

*На правах рукописи*



БЕРИЗОВСКАЯ ЕЛЕНА ИГОРЕВНА

Разработка унифицированного способа установления подлинности  
лекарственных средств пептидной и белковой природы методом  
масс-спектрометрии высокого разрешения

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (МГУ имени М.В.Ломоносова).

*Научный руководитель:*

кандидат химических наук, старший научный сотрудник **Родин Игорь Александрович**

*Официальные оппоненты:*

**Варламов Валерий Петрович,**  
доктор химических наук, профессор,  
заведующий лабораторией инженерии  
ферментов, Институт биоинженерии,  
ФИЦ Биотехнологии РАН

**Савельева Елена Игоревна,**  
доктор химических наук, заведующая  
лабораторией аналитической токсикологии,  
ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России

*Ведущая организация:*

**ФГБУ «Научный центр экспертизы средств  
медицинского применения» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации**

Защита состоится 23 декабря 2015 г. в 15 ч 00 мин в аудитории 446 на заседании диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова <http://www.chem.msu.su>. Текст автореферата размещен на сайте ВАК России <http://vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан \_\_\_\_\_

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Моногорова О.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В настоящее время фальсификация лекарственных средств (ЛС) является серьезной проблемой. По оценкам экспертов 30-40 % всех ЛС, находящихся на фармацевтическом рынке Российской Федерации, являются контрафактными.

С каждым годом применение в терапевтических целях биологически активных пептидов и белков, таких как, например, инсулина, соматотропина, интерферонов, гормонов, факторов роста и т.п., возрастает. Проводятся исследования по модификации известных фармакологических структур с целью получения более активных аналогов, обладающих меньшими побочными эффектами. Для устранения затруднений применения лекарственных средств пептидной и белковой природы (напр. невозможность перорального введения, быстрота распада после введения, длительных вторичных эффектов и др.) их модифицируют путем введения дополнительных групп. Вариативность лекарственных форм пептидных препаратов создает дополнительные трудности при разработке унифицированных процедур их контроля. В последние годы сообщалось о подделке препаратов соматотропина в США (Серостим); в России, по результатам исследования Ассоциации международных фармацевтических производителей, фальсификация гормональных препаратов системного действия занимает второе место. В связи с вышеизложенным важной задачей является контроль качества ЛС пептидной или белковой природы.

Одним из показателей, подлежащих обязательному контролю на соответствие требованиям нормативной технической документации, является подлинность действующего вещества, поскольку замены в аминокислотной последовательности и модификации рекомбинантных пептидов и белков могут привести к фармакологической инактивации, аутоиммунным ответам и другим неблагоприятным эффектам.

В настоящее время контроль качества ЛС пептидной и белковой природы осуществляют в соответствии с требованиями действующей на территории РФ Государственной Фармакопеи (ГФ РФ) и МУК 4.1/4.2.588-96. Для определения подлинности действующих веществ применяются методики, разработанные в 60-80 годах прошлого столетия. Утверждены следующие фармакопейные статьи (ОФС) на методы контроля: «Определение белка» ОФС 42-0053-07, «Биологические испытания инсулина» ОФС 42-0126-09, «Определение цинка в препаратах инсулина» ОФС 42-0118-09 и «Определение электрофоретической чистоты и молекулярных масс генно-инженерных препаратов».

Анализ требований зарубежных фармакопей показал, что при оценке качества ЛС пептидной и белковой природы, а также для обнаружения примесей используются следующие физико-химические методы: ИК-спектроскопия, электрофорез, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с УФ-детектированием. Метод ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием в варианте пептидного картирования используется для подтверждения подлинности генно-инженерных полипептидов: глюкагона человеческого, соматотропина, инсулина человеческого, инсулина лизпро. В последних изданиях зарубежных фармакопей метод пептидного картирования введен для всех субстанций инсулинов, а в БФ и ЕФ – для соматотропина. В Государственной

Фармакопее России XII выпуска стандарты, регламентирующие качество субстанций и готовых лекарственных форм пептидов и белков, отсутствуют, что обуславливает необходимость разработки методик контроля качества ЛС белковой и пептидной природы, ввиду их жизненной потребности для ряда пациентов.

Работы в области контроля качества ЛС пептидной и белковой природы зависят от уровня развития аналитической химии и разработки новых методов химического анализа. В мировой практике для исследования пептидов и белков наиболее распространен метод ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрическим, преимущественно тандемным (ВЭЖХ-МС/МС), детектированием. Для установления аминокислотной последовательности описано применение различных ферментов с последующей идентификацией продуктов протеолиза. Использование данного опыта для установления подлинности ЛС пептидной и белковой природы является целесообразным и перспективным. Вместе с тем, специфичность действия протеаз ограничивает набор получаемых пептидов и приводит к многочисленным вариантам последовательности аминокислот, включенных в базы данных. Решением данной проблемы является комплексное применение нескольких ферментов в индивидуальном состоянии и в комбинациях. Использование тандемной масс-спектрометрии выбранных ионов может привести к неполному результату, поскольку некоторые из характеристичных пептидов не подвергаются фрагментации. Алгоритм интеллектуального управления измерениями позволяет получать масс-спектры вторичных ионов для более широкого круга ионов-прекурсоров.

Таким образом, разработка унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы путем их протеолиза с применением различных ферментов и их комбинаций и последующим ВЭЖХ-МС/МС определением продуктов деградации, а также постадийная экспериментальная оценка разработанного способа является актуальной задачей.

**Цель работы** состояла в разработке унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- разработать алгоритм установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы;
- изучить влияние вспомогательных компонентов готовых форм лекарственных средств пептидной и белковой природы на полноту протеолиза действующих веществ и подобрать условия подготовки проб с использованием ферментативного расщепления;
- изучить влияние параметров тандемного масс-спектрометрического детектирования высокого разрешения с использованием режима интеллектуального управления измерениями на степень идентификации аминокислотной последовательности аналитов;
- провести апробацию разработанного унифицированного способа и подтвердить его пригодность для установления подлинности лекарственных средств пептидной или белковой природы.

**Научная новизна.**

1. Разработан унифицированный способ установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, предусматривающий:

– предварительную экспресс-индикацию наличия соединений пептидной и белковой структуры в ЛС спектрофотометрическим методом;

– установление моноизотопной молекулярной массы действующих веществ лекарственных средств методом масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением;

– установление аминокислотной последовательности действующих веществ лекарственных средств с использованием химических (восстановление дисульфидных связей, модификация сульфгидрильных групп), биохимических (ферментативное расщепление с применением набора специфических протеаз) и инструментальных методов (ВЭЖХ, тандемная масс-спектрометрия на основе двух стратегий установления аминокислотной последовательности).

2. Разработан способ подготовки проб лекарственных средств для идентификации аминокислотной последовательности методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием пяти протеаз (Asp-N, Arg-C, Glu-C, Lys-C, трипсин) и их комбинаций (Glu-C и трипсин, Asp-N и трипсин). Показано увеличение количества специфических пептидов в среднем в 2,7 раза при использовании предложенного набора протеаз и их комбинаций по сравнению с принятой методикой трипсинолиза.

3. Выявлено, что вспомогательные компоненты готовых форм лекарственных средств способны замедлять процессы ферментативного расщепления действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой природы. Установлено, что для увеличения полноты ферментативного расщепления готовых форм лекарственных средств пептидной и белковой природы требуется повышение температуры с 37 до 40-45 °С, увеличение продолжительности реакции ферментативного расщепления с 2-4 до 6 ч.

4. Оптимизированы параметры тандемного масс-спектрометрического детектирования с ионизацией электрораспылением при атмосферном давлении в режиме интеллектуального управления измерениями. Установлено, что при значениях энергии диссоциации ( $30 \pm 15$ ) %, диапазона детектируемых зарядовых состояний 2-6, времени накопления ионов в ловушке 100 мс, ширины изоляции масс  $2 m/z$ , длительности динамического исключения 60 мс, количества ионов в орбитальной ионной ловушке  $5 \times 10^5$ , диапазона сканирования детектируемых ионов 300-2000  $m/z$  достигается 100 % степень идентификации аминокислотной последовательности действующих веществ ЛС. Показано, что выбранные условия применимы для масс-спектрометров разных типов. Данный факт свидетельствует о принципиальной возможности автоматизации процесса масс-спектрометрического анализа лекарственных средств пептидной и белковой природы.

**Практическая значимость.** Разработанный способ апробирован при контроле качества лекарственных средств на основе рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина гларгин, инсулина глулизин, инсулина детемир, рекомбинантного

соматотропного гормона человека, тимозина бета и субстанций орексина А и инсулина лизпро. Показана универсальность данного способа для исследованных препаратов.

Предложенный унифицированный способ установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы внедрен в Федеральном государственном унитарном предприятии «Научный центр «Сигнал» (ФГУП «НЦ «Сигнал»). На основании полученных результатов разработаны, аттестованы и внесены в область аккредитации ФГУП «НЦ «Сигнал» методики идентификации рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина гларгин и рекомбинантного соматотропного гормона человека в лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием. С использованием разработанного подхода проанализировано более 300 проб лекарственных препаратов различных видов, серий и производителей.

**На защиту выносятся следующие положения:**

1. Предложенный алгоритм установления подлинности ЛС пептидной и белковой природы, позволяющий повысить степень идентификации аминокислотной последовательности и сократить время анализа.

2. Разработанная процедура подготовки проб лекарственных средств для идентификации аминокислотной последовательности методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием пяти протеаз (Asp-N, Arg-C, Glu-C, Lys-C, трипсин) и их комбинаций (Glu-C и трипсин, Asp-N и трипсин).

3. Оптимизированные параметры тандемного масс-спектрометрического детектирования высокого разрешения с ионизацией электрораспылением при атмосферном давлении в режиме интеллектуального управления измерениями.

4. Результаты апробации разработанного способа установления аминокислотной последовательности на действующих веществах ЛС с различной длиной пептидной цепи.

