

"2021, Año de la Independencia"

**COMENTARIOS**

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de febrero y hasta el 31 de marzo de 2021, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sito en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México.

Correo electrónico: [consultas@farmacopea.org.mx](mailto:consultas@farmacopea.org.mx).

**DATOS DEL PROMOVENTE**

**Nombre:** \_\_\_\_\_  
**Institución o empresa:** \_\_\_\_\_  
**Teléfono:** \_\_\_\_\_

**Cargo:** \_\_\_\_\_  
**Dirección:** \_\_\_\_\_  
**Correo electrónico:** \_\_\_\_\_

**MONOGRAFÍA NUEVA**

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>MGA 0536. MAPEO PEPTÍDICO</b></p> <p>Las proteínas pueden existir como grandes estructuras complejas que pueden estar compuestas de subpoblaciones que muestran heterogeneidad en su secuencia primaria debido a un ensamblaje de sus aminoácidos inadecuado, degradación o modificación postraduccional. La alta masa molecular de las proteínas combinada con su complejidad hace que sea particularmente difícil identificar químicamente un producto proteico intacto utilizando un único método analítico. Sin embargo, es posible romper la proteína de prueba en fragmentos más pequeños que se pueden identificar con suficiente resolución de masa para determinar la secuencia primaria de la proteína. Este proceso es la base de la técnica de identificación de proteínas comúnmente conocida como mapeo de péptidos. La técnica de mapeo de</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>péptidos implica un paso de digestión en el que la proteína se rompe selectivamente en enlaces amida entre residuos de aminoácidos específicos para producir un conjunto predecible de péptidos. La separación, detección e identificación por medio de técnicas cromatográficas analíticas de la mezcla de péptidos revelan información sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína que se puede utilizar para identificar la proteína. El mapeo de péptidos es un procedimiento que tiene su aplicabilidad principalmente de manera comparativa; los resultados de la proteína de prueba se contrastan con los resultados de un patrón de referencia o material tratado de manera similar para determinar la identidad de la proteína de prueba. Esta identificación comparativa confirma que la estructura primaria de la proteína de prueba coincide con la de la proteína de referencia.</p>		
<p>La capacidad del mapeo de péptidos para detectar alteraciones importantes en la secuencia primaria ha dado lugar a muchas aplicaciones para la determinación de la calidad de las proteínas que están fuera del alcance de este capítulo. La pureza de la proteína de prueba con respecto a la incorporación incorrecta de aminoácidos u otro ensamblaje incorrecto, como la alteración del enlace disulfuro, las modificaciones postraduccionales y la degradación, se puede determinar usando un mapa peptídico cuantitativo. La comparación del mapeo de péptidos durante la ampliación o los cambios de fabricación puede</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>respaldar los estudios de consistencia del proceso. Además, el mapeo de péptidos se puede utilizar para determinar el grado y la ubicación específica de aminoácidos de modificaciones tales como glicosilación y conjugación (por ejemplo, grado de pegilación). El enfoque de este capítulo estará en el uso del mapeo de péptidos para la identificación química de un producto proteico donde la especificidad es el atributo principal del método analítico.</p>		
<p>El mapeo peptídico es una prueba de identidad para las proteínas, implica el tratamiento químico o enzimático de una proteína que da como resultado la formación de péptidos, seguidos de la separación e identificación de éstos de una manera adecuada y reproducible. El mapeo peptídico es una prueba que permite identificar cambios en la secuencia de aminoácidos que pudieran resultar de mutaciones puntuales y/o corrimientos en el marco de lectura.</p>		
<p>El mapeo peptídico genera una huella única de cada proteína, nos permite confirmar los patrones de digestión con respecto a una sustancia de referencia y nos ayuda a detectar de manera directa alteraciones en la secuencia de la proteína demostrando indirectamente la consistencia en el proceso de fabricación y la estabilidad de la línea celular productora. La secuencia de aminoácidos de la proteína de prueba debe evaluarse para seleccionar las condiciones de pretratamiento y ruptura que den como resultado la longitud óptima del péptido para el análisis. Dependiendo de la</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>aplicación, la cobertura de la secuencia completa o casi completa es importante, porque puede no haber conocimiento previo de las alteraciones de la proteína durante el desarrollo. Los siguientes puntos deben tenerse en cuenta durante el desarrollo de una técnica analítica de mapeo de péptidos. Estos elementos también se presentan gráficamente en la <i>figura 1</i>.</p>		
