

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

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

### **Актуальность темы исследования.**

Диссертационная работа Беризовской Е.И. посвящена одной из наиболее актуальных проблем фальсификации лекарственных средств.

Одним из обязательных показателей качества лекарственных средств является подлинность действующего вещества. В связи с появлением на фармацевтическом рынке новых препаратов на основе рекомбинантных пептидов и белков чрезвычайно важной задачей является разработка стратегии оценки данного параметра с использованием современного арсенала химических и физико-химических методов.

Таким образом, диссертационное исследование Беризовской Е.И. по разработке унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы методом масс-спектрометрии высокого разрешения имеет важное значение для науки и практики.

### **Степень обоснованности научных положений и выводов.**

Для обоснования научных положений автором использован широкий арсенал современных методик исследований: комплекс химических и биохимических методов (восстановление дисульфидных связей, модификация сульфгидрильных групп и последующее ферментативное расщепление с применением набора специфических протеаз), метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения с использованием режима

интеллектуального управления измерениями, а также алгоритм обработки результатов, основанный на динамическом программировании.

Полученные результаты апробированы на коммерчески доступных лекарственных средствах с различной длиной пептидной цепи. Предложенный подход позволил выявить две фальсифицированные биологически активные добавки к пище, одно лекарственное средство и две субстанции, чем показал свою работоспособность.

### **Научная новизна и значение полученных результатов для науки и практики**

Научная новизна исследования и теоретическая значимость полученных результатов работы Беризовской Е.И. несомненна и заключается в следующем.

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 результатов работы**

На основании полученных результатов разработаны и аттестованы 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 внесены в область аккредитации ФГУП «НЦ «Сигнал», что подтверждается актом внедрения. С использованием указанного способа проанализировано более 300 образцов лекарственных препаратов различных видов, серий и производителей.

### **Объем и структура диссертации**

В целом, диссертационная работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 143 страницах машинописного текста (без учета приложения), содержит 67 рисунков и 14 таблиц, в списке цитируемой литературы 213 источников, большинство из которых – статьи зарубежных изданий с высоким импакт-фактором. Приложение включает 6 рисунков и 8 таблиц на 57 страницах.

Во введении, помимо актуальности темы диссертации и общей характеристики работы, сформулированы цели и задачи исследования.

Глава I диссертации посвящена критическому обзору литературы по теме диссертации, состоящему из двух частей. В первой части описываются известные данные о лекарственных средствах пептидной и белковой природы. Во второй – методы определения пептидов и белков, существующие подходы расчета молекулярной массы пептидов и белков с использованием метода масс-спектрометрии, способы установления аминокислотной последовательности пептидов и белков, основанные на методах жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием. Следует отметить, что материал изложен логично, охарактеризованные методы исследований охватывают весь ряд вопросов, которые впоследствии возникают при обсуждении результатов работы. Значительное количество рассмотренных работ опубликовано в последние

годы, что позволяет судить о высоком умении диссертанта работать с литературой.

Глава 2 диссертации посвящена характеристике объектов исследования, стандартных образцов, реагентов, используемого оборудования и технике эксперимента. Диссертантом, в основном, использованы реактивы и вспомогательные материалы зарубежных производителей, подробно описаны условия подготовки проб стандартных и исследуемых образцов и их хранения.

В главе 3 диссертации представлены непосредственно экспериментальные результаты диссертационного исследования и их обсуждение. Экспериментальная часть работы изложена подробно и не оставляет сомнений в надежности используемых методов и достоверности полученных результатов. В качестве новых научных результатов диссертантом выдвинуты следующие научные положения.

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

Для подтверждения данного положения, автором проведены экспериментальные исследования по разработке алгоритма оценки подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, позволяющего контролировать подлинность ЛС в несколько стадий, изучению мешающего влияния вспомогательных компонентов лекарственных средств пептидной и белковой природы на полноту протеолиза, изучению влияния параметров тандемного масс-спектрометрического детектирования высокого разрешения с использованием режима интеллектуального управления измерениями на степень идентификации аминокислотной последовательности аналитов, разработке процедуры автоматической обработки результатов с использованием специализированного программного обеспечения, апробации разработанного подхода на препаратах, находящихся в продаже.

Достоверные экспериментальные данные подтверждают это положение, что отражено в выводах.

2. Разработана 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).

Второе научное положение подтверждено проведенными автором экспериментальными исследованиями, которые показали, что для увеличения полноты ферментативного расщепления готовых форм лекарственных средств пептидной и белковой природы требуется повышение температуры до 40-45 °С, увеличение продолжительности реакции ферментативного расщепления до 6 ч по сравнению с известными методиками. При этом соотношения фермент : субстрат соответствуют литературным данным, а pH среды отлична лишь для эндопротеиназы Glu-C. Таким образом, выявлено незначительное влияние вспомогательных компонентов готовых форм лекарственных средств, предположительно, стабилизаторов, которые могут замедлять процессы деградации действующих веществ лекарственных средств пептидной и белковой природы

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

Это положение подтверждено анализом и обобщением полученных экспериментальных данных.

В главе 4 представлены результаты апробации разработанного способа установления аминокислотной последовательности на действующих веществах лекарственных средств с различной длиной пептидной цепи. Достоверные экспериментальные данные подтверждают это положение, что отражено в выводах.