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены на 5-ой Международной конференции-школе для молодежи «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения» (г. Санкт-Петербург, 2013 г.), II Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации», посвящённой 85-летию со дня рождения В.А. Кухтина (г. Чебоксары, 2014 г.), 2-ой молодежной школе-конференции «Новые методы аналитической химии» (УОБ «Горизонт», 2014 г.), Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии» с международным участием, посвященной памяти проф. М.С. Вигдергауза (г. Самара, 2015 г.).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 4 тезиса докладов.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, трех глав экспериментальной части, общих выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 143 страницах машинописного текста (без учета приложения), содержит

67 рисунков и 14 таблиц, в списке цитируемой литературы 213 источников. Приложение включает 6 рисунков и 8 таблиц на 57 страницах.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы, представленном в **первой главе**, в соответствующих разделах кратко рассмотрены и обобщены известные данные о лекарственных средствах пептидной и белковой природы. Рассмотрены традиционные способы определения белка и существующие подходы расчета молекулярной массы пептидов и белков с использованием метода масс-спектрометрии. Систематизированы данные о современных способах установления аминокислотной последовательности пептидов и белков, основанных на методах жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием. Особое внимание уделено базам данных и программному обеспечению, используемому для идентификации пептидов. Отмечены достоинства и недостатки рассмотренных подходов.

Во **второй главе** перечислены материалы и методы, применявшиеся в работе, а также описаны методики экспериментов. В исследовании были использованы следующие стандартные образцы: рекомбинантный инсулин человека, инсулин лизпро, инсулин аспарт, инсулин гларгин, рекомбинантный соматотропный гормон человека (все European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard), («Fluka», Германия). Экспериментальные исследования проводили на спектрофотометре Agilent 8453 с кюветами длиной 10 мм («Agilent Technologies», США), хроматографическом оборудовании: высокоэффективном жидкостном хроматографе Accela Pump, оснащенном встроенным дегазатором, оборудованным системой автоматического ввода пробы Accela Autosampler, блоком для термостатирования хроматографической колонки и диодно-матричным детектором Accela PDA; ВЭЖХ-МС/МС анализ проводили с использованием жидкостного хроматографа модели UltiMate 3000 RSLC «Dionex», оснащенного насосом HPG-3400RS, 6-и канальным дегазатором SRD-3600, оборудованный системой автоматического ввода пробы WPS-3000TSL Analytical с масс-спектрометрическим детектором QExactive с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении («Thermo Scientific» США). В работе использовали хроматографическую колонку ZORBAX 300SB-C18 длиной 250 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, размер сорбента 5,0 мкм с размером пор 300 Å («Agilent Technologies», США).

**Третья глава** посвящена алгоритму установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, представленному на рис. 1. Он включает в себя несколько стадий. Во-первых, для сокращения времени исследований использовали предварительную экспресс-индикацию наличия соединений пептидной и белковой структуры в ЛС спектрофотометрическим методом. При положительном результате следующим шагом было оценка соответствия теоретической и экспериментальной моноизотопной молекулярной массы действующего вещества ЛС методом масс-спектрометрии высокого разрешения.



**Рис. 1.** Алгоритм установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы.

При получении положительного результата на следующем этапе необходимо установить аминокислотную последовательность действующего вещества ЛС методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Для этого требуется предварительная обработка ферментами с целью расщепления белка по заранее известным аминокислотным группировкам, получение масс-спектров вторичных ионов с использованием алгоритма интеллектуального управления измерениями и обработка полученных результатов с использованием специализированного программного обеспечения. На основании проведенных исследований делается заключение о подлинности действующего вещества лекарственного средства. Подлинным считается действующее вещество, аминокислотная последовательность которого соответствует заявленной производителем.

Для предварительной экспресс-индикации наличия соединений пептидной и белковой структуры в лекарственных препаратах был выбран метод Бредфорд, как наиболее простой в исполнении. При отсутствии в составе действующего вещества ЛС аргинина и циклических аминокислот использовали прямое спектрофотометрическое определение наличия белков в диапазоне длин волн 200–220 нм. При получении отрицательного результата дальнейшие исследования не проводили, и делали заключение о несоответствии подлинности действующего вещества заявленному. При положительном результате на следующем этапе исследований устанавливали соответствие теоретической и экспериментальной моноизотопной молекулярной массы действующего вещества ЛС методом масс-спектрометрии высокого разрешения.



Теоретическую моноизотопную молекулярную массу рассчитывали по формуле (1).

$$M_{i(C_m H_n N_l O_k S_p)} = m(M_{iC}) + n(M_{iH}) + l(M_{iN}) + k(M_{iO}) + p(M_{iS}), \quad (1)$$

где  $M_{i(C_m H_n N_l O_k S_p)}$  – моноизотопная молекулярная масса аналита;

$m, n, l, k, p$  – число атомов С, Н, N, О и S в молекуле, соответственно;

$M_{iC}, M_{iH}, M_{iN}, M_{iO}, M_{iS}$  – массы основных изотопов элементов С, Н, N, О и S,

соответственно.

По значению точных отношений масс к заряду  $m/z$  ( $\delta = \pm 5$  ppm) многозарядных ионов белков, с использованием программы обработки данных Xcalibur 2.2, для стандартных образцов рекомбинантного соматотропного гормона человека (РСГ), рекомбинантного инсулина человека (РИЧ), инсулина лизпро, инсулина аспарт и инсулина гларгин рассчитывали моноизотопную молекулярную массу действующего вещества по формуле (2) для пика изотопа с наименьшим значением соотношения массы к заряду в кластере изотопов мультитарядного иона.

$$M_i = n * (m_i - H), \quad (2)$$

где  $M_i$  – рассчитанная моноизотопная молекулярная масса исследуемого соединения;

$n$  – значение зарядового состояния иона;

$m_i$  – значение  $m/z$  для пика моноизотопного мультитарядного иона;

$H$  – моноизотопная масса водорода,  $H=1,0078$ .

Экспериментальные значения усредняли в соответствии с формулой (3) и сравнивали с теоретическими (табл. 1).

$$Mr_{cp} = \frac{\sum_1^n Mr_{расч}}{n}, \quad (3)$$

где  $Mr_{cp}$  – среднее значение молекулярной массы действующего вещества лекарственного средства из  $n$  определений;

$Mr_{расч}$  – рассчитанные значения молекулярной массы действующего вещества лекарственного средства в  $n$  определениях;

$n$  – количество определений, в которых различия в значениях измеренных молекулярной массы белка между определениями не превысили границ допустимой ошибки.

**Таблица 1.** Результаты оценки моноизотопной молекулярной массы стандартных образцов методом масс-спектрометрии высокого разрешения

Действующее вещество	z	m/z	$M_p$ , Да	$M_c$ , Да	$M_{ит}$ , Да	$\Delta$ , Да
Рекомбинантный соматотропный гормон	15	1702,2408	22116,03	22115,76	22115,79	0,03
	14	1580,6595	22115,12			
	13	1475,4158	22116,12			
Рекомбинантный инсулин человека	6	968,2926	5803,7088	5803,67	5803,64	0,03
	5	1161,7374	5803,6480			
	4	1451,9207	5803,6516			
Инсулин лизпро	6	968,2900	5803,6932	5803,65	5803,64	0,01
	5	1161,7343	5803,6325			
	4	1451,9162	5803,6336			
Инсулин гларгин	6	1010,8177	6058,8594	6058,84	6058,82	0,02
	5	1212,7764	6058,8430			
	4	1515,7128	6058,8200			

Действующее вещество	z	m/z	M <sub>p</sub> , Да	M <sub>c</sub> , Да	M <sub>ит</sub> , Да	Δ, Да
Инсулин аспарт	6	971,2840	5821,6572	5821,62	5821,61	0,01
	5	1165,3294	5821,6080			
	4	1456,4098	5821,6080			

M<sub>p</sub> – рассчитанная моноизотопная молекулярная масса;  
M<sub>c</sub> – молекулярная масса, усредненная по трем рассчитанным значениям;  
M<sub>ит</sub> – теоретическая моноизотопная молекулярная масса.

Из полученных данных следует, что определенные моноизотопные молекулярные массы для рекомбинантного соматотропного гормона, инсулина гларгин, инсулина аспарт, позволяют делать выводы о подлинности действующего вещества в ЛС, т.к. величина ошибки составляет 0,01-0,03 Да. Однако, для препаратов рекомбинантного инсулина человека и инсулина лизпро, обладающих идентичными массами, подлинность можно оценить только при установлении аминокислотной последовательности, что требует проведения исследований с использованием специфических протеаз.

При получении расчетной моноизотопной молекулярной массы, отличной от теоретической, дальнейшие исследования не проводили, и делали заключение о несоответствии подлинности действующего вещества заявленному. При положительном результате на следующем этапе исследований определяли аминокислотную последовательность с использованием подходов снизу вверх и с середины вниз, при которых образец расщепляется ферментом по заранее известным аминокислотным группировкам. При реализации подхода снизу вверх использовали Glu-C и трипсин, а для подхода с середины вниз – Lys-C, Asp-N и Arg-C. С целью получения дополнительной информации проводили дополнительную обработку трипсином лизатов пептидов после расщепления протеазами Glu-C и Asp-N. Для повышения производительности и достоверности установления аминокислотной последовательности представляется целесообразным использовать алгоритм интеллектуального управления измерениями, позволяющий в соответствии с заданными настройками автоматически выбирать ион-предшественник для фрагментации.

Для получения достоверных результатов при определении подлинности ЛС пептидной или белковой природы необходимо добиться полноты ферментативного расщепления путем выбора условий его проведения при вариации четырех параметров: pH среды, соотношение фермент : субстрат, температура и время инкубации с ферментом. При этом надо убедиться, что вспомогательные компоненты готовых форм ЛС не оказывают влияния на полноту ферментативного расщепления. Оценку проводили путем сравнения степени протеолиза стандартов рекомбинантного инсулина человека (РИЧ) и рекомбинантного соматотропного гормона человека (РСГ), а также лекарственных средств «Актрапид НМ» и «Растан», действующими веществами которых является РИЧ и РСГ, соответственно, в различных экспериментах с предварительным восстановлением и алкилированием дисульфидных связей по схеме с использованием 1,4-дитиотреитола, трис-(2-карбоксиил)фосфина и 4-винилпиридина.

