

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
АНАЛИЗА ЗООТОКСИНОВ В РАМКАХ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
(ОБЗОР)**

Юдина Н.С., Астафьева О.В., Лукша В.В., Никифоров А.С., Чепур С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая д. 4

Резюме. Большое разнообразие ядовитых животных в природе, а также широкий спектр биологических эффектов их ядов, послужили основой для возникновения и роста интереса к токсинам животного происхождения. Исследовательские группы по всему миру в настоящее время продолжают выделять все новые биологически активные токсины ядов животных, имеющие высокий потенциал в рамках разработки новых лекарственных препаратов. Обнаруженная высокая фармакологическая активность соединений, содержащихся в ядах животных, способствовала росту числа созданных на их основе средств. Важным этапом при разработке любого препарата являются фармакокинетические исследования для установления эффективности и безопасности активного вещества. Исследования зависимости терапевтического и токсического эффектов от концентрации вещества, а также установление места накопления, периода выведения, биодоступности и других характеристик проводят с помощью физико-химических методов анализа. Применяемые в таких исследованиях методы должны характеризоваться высокой чувствительностью, отсутствием ложноположительных и ложноотрицательных результатов, высокой степенью достоверности и воспроизводимости полученных результатов. К современным методам, соответствующим этим требованиям, можно отнести хроматографические методы анализа, вестерн-блоттинг, ферментно-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA), спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и др. Наиболее распространенным и универсальным является метод tandemной масс-спектрометрии (ТМС) – современный высокоточный и высокочувствительный способ идентификации соединений, в том числе токсинов — как низкомолекулярных, так и белковой природы. ТМС обладает преимуществом в сравнении с иммунологическими методами анализа по степени достоверности, позволяет работать с различными матрицами и имеет большую значимость при количественном анализе препаратов на основе зоотоксинов.

Ключевые слова: зоотоксины; лекарственные средства; физико-химические методы анализа; хроматография; масс-спектрометрия; белки; пептиды

MODERN METHODS OF QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF ZOOTOXINS IN THE FRAMEWORK OF PHARMACOKINETIC STUDIES (REVIEW)

Yudina N.S., Astafyeva O.V., Luksha V.V., Nikiforov A.S., Chepur S.V.

*State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of Ministry of Defense of the Russian Federation, 195043, St. Petersburg, Lesoparkovaya St., 4,
Russian Federation*

Abstract. A wide variety of zootoxins in nature, as well as a wide range of their action, served as the basis for the growth of research interest in toxins of animal origin. The discovered high pharmacological activity of the compounds contained in the poison contributed to the growth in the number of drugs developed on their basis. Currently, research groups continue to isolate new active toxins of animal origin, which in the future can be used to develop new drugs. An important step in the development of any drug is pharmacokinetic studies to establish the effectiveness and safety of the active substance. Studies of the dependence of therapeutic and toxic effects on the concentration of a substance, as well as the determination of the place of accumulation, the period of elimination, bioequivalence and other characteristics, are carried out by methods of physicochemical analysis. The methods used in such studies should be characterized by high sensitivity, the absence of false positive and false negative results, and a high degree of reliability and reproducibility of the results obtained. These include chromatographic methods of analysis, Western blotting, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), NMR spectroscopy, etc. The most common and versatile method is tandem mass spectrometry – a modern high precision and highly sensitive method for identifying compounds, including toxins – both low molecular weight and protein nature. The method has an advantage in comparison with immunological methods of analysis in terms of reliability, allows you to work with various matrices and is of great importance in the quantitative analysis of preparations based on zootoxins.

Key words: zootoxins; drug; physicochemical analysis techniques; chromatography; mass-spectrometry; proteins; peptides

Введение. В современном мире несмотря на развитие синтетической химии и биотехнологии яды животных продолжают исследовать с целью выделения активных компонентов для дальнейшего использования в фармакологии. Токсины встречаются практически у всех живых организмов от бактерий до грибов и растений, оказывая влияние на определенные мишени (рецепторы, ткани, клеточные мембраны и т.п.) с характерным механизмом действия. Возможность применения направленного специфического действия

выделенных компонентов ядов животных позволяет активно использовать природные токсины в разработке фармакологических препаратов.

Многообразие зоотоксинов представляют соединения с различной химической структурой: от крупных молекул белков, размером несколько сотен кДа, до различных низкомолекулярных соединений. Среди наиболее перспективных групп выделяют токсины губок (преимущественно низкомолекулярные соединения) и змей, а также членистоногих и конусов (преимущественно белки и пептиды) [1]. Компоненты ядов этих и других видов животных уже активно используются в фармакологии. В связи с этим, сформирован целый комплекс методов выделения, идентификации (качественной оценки), и количественного анализа токсинов и их метаболитов в биологических жидкостях, органах и тканях. Тем не менее совершенствование уже существующих методов и разработка новых способов анализа позволяют получать все более информативные и достоверные результаты за меньшее время анализа. Выбор проб для проведения исследований зависит от свойств кандидатного лекарственного соединения, но необходимым этапом для каждого из них выступает определение продолжительности циркуляции, лечебной и токсической доз [2]. Эти исследования проводят на пробах крови (сыворотки, плазмы), одной из наиболее информативных и сложных матриц.

Цель обзора состоит в формировании обобщенного представления о существующих современных методах физико-химического анализа в рамках проведения фармакокинетических исследований лекарственных средств на основе зоотоксинов. Представленный материал может быть полезен при выборе оптимальной стратегии исследований в клинко-диагностических лабораториях и лабораториях смежных направлений.

Методы выделения и разделения веществ. Проведение качественного и количественного анализа зоотоксинов в многокомпонентных матрицах по классической схеме требует предварительной подготовки образца, которая заключается в получении очищенной фракции, содержащей количественно выделенную молекулу токсина в пробе. Пробы, содержащие низкомолекулярные токсины, и пробы белков и пептидов готовят с применением различных подходов, но большинство этих способов предполагает разделение компонентов на основании различия их физических и химических свойств. Эти подходы также отличаются и по типам матриц. Чаще всего анализу подвергают пробы сыворотки или плазмы крови, а также пробы мочи, различных органов и тканей.

Подготовка проб для определения белковых токсинов и пептидов сопряжена с большей трудоемкостью, поскольку свойства целевой молекулы и компонентов матрицы химически довольно близки. Современные разработки позволяют выбрать оптимальный способ

подготовки проб в зависимости от оснащенности лаборатории без существенной потери эффективности выделения. К таким способам относятся: фракционирование с применением мембранных фильтров с отсечкой по массам, удаление наиболее выраженных белков в образцах крови методом осаждения, различные вариации аффинной хроматографии: с помощью центрифужных колонок с аффинными сорбентами, колонок для деплеции (обеднения) мажорных белков и т.п.

Рассматривая зоотоксины как активные компоненты лекарственных средств следует отметить, что многие из них (в отличие от большинства синтетических низкомолекулярных соединений) обладают собственной иммуногенностью. Это свойство позволяет получать высокоаффинные специфические антитела к целевым молекулам, которые затем используются в аналитических системах для выделения, предварительной идентификации и количественной оценки токсинов-антигенов. По этой причине иммунноаффинная очистка – распространенный метод выделения пептидных и белковых токсинов из пробы, зачастую применяемый как стадия тонкой очистки после более грубых способов. Помимо специфических антител для этой цели могут быть использованы также различные лиганды, обладающие высокой степенью аффинности к целевой молекуле. Это химические соединения с пространственной структурой, идентичной комплиментарной структуре (паратопу) антитела или мишени токсина (например, рецептора).

В общем виде очистка проб и выделение целевого соединения основаны на принципах метода хроматографии. *Хроматография* как метод физико-химического анализа базируется на особенности перераспределения веществ между подвижной и неподвижной фазой [3]. Существует широкое разнообразие хроматографических методов, однако в подавляющем большинстве случаев используют обращено-фазовую и/или ионообменную хроматографии. Эти методы на сегодняшний день могут быть адаптированы практически для любого соединения и реализованы как в виде плавных градиентов для разделения сложных смесей, так и в виде ступенчатых методов для очистки целевых фракций.

Ионообменная хроматография (ion exchange chromatography, IEXC) разделяет молекулы на основе обратимых заряд-зарядовых взаимодействий между заряженными функциональными группами аналитов и ионообменной подложкой, которая имеет противоположный заряд. После связывания растворенных веществ колонку промывают буфером с низким содержанием ионов. Нейтральные аналиты или аналиты, несущие тот же заряд, что и ионообменная подложка, легко удаляются во время стадии промывки (рисунок 1). Связанные аналиты затем элюируют путем постепенного увеличения либо ионной силы, либо pH буфера [4].

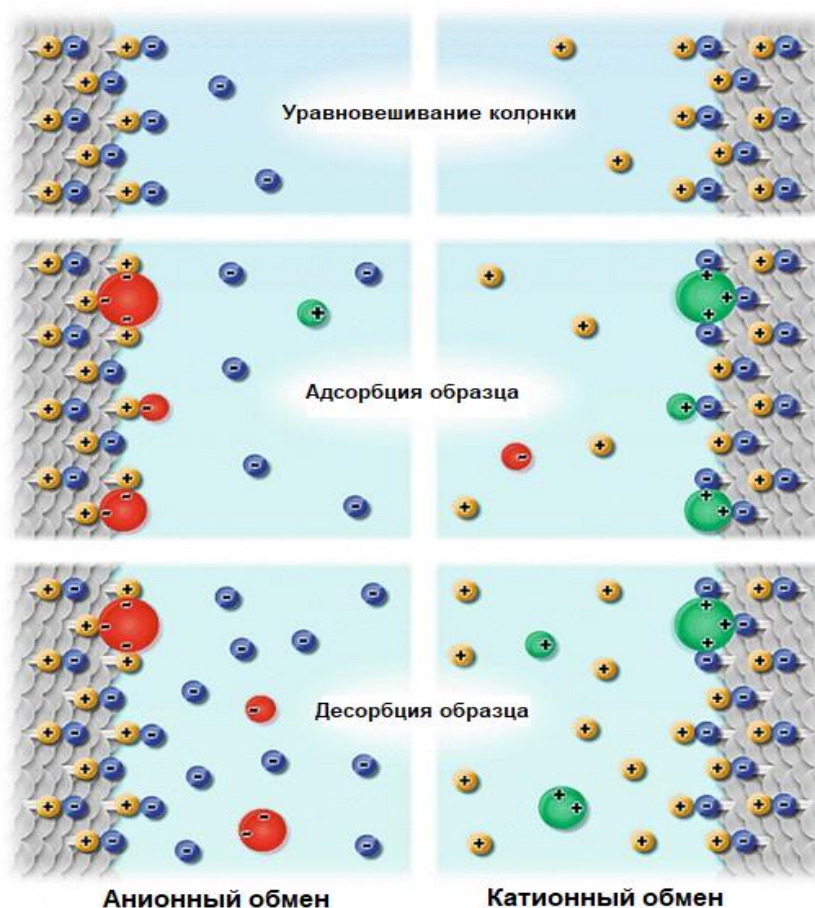


Рисунок 1. Схематичное изображение процесса ионообменной хроматографии

В случае пептидов и белков входящие в их последовательность ионизированные аминокислоты лизин, цистеин и гистидин обеспечивают положительные заряды, а отрицательные заряды обеспечиваются остатками аспартата и глутамата. Показатель pH среды подбирают в соответствии с типом сорбента (анионообменный или катионообменный) и физико-химическими свойствами целевой молекулы. Обеспечение взаимодействия с ионообменным сорбентом происходит за счет создания условий, в которых аналит будет иметь заряд, противоположный заряду сорбента.