<p><i>Figura 1. Véase al final de la monografía.</i></p>		
<p>Los pasos principales para el desarrollo del método son: aislamiento y purificación de la proteína, corte selectivo de los enlaces peptídicos, separación cromatográfica y análisis e identificación de los péptidos.</p>		
<p>El corte completo de los enlaces peptídicos es más probable que ocurra cuando se usan enzimas tales como endoproteasas (por ejemplo, tripsina), en lugar de reactivos de escisión química. Para una correcta ejecución y análisis del mapa obtenido por el método de mapeo peptídico este debe contener suficientes péptidos para ser significativo, de un tamaño adecuado y evitar fragmentos muy pequeños, ya que el mapa puede perder su especificidad.</p>		
<p><b> AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN </b></p>		
<p>El aislamiento y la purificación pueden ser necesarios para el análisis de fármacos a granel, formas de dosificación o patrones de referencia o materiales que contienen excipientes o proteínas portadoras que interfieren en el análisis. Las</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>sustancias residuales que interfieren pueden afectar la eficiencia de la ruptura enzimática y la apariencia del mapa peptídico. El impacto de las sustancias residuales o del proceso de purificación de la muestra en el mapa peptídico de prueba final debe evaluarse y validarse durante el proceso de desarrollo.</p>		
<b>CORTE SELECTIVO DEL ENLACE PEPTÍDICO</b>		
<p>El enfoque utilizado para la ruptura de enlaces peptídicos, dependerá de la proteína en estudio. Puede haber razones específicas para usar otros agentes de ruptura o combinaciones de los mismos.</p>		
<p>La estructura terciaria de las proteínas puede dificultar el acceso completo de la enzima utilizada para la ruptura a todos los sitios de corte, lo que da como resultado una cobertura de secuencia inaceptable. El tratamiento de proteínas con agentes caotrópicos (por ejemplo, cloruro de guanidinio, urea) y tensoactivos (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio) puede usarse para desplegar la proteína antes de la digestión. Los agentes desnaturantes pueden afectar la actividad enzimática y puede ser necesaria una purificación adicional (por ejemplo, diafiltración) o pasos de dilución antes de la digestión. Puede ser necesario reducir y alquilar los enlaces disulfuro antes de la digestión para permitir que la enzima tenga acceso completo a los sitios de corte; sin embargo, la información de enlace de cisteína a cisteína se pierde. Los reactivos comunes para la</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*															
<p>reducción de disulfuro incluyen compuestos de ditiotreitil y trialquilfosfina como tris (2-carboxietil) fosfina. Los reactivos para la alquilación de cisteínas reducidas incluyen yodoacetamida, ácido yodoacético y 4-vinilpiridina. El uso de agentes alquilantes puede crear aductos que impactarán en la separación cromatográfica y alterarán el peso molecular del péptido afectado.</p>																	
<p>Algunos de los agentes de corte más empleados y su especificidad se muestran en la <i>Tabla 1</i>. Esta lista no es limitativa y se ampliará a medida que se identifiquen otros agentes de corte.</p>																	
<p><u>Tabla 1. Ejemplos de enzimas para corte.</u></p> <table border="1" data-bbox="128 813 724 1424"> <thead> <tr> <th>Tipo</th> <th>Agente</th> <th>Especificidad</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>Tripsina</td> <td>Lado C-terminal de Arg y Lys</td> </tr> <tr> <td>Enzimático</td> <td>Quimotripsina</td> <td>Lado C-terminal de residuos hidrofóbicos (ejemplo: Leu, Met, Ala, aromáticos)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Pepsina A</td> <td>Baja especificidad de digestión (no recomendada)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Endolisina</td> <td>Lado C-terminal de Lys</td> </tr> </tbody> </table>	Tipo	Agente	Especificidad		Tripsina	Lado C-terminal de Arg y Lys	Enzimático	Quimotripsina	Lado C-terminal de residuos hidrofóbicos (ejemplo: Leu, Met, Ala, aromáticos)		Pepsina A	Baja especificidad de digestión (no recomendada)		Endolisina	Lado C-terminal de Lys		
Tipo	Agente	Especificidad															
	Tripsina	Lado C-terminal de Arg y Lys															
Enzimático	Quimotripsina	Lado C-terminal de residuos hidrofóbicos (ejemplo: Leu, Met, Ala, aromáticos)															
	Pepsina A	Baja especificidad de digestión (no recomendada)															
	Endolisina	Lado C-terminal de Lys															