Степень протеолиза определяли по соотношению белка, подвергнувшегося расщеплению к его же количеству в отрицательном контроле методом высокоэффективной жидкостной

хроматографии со спектрофотометрическим детектированием в диапазоне 200-900 нм. Расчет проводили для каждой из проб во всех экспериментальных сериях по формуле (4)

$$DH = \frac{S_1 - S_x}{S_1} * 100, \quad (4)$$

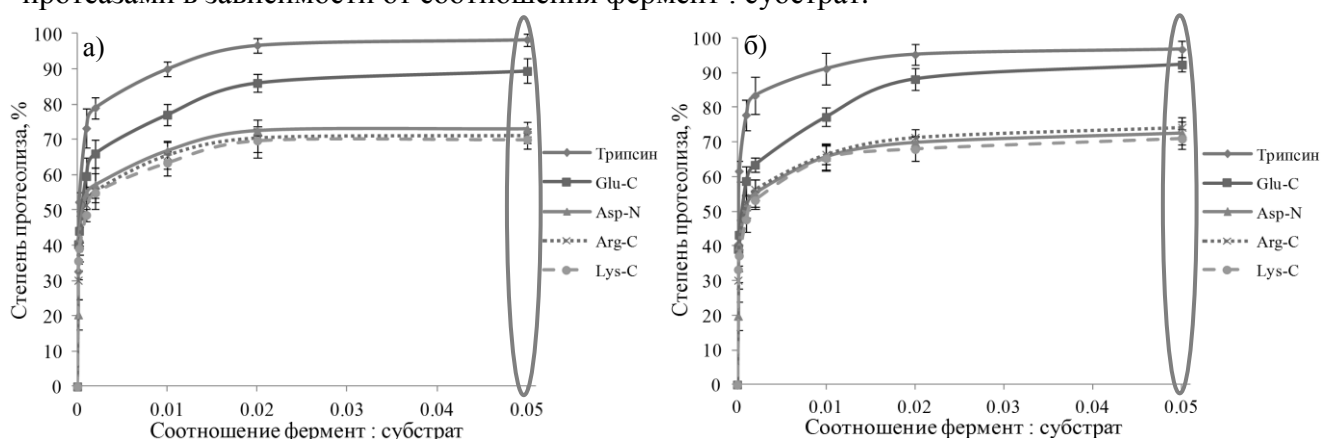
где  $DH$  – степень протеолиза (%),

$S_1$  – площадь пика, соответствующего белку, подвергшемуся расщеплению, в отрицательном контроле,

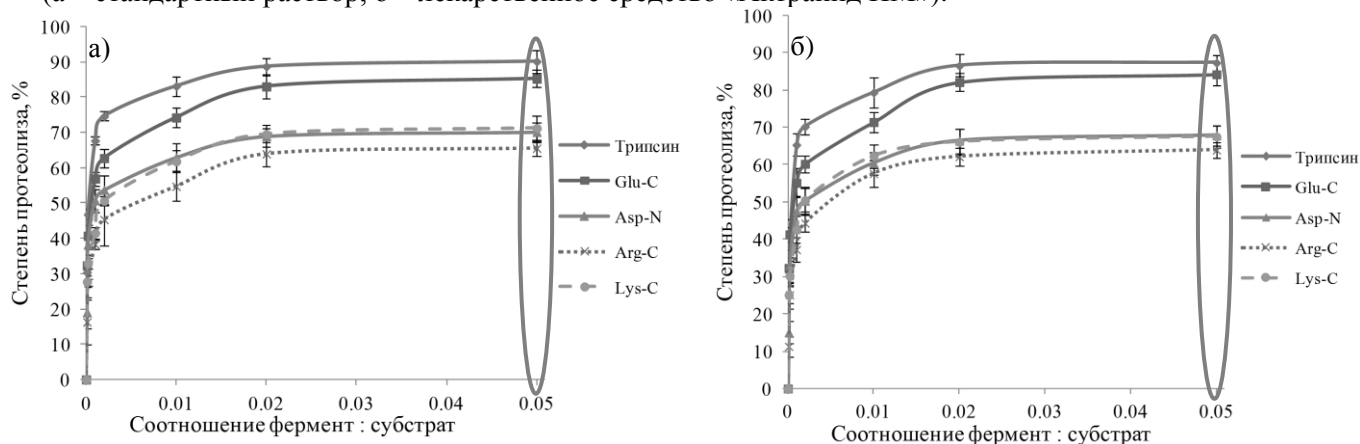
$S_x$  – площадь пика, соответствующего белку, подвергшемуся расщеплению, в эксперименте,

100 – коэффициент пересчета в проценты.

На рисунках 2 и 3 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартных растворов и лекарственных средств РИЧ и РСГ различными протеазами в зависимости от соотношения фермент : субстрат.



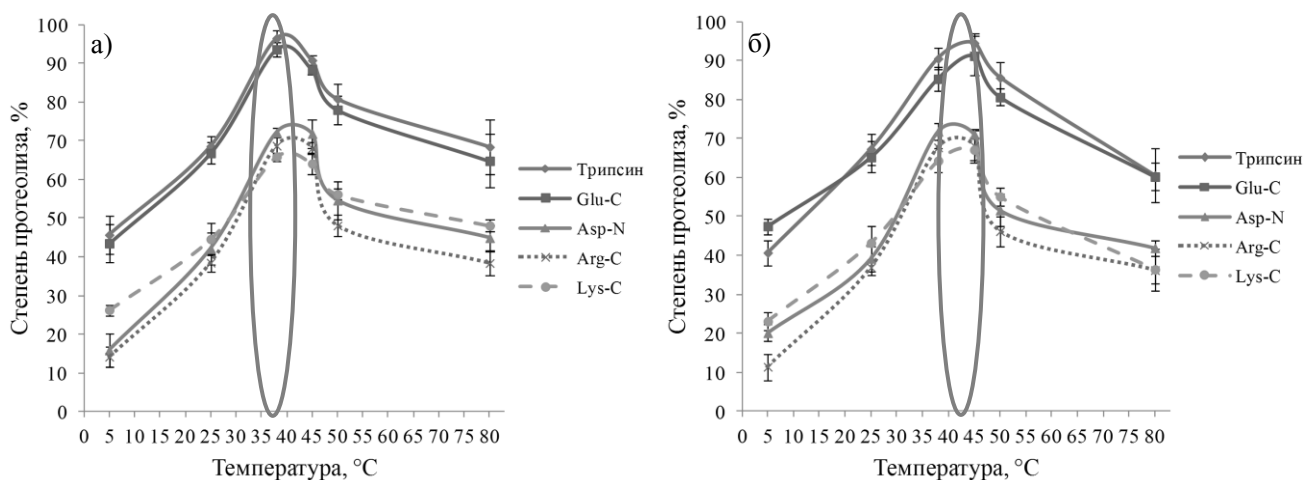
**Рис. 2.** График зависимостей степени протеолиза РИЧ от соотношения фермент : субстрат в пробе (а – стандартный раствор, б – лекарственное средство «Актрапид НМ»).



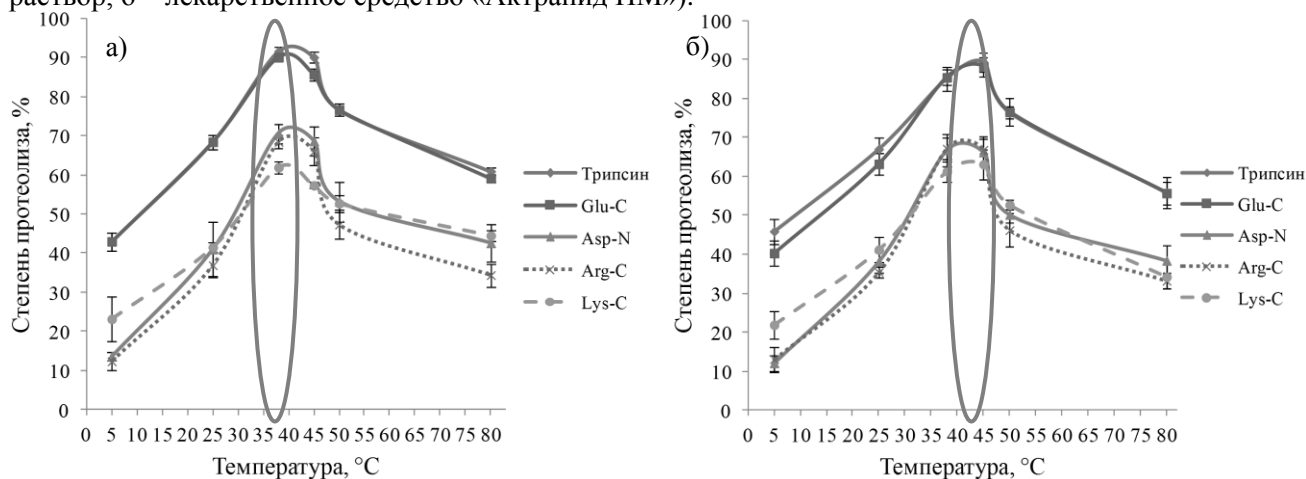
**Рис. 3.** График зависимостей степени протеолиза РСГ от соотношения фермент : субстрат в пробе (а – стандартный раствор, б – лекарственное средство «Растан»).

Из полученных результатов можно сделать вывод, что вспомогательные компоненты готовых форм исследуемых лекарственных препаратов не оказывают влияния на полноту протеолиза, максимальное расщепление исследуемых аналитов достигается при добавлении фермента в пробу в соотношении 1 : 20 для всех вышеперечисленных протеаз, однако незначительно превышает степень протеолиза при соотношении 1 : 50, которое и будем использовать в дальнейших исследованиях. Полученные результаты соответствуют описанным в литературе условиям проведения ферментативного расщепления.

На рисунках 4 и 5 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартных растворов и лекарственных средств РИЧ и РСГ различными протеазами в зависимости от температуры инкубации.



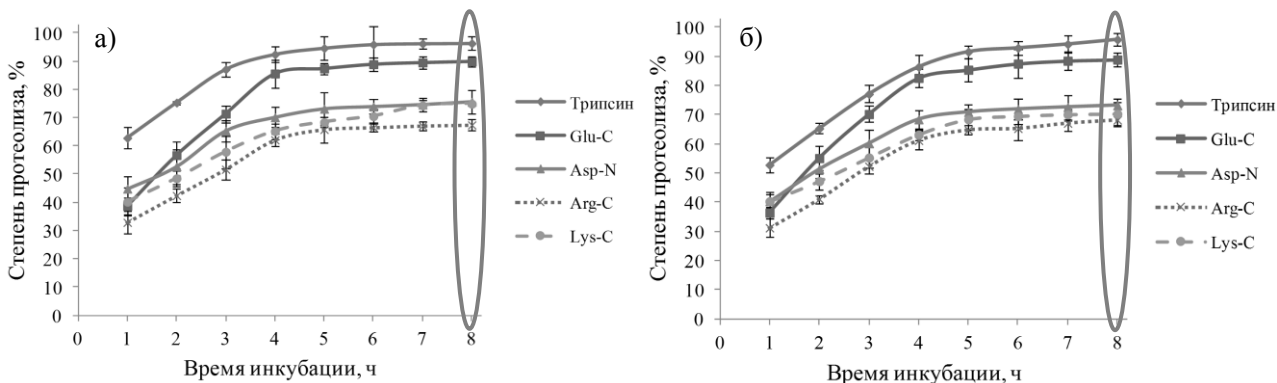
**Рис. 4.** График зависимостей степени протеолиза РИЧ от температуры инкубации (а – стандартный раствор, б – лекарственное средство «Актрапид НМ»).