Частный случай ионообменной хроматографии посредством ступенчатой очистки и концентрирования — *твердофазная (микро) экстракция (ТФЭ, ТФМЭ)*. Метод активно используется в лабораторной практике при работе как с объектами окружающей среды, так и при анализе биологических проб. Этот метод удобен для выделения низкомолекулярных соединений различных лекарственных средств в том числе и токсинов, а также их метаболитов [5]. Для проведения ТФЭ используют патроны, которые представляют собой колонки, заполненные различными типами сорбентов, которые подбирают в зависимости от полярности выделяемого вещества. Это могут быть сильные или слабые катионо- или анионообменные смолы, обращенно-фазовый сорбент C18, и сорбенты со специфическими

группами [6]. Новым направлением ТФЭ является ее сочетание с магнитной сепарацией, что по сути является аналогом магнитной сепарации белков и пептидов, но позволяет без предварительной подготовки проб проводить экстракцию даже такой сложной матрицы как плазма крови [7]. Процесс экстракции заключается в установке патрона в гнездо вакуумного манифолда, и проведении последовательных стадий кондиционирования и промывки сорбента патрона, внесение пробы, промывки сорбента от несвязавшихся соединений и элюции удержанного сорбентом вещества. Эта процедура занимает минимальное время и позволяет проводить поточную подготовку проб. Являясь одним из способов микроэкстракции ТФЭ, в отличие от жидкостной экстракции, позволяет избежать большого количества различных токсичных органических растворителей (хлороформ, эфир, гексан и др), сконцентрировать целевой компонент в форме, пригодной для последующего количественного анализа. Методом ТФЭ можно очищать разнообразные пробы, включая основные биологические жидкости — мочу, сыворотку крови, а также экстракты органов и тканей.

Аффинная хроматография — это метод, применяемый на этапе подготовки пробы к дальнейшему анализу, представляет собой эффективный способ выделения и очистки, который так же предполагает использование аффинных молекул — антител или других лигандов, способных взаимодействовать с целевой биомолекулой. Если специфичность этого взаимодействия подтверждена, то такой метод может рассматриваться как способ предварительной идентификации аналита (рисунок 2) [8]. Для проведения аффинной хроматографии (АХ) подбирают условия, при которых происходит специфическое и обратимое связывание аналита с его лигандом (синтетическим соединением, рецептором, антителом), иммобилизованным на неподвижной фазе хроматографической колонки. Связывание может включать комбинацию электростатических или гидрофобных взаимодействий, а также короткодействующих молекулярных взаимодействий, таких как силы Ван-дер-Ваальса и водородные связи. В результате из экстракта, проходящего через колонку, адсорбируется только нужный аналит, другие вещества вымываются. Взаимодействие с белком-лигандом может быть нарушено либо специфически, используя конкурентный лиганд, либо неспецифически — путем изменения pH, ионной силы или полярности. Возможности применения метода ограничены доступностью иммобилизованных лигандов.

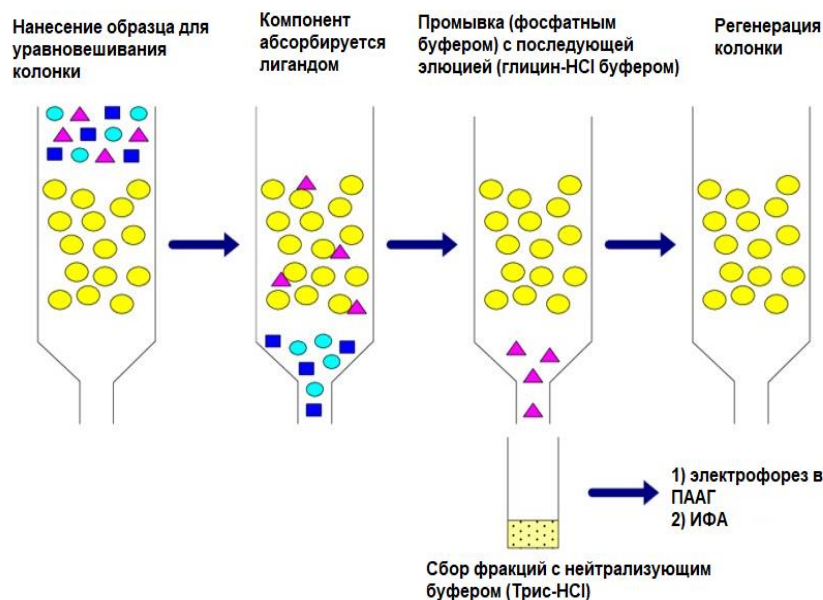


Рисунок 2. Этапы аффинной хроматографии

Принцип АХ реализован для поточного анализа биологических проб в формате центрифужных спин-колонок. Коммерческие доступные сорбенты имеют уже привитые лиганды: синтетические соединения и антитела против основных, «мажорных», белков крови. Центрифужные колонки рассчитаны на небольшой объем пробы, от 0,05 до 2,0 мл, и характеризуются высокой эффективностью очистки и степенью извлечения целевой биомолекулы при условии дальнейшего анализа с помощью высокочувствительных методов, например хромато-масс-спектрометрии.

Весьма успешно зарекомендовал себя *метод магнитной сепарации (МС)* при подготовке проб. В его основе лежит принцип иммунноаффинного выделения, но в случае магнитной сепарации лиганды конъюгируют с модифицированной поверхностью магнитных частиц оксида железа, к магнитным частицам с привитым лигандом затем вносят исследуемую пробу, инкубируют смесь для осуществления аффинного взаимодействия и удаляют не связавшиеся компоненты. Последующие стадии промывки и элюции целевого соединения проводят аналогично методу аффинной хроматографии. Данная методика экстракции проводится в пробирках типа эппендорф с применением специального штатива с магнитом, позволяющим иммобилизовать частицы на стадиях промывки [9].

Метод МС подходит для количественного определения различных соединений в образцах биологических жидкостей, в частности сыворотки крови, а также тканях и клеточных лизатах [10]. К недостаткам МС относится не высокая степень извлечения целевого компонента, что в конечном итоге снижает чувствительность методики количественного анализа полученного элюата.

Наиболее распространенный метод, используемый в контрольно-аналитических лабораториях – это *капиллярный электрофорез (КЭ)*, который подходит для разделения широкого спектра соединений. При капиллярном электрофорезе (capillary electrophoresis, CE) разделение проводят в тонких кварцевых капиллярах с диаметром от 25 до 75 мкм [11]. Существует большое разнообразие модификаций этого метода, однако во всех из них ключевую роль играют процессы, происходящие внутри капилляра. В классических вариантах используют электрофоретические буферы с pH выше 2,5. В этих условиях силанольные группы на стенке кварцевого капилляра диссоциируют и формируется двойной электрический слой. В результате подвижный раствор внутри капилляра приобретает положительный заряд и при приложении к нему тока начинает миграцию к катоду – формируется электроосмотический поток. Параллельно с этим происходит движение заряженных молекул аналита в соответствии с их собственным зарядом.

В других модификациях этих методов стенка капилляра может блокироваться специализированным полимером (для предотвращения формирования электроосмотического потока) или её заряд может инвертироваться (для формирования отрицательно заряженного электроосмотического потока).

В отличие от хроматографических методов, в КЭ не происходит снижения эффективности из-за процессов, связанных с вязкостью растворов, трения о неподвижные элементы хроматографической системы и т.д. Таким образом, КЭ – это один из наиболее эффективных методов разделения сложных смесей, позволяющий получать очень узкие пики. Тем не менее его селективность ограничена и в реальной практике этот метод зачастую не позволяет провести полноценный ненаправленный анализ сложных смесей. Сильная сторона этого метода – его универсальность: на одном и том же приборе для КЭ можно проводить разделение белков, малых молекул и неорганических ионов.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) основана на использовании полярной жидкой подвижной фазы (чаще всего смеси вода/ацетонитрил) и неполярной твердой фазы (чаще всего C8 и C18 углеводороды, иммобилизованные на силикагеле) [12].

Свое название этот метод получил за счет того, что его техническое исполнение создает условия для максимальной эффективности разделения по кривой Ван-Деемтера в соответствии с рисунком 3. Чем ниже высота эквивалентная теоретической тарелке, тем выше эффективность разделения. Это достигается за счет поддержания определенной скорости тока подвижной фазы через колонку, плотно и равномерно наполненную неподвижной фазой. В результате в системе формируется высокое давление, характерное для ВЭЖХ.