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Glutamil endopeptidasa (Glu-C endoproteinasa; V8 proteasa); de origen de <i>S. aureus</i> cepa V8)</p> <p>Peptidil Asp metaloendopeptidasa (Asp-N endoproteinasa)</p> <p>Clostripaina (Arg-C endopeptidasa)</p>	<p>Lado C-terminal de Glu y Asp</p> <p>Lado N-terminal de Asp</p> <p>Lado C-terminal de Arg</p>	
<p>Se pueden usar diferentes agentes de corte dependiendo del tamaño o la configuración de la proteína. Por ejemplo, en caso de utilizar tripsina como agente de corte para proteínas con una masa molecular mayor que 100 000 Da, los residuos de lisina se deben proteger mediante citraconilación o malailación; de lo contrario, se generarán demasiados péptidos.</p>		
<p>La digestión con tripsina, puede introducir ambigüedades en el mapeo peptídico, debido a las reacciones colaterales que ocurren durante la reacción de digestión tales como uniones no específicas, desamidación, isomerización disulfuro, oxidación de residuos de metionina o formación de grupos piroglutámicos creados de la desamidación</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
de la glutamina en el extremo <i>N</i> -terminal de los péptidos generados.		
Para lograr una digestión enzimática efectiva se recomienda realizar un análisis <i>in silico</i> para evaluar la secuencia de corte y determinar la mejor enzima de corte.		
<b>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA DIGESTIÓN</b>		
Los factores que afectan la eficacia y reproducibilidad de la digestión de proteínas incluyen el pH, la solución buffer de digestión, la temperatura, el tiempo y la proporción de enzima/reactivo de digestión a proteína.		
<b>El pH de la mezcla de digestión.</b> Se determina con base en las condiciones óptimas descritas para cada una de las enzimas que se empleen y en caso de usar una mezcla se busca el pH con mejor actividad para el grupo de enzimas. Por ejemplo, cuando se usa tripsina como un agente de corte, un ambiente ligeramente alcalino (pH 7.5 a 8) es óptimo; sin embargo, cuando se utiliza bromuro de cianógeno como agente de corte, se requiere un ambiente ácido de pH 2.		
<b>Temperatura.</b> La temperatura óptima depende de la enzima de corte; por ejemplo, la mayoría de las enzimas tienen una actividad óptima en un rango de 25 a 37 °C. La temperatura puede definir la especificidad de la enzima hasta cierto punto, por lo que, en algunos casos, el ajuste de la temperatura se puede utilizar para optimizar las		