Сформулированные выводы вытекают из поставленных задач и результатов исследования и основаны на достаточном материале.

Опубликованные 8 научных работ по теме диссертации (в том числе 4 в изданиях, рекомендованных по Перечню ВАК) достаточно полно отражают полученные результаты и выводы.

По работе Беризовской Е.И. можно сделать следующие замечания:

*1. Расщепление белковых субстанций протеолитическими ферментами на мой взгляд можно было контролировать и иллюстрировать картинками электрофореза в ПААГ. В описанном эксперименте также не совсем понятно сколько фермента по белку было взято в эксперимент и не влияет ли внесённый белок на итоговую картину содержания аминокислот?*

*2. Выбранное соотношение фермент-субстрат 1: 50 является соотношением по белку?*

*3. Имеются некоторые мелкие технические погрешности, например, популярная ссылка на определение белка по Брэдфорду приводится в диссертации под номером 204 , а в списке литературы - 60. Вместо инициалов М.М. ошибочно указаны инициалы М.Н.*

Сделанные замечания не снижают общую положительную оценку результатов диссертации Е.И. Беризовской.

Результаты исследования Беризовской Е.И. имеют существенную теоретическую и практическую значимость и представляют важный вклад в развитие методов анализа лекарственных средств.

### **Заключение**

Диссертация Беризовской Елены Игоревны «Разработка унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы методом масс-спектрометрии высокого разрешения» является научно-квалификационной работой, выполненной автором лично, в которой содержится новое решение актуальной проблемы оценки подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы.

Содержание диссертационной работы соответствует паспорту специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

Считаю, что по объему полученного экспериментального материала, его новизне, уровню обсуждения результатов, их научному и практическому значению диссертационная работа Е.И. Беризовской отвечает критериям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» ВАК Минобрнауки России (утвержденного Постановлением правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. в редакции от 30.07.2014 г. № 723), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

#### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОППОНЕНТ

Зав. лабораторией инженерии ферментов Института биоинженерии ФИЦ  
ФОБ РАН

Доктор химических наук, профессор  Варламов Валерий Петрович

Институт биоинженерии Федерального исследовательского центра  
"Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук.  
119071 Москва, Ленинский пр-т, 33, 2. Тел. 8(499)135-65-56.  
e-mail: varlamov@biengi.ac.ru

Учёный секретарь ФИЦ ФОБ РАН 

Канд. биологических наук

7 декабря 2015 г.

Орловский Александр Фёдорович





В диссертационный совет Д 501.001.88  
при федеральном государственном бюджетном  
образовательном учреждении высшего  
образования «Московский государственный  
университет им. М.В. Ломоносова»  
от Варламова Валерия Петровича

Настоящим даю согласие выступить официальным оппонентом 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.

О себе сообщаю следующие сведения:

1. Варламов Валерий Петрович, гражданин РФ.
2. Доктор химических наук (03.00.23 – Биотехнология), профессор, заведующий лабораторией инженерии биополимеров.
3. Институт биоинженерии Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук.
4. Адрес места работы:

117312 Москва, пр. 60-летия Октября д.7, к.1, Тел./факс: 8(499)135-65-56;  
[varlamov@biengi.ac.ru](mailto:varlamov@biengi.ac.ru)

5. Основные работы по профилю оппонируемой диссертации:

Д.В. Курек, С.А. Лопатин, В.П. Варламов. *Перспективы использования хитинсвязывающих доменов для выделения и очистки рекомбинантных белков методом аффинной хроматографии (обзор)*// Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45, № 1, С. 5-13.

A. Zubareva, A. Ilyina, A. Prokhorov, D. Kurek, M. Efremov, V. Varlamov, S. Senel, P. Ignatyev, E. Svirshchevskaya. *Characterization of protein and peptide binding to nanogels formed by differently charged chitosan derivatives*// *Molecules* 2013, 18, 7848-7864.

Ильина А.В., Зуева О.Ю., Лопатин С.А., Варламов В.П. *Ферментативный гидролиз альфа-хитина* // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 1. С. 42-45.

Хасанова Л.М., Ильина А.В., Варламов В.П., Сеницына О.А., Сеницын А.П. *Деполимеризация хитозана с использованием ферментного комплекса, продуцируемого *Myceliophthora SP** // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 4. С. 422.

AA Zubareva, TS Shcherbinina, VP Varlamov, EV Svirshchevskaya. *Intracellular sorting of differently charged chitosan derivatives and chitosan-based nanoparticles*// *Nanoscale*, 2015, v.7, p.7942-7962. DOI: 10.1039/c5nr00327. IF=6.23

СН Куликов, ВЕ Тихонов, ЕА Безродных, СА Лопатин, ВП Варламов.  
*Сравнительная оценка антибактериальных свойств олигохитозанов в отношении *Klebsiella pneumoniae**// *Биоорганическая химия*, 2015, т. 41, №1, 67-73.

Зав. лабораторией инженерии биополимеров ФИЦ Биотехнологии РАН

Доктор химических наук, профессор  
03.00.23 – Биотехнология

Зам. начальника отдела кадров



В.П. Варламов

И.Н. Шиян