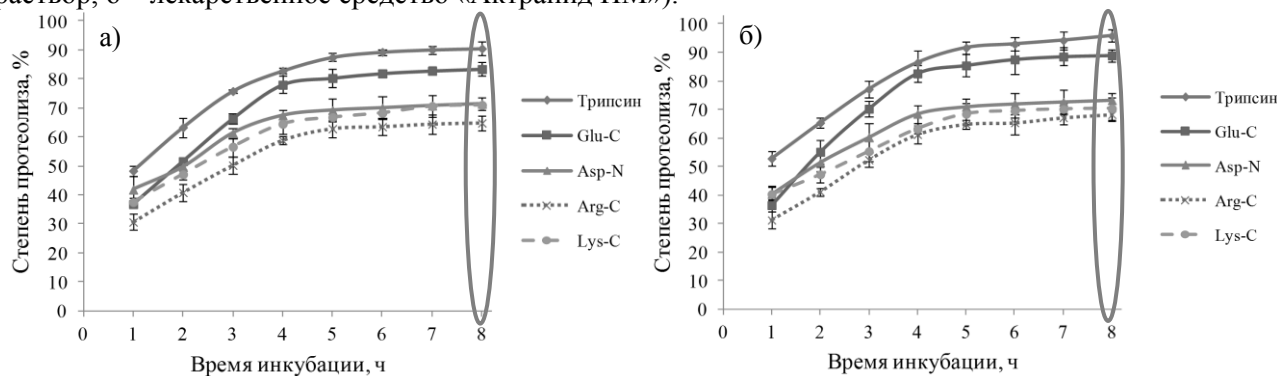
**Рис. 5.** График зависимостей степени протеолиза РСГ от температуры инкубации (а – стандартный раствор, б – лекарственное средство «Растан»).

Из экспериментальных данных следует, что температурный оптимум ферментативного расщепления исследуемых анализов совпадает для исследуемых протеаз и находится в интервале от 40 до 45 °С. Полученные результаты отличаются от описанных в литературе условий, где оптимальными являются 37-38 °С. Возможно, наличие стабилизаторов в готовых формах лекарственных средств, препятствующих реакциям деградации действующего вещества, приводит к необходимости повышения температуры реакции ферментативного расщепления.

На рисунках 6 и 7 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартных растворов и лекарственных средств РИЧ и РСГ различными протеазами в зависимости от времени инкубации. Анализ кинетических кривых показывал, что наиболее интенсивно расщепление исследуемых анализов протекает в первые 6 ч, затем степень протеолиза меняется незначительно и достигает максимума при инкубации в течение 8 ч для всех изученных протеаз. Полученные результаты отличаются от описанных в литературе условий, где протеолиз длится в течение 2-4 ч. Вероятнее всего, это также можно объяснить присутствием стабилизаторов в готовых формах лекарственных средств, что приводит к увеличению продолжительности реакции ферментативного расщепления.

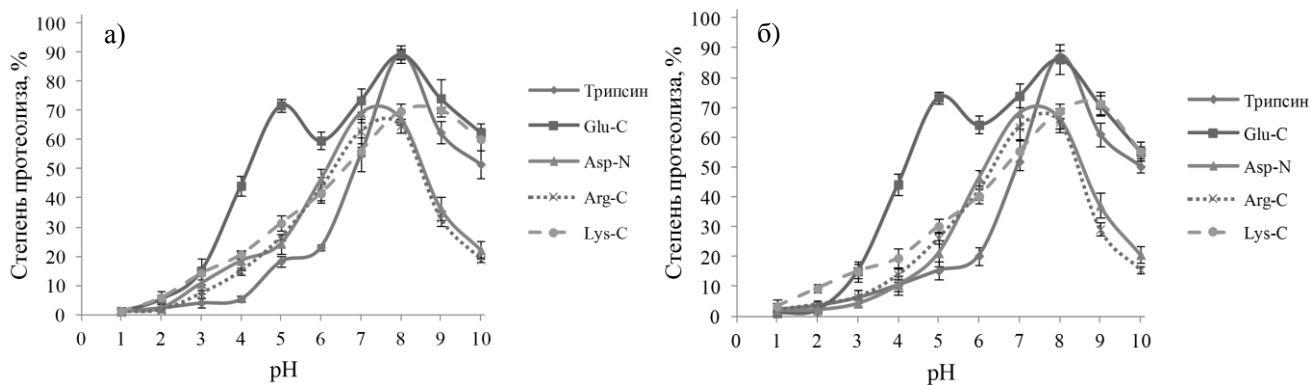


**Рис. 6.** График зависимости степени протеолиза РИЧ от времени инкубации (а – стандартный раствор, б – лекарственное средство «Актрапид НМ»).

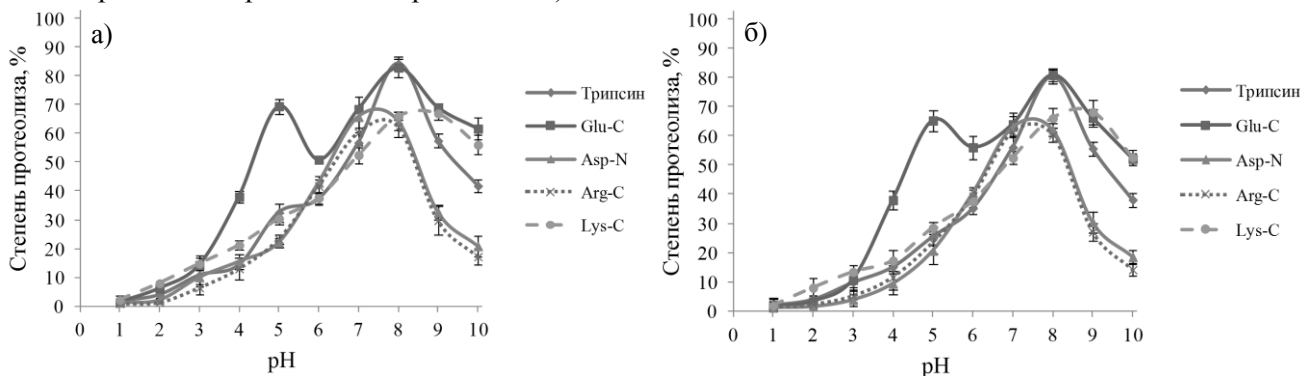


**Рис. 7.** График зависимости степени протеолиза РСГ от времени инкубации (а – стандартный раствор, б – лекарственное средство «Растан»).

На рисунках 8 и 9 представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления стандартных растворов и лекарственных средств РИЧ и РСГ различными протеазами в зависимости от рН среды в стандартных растворах и лекарственных средствах.



**Рис. 8.** График зависимости степени протеолиза РИЧ от рН среды (а – стандартный раствор, б – лекарственное средство «Актрапид НМ»).



**Рис. 9.** График зависимости степени протеолиза РСГ от рН среды (а – стандартный раствор, б – лекарственное средство «Растан»).

Из полученных данных следует, что максимальное расщепление исследуемых лекарственных средств достигается в интервале 7,0-8,0 для Asp-N и Arg-C, 8,0-9,0 для Lys-C, в

области значений рН ~ 8,0 для трипсина и Glu-C, причем последний фермент имеет еще одну точку максимума в области 5,0 рН. Полученные результаты соответствуют описанным в литературе условиям проведения ферментативного расщепления для таких протеаз как Lys-C, Asp-N, Arg-C и трипсин. Исключение составляет эндопротеаза Glu-C для которой рекомендуемое значение рН среды составляет 4,0. Таким образом, в ходе выполненных экспериментальных исследований были выбраны условия ферментативного расщепления действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой природы (табл. 2).

**Таблица 2.** Условия подготовки проб лекарственных средств с использованием ферментативного расщепления

Фермент	Соотношение фермент : субстрат	Температура, °С	Время, ч	рН среды
Трипсин	1 : 50	40–45	6	~ 8,0
Glu-C	1 : 50	40–45	6	~ 8,0
Asp-N	1 : 50	40–45	6	7,0–8,0
Lys-C	1 : 50	40–45	6	8,0–9,0
Arg-C	1 : 50	40–45	6	7,0–8,0

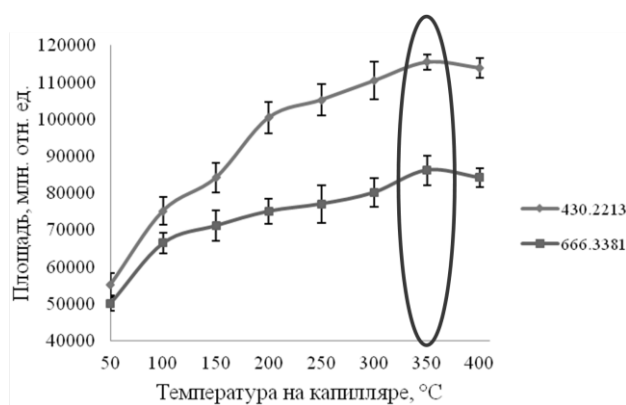
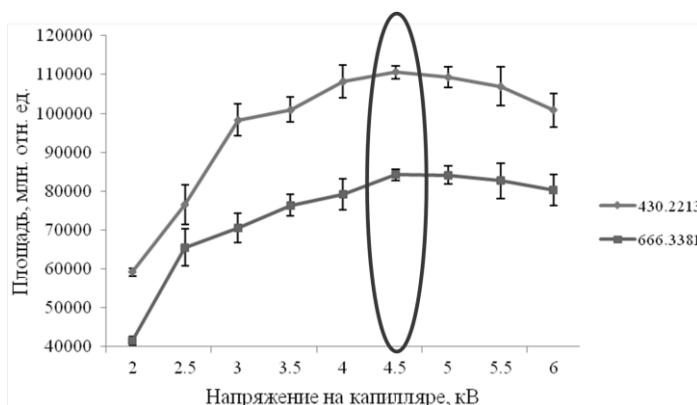
Сравнение с литературными данными позволяет сделать вывод о том, что для увеличения полноты ферментативного расщепления готовых форм лекарственных средств пептидной и белковой природы требуется повышение температуры с 37 до 40-45 °С, увеличение продолжительности реакции ферментативного расщепления с 2-4 до 6 ч. При этом соотношения фермент : субстрат соответствуют литературным данным, а рН среды отличается от стандартной величины лишь для эндопротеиназы Glu-C. Таким образом, установлена способность вспомогательных компонентов готовых форм лекарственных средств, предположительно, стабилизаторов, замедлять процессы ферментативного расщепления действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой природы.