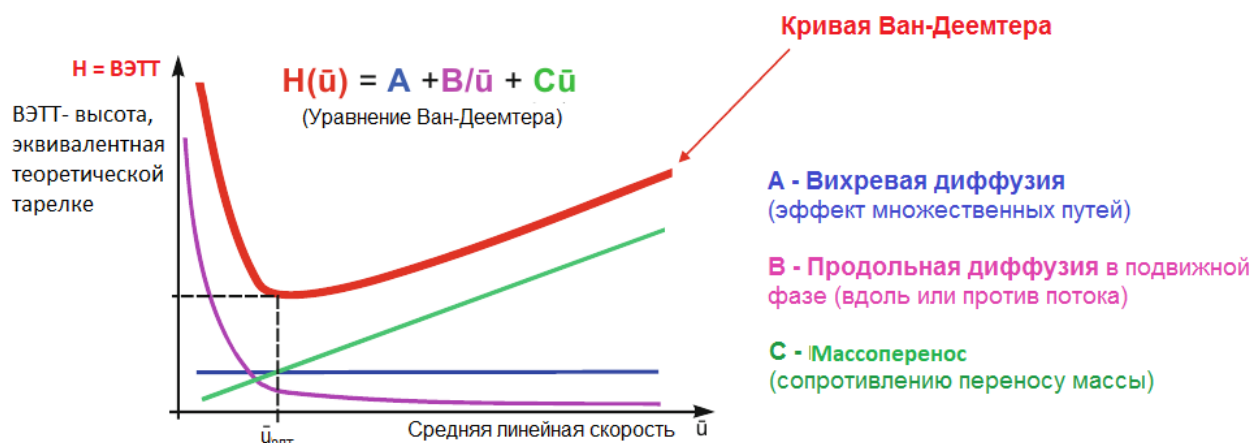


Рисунок 3. Кривая и уравнение Ван-Деемтера, описывающее условия, необходимые для оптимизации эффективности хроматографического разделения

Разделение в ВЭЖХ зависит от гидрофобного взаимодействия анализатора из подвижной фазы с иммобилизованными к неподвижной фазе гидрофобными лигандами (рисунок 4) [12]. Когда смесь растворенных в подвижной фазе веществ наносится на колонку, полярные соединения элюируются первыми, а неполярные адсорбируются на колонке с различной аффинностью. Чем выше аффинность соединения к сорбенту колонки, тем больше времени он проведет на неподвижной фазе и будет иметь более позднее время выхода.

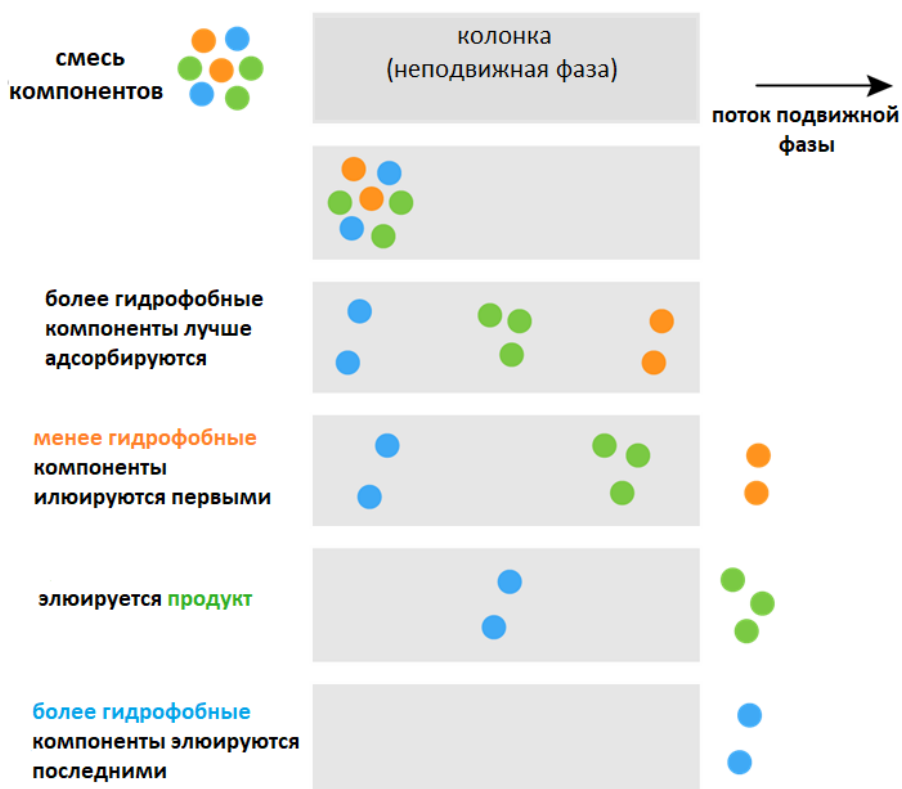


Рисунок 4. Схематичное изображение разделения гидрофобных и гидрофильных белков

Как уже отмечалось, при правильном подборе подвижной и неподвижной (колонка) фазы, ВЭЖХ позволяет разделить практически любые соединения. Несмотря на то, что эффективность этого метода ниже, чем у капиллярного электрофореза, это один из наиболее селективных методов. Метод ВЭЖХ позволяет проводить разделение практически любых классов соединений, их полуколичественный анализ, а при использовании стандартного образца – и количественный анализ целевого соединения.

Представленные методы позволяют получать очищенные фракции различных зоотоксинов для дальнейшего качественного и количественного анализа. После осуществления стадии выделения и/или очистки целевого вещества важным этапом выступает подтверждение идентичности соединения и затем — определение его концентрации в исследуемой пробе. Эти этапы предполагают наличие стандартного образца (СО) для сравнительной оценки и построения градуировочных зависимостей. На стадии фармакокинетических исследований кандидатного препарата как правило наличие СО закономерно и анализ не вызывает затруднений.

Многие методы количественного анализа предполагают и одновременное и идентификацию соединения (качественный анализ). К таким методам относится ВЭЖХ с использованием СО, ВЭЖХ-МСВР, гель-электрофорез, ферментно-связанный иммуносорбентный анализ, вестерн-блоттинг и др.

Методы качественного и количественного анализа токсинов.

Большинство методов качественного и количественного анализа низкомолекулярных веществ (НМВ) аналогичны по принципу выполнения. Однако, существующие отличия как в техническом исполнении приборов, так и в особенностях получения и обработки аналитического сигнала требуют отдельного, детального рассмотрения методов анализа НМВ и белков и пептидов.

Метод электрофоретического разделения в полиакриламидном геле (ПААГ), в частности диск-электрофореза по Лэммли с додецилсульфатом натрия (ДСН), ДСН-ПААГЭ, чаще всего применяют для определения чистоты и близкородственных примесей белков и пептидов [14]. Этот детергент способствует денатурации белков и придает им отрицательный заряд [14, 15]. Причем, количество ДСН, связавшегося с белком, соответствует количеству аминокислот в его составе. Таким образом, в этих условиях происходит нарушение надпервичных структур белка, и он приобретает отрицательный заряд, пропорциональный его массе. Разделение белков в геле со стабильной ячеистой структурой проводят в постоянном электромагнитном поле (при постоянном напряжении или токе). При этом длина пробега белка напрямую связана с его молекулярным весом [15].

Разделение веществ по молекулярным весам проводят также методом *эксклюзионной хроматографии*. В этом случае применяют специальные хроматографические колонки, заполненные сорбентом с широкими порами, в полости которых удерживаются соединения и в зависимости от их размера, соответствующего молекулярному весу. При этом чем меньше размер молекулы, тем дольше она элюируется подвижной фазой. В эксклюзионной хроматографии отсутствует взаимодействие анализируемого вещества с материалом неподвижной фазы колонки. Благодаря этому обеспечивается разделение компонентов, эффективное при исследовании проб белков, которые содержат агрегаты, вспомогательные вещества, клеточный детрит и другие загрязнения, образующиеся при деградации белков. По этой причине эксклюзионная хроматография широко используется для характеристики биотерапевтических молекул в процессе их разработки и производства.

В случае применения метода ДСН-ПААГЭ заключение о подлинности пептида или белка основано лишь на соответствии молекулярного веса. Для более достоверного определения дополнительно проводят изоэлектрофокусирование.

Изоэлектрофокусирование (isoelectrofocusing, IEF) – метод, который представляет собой частный случай гель-электрофореза, применяется для определения изоэлектрической точки биомолекулы, pI – значения pH , в котором суммарный заряд молекулы равен нулю. Определение pI проводят в геле с иммобилизованными амфолитами, формирующими градиент pH . Электрофорез проводят без добавления ДСН, чтобы не изменять собственный заряд испытуемой молекулы. В результате пептид или белок мигрирует в геле в направлении от отрицательно заряженного электрода (катода), одновременно меняя значение собственного заряда от положительного к отрицательному в зависимости от участка градиента, и наоборот. Миграция прекращается, когда молекула оказывается в среде с pH , равным его изоэлектрической точке, т.е. суммарный заряд будет равен 0. Метод изоэлектрической фокусировки позволяет разделять полипептиды с разными значениями изоэлектрической точки, но близким молекулярным весом. Он применяется и для аналитических и для препаративных целей, а также в качестве первого измерения при проведении двумерного гель-электрофореза [16].

Двумерный гель-электрофорез (two dimensional electrophoresis, 2DE) используют для анализа сложных смесей белков [17] как правило в рамках протеомных исследований. На первом этапе смесь белков разделяют с помощью изоэлектрической фокусировки (первое направление). Затем гель с разделенными по зарядам белками подвергают разделению методом диск-электрофореза по молекулярным весам.

Более достоверным методом подтверждения наличия целевой молекулы пептида или белка, а также его количественной оценки считаются методы, основанные на использовании

специфичных антител: вестерн-блоттинг и ELISA. Тем не менее, в подавляющем большинстве случаев их применение ограничено относительным, сравнительным анализом изменения содержания вещества между образцами, но не для абсолютного определения.

Количественный анализ НМВ уже долгое время осуществляют наиболее достоверным методом ядерно-магнитного резонанса. Но данное направление активно развивается и на сегодняшний день существует множество вариантов исполнения и приложения этого способа для идентификации различных соединений.