"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>condiciones de digestión de determinadas proteínas que permita obtener péptidos adecuados para su análisis. Idealmente, la temperatura de digestión minimizará las reacciones secundarias químicas relacionadas con la muestra, como la desamidación y la agregación de proteínas, maximiza la susceptibilidad de la proteína de prueba a la digestión mientras se mantiene la actividad de la enzima.</p>		
<p><b>Tiempo.</b> Es necesario asegurarse de que el tiempo de digestión sea suficiente para el uso previsto para evitar digestiones variables. Debe realizarse una cinética de digestión para determinar el tiempo óptimo en el que se obtiene un mapa de digestión reproducible y completo, con fragmentos de péptidos mínimos resultantes de la digestión parcial. El tiempo de digestión varía de minutos a días y las alícuotas de una única reacción pueden estabilizarse de manera apropiada para su análisis y determinar el tiempo requerido para la digestión completa de la proteína. La reacción normalmente se detiene por un cambio en el pH o por congelación.</p>		
<p><b>Cantidad de enzima utilizada.</b> Se debe usar una cantidad suficiente de enzima de corte para alcanzar el nivel deseado de digestión en un período de tiempo práctico (es decir, 2 a 20 h), y que no contribuya en señales adicionales al mapa peptídico. Sin embargo, aunque cantidades mayores de enzima pueden ser utilizadas para completar una digestión rápida (1 a 6 h), es necesario considerar que altas concentraciones de</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>una enzima pueden contribuir a la señal inespecifica en el mapa peptídico. Generalmente se utiliza una relación de proteína/proteasa de 20:1 y 200:1.</p>		
<p>En los casos en los que la enzima de corte es inestable, para incrementar la eficacia del corte se recomienda que la enzima se adicione en dos o más etapas para optimizar su actividad de corte.</p>		
<p>Las enzimas pueden unirse a un soporte sólido para permitir el uso de cantidades relativas más altas de proteasa mientras se evita la contaminación por autólisis enzimática y la contribución de fragmentos enzimáticos al mapa de péptidos. Los reactivos de ruptura química se usan generalmente en un exceso molar significativo y es posible que deban eliminarse al final de la digestión.</p>		
<p>La concentración óptima de la proteína de prueba en la digestión debe determinarse empíricamente, sin embargo, se recomienda realizar un análisis para determinar una concentración adecuada que permita obtener señales visibles de péptidos pequeños. La concentración debe ser lo suficientemente baja para minimizar la posible agregación de proteínas intactas y parcialmente digeridas, pero debe ser suficiente para que resulte en la detección de todos los péptidos después de la separación cromatográfica con el método de detección seleccionado. Es posible que se requiera la dilución o concentración de la muestra mediante técnicas como la filtración centrífuga. Cualquier paso de dilución o concentración realizado en la proteína de prueba también debe realizarse en el</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>estándar o material de referencia del producto. La recuperación de proteínas debe evaluarse para cualquier paso de concentración y el impacto de la dilución o la concentración en la especificidad y precisión del método debe investigarse durante el desarrollo y considerarse para su inclusión en los estudios de solidez realizados para la validación del método.</p>		
<p>El paso de digestión puede introducir ambigüedades en el mapa de péptidos como resultado de reacciones secundarias, como escisión inespecífica, desamidación, isomerización de disulfuro, oxidación de residuos de metionina, carbamilación de residuos de lisina o formación de grupos piroglutámicos creados a partir de la desamidación de glutamina en la N-terminal de un péptido. La autólisis puede introducir picos extraños producidos por la enzima proteolítica que se digiere a sí misma. Las intensidades de los picos de péptidos de autólisis dependen de la relación de enzima a sustrato y de las modificaciones y la calidad de la enzima utilizada. Para evitar la autólisis, las soluciones reactivas de enzimas proteolíticas deben prepararse a un pH que inhiba la actividad enzimática o las soluciones reactivas deben prepararse inmediatamente antes de su uso. Se pueden usar enzimas modificadas, donde se realizan cambios en la proteasa para prevenir la autólisis. Se encuentran disponibles preparaciones comerciales de tripsina (a menudo llamadas "grado proteómico") en las que los</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>residuos de lisina de la enzima se han metilado o acetilado para reducir el número de sitios de escisión autolítica. Para identificar los artefactos de digestión, se realiza una determinación en blanco usando un control de digestión con todos los reactivos excepto la proteína de prueba.</p>		
<b>SEPARACIÓN</b>		
<p>En la separación cromatográfica es importante resolver la complejidad de la mezcla de péptidos resultante de la digestión, de tal forma que haya una interpretación válida de los datos, significativa y reproducible. Las condiciones cromatográficas, columna y fases móviles finales dependerán de la complejidad del mapa de péptidos. Se requerirán experimentos de optimización del método para obtener el cromatograma reproducible de la más alta calidad. El peso molecular de la proteína de prueba también influye en la complejidad del mapa.</p>		
<p>Las principales técnicas de separación que se utilizan en el Mapeo de péptidos son cromatografía de intercambio iónico, hidrofobicidad y mapeo peptídico, todas estas se pueden llevar a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía de líquidos de ultra alta resolución y electroforesis capilar. Sin embargo, la cromatografía por fase reversa utilizando un cromatografo de líquidos de alta resolución (FR-CLAR) es el método más utilizado en la etapa de separación en el mapeo de péptidos.</p>		