Для повышения производительности и достоверности контроля подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы представляется целесообразным использовать алгоритм интеллектуального управления измерениями, позволяющий в изменяющихся условиях анализа автоматически выбирать ион для фрагментации.

Для успешного применения данного алгоритма необходимо получить интенсивные сигналы ионов-предшественников исследуемых соединений для их дальнейшей фрагментации. На интенсивность сигнала влияют такие параметры источника ионизации как потенциал, прикладываемый к капилляру и температура капилляра. Оценку изменений вышеуказанных параметров проводили на примере РИЧ для масс-спектрометра с орбитальной ионной ловушкой QExactive. Были выбраны два характеристичных иона для оценки, полученных после расщепления трипсином: GFFYTPK  $[M+2H]^{2+}$  с  $m/z$  430,2213 и FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK  $[M+3H]^{3+}$  с  $m/z$  666,3381. Критерием выбора оптимальных значений является максимальная интенсивность выбранных ионов в масс-спектре.

Для установления оптимального значения потенциала на капилляре сравнивали площади пиков соответствующих ионов при значении напряжения от 2 до 6 кВ с шагом в 0,5 кВ (рис. 10). Для установления оптимального значения температуры капилляра сравнивали

площади соответствующих ионов РИЧ при значениях оптимизируемого параметра от 50 до 400 °С с шагом в 50 °С (рис. 11).



**Рис. 10.** Зависимость площадей пиков ионов с массами 430,2213 и 666,3381 от потенциала на капилляре источника электрораспыления.

**Рис. 11.** Зависимость площадей пиков ионов с массами 430,2213 и 666,3381 от температуры капилляра.

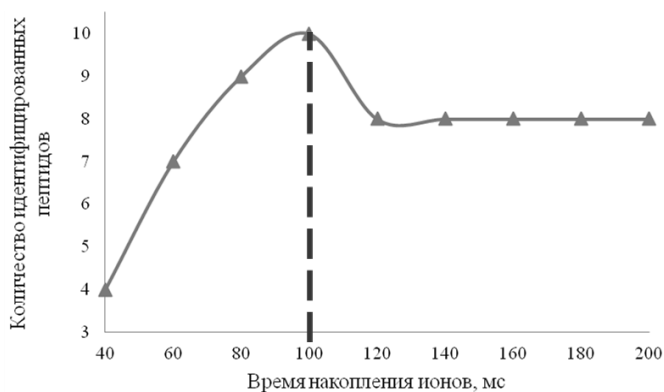
Из полученных результатов видно, что с увеличением потенциала на капилляре возрастает интенсивность сигнала за счет увеличения количества ионов в источнике. Значение напряжения, при котором интенсивность сигнала максимальна, составляет 4,5 кВ. Это соответствует рекомендуемому диапазону величин данного параметра для масс-спектрометрического анализа высокомолекулярных соединений – 3-6 кВ. При напряжении на капилляре выше 5 кВ интенсивность выбранных ионов в масс-спектре снижается вследствие их фрагментации. При используемом в работе потоке подвижной фазы  $0,5 \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$  оптимальное значение температуры капилляра составляет 350 °С. При температуре 400 °С интенсивность выбранных ионов РИЧ снижается вследствие их деструкции.

Для получения в автоматическом режиме информативных масс-спектров фрагментных ионов необходимо оценить влияние параметров работы масс-спектрометра: энергии диссоциации, диапазона детектируемых зарядовых состояний, времени накопления ионов в ловушке, ширины изоляции масс, длительности динамического исключения, количества ионов в орбитальной ионной ловушке, диапазона сканирования детектируемых ионов.

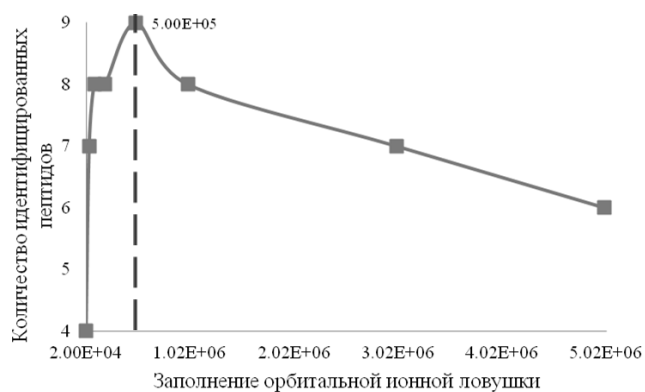
Для получения масс-спектров фрагментных ионов использовали профилирование энергии столкновений для HCD фрагментации со значением  $(30 \pm 15) \%$ . Таким образом, результирующий спектр содержит как ионы-предшественники, так и мелкие фрагменты, следовательно будет более информативен для автоматической обработки специализированным программным обеспечением. Диапазон детектируемых зарядовых состояний в автоматическом режиме устанавливали от 2 до 6. Однозарядные ионы не использовали для МС/МС экспериментов, поскольку эти спектры, в основном, принадлежали матрице. Полученные в ходе протеолиза короткие однозарядные пептиды не влияют на степень установления аминокислотной последовательности, поскольку для идентификации белков по базам данных требуются пептиды, состоящие минимум из 6-7 аминокислот.

Для оценки влияния времени накопления ионов в орбитальной ионной ловушке на количество идентифицированных пептидов сравнивали число идентифицированных пептидов при значениях оптимизируемого параметра от 40 до 200 с шагом в 20 мс (рис. 12). При исследовании влияния количества ионов в орбитальной ионной ловушке на количество

идентифицированных пептидов сравнивали число идентифицированных пептидов при вариации значений данного параметра от  $2 \times 10^4$  до  $5 \times 10^6$  (рис. 13).



**Рис. 12.** Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от времени накопления ионов в орбитальной ионной ловушке.



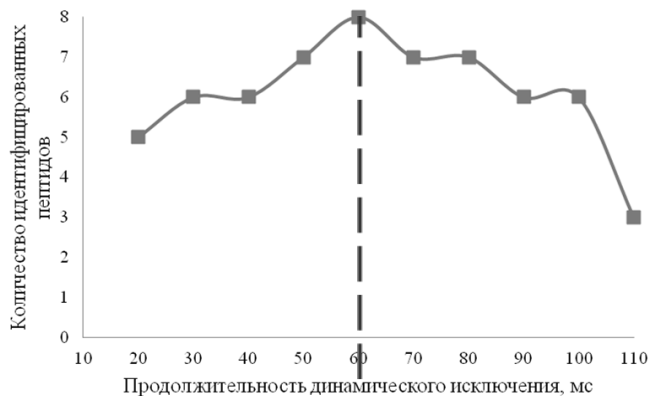
**Рис. 13.** Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от количества ионов в орбитальной ионной ловушке.

Из полученных результатов следует, что максимальное число идентификаций достигается при 100 мс накопления ионов и значении количества ионов в орбитальной ионной ловушке  $5 \times 10^5$ . Важно отметить, что количество и время накопления ионов в орбитальной ионной ловушке не являются независимыми параметрами. Получением масс-спектров второго порядка в автоматическом режиме будет управлять параметр, заданное значение которого достигается в первую очередь, т.е. если накопление установленного количества ионов в орбитальной ионной ловушке занимает больше заданного времени накопления ионов, то измерениями будет управлять второй параметр, а если меньше – первый.

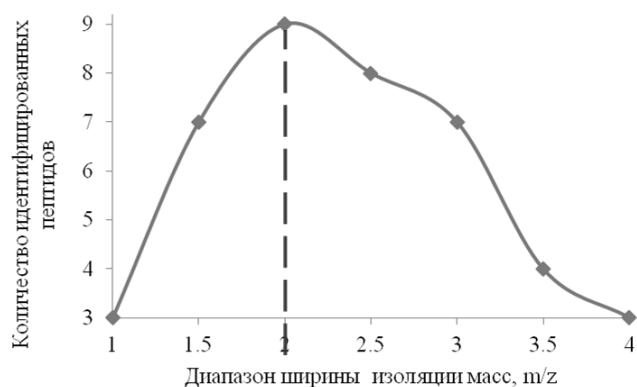
Величина минимального сигнала иона-предшественника автоматически выбирается программным обеспечением Xcalibur 2.2 в зависимости от установленного параметра количества ионов в орбитальной ионной ловушке. При низких минимальных значениях данного параметра масс-спектр вторичных ионов включает очень много информации, что может привести к значительным нагрузкам на вычислительную систему, а при высоких значениях данного параметра не будут получены масс-спектры вторичных ионов пептидов с небольшими интенсивностями ионов-предшественников и, следовательно, степень идентификации аминокислотной последовательности снизится.

Продолжительность динамического исключения является еще одним параметром алгоритма интеллектуального управления измерениями. При его использовании фрагментированный ион помещается в список исключений и не подвергается повторной фрагментации в течение определенного времени. Для оптимизации длительности динамического исключения сравнивали количество идентифицированных пептидов при значениях от 20 до 110 мс с шагом в 10 мс (рис. 14). Для изоляции ионов-предшественников в режиме интеллектуального управления измерениями был использован параметр диапазон ширины изоляции масс. С целью оптимизации данного параметра сравнивали количество идентифицированных пептидов при значениях от 1 до 4 шагом в 0,5 m/z (рис. 15).