Спектроскопия ядерно-магнитного резонанса. Оценка структуры низкомолекулярных соединений стала возможна с появлением метода ядерной магнитно-резонансной спектроскопии (ЯМР) и является предпочтительным во многих аналитических лабораториях. Метод ЯМР спектроскопии основан на магнитных свойствах ядер атомов, имеющих нечетное число электронов (обладают спином, отличным от нуля). Современные приборы, в отличие от первых вариантов с одним магнитным полем определенной частоты, реализованы на двойном резонансе. В этом случае ядра атомов погружены в статическое магнитное поле и подвергаются воздействию второго магнитного поля, между ядрами происходит магнитный резонанс посредством связи (скалярная связь) или посредством пространственного (биполярного) взаимодействия. Полученные спектральные данные позволяют провести расчёт химической формулы соединения и получить подробную информацию о топологии, динамике и трехмерной структуре молекул в растворах и твердом состоянии [18]. Большинство методов ЯМР-спектроскопии, используемой в биологии, основано на изучении резонанса атомов протона и стабильных изотопов углерода и азота (^{13}C и ^{15}N). Для этого, зачастую в живые организмы специально вводят тяжелые изотопы этих соединений, например, в процессе экспрессии рекомбинантного белка. Современные ЯМР-спектрометры позволяют исследовать также структуру пептидов и белков. Для этих целей разработаны приборы высокого разрешения. Как и метод кругового дихроизма, ЯМР макромолекул позволяет установить конформацию белка, наличие агрегатов, межмолекулярных взаимодействий и т.п. [19]. Однако, применение метода ЯМР для идентификации белков и их количественного анализа имеет ряд ограничений, он менее информативен по сравнению с масс-спектрометрическим анализом при установлении первичной структуры белка.

Основной недостаток ЯМР – это требования к высокой чистоте и концентрации вещества для ЯМР-анализа. В последние годы стало осуществимым абсолютное количественное определение без использования эталонных веществ или добавления эталонных соединений. При подготовке проб в рамках фармакокинетических исследований возникает проблема очистки и концентрирования целевых молекул для снижения шума, который затрудняет интерпретацию данных. Эту трудность можно преодолеть с помощью

метода SIERRA/SMILE [20] или с помощью диффузионной упорядоченной спектроскопии (DOSY; [21]), которые подавляют большинство сигналов, относящиеся к низкомолекулярным соединениям.

Улучшение характеристик ЯМР приборов продолжается и уже опробировано оборудования для 2-мерных ЯМР экспериментов [22]. Их использование значительно повысило мощность метода для подтверждения строения молекул, расширили круг и сложность решаемых проблем. В настоящее время активно развивается направление настольных ЯМР спектрометров без криогенных магнитов и новые решения уже доступны для потребителей.

Возможности ЯМР в последние годы активно используются в рамках метаболического профилирования: для идентификации диагностических биомаркеров, скрининга эффективности и безопасности лекарственных средств, их токсичности. Интерес к применению метаболомики на основе ЯМР растет из-за его неразрушающего принципа анализа и минимальных требований к подготовке проб. Кроме того, этот способ имеет потенциал высокой производительности, и может достигать до 100 образцов в день без потери воспроизводимости результатов [23].

Тандемная масс-спектрометрия (ТМС) — это высокопроизводительный аналитический метод обнаружения, используемый для получения информации о молекулярных массах и химической структуре пептидов, белков, углеводов, олигонуклеотидов, природных продуктов и метаболитов лекарственных средств. Этот метод основан на изучении поведения заряженных молекул в электромагнитном поле. На основе этих наблюдений проводится расчёт соотношения массы к заряду молекулы (m/z) из которой можно рассчитать и моноизотопную массу молекулы. В отличие от ЯМР, ТМС требует минимальное количество образца, имеет высокую чувствительность и позволяет проводить одновременную детекцию нескольких соединений. Тандемная МС позволяет характеризовать молекулярную массу изучаемых соединений и, частично, их химическую структуру [24]. Реализовать этот подход позволяют приборы с двумя последовательно установленными масс-анализаторами: после измерения массы молекулярного иона первым анализатором происходит её фрагментация (разрыв ковалентных связей) в коллизионной ячейке с заданной энергией диссоциации, в результате чего формируется масс-спектральная характеристика полученных таким образом фрагментов (рисунок 5), регистрируемая вторым анализатором. По полученным масс-спектрам фрагментов можно установить исходную химическую структуру соединения.

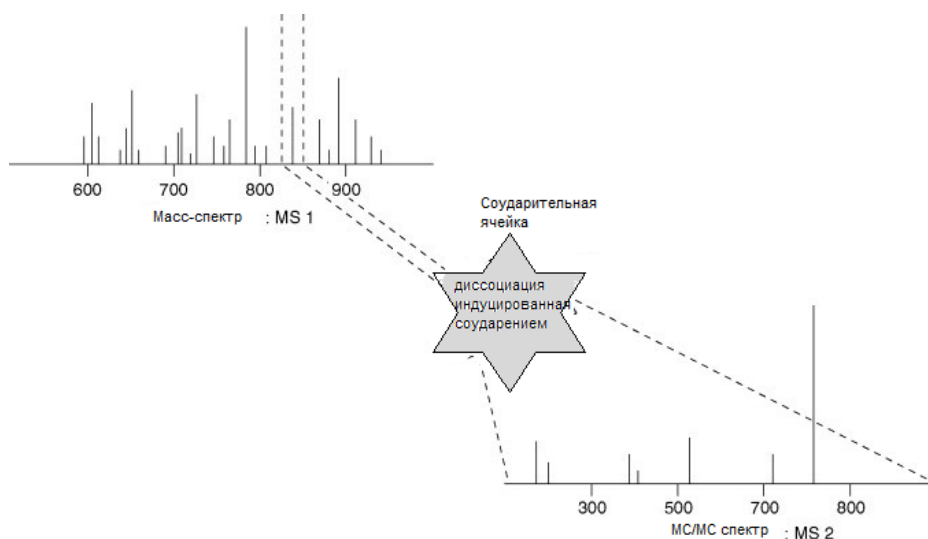


Рисунок 5. Пример масс-спектров при анализе методом tandemной масс-спектрометрии: MS1 – спектр масс исходной смеси соединений, из которой выделяется целевой ион (как правило при помощи квадрупольного масс-анализатора), который затем подвергается диссоциации в коллизионной ячейке (collision induced dissociation, CID); MS2 – спектр фрагментных ионов родительского иона, по которым проводят восстановление его структуры

Поскольку масс-спектрометрия предполагает анализ заряженных молекул – ионов, для ионизации применяют различные методы, в зависимости от задачи и свойств исследуемых соединений. Исследование зоотоксинов с массой менее 1000 Да предпочтительнее проводить с использованием «жестких» методов ионизации, сопровождаемых фрагментацией исходной молекулы (чаще всего ионизация электронным ударом). Ионизация при атмосферном давлении, «мягкими» методами, осуществляется как правило электрораспылением, и применяется для анализа белков и пептидов или для получения протонированной молекулы небелкового токсина.

Подбор условий ионизации позволяет получить достаточно информативные масс-спектры и точно установить структуру целевого соединения. Современное программное обеспечение для качественного и количественного анализа масс-спектрометрических данных как правило основано на применении обширных по числу различных соединений баз данных (несколько десятков тысяч) масс-спектров. Это существенно упрощает как идентификацию молекул в составе образцов, так и значительно повышает точность анализа смесей соединений с близкими характеристиками, плохо разделяемыми методом ВЭЖХ.

Решение задачи разделения близкородственных соединений также можно получить применением метода *тандемной масс-спектрометрии с модулем измерения ионной подвижности*. В этом случае ионы мигрируют под действием электромагнитного поля, в то время как им противодействует поток нейтрального газа, чаще всего гелия или азота (рисунок

6). Различия в ионной подвижности, в частности, позволяют разделять стереоизомеры, имеющие одинаковую химическую структуру.

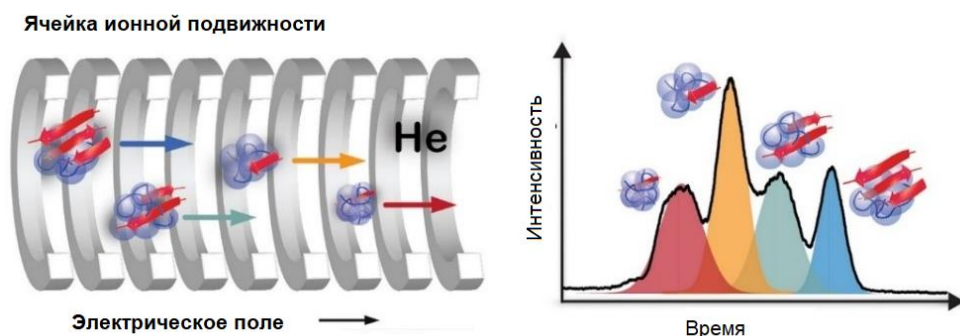


Рисунок 6. Схематическое изображение ячейки для измерения ионной подвижности

Как и в случае низкомолекулярных соединений, измерение ионной подвижности широко применяется и для определения структуры белков, в том числе и при помощи подхода «сверху вниз». Тем не менее, даже эти методы не эффективны для установления пространственной структуры белка *de novo*.

Идентификация белков и пептидов в отличие от установления структуры низкомолекулярных соединений осуществляется путем определения аминокислотной последовательности в пептидных фрагментах целевого соединения. В этом случае важным фактором выступает применение оборудования высокого разрешения, которое позволяет установить точную массу (с отклонением в определении масс не более 10 ppm). Такой подход получил название масс-спектрометрия высокого разрешения, МСВР. В отличие от традиционной тандемной масс-спектрометрии с квадрупольными масс-анализаторами для проведения исследований методом МСВР необходимо оборудование с более высоким разрешением. В этом случае масс-анализатор может быть времяпролетным, орбитальной ионной ловушкой, а также МСВР является масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС-ИЦРПФ).

Наибольший прогресс был достигнут в анализе белков и пептидов при помощи МСВР. Как уже отмечено, в отличие от малых молекул, для них используют преимущественно мягкие методы ионизации, чаще всего ионизацию электрораспылением (electro spray ionization – ESI) и матрично-ассоциированную лазерную дисорбцию/ионизацию (matrix assisted laser desorption/ionisation, MALDI). Существуют алгоритмы для автоматического расчета энергии диссоциации белков и пептидов таким образом, чтобы происходил преимущественно разрыв пептидной связи. В результате, в зависимости от того, какой фрагмент остался

протонированным, формируется у- и b-серия ионов, соответствующие потерям аминокислот с C- и N-конца соответственно (рисунок 7).

