

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

официальный оппонент: Савельева Елена Игоревна, доктор химических наук, заведующая лабораторией аналитической токсикологии Федерального государственного унитарного предприятия "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России)

188 663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолловский, ст. Капитолово, корп. №93

e-mail: savelieva@rihophe.ru

т/факс (812) 449-61-77 доб.240

На фармацевтическом рынке Российской Федерации рост количества фальсификатов принял угрожающие размеры. Введен в действие Федеральный закон об уголовной ответственности за фальсификацию лекарственных средств и биологически активных добавок к пище. Издаются ведомственные указы и постановления, регулирующие процедуры контроля качества фармацевтической продукции. В частности, Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 N 916 "Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств". Тем не менее ситуация становится все более тревожной. Контроль подлинности лекарственных средств относится к тем приложениям аналитической химии, в которых особенно ощутима пропасть между наукой и реально существующей практикой.

Диссертационная работа Е.И.Беризовской выполнена на актуальную тему, поскольку ряд препаратов белковой и пептидной природы относятся к категории жизненно необходимых, в то время как существующие

фармакопейные методы не обеспечивают достоверного контроля их подлинности. В частности, описаны случаи потери зрения и даже гибели больных диабетом в результате применения фальсификатов инсулина. От качества эритропоэтина зависит выживаемость больных после трансплантации почки. Речь идет даже не о препаратах, доступных на «черном рынке», а об официальных лекарственных средствах, приобретаемых в аптечной сети. Анализируя информацию, предоставляемую региональными центрами контроля качества лекарственных средств, мы не обнаружили случаев выявления фальсификатов в группе белковых и пептидных препаратов по показателю «подлинность», в то время как озабоченность врачей и пациентов отсутствием гарантий подлинности жизненно важных препаратов возрастает. Актуальность диссертационной работы исчерпывающим образом обоснована автором, но достаточно сказать только, что Государственная Фармакопея РФ не содержит методов, которые позволили бы вообще хоть как-то отличать пептидные препараты друг от друга. Весь арсенал методов контроля ограничен определением содержания общего белка и биоидентичностью для инсулина. В отдельных публикациях и нескольких диссертациях в последние годы высказывается предложение внедрить в практику контроля качества пептидных препаратов метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Безусловно, это было бы большим шагом вперед, но остаются непреодолимыми ограничения по молекулярной массе аналитов и обязательному наличию образца сравнения. Сотрудниками Российской Антидопинговой лаборатории опубликован ряд работ, в которых показаны примеры успешной безэталонной идентификации компонентов белковой и пептидной природы в фармацевтических препаратах методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС). Недостатком предлагаемого ими подхода является пренебрежение более простыми и доступными методами, которые позволяют быстро и надежно установить фальсификаты, вообще не содержащие компонентов белково-пептидной природы и обеспечить оправданное применение дорогостоящей ВЭЖХ-МС/МС технологии. Кроме того, возможности этой технологии в предшествующих данной диссертации работах были использованы далеко не в полной мере. ВЭЖХ-МС/МС в варианте пептидного картирования является мощным инструментом для идентификации аминокислотных последовательностей пептидов, но на практике это сложное и дорогостоящее исследование не всегда приводит к положительным результатам. Тому может быть много причин. Важнейшая из них кроется в том, что протеолиз пептидов далеко не всегда проходит заранее ожидаемым образом, в частности, специфические сайты разрезания могут быть

пропущены, а в неспецифических (преимущественно концевых) сайтах произойдет разрезание. Эти с трудом поддающиеся прогнозу и контролю события создают дополнительную неопределенность, затрудняющую процесс установления аминокислотной последовательности пептидов. Для преодоления этой проблемы автором предложено в процессе ферментативного гидролиза использовать не только трипсин, но и еще четыре других протеолитических фермента, а также их комбинации. Такой многовариантный подход позволил снизить относительную долю случайных событий при протеолизе и увеличить количество полезных для интерпретации пептидов в среднем в 2,7 раза по сравнению с ранее известной стандартной методикой трипсинолиза. Также необходимо отметить, что автором впервые успешно решена задача адаптации условий протеолиза применительно к реальным фармацевтическим композициям, некоторые из которых содержат ингибиторы протеолитических ферментов. Не менее важным решением, позволившим повысить надежность и эффективность расшифровки аминокислотных последовательностей пептидных препаратов было применение не одного, а двух подходов к определению аминокислотных последовательностей («снизу вверх» и «с середины вниз»). Большое внимание в работе уделено и оптимизации условий ВЭЖХ-МС/МС анализа как такового, что явилось также необходимым элементом достижения успеха. С целью сокращения времени обработки масс-спектрометрических данных использовали собственную базу аминокислотных последовательностей биологически активных веществ пептидной и белковой природы, а применение алгоритма SPIDER обеспечило возможность обработки серии экспериментальных данных с использованием всех применяемых ферментов одновременно.

