencing using mirror proteases of Ac-LysargiNase and Trypsin for large-scale proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2019;18(4):773–85. <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR118.000918>
22. Watts E, Bashyal A, Dunham SD, et al. Enhanced characterization of lysine-linked antibody drug conjugates enabled by middle-down mass spectrometry and higher-energy collisional dissociation-triggered electron-transfer/higher-energy collisional dissociation and ultraviolet photodissociation. *Antibodies (Basel)*. 2024;13(2):30. <https://doi.org/10.3390/antib13020030>
23. Millán-Martín S, Jakes C, Carillo S, et al. Inter-laboratory study of an optimised peptide mapping workflow using automated trypsin digestion for monitoring monoclonal

- antibody product quality attributes. *Anal Bioanal Chem.* 2020;412(25):6833–48. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02809-z>
24. Hernández-Corroto E, Sánchez-Milla M, Sánchez-Nieves J, et al. Immobilization of thermolysin enzyme on dendronized silica supports. Evaluation of its feasibility on multiple protein hydrolysis cycles. *Int J Biol Macromol.* 2020;165(Pt B):2338–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.138>
 25. Qian C, Niu B, Jimenez RB, et al. 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>
 26. Sitasuwan P, Powers TW, Medwid T, et al. Enhancing the multi-attribute method through an automated and high-throughput sample preparation. *MAbs.* 2021;13(1):1978131. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1978131>
 27. Liu YD, Stepurska K, Legg K, et al. Automation streamlines peptide map preparation, analysis and reporting for biotherapeutic antibody characterization. *Talanta.* 2026;298(B):128959. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128959>
 28. Xing T, Li S, Tang S, et al. Distinct chemical degradation pathways of AAV1 and AAV8 under thermal stress conditions revealed by analytical anion exchange chromatography and LC-MS-based peptide mapping. *J Pharm Biomed Anal.* 2024;251:116452. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.116452>
 29. Ping Jiang P, Li F, Ding J. Development of an efficient LC-MS peptide mapping method using accelerated sample preparation for monoclonal antibodies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2020;1137:121895. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121895>
 30. Ai Y, Xu J, Gunawardena HP, et al. Investigation of tryptic protein digestion in microdroplets and in bulk solution. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2022;33(7):1238–49. <https://doi.org/10.1021/jasms.2c00072>
 31. Ваганова ОА. Рекомендации по оформлению раздела нормативной документации на лекарственные средства: пептидное картирование. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2021;11(4):276–7. Vaganova OA. Recommendations for the contents of the "peptide mapping" part of a product specification file. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2021;11(4):276–7 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-4-276-277>
 32. Veenstra TD, Van QN, Fox SD, Issaq HJ. Chapter 14 – Protein and metabolite identification. In: Issaq HJ, Veenstra TD, eds. *Proteomic and metabolomic approaches to biomarker discovery.* 2nd ed. Academic Press; 2020. P. 247–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818607-7.00014-1>

Вклад авторов. Автор подтверждает соответствие своего авторства критериям ICMJE.

Author's contributions. Author confirms that she meets the ICMJE criteria for authorship.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Попкова Александра Владимировна / Aleksandra V. Popkova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-8170-3139>

Поступила 19.08.2025

После доработки 11.02.2026

Принята к публикации 21.04.2026

Received August 19, 2025

Revised February 11, 2026

Accepted April 21, 2026