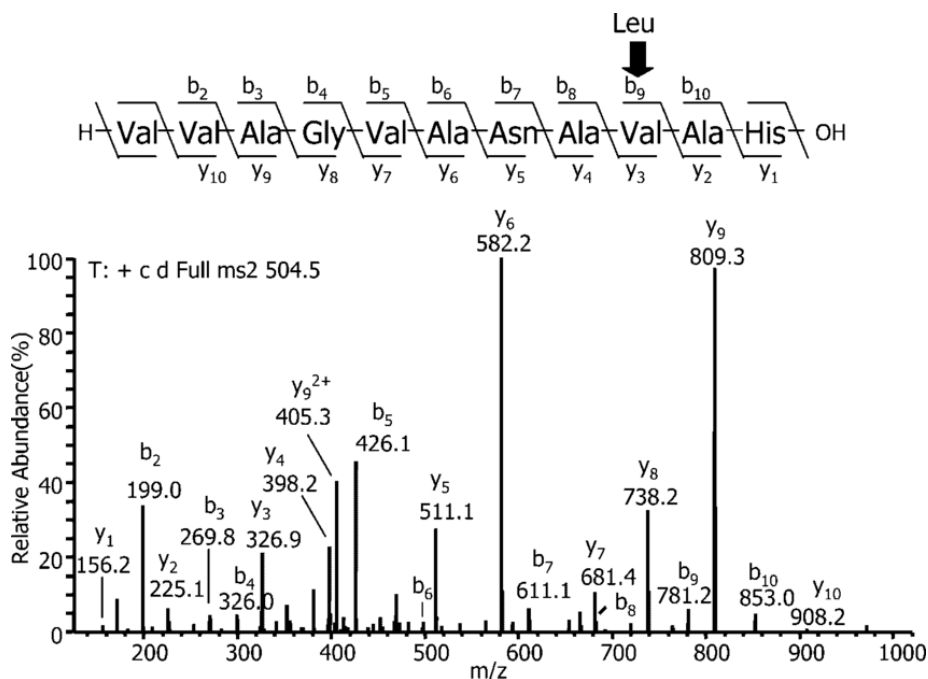


Рисунок 7. Пример масс-спектра фрагментных ионов пептида с отмеченными у- и b-ионами [25]

При использовании высокопроизводительных масс-спектрометров этот метод позволяет проводить *de novo* секвенирование пептидов. Анализ моноизотопных масс пептидных остатков способствуют получению информации о наличии и типах пост-трансляционных модификаций, например, окисление метионина, фосфорилирование, а также поиску замен отдельных аминокислот в последовательности.

Установление первичной структуры белков с помощью МС можно проводить двумя различными подходами. «Восходящие» протеомные методы основаны на анализе пептидов, используемых в качестве суррогатов целевых белков [26]. Для этого белок фрагментируют при помощи специфических протеаз, обычно трипсина или его смеси с лизилэндопептидазой (LysC) [27]. После переваривания пептиды анализируют при помощи тандемной масс-спектрометрии.

Методы «сверху вниз», напротив, не предполагают нарушения структуры белка при помощи протеолиза. Целые молекулярные ионы белка, генерируемые посредством ESI или MALDI ионизации, вводятся в масс-анализатор [28]. Такой подход позволяет определять массу больших биомолекул с использованием масс-анализаторов с умеренными верхними пределами отношения m/z.

Хотя общим методом для оценки подлинности целевого соединения как для НМВ так и для пептидов и белков является метод ВЭЖХ-МСВР, среди способов качественного и количественного анализа белков существует большее разнообразие и возможность подбора оптимального метода анализа, реализуемого в конкретной лаборатории.

Первым методом качественного анализа полипептидных последовательностей был метод деградации или *N*-концевое секвенирование по Эдману. Метод представляет собой химический способ секвенирования целого полипептидного белка от его N-конца. Суть процесса заключается в маркировке и удалении аминокислотного остатка в соответствии с рисунком 8 [29].

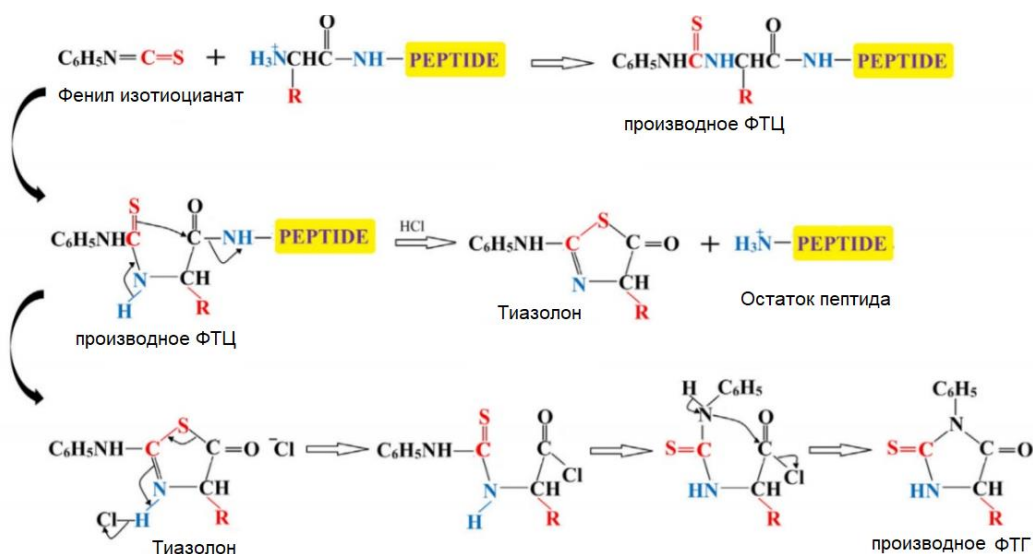


Рисунок 8. Этапы метода деградации по Эдману

Методика такого секвенирования достаточно трудоемка: к денатурированному образцу белка добавляют фенилизотиоцианат и инкубируют с безводной кислотой (например, трифторуксусной кислотой), которая разрывает пептидную связь между первой и второй аминокислотами белка. Таким образом, аминокислоты у N-концевого остатка становятся свободными в виде производного тиазолинона. Затем этот тиазолинон экстрагируют органическим растворителем и переводят в более стабильное производное фенилтиогидантоина (ПТГ). Производные ПТГ анализируют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

К недостаткам метода следует отнести большой расход специфических реактивов, трудоемкость, длительность анализа и практически не реализуемо секвенировать белки с большим молекулярным весом. Кроме того, для дальнейшей идентификации аминокислот необходимо иметь их СО.

Рентгеновская кристаллография — это метод определения расположения атомов в кристалле. С помощью этого метода может быть обнаружена трехмерная структура и функция

многих биологических молекул, включая белки. Кристаллы чистого белка подвергаются воздействию рентгеновского излучения в соответствии с рисунком 9. В зависимости от организации атомов в кристалле и количества электронов в атомах рентгеновский луч преломляется. По углам и интенсивностям отклонений лучей лазера получают дифракционную картину, а кристаллограф (или специализированное ПО) затем составляет карту электронной плотности. Из этой карты можно определить положения атомов в кристаллизованном белке и трехмерную структуру белка [30].



Рисунок 9. Принцип рентгеновской кристаллографии: получение дифрактограммы структуры белка

Электронная микроскопия в сочетании с анализом изображений используется для определения формы и трехмерных структур крупных белков и крупных макромолекулярных комплексов с молекулярной массой более 150 кДа, которые не могут быть исследованы с помощью обычной рентгеновской кристаллографии или методов ЯМР из-за их большого размера или неоднородной структуры. Прямые изображения молекул в их физиологическом окружении могут быть получены с помощью электронных лучей, однако разрешение изображений низкое (515Å), и обычно требуется дополнительная информация из рентгеновской кристаллографии и/или ЯМР [31]. Трансмиссионная электронная микроскопия – одна из форм электронной микроскопии и позволяет получать двухмерные черно-белые изображения. Структура образца определяется электронным пучком, который частично прошел через образец. В сканирующем электронном микроскопе электронный луч проходит по всей поверхности образца, и изображение восстанавливается путем сопоставления детектированных сигналов вторичных электронов [31].

Круговой дихроизм – это важный метод для анализа изомеров низкомолекулярных соединений и представляет собой измерения разницы в поглощении право и левополяризованного света хиральными молекулами. Это метод также используется для анализа вторичных и третичных структур, определения термостабильности белков, конформационной стабильности белков в различных условиях окружающей среды и кинетики конформационных изменений [32]. Вещество должно содержать одну или несколько хиральных молекул (светопоглощающие группы, хромофоры). Круговой дихроизм измеряется с помощью спектрополяриметра, который проводит измерения в дальнем УФ-диапазоне длин волн 190-250 нм и ближнем УФ-диапазоне длин волн 250-350 нм.

Существуют и портативные устройства для качественного и, реже, количественного анализа биологических проб, не уступающие в точности и чувствительности лабораторным стационарным приборам.

Биосенсоры – устройства, известные уже достаточно давно, однако развитие технологий значительно расширило диапазон их применения. Сегодня биосенсорные системы применяют в аналитических и клинических лабораториях для осуществления целевого (таргетного) анализа биологически активных соединений и биомаркеров [33]. Решение проблемы выявления соединения, представляющего интерес, требует междисциплинарного подхода. Сложность анализа заключается в экранирующем влиянии мажорных компонентов, преодолении матричного эффекта, недостаточной селективности способа получения аналитического сигнала и пр. Наибольшей специфичностью для определения биомолекул обладают антитела и синтетически полученные пептиды — аптамеры. Наиболее чувствительные, селективные биосенсоры реализованы на платформах *микрофлюидных систем*, в общем случае напоминающих хроматографическую колонку большой длины (рисунок 10). Микрофлюидные биосенсоры [34] позволяют выявлять любые виды соединений в зависимости от эффективности подобранного лиганда и детектора.

