

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ФГБУ «Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»
Минздрава России,
доктор медицинских наук



Ю.В. ОЛЕФИР

« 02 12 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу
Беризовской Елены Игоревны
«Разработка унифицированного способа установления подлинности
лекарственных средств пептидной и белковой природы методом
масс-спектрометрии высокого разрешения», представленной на соискание
ученой степени кандидата химических наук по специальности
02.00.02 – Аналитическая химия

Актуальность темы исследования

В современном биотехнологическом производстве недостаточно разработанной является проблема оценки подлинности биологически активных компонентов. Определение аминокислотной последовательности рекомбинантных пептидов и белков, а также их модифицированных аналогов является необходимой процедурой при контроле качества готовых форм лекарственных средств на их основе. Поэтому исследование, направленное на установление подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии в

сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения, безусловно, является актуальным.

Таким образом, поставленная в работе Беризовской Е.И. тема диссертационного исследования является актуальной для науки и практики, а цель и задачи исследования очень важны и весьма своевременны для решения теоретических и практических вопросов установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, представленных на фармацевтическом рынке Российской Федерации.

Научная новизна

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнений и заключается в разработке унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, предусматривающего:

– 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).

Интересен способ подготовки проб лекарственных средств для идентификации аминокислотной последовательности методом ВЭЖХ-МС/МС, в котором соискатель предложил использование 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.

Представляют несомненный интерес полученные результаты оптимизации процесса ферментативного расщепления готовых форм лекарственных средств. 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 и увеличение продолжительности реакции ферментативного расщепления с 2-4 до 6 ч.

Для автоматизации процесса масс-спектрометрического детектирования предложено использование режима интеллектуального управления измерениями. Соискателем оптимизированы параметры тандемного масс-спектрометрического детектирования с ионизацией электрораспылением при атмосферном давлении в режиме интеллектуального управления измерениями. Установлено, что при значениях энергии диссоциации (30 ± 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 5×10^5 , диапазона сканирования детектируемых ионов 300-2000 m/z достигается 100 % степень идентификации аминокислотной последовательности действующих веществ лекарственных средств. 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.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена 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.

В обзоре литературы, представленном первой главой, кратко рассмотрены и обобщены известные данные о лекарственных средствах пептидной и белковой природы. Описаны 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, к ним даны пояснения, расшифровка формул расчета.

Третья глава посвящена алгоритму установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы. Представлены результаты использования метода Бредфорда для предварительной экспресс-индикации наличия соединений пептидной и белковой структуры в лекарственных препаратах; оценки соответствия теоретической и экспериментальной моноизотопной молекулярной массы действующего вещества лекарственного средства методом масс-спектрометрии высокого разрешения, установлено, что при этом величина ошибки составляет 0,01-0,03 Да. Определено влияние вспомогательных компонентов готовых форм лекарственных средств пептидной и белковой природы на полноту ферментативного расщепления путем выбора условий его проведения при вариации четырех параметров: рН среды, соотношение фермент: субстрат,

температура и время инкубации с ферментом. Сравнение с литературными данными позволило 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 и увеличение продолжительности реакции ферментативного расщепления с 2-4 до 6 ч. Оптимизированы параметры тандемного масс-спектрометрического детектирования высокого разрешения с ионизацией электрораспылением при атмосферном давлении в режиме интеллектуального управления измерениями.

Четвертая глава посвящена апробации разработанного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы на действующих веществах ЛС с различной длиной пептидной цепи. С использованием указанного способа проанализировано более 300 образцов лекарственных препаратов различных видов, серий и производителей. Выявлены две фальсифицированные биологически активных добавки к пище, один лекарственный препарат и две субстанции.

Результаты исследований сформулированы в виде выводов.

Структура работы имеет внутреннее единство, а представленный в диссертации фактический материал изложен логично, в доступной форме, в полной мере отражает основные этапы алгоритма оценки подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы и его апробацию на доступных препаратах.

Экспериментальная часть диссертационной работы и анализ литературных сведений по данной теме выполнены диссертантом самостоятельно.

Обоснованность положений диссертации, полученных в результате экспериментальных исследований, обусловлена выполнением данной работы на высоком методическом уровне с использованием комплекса химических, биохимических и инструментальных методов исследования.

Результаты собственных исследований убедительны и основаны на достаточном экспериментальном материале и не вызывают сомнений. Они представлены на четырех российских и международных конференциях и симпозиумах. Основные положения и выводы диссертационной работы отражены в четырех публикациях, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Структура и объем диссертационной работы, выводы, а также автореферат полностью отражают и подтверждают научные положения, рассматриваемые в данной диссертации.

Вопросы и замечания

1. В главе 3 разд. 3.4.1 указаны сравниваемые препараты рекомбинантного инсулина человека и рекомбинантного соматотропного гормона человека. Хотелось бы привести более полное описание готовых форм и используемых в них вспомогательных компонентов. Данная информация сделает более наглядными полученные результаты.

2. Поскольку дозы лекарственных средств пептидной и белковой природы выражаются в международных единицах, основанных на их биологической активности, в описании эксперимента в главе 2 разд. 2.2.5 следовало бы привести перерасчет концентрации из МЕ/мл в мг/мл.