Таким образом, разработка унифицированного способа установления подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, основанного на использовании группы специфических протеаз и их комбинаций, а также применении различных подходов к установлению их аминокислотной последовательности и автоматизации процесса масс-спектрометрического анализа позволили повысить достоверность результатов вследствие увеличения объема поддающихся интерпретации масс-спектрометрических данных, а также избежать необоснованного применения длительных и дорогостоящих процедур посредством предварительных исследований с применением простых в исполнении и экономичных методов. Разработанный автором алгоритм последовательного решения вопросов о наличии в субстанции веществ белково-пептидной природы (да или нет), соответствия моноизотопной массы

фармакологического ингредиента заявленной формуле (да или нет) и аутентичности препарата по аминокислотной последовательности является новым и представляет собой алгоритм продвижения от простых и экспрессных методов контроля к более сложным. Это позволяет ограничить общий объем исследований необходимым и достаточным количеством операций.

В диссертации обоснованы и изложены рекомендации для полного цикла исследований по контролю подлинности белковых и пептидных препаратов в отсутствие стандартного образца сравнения для активного фармакологического ингредиента. Практическую ценность таких рекомендаций трудно переоценить. Достоверность результатов работы подтверждается использованием высокотехнологичного прецизионного аналитического оборудования, сертифицированных программ сбора и обработки данных. Предложенные методические рекомендации апробированы при исследовании более трехсот образцов. 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.

Диссертация имеет традиционную структуру. Обзор литературы (глава 1) содержит необходимую информацию о строении и свойствах исследуемых лекарственных средств (препараты инсулина и гормона роста), а также методах их контроля. Рассмотрены различные варианты экспериментальных подходов к контролю подлинности лекарственных средств пептидной природы. Обоснована ведущая роль масс-спектрометрии высокого разрешения для установления аминокислотных последовательностей в исследуемых препаратах как ключевого метода контроля их подлинности. Литературный обзор удачно структурирован, поскольку отражает логику последующей экспериментальной работы. Экспериментальная часть (глава 2) содержит исчерпывающие сведения об использованных реактивах и материалах, исследуемых и стандартных образцах, технике экспериментов и условиях инструментального анализа. Глава 3 посвящена изложению и обсуждению разработанных экспериментальных подходов. Ключевой момент работы - алгоритм контроля подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы, наглядно проиллюстрирован схемой, представленной на рисунке 12 (стр.62) диссертации. Глава 4 демонстрирует работоспособность предложенного способа как при подтверждении

подлинности препаратов пептидной природы, так и при выявлении фальсификатов.

В ряду несомненных достоинств работы следует особо отметить прослеживаемость хода и результатов анализа на всех его этапах, что свидетельствует о мастерстве автора, проявленном не только при проведении экспериментов, но и при представлении их результатов. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 4 тезиса докладов.

Замечания носят исключительно редакционный характер и адресованы преимущественно к литературному обзору. Несмотря на имеющиеся ссылки на первоисточники, трудно согласиться с характеристиками, предписанными автором трем поколениям лекарственных средств биотехнологического происхождения. Далее следует цитата со стр. 14: «Третье поколение биотехнологических ЛС – это продукция терапевтических белков пациентом после трансформации соответствующего гена». Создается впечатление, что пациент используется в качестве биореактора для наработки терапевтических белков. Генная терапия – совсем иная область, не имеющая прямого отношения к данной диссертации и, безусловно, не заслуживающая подобных трактовок. Кроме того, хотелось бы предостеречь автора от таких выражений как «...плохая биодеструкция в организме человека...», «...хорошо деградируется в организме...». Во-первых, препарат не сам себя деградирует, а происходит это под действием соответствующих ферментов (процесс автору знаком), а во-вторых, «хорошо» и «плохо» - категории неоднозначные, особенно в данном контексте. Есть и другие неудачные выражения «биодоступны в течение 10-15 мин после введения», «увеличение адсорбции раствора», «используются обращенные фазы с использованием силикагеля», «ферменты в индивидуальном состоянии». Все эти незначительные стилистические огрехи ни в коей мере не снижают общего положительного впечатления от работы.