**Рис. 14.** Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от значения продолжительности динамического исключения.

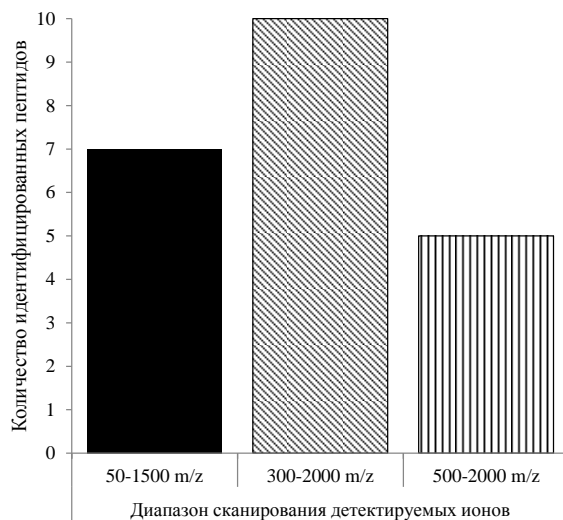


**Рис. 15.** Зависимость количества идентифицированных пептидов РИЧ от диапазона ширины изоляции масс.

Полученные результаты показали, что максимальное число идентификаций достигается при продолжительности динамического исключения 60 мс. Для масс-спектрометров с орбитальной ионной ловушкой максимальное число исключений ионов составляет 500. Установка узкого диапазона ширины изоляции масс приводит к снижению чувствительности вследствие потери информативных ионов, а широкий диапазон изоляции масс может привести к совместной изоляции и со-фрагментации соседних пептидов, что отрицательно сказывается на степени идентификации аминокислотной последовательности. При ширине изоляции масс в 2,0 m/z количество идентифицированных пептидов максимально.

При использовании интеллектуального управления измерениями была задействована опция, при которой для фрагментации отбирается моноизотопный пик из общего кластера изотопного распределения. Применение данного параметра значительно влияет на полноту покрытия аминокислотной последовательности.

Для установления влияния значения диапазона сканирования детектируемых ионов сравнивали количество идентифицированных пептидов при значениях диапазонов масс детектируемых ионов 50-1500, 300-2000 и 500-2000 m/z (рис. 16).



**Рис. 16.** Зависимость количества идентифицированных пептидов от диапазона сканирования детектируемых ионов для РИЧ.

Основываясь на полученных результатах можно сделать вывод, что при диапазоне регистрации масс детектируемых ионов 300-2000 m/z идентифицируется наибольшее количество пептидов, поскольку данный интервал позволяет детектировать короткие пептиды, но при этом не перегружен масс-спектрами вторичных ионов матрицы.

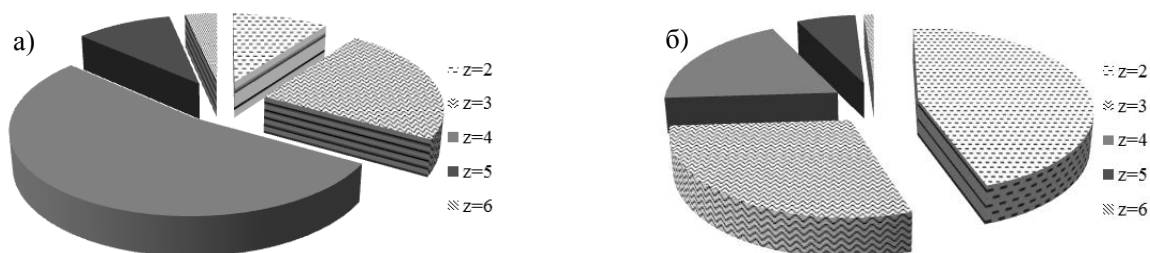
Для регистрации спектров многозарядных ионов масс-спектрометр должен обладать достаточной разрешающей способностью. В связи с этим измерения выполняли при высоком разрешении (35 000), что позволяет определять соотношения массы к заряду с точностью менее 5 ppm и тем самым различать аминокислоты и их модификации с одинаковыми целочисленными массами.

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных исследований были выбраны параметры масс-спектрометрического детектирования высокого разрешения при использовании алгоритма интеллектуального управления измерениями (табл. 3).

**Таблица 3.** Параметры тандемного масс-спектрометрического детектирования с использованием режима интеллектуального управления измерениями

Наименование параметра	Значение
Тип источника ионизации	Электростатическое распыление
Напряжение на капилляре распылителя	4,5 кВ
Температура капилляра	350 °С
Тип ячейки соударительной диссоциации	Ячейка высокоэнергетической соударительной диссоциации
Энергия диссоциации	(30 ± 15) %
Детектируемое зарядовое состояние	2-5
Количество ионов в орбитальной ионной ловушке	$5 \times 10^5$
Время накопления ионов	100 мс
Продолжительность динамического исключения	60 мс
Фильтр масс для изоляции прекурсоров	Квадрупольный фильтр масс
Ширина изоляции масс	2,0 m/z
Прекурсор	Моноизотопный пик из общего изотопного распределения
Диапазон детектируемых масс	300-2000 m/z
Масс-спектральное разрешение	35 000

Влияние выбранных параметров режима интеллектуального управления измерениями на интенсивность аналитических сигналов исследовали на примере раствора РСГ после обработки трипсином. На основании значений площадей хроматографических пиков, построенных по выделенным ионам, выявлено, что наибольшая интенсивность характерна для немодифицированных коротких пептидов, в масс-спектре которых пик с максимальной интенсивностью является двухзарядным. Для РИЧ наблюдается аналогичная зависимость. Однако соотношение количества получаемых ионов в различных зарядовых состояниях для РИЧ и РСГ после ферментативного расщепления трипсином при выбранных условиях анализа оказалось различным. На рис. 17 приведены соответствующие круговые диаграммы.



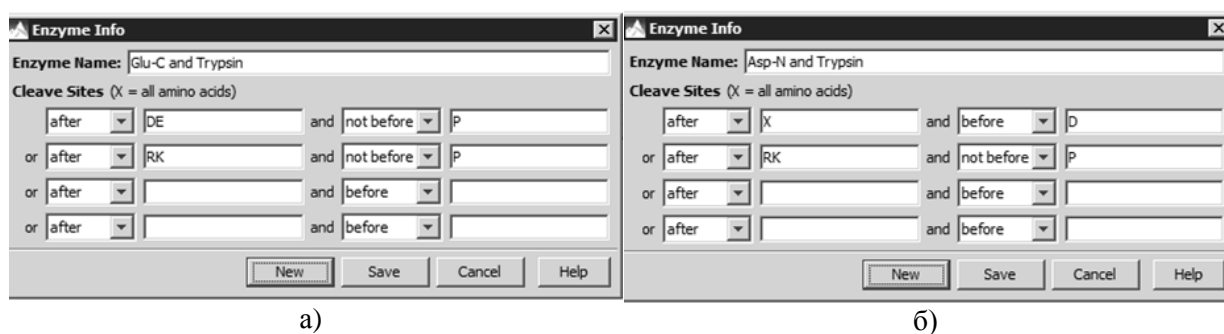
**Рис. 17.** Круговые диаграммы, показывающие распределение количества ионов по их зарядовым состояниям (а - для рекомбинантного инсулина человека, б – рекомбинантного соматотропного гормона человека)

Анализ данных, представленных на рис. 18, показывает, что для РИЧ характерно образование ионов в зарядовом состоянии +4, а для РСГ +2. Это связано с действием трипсина,

после обработки которым рекомбинантного соматотропного гормона получают более короткие пептиды. Из вышесказанного можно сделать вывод, что количество получаемых ионов в различных зарядовых состояниях не зависит от условий масс-спектрометрического анализа и обусловлено, аминокислотной последовательностью аналита и применяемым ферментом.

Выбранные условия масс-спектрометрического детектирования с использованием режима интеллектуального управления измерениями также использовались на приборах Orbitrap Fusion, Agilent Q-TOF и Shimadzu IT-TOF. С использованием выбранных параметров были проанализированы трипсинолизаты препарата рекомбинантного инсулина человека на масс-спектрометрах разных типов. Степень покрытия аминокислотной последовательности для всех приборов составила 100 %. Данный факт свидетельствует о подходящих значениях выбранных параметров и принципиальной возможности автоматизации процесса масс-спектрометрического анализа лекарственных средств пептидной и белковой природы.

Для подтверждения аминокислотной последовательности действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой природы было выбрано программное обеспечение PEAKS Studio 7.0 («Bioinformatics Solutions Inc.», Канада), поскольку точность и чувствительность алгоритмов SPIDER в PEAKS обеспечивается встроенной статистической проверкой и фильтрацией результатов. Данный программный комплекс располагает достаточным набором ферментов для указания параметров идентификации и предусматривает возможность создания различных комбинаций пользователем. Согласно представленному ранее алгоритму использовали сочетание таких протеаз как Glu-C и трипсин, а также Asp-N и трипсин. Данные пары были добавлены в базу данных ферментов (рис. 18).



**Рис. 18.** Созданные комбинации используемых ферментов (а – Glu-C и трипсин, б – Asp-N и трипсин).

С целью сокращения времени обработки масс-спектрометрических данных создали базу аминокислотных последовательностей действующих веществ ЛС пептидной и белковой природы в формате .fasta (рис. 19). В нее вошли аминокислотные последовательности рекомбинантного инсулина человека, инсулина аспарт, инсулина лизпро, инсулина гларгин, инсулина глулизин, инсулина детемир, рекомбинантного соматотропного гормона, орексина А и тимозина бета.

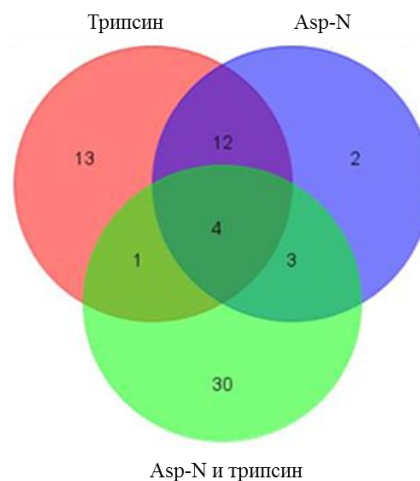
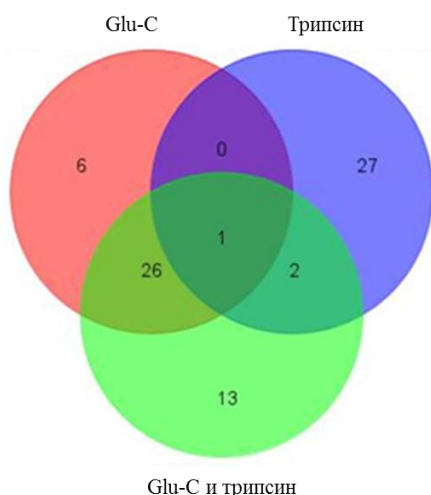
```

>insulin_human
GIVEQCCTSICSLYQLENYCNFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
>insulin_aspart
GIVEQCCTSICSLYQLENYCNFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT
>insulin_lispro
GIVEQCCTSICSLYQLENYCNFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT
>insulin_glargine
GIVEQCCTSICSLYQLENYCGFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR
>insulin_glulisine
GIVEQCCTSICSLYQLENYCNFVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPET
>insulin_detemir
GIVEQCCTSICSLYQLENYCNFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKP
>somatotropin_human
FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPT
PSNREETQQKSNLELLRISLLLQSWLEPVQFLRSVFNLSVYGASDSNVYDLLKDLLEEG
IQTLMGRLLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKMMDKVEFLRIV
QCRSVEGSCGF
>Orexin_A
PEPLPDCCRQLTCSRLYELLHGAGNHAAGILTL
>timozin_beta
SDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPLPSKETIEQEKQAGES

```

**Рис. 19.** Созданная база данных аминокислотных последовательностей действующих веществ исследуемых лекарственных средств LekSredstva.fasta.