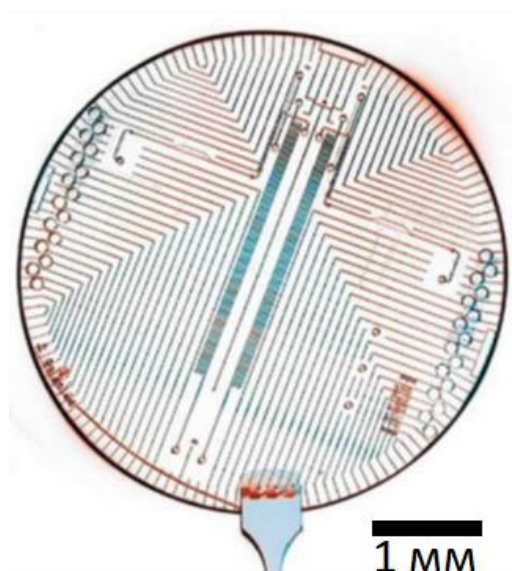


Рисунок 10. Один из вариантов исполнения биосенсора на основе микрофлюидной системы («лаборатория-на-чипе»)

Получить быстрый, однозначный ответ за минимальное время анализа позволяет детектирование электрического сигнала при взаимодействии молекул аналита и лиганда. Этот принцип лежит в основе проектирования большинства биосенсоров. Чувствительность такого метода находится на уровне $n \times (10^{-9} - 10^{-12})$ г. Биосенсорные устройства на основе микрофлюидики уже сейчас коммерчески доступны для использования в домашних условиях для контроля получаемых доз лекарственных средств.

Количественный анализ удобно совмещать с методами разделения: хроматографическими и электрофоретическими [35]. Важным условием является выбор оптимального для исследуемого соединения детектора. Наиболее распространенные детекторы – спектрофотометрические, в которых аналитическим сигналом служит изменения поглощения определенной длины волны. Чаще всего детекция осуществляется в УФ диапазоне на длине волны 254 нм для низкомолекулярных веществ, 280 и 214 нм для пептидов и белков – такой метод универсален для подавляющего большинства рассматриваемых соединений и характеризуется высокой чувствительностью и широким диапазоном линейности.

Ряд аналитов обладает естественной хеми - или флуоресценцией. Для них удобно использовать флуоресцентные детекторы, измеряющие интенсивность излучения, выделяемого при определенной длине волны возбуждения. Реже используются рефрактометрические детекторы, где аналитическим сигналом служит изменение преломления подвижной фазы или ведущего электролита и кондуктометрические детекторы проводимости. Эти методы также универсальны, как и УФ-спектрофотометрия, но

характеризуются высокой чувствительностью к условиям окружающей среды и поэтому реже применяются на практике.

Описанные методы анализа, предполагающие получение хроматограммы или электрофореграммы исследуемой пробы, позволяют провести и количественный анализ. На полученном графике проводится измерение площадей пиков и с помощью ПО рассчитывают относительное содержание каждого компонента. Более точный анализ проводят с построением линейной регрессионной зависимости площади пика от концентрации СО. Для получения этой зависимости рекомендуется брать не менее пяти градуировочных растворов, имеющих концентрацию с шагом в одну степень (0,1 мкг, 1,0 мкг, 10,0 мкг, и т.д.). Рекомендуется, чтобы ожидаемый диапазон концентраций в исследуемых биопробах был на порядок больше, чем самая низкая и на порядок меньше, чем самая высокая концентрации стандарта. По результатам анализа градуировочных растворов вычисляют уравнение регрессионной зависимости, по которому в дальнейшем будет проводиться расчет количества целевого соединения в экспериментальном образце, а также рассчитывается коэффициент детерминации – полученная зависимость считается валидной только если он выше, чем 0,95. Полученная линейная зависимость ответа детектора от концентрации аналита – диапазоном линейности. Рекомендуется четко определять его для каждого СО.

Универсальным и вместе с тем наиболее точным способом установления концентрации вещества в пробе проводят методом абсолютной градуировки или внутреннего стандарта, с помощью ВЭЖХ [36]. Чувствительность ВЭЖХ определяется используемым детектором, как правило используют УФ-детектор или масс-спектрометрический детектор (МСД), а также свойствами анализируемого объекта, и может достигать $n \times 10^{-9}$ г. Благодаря доступности разнообразных хроматографических колонок для разделения различных классов веществ, метод позволяет добиться высокой селективности и эффективности. Это обусловило широкое внедрение метода в практику определения лекарственных средств в биологических жидкостях. Однако, наиболее точным способом качественного и количественного анализа как НМВ, так и пептидов и белков до сих пор считается ВЭЖХ, совмещенная с масс-спектрометрическим детектированием.

Количественная оценка белков и пептидов также возможна с применением *иммунохимических методов*. Один из классических методов биоаналитической лаборатории – это вестерн-блоттинг и ферментно-связанный иммуносорбентный анализ.

Вестерн-блоттинг используют для определения специфичных белков, их количества в образце и их посттрансляционных модификаций [37]. На первом этапе белки разделяют с помощью ДСН-ПААГЭ. Далее белки переносят на нитроцеллюлозную или ПВДФ(PVDF)-

мембрану (поливинилиденфторид), и затем детектируют с использованием антител, специфичных к заданному белку (рисунок 11).

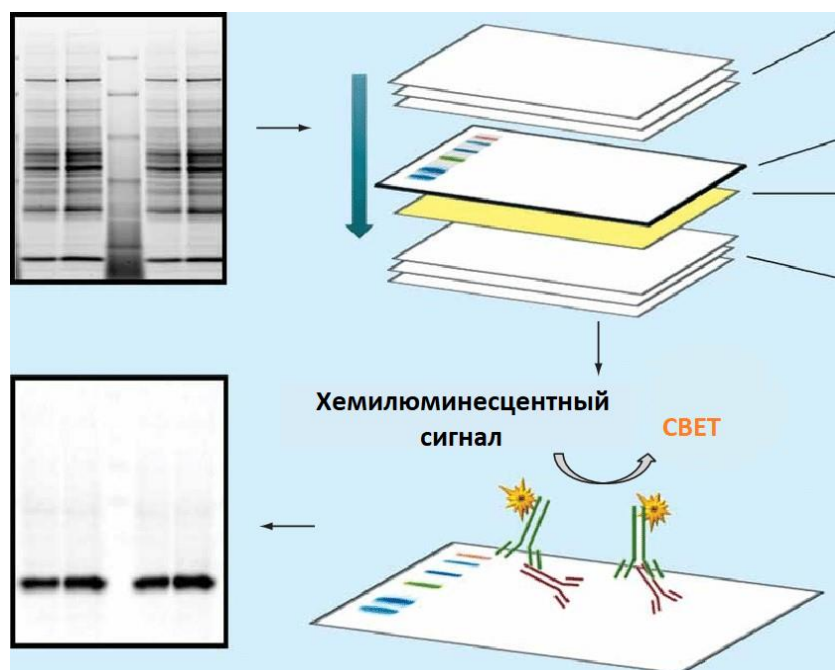


Рисунок 11. Схема метода вестерн-блоттинга

Вестерн-блоттинг характеризуется сравнительно низким пределом количественного определения и не требует дорогостоящего оборудования, однако имеет ряд недостатков. Осуществление этого метода достаточно трудоемко и требует специальных навыков у исполнителя. Кроме того, такой подход имеет невысокую производительность.

Ферментно-связанный иммуносорбентный анализ (ELISA) отличается от вестерн-блоттинга, тем, что антитела, реже антигены (белки, пептиды, гормоны и т.д.) иммобилизуются на твердом сорбенте лунок планшет. Получение сигнала происходит после образования комплекса с антителом, связанного с ферментом. Добавление субстрата приводит к наработке окрашенного (колориметрия), флуоресцирующего (флуориметрия) или люминесцентного продукта реакции, который позволяет определять концентрации целевых соединений [38].

Основной недостаток методов иммунодетекции – это необходимость наличия специфичных антител. В случае недоступности специфических антител количественный анализ белков проводят при помощи масс-спектрометрии с использованием «восходящего» подхода или «сверху вниз» [38]. В обоих направлениях количественного ТМС анализа необходимо использование стандартных образцов целевых соединений (положительный контроль). В большинстве случаев используют подход «снизу вверх», в котором количество исходного белка вычисляют на основе количественного анализа нескольких целевых пептидов этого белка, полученных после его протеолиза. В этом случае в качестве стандартов возможно

применение искусственно синтезированных пептидов, но более достоверные результаты получают, подготавливая градуировочные растворы СО белка тем же способом, что и исследуемые пробы.

Помимо технических сложностей, недостатки этого подхода связаны с тем, что концентрации пептидов лишь частично отражают реальную концентрацию белка и то, что диапазон линейности масс-спектрометрических детекторов ниже, по сравнению с традиционными хроматографическими детекторами. Тем не менее, этот метод эффективен в отношении работы с пептидами, и имеет наиболее высокую степень достоверности среди большинства методов качественного анализа, а также способен конкурировать по уровню чувствительности с такими методами как ИФА.

Методы ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР зарекомендовали себя в широком спектре исследований от экологических до клинико-диагностических лабораторий, а для фармакокинетических исследований это один из стандартных подходов [39, 40]. В то же время прогрессивное развитие все новых подходов и совершенствование технического исполнения уже используемого оборудования позволяет решать все более сложные задачи. К таким задачам относится метод микродозирования лекарственных средств. Его применяют для оценки терапевтической и токсической дозы для человека. Эти исследования проводят, когда результаты тестов на животных не удается перенести на человека, а также для уточнения доз. По этой причине концентрации исследуемого вещества значительно снижены и чувствительности многих методов количественного анализа уже может быть недостаточно. Существует несколько методов способных реализовать количественный анализ лекарственных средств в условиях микродозирования: уже описанный метод ВЭЖХ-МСВР, ускорительная масс-спектрометрия (УМС) и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) [41].