Объем и качество проведенных исследований, обоснованность и уровень обсуждения их результатов, а также квалификация соискателя заслуживают самой высокой оценки. В диссертационной работе предложено научно обоснованное и апробированное на практике решение этой важной народно-хозяйственной задачи.

Рецензируемая работа представляет собой законченное исследование, выполненное на актуальную тему с использованием последних достижений в

области аналитической химии, и может быть рекомендована к защите по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

По своему научному уровню, значимости полученных лично автором результатов, их обоснованности, новизне и практической ценности, а также общему объему исследований диссертационная работа соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор – Беризовская Елена Игоревна, присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – Аналитическая химия.

доктор химических наук по специальности
20.02.23 «Поражающее действие специальных
видов оружия, средства и способы защиты»,
кандидат химических наук по специальности
02.00.02 «Аналитическая химия»

Савельева Е.И.

ФГУП "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-биологического агентства России
188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмолловский, ст. Капитолово, корп. № 93
тел. 8(812) 449-61-77 доб. 240
e-mail: savelieva@rihophe.ru

Подпись заведующей лабораторией аналитической токсикологии ФГУП НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека («НИИ ГПЭЧ») удостоверяю:

Ученый секретарь ФГУП «НИИГПЭЧ»,
доктор медицинских наук, профессор
08.12.15



Козяков В.П.

В диссертационный совет Д 501.001.88
при федеральном государственном бюджетном
образовательном учреждении высшего
образования «Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова»
от Савельевой Елены Игоревны

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. Савельева Елена Игоревна, гражданин РФ.
2. Доктор химических наук (20.02.23 – Поражающее действие специальных видов оружия, средства и способы защиты), заведующая лабораторией аналитической токсикологии.
3. Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека».
4. Адрес места работы:

188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский,
ст. Капитолово, корп. № 93 8(812) 449-61-77 доб. 240;
esavelieva59@mail.ru
<http://www.rihophe.ru/>

5. Основные работы по профилю оппонируемой диссертации:

Околов И.Н., Тахтаев Ю.В., Мяжитова А.И., Морозова Т.Е., Криворотова Н.В., Каракашев Г.В., Савельева Е.И. Определение концентрации глазных капель левофлоксацина и моксифлоксацина в содержимом влаги передней камеры глаза методом ВЭЖХ-МС // Катакратальная и рефракционная хирургия. 2012. Т. 12. № 4. С. 44-51.

Уколов А.И., Каракашев Г.В., Уколова Е.С., Савельева Е.И., Радилов А.С. Систематический токсиколого-аналитический скрининг биологических образцов методом хроматомасс-спектрометрии. Примеры обнаружения диазепамы, трамадола и прозерина // Масс-спектрометрия. 2013. Т. 10. № 2. С. 120-128.

Морозова, Т.Е., Каракашев, Г.В., Сорокоумов, П.Н., Савельева, Е.И., Зенкевич, И.Г. Сравнение точности метода абсолютной градуировки и модифицированного метода последовательных стандартных добавок на примере определения 3-(2,2,2-три-метил-гидразиний)-пропионовой кислоты в моче в условиях нелинейности детектирования // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17. № 2. С. 184-189.

Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Копейкин В.А., Конева В.Ю., Радилов А.С. Особенности анализа фосфорорганических отравляющих веществ, реактивированных из состава аддуктов с белками крови, при установлении факта воздействия химического оружия // Токсикологический вестник. 2014. № 4. С. 39-46.

Доктор химических наук
20.02.23 – Поражающее действие специальных
видов оружия, средства и способы защиты

Подпись доктора химических наук Е.И.Савельевой удостоверяю:
Ученый секретарь, доктор медицинских наук, профессор



Савельева Е.И.

Козяков В.П.