Использование нескольких протеаз, а также их комбинаций позволяет повысить достоверность идентификации аминокислотной последовательности благодаря увеличению количества различных пептидов. На рис. 20 и 21 представлены диаграммы Эйлера-Венна, показывающие количество идентифицированных пептидов для стандартного раствора инсулина лизпро после обработки ферментом Glu-C, трипсином, а также их комбинации и Asp-N, трипсином, а также их комбинации, соответственно.

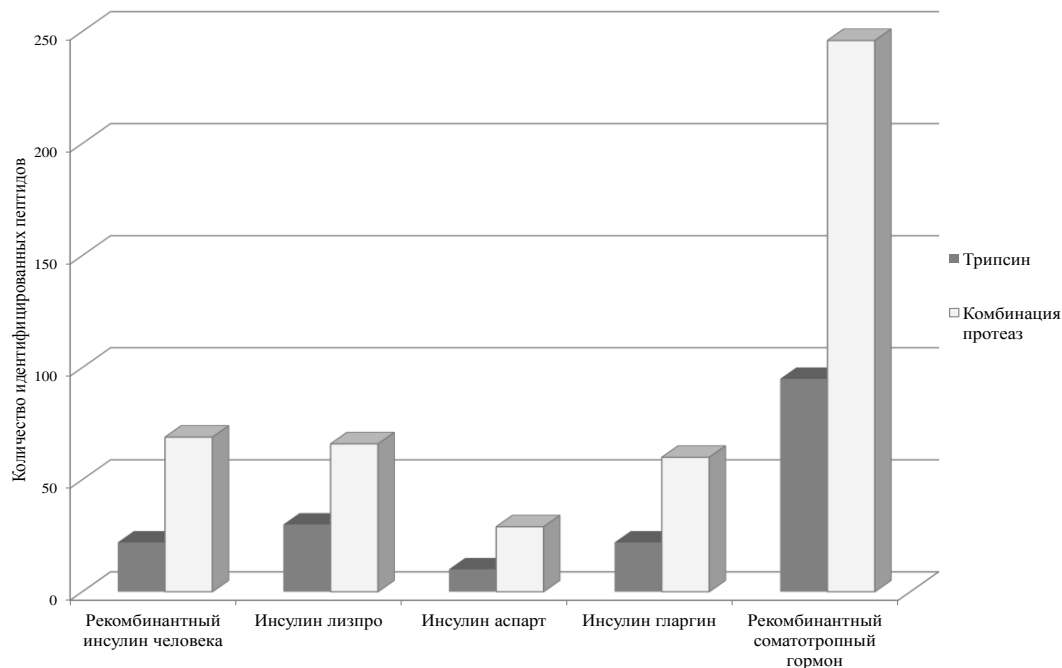


**Рис. 20.** Диаграмма, показывающая число идентифицированных пептидов при использовании фермента Glu-C, трипсина и их совместного использования.

**Рис. 21.** Диаграмма, показывающая число идентифицированных пептидов при использовании фермента Asp-N, трипсина и их совместного использования.

Из представленных данных следует, что при обработке инсулина лизпро эндопротеазой Glu-C идентифицировано 33 пептида, трипсином – 30 и их комбинации – 42. При этом сочетание двух протеаз дает 13 уникальных пептидов, а использование Glu-C и трипсина по отдельности – 6 и 27 соответственно. При обработке эндопротеазой Asp-N идентифицирован 21 пептид, трипсином 30 и их комбинации – 38. При этом сочетание двух протеаз дает 30 уникальных пептидов, а использование Asp-N и трипсина по отдельности 2 и 13 соответственно. Таким образом целесообразно использовать вышеуказанные ферменты как в индивидуальном состоянии, так и в комбинации. На рис. 22 показано количество идентифицированных пептидов, обнаруженных для стандартных растворов рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина гларгин и рекомбинантного

соматотропного гормона человека после обработки пятью использованными протеазами и их комбинациями в сравнении со стандартной методикой применения только трипсина.



**Рис. 22.** Диаграмма, показывающая количество идентифицированных пептидов при использовании отдельных протеаз и их комбинаций.

Приведенные результаты позволяют сделать вывод о преимуществе использования пяти протеаз и их комбинаций, поскольку количество идентифицированных пептидов в среднем в 2,7 раз больше, чем при применении стандартной методики с трипсином.

**Четвертая глава** посвящена апробации разработанного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы на действующих веществах ЛС с различной длиной пептидной цепи. Для апробации разработанного подхода установления подлинности лекарственных средств было закуплено 17 препаратов, действующим веществом которых является инсулин: 5 препаратов рекомбинантного инсулина человека, 2 препарата инсулина глулизин, 2 препарата инсулина гларгин, 2 препарата инсулина лизпро, 4 препарата инсулина аспарт, 2 препарата инсулина детемир; 4 препарата, действующим веществом которых является РСГ; 2 биологически активных добавки для улучшения функционального состояния поджелудочной железы и сердечно-сосудистой системы; препарат «Тимозин бета» и субстанции «Орексин А» и инсулина лизпро различных производителей и различных партий.

**Препараты инсулина.** На первом этапе исследований с использованием спектрофотометрического метода было установлено, что все образцы содержат вещества с пептидной связью. Затем для указанных ЛС рассчитали молекулярную массу с использованием формулы (2) (для пика изотопа с наименьшим значением соотношения массы к заряду в кластере изотопов многозарядного иона) по масс-спектральным характеристикам представленных образцов для зарядовых состояний 4, 5 и 6. Экспериментальные значения моноизотопных молекулярных масс усредняли и сравнивали с теоретическими. Полученные результаты представлены в табл. 4. Из полученных данных следует, что определенные моноизотопные молекулярные массы для рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина глулизин, инсулина гларгин, инсулина аспарт и инсулина детемир,

соответствуют заявленной производителем моноизотопной молекулярной массе, а величины ошибок их определения не превышают 0,03 Да.

**Таблица 4.** Экспериментальные значения моноизотопных молекулярных масс исследуемых ЛС на основе инсулина

Название ЛС	Действующее вещество	$M_c$ , Да	$M_{it}$ , Да	$\Delta$ , Да
Инсуман Рапид ГТ	Рекомбинантный инсулин человека	5803,67	5803,64	0,03
Хумулин Регуляр		5803,67		0,03
Актрапид		5803,66		0,02
Ринсулин Р		5803,67		0,03
Биосулин Р		5803,66		0,02
Хумалог	Инсулин лизпро	5803,65	5803,64	0,01
Хумалог Микс 25		5803,66		0,02
Апидра Солостар	Инсулин глулизин	5818,67	5818,64	0,03
Апидра		5818,66		0,02
Лантус Солостар	Инсулин гларгин	6058,84	6058,82	0,02
Лантус		6058,85		0,03
Новомикс Пенфилл	Инсулин аспарт	5821,62	5821,61	0,01
Новомикс ФлексПен		5821,64		0,03
Новорапид Пенфилл		5821,63		0,02
Новорапид ФлексПен		5821,63		0,02
Левемир ФлексПен	Инсулин детемир	5912,80	5912,79	0,01
Левемир Пенфилл		5912,81		0,02

$M_c$  – молекулярная масса, усредненная по трем рассчитанным значениям;  
 $M_{it}$  – теоретическая моноизотопная молекулярная масса.

Далее с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 7.0 устанавливали аминокислотную последовательность исследуемых ЛС. Для всех препаратов достигнуто 100 % степень идентификации аминокислотной последовательности. Результаты представлены в таблице 5.

**Таблица 5.** Результаты обработки данных анализа ЛС на основе инсулина человека

Наименование соединения	Покрытие (%)	Идентифицировано пептидов	Идентифицировано уникальных пептидов
Рекомбинантный инсулин человека	100	69	37
Инсулин лизпро	100	66	36
Инсулин аспарт	100	29	18
Инсулин гларгин	100	60	31
Инсулин глулизин	100	51	28
Инсулин детемир	100	70	36

Препараты рекомбинантного соматотропного гормона. На первом этапе исследований с использованием спектрофотометрического метода было установлено, что все образцы содержат вещества белковой природы. Затем рассчитывали молекулярную массу с использованием формулы (2) (для пика изотопа с наименьшим значением соотношения массы к заряду в кластере изотопов многозарядного иона) по масс-спектральным характеристикам представленных образцов для зарядовых состояний 13, 14 и 15. Экспериментальные значения моноизотопных молекулярных масс усредняли и сравнивали с теоретическими. Полученные результаты представлены в табл. 6. Из полученных данных следует, что определенные моноизотопные молекулярные массы для РСГ соответствуют заявленным производителями

моноизотопным молекулярным массам, а величина ошибки ее определения не превышает 0,03 Да.

**Таблица 6.** Экспериментальные значения моноизотопных молекулярных масс исследуемых ЛС на основе рекомбинантного соматотропного гормона

Название ЛС	Действующее вещество	M <sub>c</sub> , Да	M <sub>т</sub> , Да	Δ, Да
Растан	Рекомбинантный соматотропный гормон человека	22115,76	22115,79	0,03
Генотропин		22115,77		0,02
Джинтропин		22115,76		0,03
Сайзен		22115,78		0,01

M<sub>c</sub> – молекулярная масса, усредненная по трем рассчитанным значениям;  
M<sub>т</sub> – теоретическая моноизотопная молекулярная масса.