<p>La selección de la columna cromatográfica está determinada por cada proteína. Las columnas con</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>diferente tamaño de poro (80-1000 Å) o de sílica no porosa, polimérica o soportes híbridos, han mostrado dar una buena separación. Están disponibles columnas con tamaños de partículas entre 3 a 5 µm y menores de 2 µm, las cuales son utilizadas cuando se requiere una mayor eficiencia. Generalmente las que tienen octil u octadecilsilil enlazadas a las fases, son ideales para péptidos. El octadecilsilano (L1) con 300 Å o tamaño de poros menores, es la columna más comúnmente empleada en la etapa de separación en el mapeo de péptidos.</p>		
<p>La fase móvil más común para la separación de péptidos por FR-CLAR es agua con acetonitrilo como solvente orgánico, sin embargo, se pueden utilizar otros solventes orgánicos, como el metanol, alcohol isopropílico o alcohol n-propílico. Los disolventes como los alcoholes propílicos en la fase móvil pueden ser útiles para separar muestras que contienen muchos péptidos altamente hidrófobos; sin embargo, cabe señalar que los péptidos hidrófilos o pequeños posiblemente pueden eluir en un volumen vacío de columna.</p>		
<p>El control de temperatura de la columna cromatográfica es necesario para lograr una buena reproducibilidad. La temperatura de la columna se puede usar para optimizar la separación de péptidos o mejorar la retención o elución de ciertos péptidos, ya que la resolución aumenta típicamente con la temperatura para una columna de fase reversa.</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p><b>DETECCIÓN</b></p>		
<p>Mientras que la CLAR en fase reversa es el método más común de separación en el mapeo de péptidos para la prueba de identidad, el método de detección más común es la absorción de luz ultravioleta (UV) a 214 nm. Los péptidos resultantes de la digestión de proteínas pueden no contener aminoácidos con cadenas laterales aromáticas que absorban luz a longitudes de onda más altas (280 nm), por lo que la detección a 214 nm (es decir, la longitud de onda donde los enlaces peptídicos absorben la luz) es esencial para garantizar la cobertura de la secuencia de la proteína mientras se minimiza el fondo debido a la fase móvil. También pueden ser adecuados otros métodos de detección.</p>		
<p>La limitación de la detección por UV es que no proporciona información estructural del péptido. La espectrometría de masas es un método de detección útil, que proporciona información de la masa que ayuda a la identificación de péptidos, también como selectividad en casos donde hay co-elución de péptidos. En la mayoría de las aplicaciones, el eluyente de la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución en fase reversa puede ser introducido directamente en el espectrofotómetro de masas, siempre y cuando la fase móvil sea compatible. Las consideraciones sobre la fase móvil específica, son dependientes del método de ionización seleccionado. La ionización por electro-aspersión (ESI) es el método</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>más común para la introducción de proteínas y péptidos en el analizador de masas, las mezclas volátiles de agua-solvente proporcionan la mayor eficiencia de ionización. Debido a que la ionización por ESI en presencia de solventes está limitado a moléculas más básicas que el solvente, comúnmente se adiciona ácido fórmico o ácido acético a la fase móvil. Las sustancias amortiguadoras y sales deben ser minimizadas ya que pueden reducir la señal y las sales no volátiles pueden depositarse en la fuente de ionización. El TFA debe evitarse porque puede resultar en una supresión de iones, como un tipo de interferencia de matriz, el cual puede reducir la señal de algunos péptidos, particularmente cuando se utiliza ESI. La supresión de iones también puede reducir la eficacia de ionización de los péptidos glicosilados, lo que da como resultado una sensibilidad reducida. Por lo tanto, es importante probar la combinación óptima para lograr resultados óptimos tanto para UV como para MS.</p>		
<p><b>ANÁLISIS DE DATOS</b></p>		
<p>Para determinar si la proteína de prueba es la proteína de interés deseada, el mapa de péptidos de la proteína de prueba debe compararse con el mapa de péptidos de la sustancia de referencia (SRef) o material generado utilizando procedimientos idénticos de pretratamiento, separación y detección.</p>		
<p>La comparación visual de los tiempos de retención, las respuestas de los picos (el área y altura del</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>pico), el número de picos y el patrón de elución general es el primer paso del procedimiento. Es una buena práctica realizar un análisis no subjetivo adicional de las proporciones de respuesta máxima de los picos críticos y los tiempos de retención de los picos. Si todos los picos críticos en la digestión de la proteína de prueba digerida y en la sustancia o material de referencia digeridos tienen los mismos tiempos de retención y relaciones de respuesta máxima, entonces se confirma la identidad de la proteína de prueba. Por ejemplo, las pruebas de mapeo de péptidos para muestras de anticuerpos monoclonales a menudo incluyen un péptido Fc común que se usa como pico de referencia. Este péptido de referencia se puede agregar a la digestión de la muestra y luego se pueden examinar las proporciones de respuesta de los picos y los tiempos de retención en comparación con los criterios de aceptación predefinidos del pico de referencia. El método de comparación seleccionado debe depender de la complejidad del mapa de péptidos resultante y la especificidad requerida para la aplicación de prueba de identidad particular (por ejemplo, diferenciación entre diferentes productos proteicos fabricados en la misma instalación o diferenciación de variantes del mismo producto proteico).</p>		
<p>Cuando se requiere una alta especificidad, se puede usar un espectrómetro de masas para análisis de rutina para proporcionar información sobre modificaciones de péptidos, truncamientos,</p>		