3. Автором рассмотрены лекарственные средства, действующими компонентами которых являются немодифицированные пептиды и белки. Возможно ли применение предложенного унифицированного способа для оценки подлинности, например, гликозилированных пептидов и белков, какими являются, рекомбинантный эритропоэтин и хорионический гонадотропин человека?

4. В работе используются протеазы Lys-C и Arg-C. Оправдано ли их применение, если специфичность данных ферментов схожа с трипсином?

5. В работе встречаются опечатки и огрехи, так, например, в таблице 8 названия столбцов следует привести на русском языке. Также в оформлении

имеются несоответствия общим требованиям к оформлению кандидатских и докторских диссертаций. Так, согласно ГОСТ Р 7.0.11-2011 перечень сокращений, использованных в диссертации, помещают после основного текста перед списком литературы.

Указанные замечания не влияют на ценность и значимость полученных результатов и общую положительную оценку результатов работы.

Практическая значимость результатов работы

На основании полученных результатов разработаны и аттестованы в соответствии с ГОСТ Р 8.795-2012 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. Данные методики внедрены в практику работы ФГУП НЦ «Сигнал» ФСТЭК России.

Полученные результаты свидетельствуют об актуальности и необходимости разработки унифицированного способа оценки подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы. Разработанный автором алгоритм проведения исследований, подходы к автоматической обработке результатов, а также методики идентификации, целесообразно использовать разработчикам лекарственных средств пептидной и белковой природы.

Заключение

Диссертационная работа Беризовской Елены Игоревны «Разработка усовершенствованного подхода к оценке подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы методом масс-спектрометрии высокого разрешения» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи – разработка унифицированного способа оценки подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы - имеющей важное значение для развития аналитической химии.

По актуальности темы, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полученных результатов, выводов и рекомендаций работа соответствует современным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, определенным пунктом 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., № 842 в редакции от 30.07.2014 г. № 723), работа Беризовской Е.И. полностью соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. в редакции от 30.07.2014 г. № 723, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании секции №2 Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (протокол № 13 от 27 ноября 2015 г.).

Отзыв подготовлен:

начальник лаборатории нанолекарств,
препаратов для клеточной и генотерапии
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России
кандидат химических наук, доцент
«02» 12 2015 г.


Яшкир Вадим Анатольевич

Адрес: 123182, Россия, г. Москва, ул. Щукинская, д. 6, корп. 1.

Телефон: 8 (495) 234-61-04, доб. 30-08.

e-mail: yashkir@exrmed.ru.

Подпись  «УДОСТОВЕРЯЮ»

Ученый секретарь ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор

А.Н. Яворский

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минздрав России)

**федеральное
государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»
(ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России)**

127051 Москва, Петровский бульвар д. 8.
Тел. (495) 234-6106, 625-4342, факс 625-4350

В диссертационный совет Д 501.001.88
при федеральном государственном
бюджетном образовательном
учреждении высшего образования
«Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова»
от генерального директора ФГБУ
«Научный центр экспертизы средств
медицинского применения»
Минздрава России
Олефира Юрия Витальевича

№ 524

На № _____ от _____

Настоящим даю согласие выступить ведущей организацией на защите диссертации Беризовской Елены Игоревны на тему: «Разработка унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы методом масс-спектрометрии высокого разрешения», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Об организации сообщаю следующие сведения:

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России).

127051, Россия, г. Москва, Петровский б-р, д. 8.

8 (495) 625-44-39

e-mail:kabinet@expmed.ru

2. Генеральный директор ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, доктор медицинских наук Юрий Витальевич Олефир.

3. Отзыв составил Яшкир Вадим Анатольевич, кандидат химических наук, химия, биоорганическая химия, химия природных и физиологически активных веществ, доцент, начальник лаборатории нанолекарств, препаратов для клеточной и генотерапии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России.

4. Основные работы по профилю диссертации за последние 5 лет:

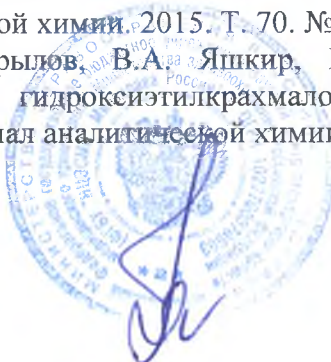
А.А. Кутин, Т.В. Мастеркова, В.А. Яшкир, В.А. Меркулов, О.А. Ваганова Хромато-масс-спектрометрия: использование для идентификации лекарственных субстанций и примесей // Вестник НЦЭСМП. 2013. № 2. С. 12-14.

Н.С. Шубина, В.А. Яшкир, А.А. Кутин Применение масс-спектрометрии для установления подлинности пептидных фармацевтических субстанций // Успехи в химии и химической технологии. 2014. Т. 281. № 9 (158). С. 66-68.

Н.Е. Кузьмина, С.В. Моисеев, В.И. Крылов, В.А. Яшкир, В.А. Меркулов Определение средней молекулярной массы гидроксиэтилкрахмалов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР // Журнал аналитической химии. 2015. Т. 70. № 1. С. 30-36.

Н.Е. Кузьмина, С.В. Моисеев, В.И. Крылов, В.А. Яшкир, В.А. Меркулов Определение молекулярно-массового распределения гидроксиэтилкрахмалов методом диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР // Журнал аналитической химии. 2015. Т. 70. № 7. С. 727-733.

Генеральный директор ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России,
доктор медицинских наук



Ю.В. Олефир