Далее с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 7.0 устанавливали аминокислотную последовательность исследуемых ЛС. Для всех препаратов достигнуто 100 % идентификации аминокислотной последовательности. Результаты представлены в табл. 7.

**Таблица 7.** Результаты обработки данных анализа ЛС на основе рекомбинантного соматотропного гормона человека

Наименование соединения	Покрытие (%)	Идентифицировано пептидов	Идентифицировано уникальных пептидов
РСГ	100	246	150

Фальсифицированные лекарственные средства и субстанции. На стадии оценки наличия соединений пептидной и белковой природы спектрофотометрическим методом были выявлены два фальсификата биологически активных добавок для улучшения функционального состояния поджелудочной железы и сердечнососудистой системы.

На стадии установления соответствия теоретической и экспериментальной моноизотопных молекулярных масс действующего вещества ЛС методом масс-спектрометрии высокого разрешения были выявлены фальсификаты субстанции «Орексин А» и препарата «Тимозин бета».

Полученные экспериментальные данные показали, что субстанция «Орексин А» не обладает высокой степенью очистки. Методом масс-спектрометрии высокого разрешения было установлено наличие в субстанции действующего компонента и четырех примесей пептидной природы. Результаты представлены в таблице 8.

**Таблица 8.** Результаты экспериментальных исследований субстанции «Орексин А»

№ пика	RT	Содержание, %	M <sub>c</sub> , Да
1	7,04	27,6	1959,111
2	7,65	10,1	3672,758
3	7,83	10,4	3615,736
4	8,79	44,7	3558,718
5	11,17	7,20	2211,190

В работе не проводили идентификацию данных примесей, но можно предположить, что они являются продуктами деградации заявленного пептида вследствие нарушения условий хранения и модифицированными производными действующего вещества.

Исследуемый препарат «Тимозин бета» содержал три пика со сходными хроматографическими характеристиками, что свидетельствует о незначительных различиях в аминокислотных последовательностях данных соединений. Методом масс-спектрометрии

высокого разрешения было установлено наличие в субстанции действующего компонента и двух примесей. Результаты представлены в таблице 9.

**Таблица 9.** Результаты экспериментальных исследований препарата «Тимозин бета»

№ пика	RT	Содержание, %	Мс, Да
1	4,08	4,4	4918,485
2	4,27	88,0	4960,498
3	4,55	7,6	5002,505

Из данных таблицы 9 следует, что пик со временем выхода 4,08 мин соответствует действующему веществу препарата «Тимозин бета». Экспериментальная моноизотопная молекулярная масса второго пика больше теоретической на 42,01 Да, а разница между пиками со временами выхода 4,27 и 4,55 мин также составляет 42,01 Да. На основании полученных результатов можно предположить о модификации аминокислотной последовательности, а именно об ацилировании. Для доказательства присутствия предполагаемой модификации в аминокислотной последовательности проводили ферментативное расщепление с использованием пяти протеаз и их комбинаций с дальнейшим масс-спектрометрическим секвенированием основного пика при применении алгоритма интеллектуального управления измерениями. Полученные результаты доказывают ацилирование остатка серина в первом положении. Соединение со временем выхода 4,55 мин, вероятнее всего, является диацилированным производным действующего вещества препарата «Тимозин бета».

На стадии установления соответствия теоретической и экспериментальной аминокислотной последовательности действующего вещества ЛС методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения с предварительной обработкой пятью специфическими ферментами и их комбинациями был выявлен фальсификат субстанции инсулин лизпро. Степень покрытия 100 % соответствовала рекомбинантному инсулину человека, а для инсулина лизпро она составила 96 %. Кроме того, присутствие пролина и лизина в положениях 28 и 29 Б-цепи, соответственно, подтверждается 29 пептидами.

На основании полученных результатов разработаны, аттестованы и внесены в область аккредитации ФГУП «НЦ «Сигнал» методики идентификации рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина гларгин и рекомбинантного соматотропного гормона человека в лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием, что подтверждается свидетельствами об аттестации. Предложенный способ установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы используется в ФГУП «НЦ «Сигнал», что подтверждается актом внедрения. С использованием указанного способа проанализировано более 300 образцов лекарственных препаратов различных видов, серий и производителей.



## ВЫВОДЫ

1. Предложен унифицированный способ установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, включающий последовательно выполняемые:

а) предварительную проверку на присутствие в ЛС действующих веществ пептидной или белковой природы;

б) проверку соответствия моноизотопной молекулярной массы, определенной методом масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением, теоретическому значению;

в) проверку соответствия полной аминокислотной последовательности для действующих веществ с использованием пяти специфических ферментов (Asp-N, Arg-C, Glu-C, Lys-C, трипсин) и их комбинаций (Glu-C и трипсин, Asp-N и трипсин); тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением при атмосферном давлении в режиме интеллектуального управления измерениями при применении двух подходов к анализу аминокислотной последовательности исследуемых соединений («снизу вверх» и «с середины вниз»).

2. Разработан способ подготовки проб лекарственных средств для идентификации аминокислотной последовательности методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием пяти протеаз (Asp-N, Arg-C, Glu-C, Lys-C, трипсин) и их комбинаций (Glu-C и трипсин и Asp-N и трипсин). Показано увеличение количества специфических пептидов в среднем в 2,7 раза при использовании предложенного набора протеаз и их комбинаций по сравнению с принятой методикой трипсинолиза. Выявлено, что вспомогательные компоненты готовых форм лекарственных средств способны замедлять процессы ферментативного расщепления действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой природы. Установлено, что для увеличения полноты ферментативного расщепления готовых форм лекарственных средств пептидной и белковой природы требуется повышение температуры с 37 до 40-45 °С, увеличение продолжительности реакции ферментативного расщепления с 2-4 до 6 ч.

3. Оптимизированы параметры масс-спектрометрического детектирования при использовании алгоритма интеллектуального управления измерениями. Проведена сравнительная оценка влияния параметров работы масс-спектрометра на количество идентифицированных пептидов. Установлено, что при значениях энергии диссоциации ( $30 \pm 15$ ) %, диапазона детектируемых зарядов состояний 2-6, времени накопления ионов в ловушке 100 мс, ширины изоляции масс 2 m/z, длительности динамического исключения 60 мс, количества ионов в орбитальной ионной ловушке  $5 \times 10^5$ , диапазона сканирования детектируемых ионов 300-2000 m/z достигается 100 % степень идентификации аминокислотной последовательности действующих веществ ЛС. Показано, что выбранные условия применимы для масс-спектрометров разных типов. Данный факт свидетельствует о принципиальной возможности автоматизации процесса масс-спектрометрического анализа лекарственных средств пептидной и белковой природы.

4. Разработанный способ апробирован при контроле качества лекарственных средств на основе рекомбинантного инсулина человека, инсулина лизпро, инсулина аспарт, инсулина

гларгин, инсулина глулизин, инсулина детемир, рекомбинантного соматотропного гормона человека, тимозина бета и субстанций орексина А и инсулина лизпро. Показана универсальность данного способа для исследованных препаратов. С использованием указанного подхода проанализировано более 300 образцов лекарственных препаратов различных видов, серий и производителей. В результате проведенных исследований разработаны, аттестованы и внесены в область аккредитации ФГУП «НЦ «Сигнал» пять методик идентификации действующих веществ лекарственных средств белковой и пептидной природы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием, что подтверждается свидетельствами об аттестации.

Автор выражает искреннюю благодарность руководству Федерального государственного унитарного предприятия «Научный центр «Сигнал», а также сотрудникам первого научно-исследовательского отдела за помощь при проведении исследований и поддержку в работе над диссертацией.

### **Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:**

1. Беризовская Е.И., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Митрофанов Д.А., Аксенов А.В., Родин И.А., Шпигун О.А. Возможности масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением в определении моноизотопных молекулярных масс рекомбинантного инсулина человека и его аналогов // Масс-спектрометрия. 2014. Т. 11. № 4. С. 231-238

2. Беризовская Е.И., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Митрофанов Д.А., Аксенов А.В., Родин И.А., Шпигун О.А. Оптимизация процесса ферментативного расщепления лекарственных средств пептидной и белковой природы с применением специфических протеаз // Медлайн. 2014. Т. 15. С. 779-788.

3. Беризовская Е.И., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Митрофанов Д.А., Удинцев А.В., Аксенов А.В., Шевлякова О.А., Родин И.А., Шпигун О.А. Методы обработки масс-спектрометрических данных при идентификации пептидов и белков // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56, № 5. С. 266-278.

4. Беризовская Е.И., Максимов В.А., Васильев К.Ю., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Митрофанов Д.А., Удинцев А.В., Аксенов А.В., Родин И.А., Шпигун О.А. Использование тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения с интеллектуальным управлением измерениями для оценки подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2015. Т. 81. № 9. С. 5-12.

5. Беризовская Е.И., Шпигун О.А., Митрофанов Д.А., Таранченко В.Ф., Рябинин В.В., Гончаров В.М., Аксенов А.В., Родин И.А. Применение метода хромато-масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией для контроля подлинности лекарственных средств пептидной природы // Тезисы V Международной конференции-школы «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения», г. Санкт-Петербург, 14-18 июля 2013 г., С. 43.

6. Беризовская Е.И., Митрофанов Д.А., Аксенов А.В., Рябинин В.В., Таранченко В.Ф., Шпигун О.А., Родин И.А., Шевлякова О.А. Оптимизация условий ферментативного расщепления несколькими специфическими протеазами для контроля подлинности хорионического гонадотропина человека // Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы химической науки и фармации», Чебоксары, 3-4 апреля 2014 г. С. 138.

7. Беризовская Е.И., Шпигун О.А., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Митрофанов Д.А., Аксенов А.В., Родин И.А., Рябинин В.В., Гончаров В.М., Шевлякова О.А. Применение метода хромато-масс-спектрометрии для контроля подлинности лекарственных средств на основе рекомбинантного инсулина человека и его аналогов // Материалы IV Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии», Краснодар, 28 сентября – 04 октября 2014 г. С. 196.

8. Беризовская Е.И., Шпигун О.А., Васильев К.Ю., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Митрофанов Д.А., Аксенов А.В., Родин И.А. Применение метода тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения с интеллектуальным управлением измерениями для оценки подлинности лекарственных средств на основе рекомбинантного соматотропного гормона человека // Тезисы докладов Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии», Самара, 24-30 мая 2015 г., С. 217.