"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
cortes incompletos, impurezas y picos de coelución no resueltos bajo un solo pico.		
<b>Puntos a considerar previos a la validación</b>		
<p>Durante el desarrollo del procedimiento de mapeo de péptidos, se adquieren conocimientos y experiencia que conducen a la selección de criterios de idoneidad del sistema y criterios de aceptación de validación de métodos analíticos. Una revisión final del procedimiento antes de la validación puede garantizar que el procedimiento esté listo para la validación, reduciendo el riesgo de incumplimiento de los criterios. Como procedimiento general, el mapeo de péptidos puede abarcar una gama significativa de diseños, aplicaciones y requisitos experimentales para el rendimiento. En consecuencia, en un texto general, no es posible establecer criterios específicos de idoneidad o validación del sistema. Se sugieren los siguientes elementos para su evaluación antes de iniciar la validación.</p>		
<b>Cobertura</b>		
<p>La cobertura se refiere al porcentaje de la secuencia de la proteína que detecta en el mapa de péptidos y se identifica como picos resueltos discretamente. Aunque no se puede identificar una cifra específica para todas las aplicaciones, se ha descubierto que una cobertura cercana al 95 % es un objetivo de rendimiento aceptable para un procedimiento de mapeo de péptidos.</p>		
<b>Corte de enlace específicos</b>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
Los enlaces específicos cortados por la enzima elegida o el procedimiento de digestión química deben identificarse y enumerarse.		
<b>Picos principales</b>		
Los péptidos principales recuperados de los cortes de enlaces específicos deben identificarse y enumerarse.		
<b>Escisiones parciales</b>		
Deben identificarse los enlaces peptídicos susceptibles de corte parcial o incompleta y sus picos cromatográficos o señales asociados.		
<b>Escisiones menores / inespecíficas</b>		
Debe identificarse y limitarse el grado de corte en enlaces no específicos.		
<b>Picos derivados de la proteasa</b>		
Si se usa una proteasa para la digestión de la proteína de prueba, entonces cualquier pico por encima del fondo derivado de la proteasa debe identificarse y, cuando sea apropiado, limitarse.		
<b>Proteína "central" no digerida</b>		
Se debe identificar y limitar la proteína no digerida o parcialmente digerida (a menudo llamada "núcleo").		
<b>Longitud media del péptido</b>		
Describe el conjunto de péptidos producido por la combinación de la proteasa elegida y / o el reactivo de escisión química y la proteína de prueba. Esta es una compensación entre péptidos más pequeños, que muestran un mayor nivel de selectividad estructural con el mapeo de péptidos pero producen un mapa más complejo con más		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>picos y péptidos más largos que producen mapas más simples pero con menos capacidad de resolución de variantes estructurales. Ninguna longitud de péptido específica es adecuada para todas las aplicaciones, pero a menudo se considera apropiada una longitud de péptido media de 10 a 20 residuos.</p>		
<p><b>Capacidad de resolución</b></p>		
<p>La capacidad de resolución se refiere a la capacidad del sistema de separación para resolver el conjunto de péptidos generado por la proteasa o el reactivo de escisión química. Por ejemplo, una digestión puede producir 30 péptidos pero solo 20 picos debido a coeluciones o no recuperaciones. Las separaciones problemáticas deben identificarse y resolverse mediante procedimientos cromatográficos apropiados y, si es necesario, controlarse mediante el uso de patrones de referencia de péptidos o criterios de rendimiento del material o del sistema.</p>		
<p><b>Selección de criterios de idoneidad del sistema</b></p>		
<p>Deben desarrollarse criterios de idoneidad del sistema para garantizar que los elementos del procedimiento para la digestión, separación y detección de proteínas hayan proporcionado con éxito una identificación estructural de la proteína de prueba en el nivel de no ambigüedad requerido para la aplicación. Los criterios de idoneidad del sistema evaluados durante el análisis de rutina para las pruebas de identidad generalmente incluirán una evaluación del cromatograma de</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
digestión de proteínas de referencia y pueden incluir características de rendimiento como:		
• Similitud cualitativa con el cromatograma de referencia		
• Grado de digestión		
• Escisiones parciales		
• Escisiones inespecíficas		
• Relación entre alturas de pico / señal y ruido		
• Forma de pico		
• Tiempo máximo de retención		
• Resolución de picos específicos		
Para los procedimientos del método de prueba que requieren aislamiento, purificación o concentración de la muestra, se debe determinar un criterio de recuperación de la muestra e incluirlo como parte de la evaluación de idoneidad del sistema. En los casos en los que puedan existir artefactos de digestión, puede ser necesaria la evaluación de un control de digestión en blanco para demostrar la falta de interferencia.		
<b>VALIDACIÓN</b>		
Antes de validar un procedimiento de mapeo de péptidos, el procedimiento debería haber sido desarrollado hasta su forma final y documentado con criterios de idoneidad del sistema. Cada vez que se realiza el procedimiento, los resultados se evalúan contra los criterios de idoneidad del sistema para determinar si el procedimiento ha proporcionado con éxito resultados reproducibles consistentes con instancias de prueba anteriores.		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Los criterios de aceptación preaprobados a menudo evolucionan en función de los criterios de idoneidad del sistema del procedimiento. Los elementos del protocolo de validación analítica son los siguientes:</p>		