Ускорительная масс-спектрометрия основана на измерении долгоживущих радионуклидов, присутствующих в быту. Отличительной особенностью является наличие ускорителя частиц в совокупности с источником ионов масс-спектрометра, магнитов большого размера и детекторов для разделения и расчета единичных радионуклидных атомов. Метод характеризуется превосходной чувствительностью и очень низким пределом количественного определения – $n \times (10^{-15} - 10^{-18})$ г/мл. К недостаткам метода относится необходимость получения вещества с изотопом ^{14}C , что существенно повышает стоимость исследований и требует определенных условий работы с такими образцами. Кроме того, методом УМС измеряет общую концентрацию – исходного образца и его метаболитов. Удаление метаболитов и выделение не метаболизированного образца из плазмы крови возможно при использовании методик подготовки проб сыворотки и плазмы крови и последующего разделения компонентов методом ВЭЖХ с отбор целевых фракций.

Биологические образцы перед УМС анализом также необходимо подвергнуть графитизации, что отрицательно влияет на стоимость и время анализа, а сама установка занимает много места. На сегодняшний день существуют приборы российского (Уникальная научная установка «УМС ИЯФ СО РАН») и швейцарского (MICADAS-28) производства [42].

Позитронно-эмиссионная томография – это относительно новый метод визуализации с высокой чувствительностью. В случае ПЭТ, как и для УМС, требуется применение радиоизотопной метки, позитрон-излучающий радиоактивный индикатор, например ^{11}C . В результате анализа ПЭТ получают трехмерное изображение с пространственным разрешением 2-5 мм. Метод позволяет получать изображения в динамике за несколько секунд. В этом случае существуют ограничения доз – не более 10 мкГ, поскольку радиоиндикаторы обладают специфической активностью. Преимуществом метода ПЭТ является возможность проводить неинвазивный количественный анализ лекарственных средств в клинических условиях, оценить место локализации вещества, а также работать с образцами плазмы крови. Как и для ИМС, для выделения целевого соединения и метаболитов из образцов плазмы крови удобно использовать метод ВЭЖХ, тем самым оценивая метаболизм соединения. Недостатком метода выступает ограниченность работы по времени ввиду короткого времени полураспада радиоиндикатора, стоимость и невысокая доступность оборудования.

В аспекте исследований микродозирования оптимальным способом остается метод ВЭЖХ-МСВР. Он имеет преимущество по стоимости исследования, оборудование доступно и не занимает много места и возможен потоковый анализ, несмотря на более высокий предел количественного определения $n \times (10^{-12} - 10^{-15})$ г/мл.

Заключение

В последнее десятилетие исследования ядов животных получило широкое распространение, вследствие их высокой биологической активности содержащихся в них соединений, перспективных для получения фармакологических субстанций. Разработка лекарственных препаратов требует проведения нескольких стадий фармакокинетических исследований для установления терапевтических и токсических доз, локализации и накопления действующего вещества, его метаболизма и т.п. Эти исследования предполагают качественный и количественный анализ как действующего вещества, так и его метаболитов. Среди методов, рекомендованных для проведения этих исследований, многие являются общелабораторными: гель-электрофорез, хроматографии с УФ-детектированием, tandemная масс-спектрометрия, ЯМР-спектроскопия, аффинная хроматография, методы Брэдфорда и Фолина-Лоури и пр. Однако также применяют современные специфические и высокотехнологичные методы: иммуногистохимия, вестерн-блоттинг и ферментно-связанный иммуносорбентный анализ, рентгеновская кристаллография, электронная спектроскопия и др.

И хотя весь описанный аналитический аппарат уже длительное время используется в лабораторной практике, развитие приборной панели, новых подходов и новых методов исследования позволяют получить все более точную и полную информацию о фармакокинетике изучаемого лекарственного средства. Полученные данные способствуют разработке более эффективных и безопасных препаратов, в особенности это касается препаратов на основе токсинов.

В этой связи представляется важным выбрать наиболее эффективные, информативные и реализуемые в конкретной лаборатории методы и подходы, не только применительно к токсинам животного происхождения, но и для *de novo* синтезированных физиологически активных соединений.

Библиография

1. Stepensky D. Pharmacokinetics of toxin-derived peptide. *Toxins* 2018; 10: 483
2. Ballard P., Brassil P., Bui K. H. [et al.] Metabolism and pharmacokinetic optimization strategies in drug discovery. In book: Drug discovery and development, 2013: 135-144
3. Lundanes E., Reubsaet L., Greibrokk T. Chromatography: basic principles, sample preparations and related methods. *John Wiley & Sons. USA*; 2013: 224.
4. Cummins P.M., Rochfort K.D., O'Connor B.F. Ion-exchange chromatography: Basic Principles and application. *Methods Mol Biol.* 2017; 1485: 209-223.
5. Федотов П.С., Малофеева Г.И., Савонина Е.Ю. [и др.] Твердофазная экстракция органических веществ: нетрадиционные методы и подходы. *Журнал аналитической химии.* 2019; 74(3): 163-172.
6. Катаев С.С., Дворская О.Н. Сравнение эффективности твердофазной экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для патронов со смешанной фазой некоторых брендов. *Фармация и фармакология.* 2017; 5(6): 543-555.
7. Liang S-Y., Shi F., Zhao Y-G. [et al.] Determination of local anesthetic drugs in human plasma using magnetic solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Molecules* 2022; 27: 5509.
8. Liu Y. A photothermally responsive nanoprobe for bioimaging based on Edman degradation. *Nanoscale.* 2016; 8(20): 10553-10557.
9. Huang Y., Mou S., Wang Y. [et al.] Characterization of antibody–drug conjugate pharmacokinetics and in vivo biotransformation using quantitative intact LC-HRMS and surrogate analyte LC-MRM. *Anal. Chem.* 2021; 93: 6135–6144.
10. Finley S. D., Engel-Stefanini M., Imoukhuede P. [et al.] Pharmacokinetics and pharmacodynamics of VEGF-neutralizing antibodies BMC. *Systems Biology.* 2011; 5:193.
11. Wang M., Gong Q., Liu W. [et al.] Applications of capillary electrophoresis in the fields of environmental, pharmaceutical, clinical, and food analysis (2019-2021). *J Sep Sci.* 2022; 45(11): 1918-1941.
12. Bagheri M., Hancock R.E. High-performance liquid chromatography and mass-spectrometry based design of proteolytically stable antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol.* 2017; 1548:61-71.
13. Chew T.L., Ida I. M. Special Topics in Bioprocess Engineering Volume I. *Univision press SDN, BHD.* Malaysia; 2006: 224.
14. Cummins P.M., Rochfort K.D., O'Connor B.F. Ion-exchange chromatography: Basic Principles and application. *Methods Mol Biol.* 2017; 1485: 209-223.

15. Černý M., Skalák J., Černá H. [et al.] Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *Journal of proteomics*. 2013; 92: 2-27.
16. Farmerie L., Rustandi R.R., Loughney J.W. [et al.] Recent advances in isoelectric focusing of proteins and peptides. *J. Chromatogr A*. 2021; 1651: 462274.
17. Lee P.Y., Saraygord-Afshari N., Low T.Y. The evolution of two-dimensional gel electrophoresis-from proteomics to emerging alternative applications. *J. Chromatogr A*. 2020; 1651: 460763.
18. Loquet A., Bardiaux B., Gardienet C. [et al.] 3D structure determination of the Crh protein from highly ambiguous solid-state NMR restraints. *Journal of the American Chemical Society*. 2008; 130(11): 3579-3589.
19. Nguyen L.M., Roche J. High-pressure NMR techniques for the study of protein dynamics, folding and aggregation. *J Magn Reson*. 2017;277: 179-185.
20. Arbogast L. W., Delaglio F., Tolman J.R. [et al.] Selective suppression of excipient signals in 2D ¹H–¹³C methyl spectra of biopharmaceutical products. *Journal of biomolecular NMR*. 2018; 72(3-4): 149-161.
21. Wu D. H., Chen A. D., Johnson C. S. An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses. *Journal of magnetic resonance, Series A*. 1995; 115(2): 260-264.
22. Caprio V., McLachlan A.S., Sutcliffe O.B. [et al.] Structural Elucidation of Unknowns: A Spectroscopic Investigation with an Emphasis on 1D and 2D ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education*. 2018; 27(2): 223-234.
23. Guleria A., Kumar A., Kumar U. [et al.] NMR Based Metabolomics: An Exquisite and Facile Method for Evaluating Therapeutic Efficacy and Screening Drug Toxicity. *Curr Top Med Chem*. 2018; 18(20): 1827-1849.
24. Van Steendam K., De Ceuleneer M., Dhaenens M. [et al.] Mass spectrometry-based proteomics as a tool to identify biological matrices in forensic science. *International journal of legal medicine*. 2013; 127(2): 287-298.
25. Van den Broek I., Niessen W. M. A., van Dongen W. D. Bioanalytical LC–MS/MS of protein-based biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography B*. 2013. 929: 161-179.
26. Yadav R.K., Tiwari A.K., Saklani R. HPLC method for simultaneous estimation of paclitaxel and baicalein: *Pharmaceutical and pharmacokinetic applications*. 2022; 14(14): 1005-1020

27. Gillet L. C., Leitner A., Aebersold R. Mass spectrometry applied to bottom-up proteomics: entering the high-throughput era for hypothesis testing. *Annual review of analytical chemistry*. 2016; 9: 449-472.
28. Shaw J. B., Li W., Holden W.W. [et al.] Complete protein characterization using top-down mass spectrometry and ultraviolet photodissociation. *Journal of the American Chemical Society*. 2013; 135(34): 12646-12651.
29. Schneider M., Belsom A., Rappsilber J. Protein tertiary structure by crosslinking/mass spectrometry. *Trends in biochemical sciences*. 2018; 43(3): 157-169.
30. Drenth J. Principles of protein X-ray crystallography. *Springer Science & Business Media*. New York, NY; 2007: 332.
31. Valavanidis A. Predicting 3D Protein Structure by Computational Approach from Amino Acid Sequence. A leap forward in solving the classic problem of biochemistry. 2020. Available at: https://www.researchahgate.net/publication/339253934_Predicting_3D_Protein_Structure_by_Computational_Approach_from_Amino_Acid_Sequence._A_leap_forward_in_solving_the_classic_problem_of_biochemistry.
32. Zhou W., Apkarian R., Wang Z.L. [et al.] Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). In book Scanning microscopy for nanotechnology. *Springer*. New York, NY; 2006: 1-40.
33. Carpenter A.C., Paulsen I.T., Williams T.C. Blueprints for biosensors: design, limitations, and applications. *Genes*. 2018; 9: 375.
34. Southwest Center for Microsystems Education (SCME) Available at: App_BioMEM_PK14_PG_August2017.19
35. Swartz. M. HPLC detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2010; 33(9-12): 1130-1150.
36. ОФС.1.2.1.2.0005.15 Высокоэффективная жидкостная хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. М., 2015. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/420323733>
37. Vincent S.G., Cunningham P.R., Stephens N.L. [et al.] Quantitative densitometry of proteins stained with coomassie blue using a Hewlett Packard scanjet scanner and Scanplot software. *Electrophoresis*. 1997; 18(1): 67-71.
38. Ghosh R., Gilda J.E., Gomes A.V. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert review of proteomics*. 2014; 11(5): 549-560.