<p>Para los procedimientos del método de prueba que requieren aislamiento, purificación o concentración de la muestra, se debe determinar un criterio de recuperación de la muestra e incluirlo como parte de la evaluación de idoneidad del sistema. En los casos en los que puedan existir artefactos de digestión, puede ser necesaria la evaluación de un control de digestión en blanco para demostrar la falta de interferencia.</p>		
<p><b>Especificidad</b></p>		
<p>Los requisitos de rendimiento del método variarán según la aplicación del método de prueba de identidad y pueden requerir una evaluación de riesgos para comprender qué grado de especificidad se necesita para diferenciar la identidad de la proteína de prueba de otros productos procesados en la misma instalación. El mapeo de péptidos es una técnica comparativa que confirma que la estructura primaria de la proteína de prueba coincide con la de la proteína de referencia. La especificidad se establece mediante la comparación de los mapas de péptidos de un estándar o material de referencia adecuado y muestras de proteínas relacionadas estructuralmente. La selección de muestras de comparación debe seleccionarse en función de una</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>evaluación de riesgos de otros productos procesados en la misma instalación y debe documentarse en el protocolo de validación. Para minimizar la variabilidad inherente de la prueba, el procedimiento se ejecuta en el patrón de referencia o material y proteína de prueba durante la misma instancia de prueba. Un diseño de prueba de mapeo de péptidos que analiza la digestión de la proteína de prueba, el estándar de referencia o la digestión del material, y una mezcla 1: 1 (v / v) de la proteína de prueba y el estándar o material de referencia después de la digestión es un experimento útil de validación de especificidad. Ocasionalmente, puede aparecer un pico en el mapa de péptidos de una proteína de prueba que eluye en un tiempo de retención ligeramente diferente que el pico correspondiente en el patrón de referencia o el mapa de péptidos del material, lo que lleva al analista a juzgar los picos como no idénticos. La prueba de una muestra de co-mezcla durante el experimento de validación de especificidad puede demostrar que dos picos son idénticos si co-eluyen en el mapa de péptidos de co-mezcla y confirman la identidad. Las formas químicamente modificadas del estándar o material de referencia pueden producirse mediante la exposición a condiciones de pH, temperatura o agentes químicos que se sabe que provocan la alteración de la estructura primaria. Estas alteraciones típicamente incluyen desamidación de residuos de asparagina y glutamina, oxidación de</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>residuos de metionina, histidina o triptófano y escisión catalizada por ácido de enlaces peptídicos. Los mapas de péptidos de un estándar o material de referencia químicamente modificado y el estándar o material de referencia intacto pueden compararse basándose en criterios de aceptación predeterminados para demostrar si la especificidad del procedimiento de mapeo de péptidos se ve afectada por modificaciones de la cadena lateral de aminoácidos.</p>		
<p><b>Precisión</b></p> <p>Para facilitar la determinación de la precisión (repetibilidad y precisión intermedia) del procedimiento de mapeo de péptidos, debe formar parte del procedimiento un método empírico para cuantificar las respuestas de los picos (áreas de picos o alturas de picos) y el factor de retención de picos. Un enfoque consiste en realizar comparaciones de respuesta de pico y tiempo de retención de pico que se expresan en relación con un pico de referencia altamente reproducible dentro del mismo cromatograma. Los resultados de precisión obtenidos durante la validación del procedimiento analítico se informan y deben cumplir con los criterios de aceptación de la validación. Si los resultados de precisión no cumplen con los criterios de aceptación, el analista puede volver a evaluar los pasos de digestión y / o separación en el procedimiento.</p>		
<p><b>Robustez</b></p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Es probable que factores como la composición de la fase móvil, la calidad de la proteasa o la pureza del reactivo químico, la variación y edad de la columna, la temperatura de digestión y la estabilidad de la digestión afecten el rendimiento general de la prueba y su reproducibilidad. Se evalúan las tolerancias para cada uno de los parámetros clave y se establecen límites de referencia en caso de que la prueba se utilice para fines de liberación de lotes de rutina.</p>		
<p>El impacto de pequeñas variaciones en los procedimientos de purificación, pretratamiento, dilución o concentración de la muestra de proteína sobre la recuperación debe identificarse durante el proceso de desarrollo y controlarse. Se debe considerar el impacto de las sustancias residuales que quedan después de la preparación de la muestra en la especificidad y precisión del método. Los parámetros críticos identificados durante el desarrollo deben incluirse en los estudios de robustez realizados para la validación del método.</p>		
<p>Muchas estrategias de fragmentación de proteínas emplean el uso de enzimas proteolíticas. Como resultado, la parte de digestión del procedimiento de mapeo de péptidos es inherentemente más sensible a variaciones menores de los parámetros de prueba. Estos parámetros pueden incluir todos o un subconjunto de los siguientes: pH de digestión, solución buffer, concentración de solución buffer, fuerza iónica, temperatura de digestión, cinética de digestión, concentración de</p>		



"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>proteína de prueba, cantidad de proteasa, calidad de proteasa y la estabilidad de la digestión. Utilizando un enfoque de diseño de experimentos, los parámetros críticos identificados se estudian sistemáticamente para comprender su impacto en la variabilidad del método. Los parámetros de digestión en los que se ha demostrado que pequeñas variaciones afectan la precisión del procedimiento de mapeo de péptidos deben controlarse cuidadosamente dentro del procedimiento de prueba utilizando rangos operativos establecidos y validados por estos estudios.</p>		
<p>Para evaluar la calidad de la proteasa o la pureza del reactivo químico, se prepara una muestra del estándar o material de referencia y se digiere con diferentes lotes de agente de corte. Los cromatogramas de cada digestión se comparan en términos de áreas de picos, forma de picos y número. El mismo procedimiento se puede aplicar a otros productos químicos críticos o procedimientos de pretratamiento utilizados durante la preparación de la muestra, como los reactivos reductores y S-carboximetilación.</p>		
<p>Se evalúa el tiempo que se puede mantener una digestión antes de pasar a la etapa de separación del procedimiento, así como las condiciones en las que se almacena la digestión antes de la separación. Varias alícuotas de una única digestión se almacenan en diferentes condiciones de almacenamiento y se resuelven mediante el</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>método cromatográfico. Estos mapas luego se evalúan para detectar diferencias significativas.</p>		
<p>Durante el paso de separación, la variabilidad de una columna a otra, incluso dentro de un lote de una sola columna, puede afectar el rendimiento del procedimiento de mapeo de péptidos. Para evaluar las diferencias de los lotes de la columna, se digiere el estándar de referencia o el material de la proteína de interés y la digestión se somete a separación utilizando diferentes lotes de columna de un solo fabricante. Los mapas de péptidos resultantes se evalúan luego en términos del perfil de elución general, tiempos de retención y resolución de acuerdo con criterios de aceptación predeterminados.</p>		
<p>Para evaluar la vida útil de una columna en términos de robustez, se puede analizar un único resumen del estándar o material de referencia utilizando el procedimiento de mapeo de péptidos con columnas que varían según el historial de número de inyecciones (por ejemplo, 10 a 250 inyecciones por columna). Los mapas de péptidos resultantes pueden compararse luego para detectar diferencias significativas en el ensanchamiento de picos y la resolución general. A medida que una columna envejece, se puede observar un aumento en la contrapresión que puede afectar el mapa de péptidos. Los criterios de idoneidad del sistema o de validez del ensayo pueden diseñarse para diagnosticar el envejecimiento de la columna u otros eventos que puedan afectar los resultados del mapeo de péptidos.</p>		

"2021, Año de la Independencia"

Figura 1. Desarrollo de una técnica analítica de mapeo de péptidos