39. Ramprasad M.P. Analytical and Formulation Development Road Map for protein Therapeutics. In book: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. *aTyr Pharma. Elsevier*. San Diego, CA, United States; 2017: 198-215

40. ОФС.1.7.2.0035.18 Пептидное картирование. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. М., 2018. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/554199346>.

41. Ni J., Ouyang H., Aiello M. [et al.] Microdosing assessment to evaluate pharmacokinetics and drug metabolism in rats using liquid chromatography-tandem mass spectrometry technology. *Pharm. Res.* 2008; 25(7): 1572-1582

42. Пархомчук В.В., Петрожицкий А.В., Игнатов М.М. [и др.] Центр коллективного пользования «Ускорительная масс-спектрометрия НГУ-НИЦ». *Сибирский физический журнал*. 2022; 17(3) :89-101.

References

1. Stepensky D. Pharmacokinetics of toxin-derived peptide. *Toxins* 2018; 10: 483.

2. Ballard P., Brassil P., Bui K. H. [et al.] Metabolism and pharmacokinetic optimization strategies in drug discovery. In book: Drug discovery and development, 2013: 135-144

3. Lundanes E., Reubsaet L., Greibrokk T. Chromatography: basic principles, sample preparations and related methods. *John Wiley & Sons*. USA; 2013: 224.

4. Cummins P.M., Rochfort K.D., O'Connor B.F. Ion-exchange chromatography: Basic Principles and application. *Methods Mol Biol.* 2017; 1485: 209-223.

5. Fedotov P.S., Malofeevs G.I., Savonina E. Ju. [и др.] Tverdofaznaja jekstrakcija organicheskikh veshhestv: netradicionnye metody i podxodi. *Zhurnal analiticheskoy himii*. 2019; 74(3): 163-172 [in Russian].

6. Kataev S.S., Dvorskaja O.N. Sravnenie jeffektivnosti jekstrakcii lekarstvennyh i narkoticheskikh veshhestv iz krovi dlja patronov so smeshannoj fazoj nekotoryh brendov. *Farmacija i farmakologija*. 2017; 5(6): 543-555 [in Russian].

7. Liang S-Y., Shi F., Zhao Y-G. [et al.] Determination of local anesthetic drugs in human plasma using magnetic solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Molecules* 2022; 27: 5509.

8. Liu Y. A photothermally responsive nanoprobe for bioimaging based on Edman degradation. *Nanoscale*. 2016; 8(20): 10553-10557.

9. Huang Y., Mou S., Wang Y. [et al.] Characterization of antibody–drug conjugate pharmacokinetics and in vivo biotransformation using quantitative intact LC-HRMS and surrogate analyte LC-MRM. *Anal. Chem.* 2021; 93: 6135–6144.
10. Finley S. D., Engel-Stefanini M., Imoukhuede P. [et al.] Pharmacokinetics and pharmacodynamics of VEGF-neutralizing antibodies BMC. *Systems Biology.* 2011; 5:193.
11. Wang M., Gong Q., Liu W. [et al.] Applications of capillary electrophoresis in the fields of environmental, pharmaceutical, clinical, and food analysis (2019-2021). *J Sep Sci.* 2022; 45(11): 1918-1941.
12. Bagheri M., Hancock R.E. High-performance liquid chromatography and mass-spectrometry based design of proteolytically stable antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol.* 2017; 1548:61-71.
13. Chew T.L., Ida I. M. Special Topics in Bioprocess Engineering Volume I. *Univision press SDN, BHD.* Malaysia; 2006: 224.
14. Cummins P.M., Rochfort K.D., O'Connor B.F. Ion-exchange chromatography: Basic Principles and application. *Methods Mol Biol.* 2017; 1485: 209-223.
15. Černý M., Skalák J., Cerna H. [et al.] Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *Journal of proteomics.* 2013; 92: 2-27.
16. Farmerie L., Rustandi R.R., Loughney J.W. [et al.] Recent advances in isoelectric focusing of proteins and peptides. *J. Chromatogr A.* 2021; 1651: 462274.
17. Lee P.Y., Saraygord-Afshari N., Low T.Y. The evolution of two-dimensional gel electrophoresis-from proteomics to emerging alternative applications. *J. Chromatogr A.* 2020; 1651: 460763.
18. Loquet A., Bardiaux B., Gardienet C. [et al.] 3D structure determination of the Crh protein from highly ambiguous solid-state NMR restraints. *Journal of the American Chemical Society.* 2008; 130(11): 3579-3589.
19. Nguyen L.M., Roche J. High-pressure NMR techniques for the study of protein dynamics, folding and aggregation. *J Magn Reson.* 2017;277: 179-185.
20. Arbogast L. W., Delaglio F., Tolman J.R. [et al.] Selective suppression of excipient signals in 2D ^1H – ^{13}C methyl spectra of biopharmaceutical products. *Journal of biomolecular NMR.* 2018; 72(3-4): 149-161.
21. Wu D. H., Chen A. D., Johnson C. S. An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses. *Journal of magnetic resonance, Series A.* 1995; 115(2): 260-264.

22. Caprio V., McLachlan A.S., Sutcliffe O.B. [et al.] Structural Elucidation of Unknowns: A Spectroscopic Investigation with an Emphasis on 1D and 2D ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education*. 2018; 27(2): 223-234.
23. Guleria A., Kumar A., Kumar U. [et al.] NMR Based Metabolomics: An Exquisite and Facile Method for Evaluating Therapeutic Efficacy and Screening Drug Toxicity. *Curr Top Med Chem*. 2018; 18(20): 1827-1849.
24. Van Steendam K., De Ceuleneer M., Dhaenens M. [et al.] Mass spectrometry-based proteomics as a tool to identify biological matrices in forensic science. *International journal of legal medicine*. 2013; 127(2): 287-298.
25. Shimizu A., Nakanishi T., Miyazaki A. Detection and characterization of variant and modified structures of proteins in blood and tissues by mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*. 2006. 25(5): 686-712.
26. Yadav R.K., Tiwari A.K., Saklani R. HPLC method for simultaneous estimation of paclitaxel and baicalein: *Pharmaceutical and pharmacokinetic applications*. 2022; 14(14): 1005-1020.
27. Gillet L. C., Leitner A., Aebersold R. Mass spectrometry applied to bottom-up proteomics: entering the high-throughput era for hypothesis testing. *Annual review of analytical chemistry*. 2016; 9: 449-472.
28. Shaw J. B., Li W., Holden W.W. [et al.] Complete protein characterization using top-down mass spectrometry and ultraviolet photodissociation. *Journal of the American Chemical Society*. 2013; 135(34): 12646-12651.
29. Schneider M., Belsom A., Rappsilber J. Protein tertiary structure by crosslinking/mass spectrometry. *Trends in biochemical sciences*. 2018; 43(3): 157-169.
30. Drenth J. Principles of protein X-ray crystallography. *Springer Science & Business Media*. New York, NY; 2007: 332.
31. Valavanidis A. Predicting 3D Protein Structure by Computational Approach from Amino Acid Sequence. A leap forward in solving the classic problem of biochemistry. 2020. Available at:
https://www.researchgate.net/publication/339253934_Predicting_3D_Protein_Structure_by_Computational_Approach_from_Amino_Acid_Sequence._A_leap_forward_in_solving_the_classic_problem_of_biochemistry.
32. Zhou W., Apkarian R., Wang Z.L. [et al.] Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). In book *Scanning microscopy for nanotechnology*. Springer. New York, NY; 2006: 1-40.

33. Carpenter A.C., Paulsen I.T., Williams T.C. Blueprints for biosensors: design, limitations, and applications. *Genes*. 2018; 9: 375.
34. Southwest Center for Microsystems Education (SCME) Available at: App_BioMEM_PK14_PG_August2017.19
35. Swartz. M. HPLC detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2010; 33(9-12): 1130-1150.
36. OFS.1.2.1.2.0005.15 Vysokojeffektivnaja zhidkostnaja hromatografija. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIII izdanie. M., 2015. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/420323733> [in Russian].
37. Vincent S.G., Cunningham P.R., Stephens N.L. [et al.] Quantitative densitometry of proteins stained with coomassie blue using a Hewlett Packard scanjet scanner and Scanplot software. *Electrophoresis*. 1997; 18(1): 67-71.
38. Ghosh R., Gilda J.E., Gomes A.V. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert review of proteomics*. 2014; 11(5): 549-560.
39. Ramprasad M.P. Analytical and Formulation Development Road Map for protein Therapeutics. In book: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. *aTyr Pharma. Elsevier*. San Diego, CA, United States; 2017: 198-215.
40. OFS.1.7.2.0035.18 Peptidnoe kartirovanie. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. XIV izdanie. M., 2018. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/554199346>. [in Russian].
41. Ni J., Ouyang H., Aiello M. [et al.] Microdosing assessment to evaluate pharmacokinetics and drug metabolism in rats using liquid chromatography-tandem mass spectrometry technology. *Pharm. Res*. 2008; 25(7): 1572-1582.
42. Parhomchuk V.V., Petrozhichij A.V., Ignatov M.M. [i dr.] Centr kollektivnogo pol'zovanija uskoritel'naya mass spektrometrija NGU-NNC». *Sibirskij fizicheskij zhurnal*. 2022; 17(3) :89-101.