



Токарева Маргарита Алексеевна

**Разработка, валидация и апробация методики
определения инновационного лекарственного средства пептидной структуры
в биологических образцах**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Белова Мария Владимировна

Официальные оппоненты:

Белоусов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой

Перова Ирина Борисовна – кандидат фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии», лаборатория метаболомного и протеомного анализа, научный сотрудник

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «25» ноября 2026 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy b-p, d. 37/1 и на сайте организации <http://www.sechenov.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02

доктор фармацевтических наук, профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Пептидные лекарственные средства – класс фармацевтических соединений, состоящих из ряда ковалентно связанных аминокислот, обычно организованных в виде линейного полимера. В последние десятилетия наблюдается устойчивый рост интереса к лекарственным средствам пептидной природы, что обусловлено их высокой специфичностью, биосовместимостью и относительно низкой токсичностью по сравнению с низкомолекулярными синтетическими веществами. Достижения в области биотехнологии, производства рекомбинантных биологических препаратов и новых синтетических и аналитических технологий значительно ускорили процесс разработки пептидных препаратов.

Число одобренных к применению пептидных препаратов растет во всём мире. С 2016 по 2025 год в управлении по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (англ. Food and Drug Administration) было одобрено 466 лекарственных средств, среди них 34 пептидных препарата. В мире 150 пептидов в данный момент проходят различные клинические исследования, и еще 400-600 – доклинические. В Российской Федерации на данный момент зарегистрировано более 50 лекарственных средств пептидной природы синтетического или природного происхождения с известной первичной структурой. Для проведения доклинических и клинических исследований требуется разработка высокочувствительных методик определения пептидов в биологических образцах.

Степень разработанности темы исследования

Теоретические и практические основы анализа пептидных соединений заложены в трудах ученых в области биоаналитической химии и хроматографии. В настоящее время общепризнанным подходом к решению задач фармакокинетики является использование высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Однако исследования касались пептидных структур, отличающихся от объекта настоящего исследования. Инновационное лекарственное средство пептидной природы, аналог фрагмента белка эзрина человека-1 (англ. Human Ezrin Peptide-1, НЕР-1), зарегистрированное в РФ под торговым наименованием ГЕПОН®, обладает уникальными аминокислотной последовательностью и физико-химическими свойствами, что не позволяет экстраполировать на

него существующие методики без дополнительной экспериментальной проработки. Выраженная гидрофильность НЕР-1 накладывает существенные ограничения на пробоподготовку образцов, в частности, использование классической экстракции для НЕР-1 невозможно, а осаждение белков не позволяет достигнуть достаточного извлечения из биологической матрицы, если не будут применяться различные модификации. Для разделения гидрофильных соединений хроматографическими методами используются два основных режима: режим гидрофильной хроматографии, режим обращённо-фазовой (ОФ) ВЭЖХ с предварительной дериватизацией. В доступной литературе не описаны методики определения НЕР-1 в биологических образцах для целей проведения клинических исследований.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования является разработка методики количественного определения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в биологических образцах.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ литературных данных о физико-химических свойствах пептида НЕР-1, теоретически обосновать и экспериментально подобрать оптимальные условия пробоподготовки, обеспечивающие эффективное извлечение вещества из биологических матриц.
2. Разработать методику количественного определения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС, включая выбор внутреннего стандарта и параметров масс-спектрометрического детектирования.
3. Провести валидацию разработанной методики в соответствии с современными требованиями, оценив ее по следующим параметрам: селективность, специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, эффект матрицы, степень извлечения и стабильность аналита в условиях хранения и анализа.
4. Выбрать биологическую матрицу для последующей апробации методики на основании оценки распределения пептида НЕР-1 между плазмой и форменными элементами крови человека.
5. Апробировать разработанную и валидированную методику в ходе экспериментального фармакокинетического исследования при введении препарата здоровым добровольцам.

Научная новизна

Количественно определен терапевтический пептид треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат в плазме крови человека. В отличие от типичного для пептидов использования твёрдофазной экстракции при пробоподготовке, были экспериментально обоснованы условия последовательных этапов осаждения белков раствором пропионовой кислоты в метаноле, жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), дериватизации, упаривания и перерастворения, обеспечивающих высокую чувствительность и селективность определения НЕР-1 и демонстрирующих экономическую целесообразность. В данной методике расширена область применения пропионового ангидрида в качестве дериватирующего агента для терапевтических пептидов, который ранее использовался для дериватизации гистонов в протеомике с целью улучшения удерживания в ОФ-ВЭЖХ и детектирования МС/МС.

С помощью разработанной методики изучены особенности распределения пептида НЕР-1 в цельной крови человека и связывание с белками плазмы крови; определена концентрация пептида НЕР-1 в плазме крови в рамках пилотного исследования фармакокинетики при подкожном и внутримышечном введении здоровым добровольцам.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационной работы определяется вкладом в развитие методологии анализа пептидных соединений в биообразцах. В ходе исследования выявлены и систематизированы факторы, влияющие на улучшение аналитических характеристик пептида НЕР-1 при определении в биологических матрицах, что расширяет теоретические представления о хроматографическом разделении пептидов в градиентном режиме элюирования и роли дериватирующего агента в эффективности фрагментации после ионизации целевого соединения. Выявленная взаимосвязь между структурой пептида и его хроматографическими параметрами может служить основой для прогнозирования условий анализа других соединений данной группы.

Практическая значимость работы заключается в создании и валидации методики количественного определения пептида НЕР-1 в биологических образцах, пригодной для использования в лабораториях, осуществляющих доклинические и клинические исследования фармакокинетики. Разработанная методика обеспечивает чувствительность на уровне 5 нг/мл, точность и воспроизводимость результатов. На её основе составлены методические

рекомендации по анализу и правила обращения с пробами, что позволяет непосредственно применять её в практике научно-исследовательских институтов и центров доклинических исследований.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили принципы системного анализа, современные подходы к разработке и валидации биоаналитических методов, регулируемые «Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС)» (утверждены решением Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) № 85 от 03.11.2016 г) и гармонизированным руководством ICH M10 «Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis» (от 25.07.2022 г.).

После изучения научной литературы, ориентированной на количественное определение терапевтических пептидных препаратов в биообразцах, для исследования в качестве базового был выбран метод ВЭЖХ-МС/МС.

Положения, выносимые на защиту

1. Протокол пробоподготовки методики количественного определения инновационного пептида НЕР-1 в плазме крови человека.
2. Результаты разработки условий хроматографического разделения и детектирования тетрапропионилированного пептида НЕР-1 для анализа методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией.
3. Результаты валидации методики количественного определения инновационного пептида НЕР-1 в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС по параметрам: селективность, специфичность, правильность и прецизионность, эффект матрицы, линейность, степень извлечения, нижний предел количественного определения (НПКО, англ. Lower Limit of Quantification, LLOQ), стабильность.
4. Результаты апробации разработанной методики в исследованиях по определению распределения НЕР-1 в цельной крови человека и связывания НЕР-1 с белками плазмы крови.
5. Результаты апробации методики в рамках пилотного исследования фармакокинетики НЕР-1 при подкожном и внутримышечном введении здоровым добровольцам.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют пункту 4 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Степень достоверности и апробация результатов

Объективность полученных результатов подтверждается проведением исследований на современном сертифицированном поверенном оборудовании с использованием аттестованных стандартных образцов. Экспериментальные данные получены в достаточном объеме, обработаны с применением методов статистического анализа. Достоверность разработанной методики подтверждена валидацией, регулируемой «Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» и гармонизированным руководством ICH M10, что гарантирует надежность и воспроизводимость результатов.

Материалы проведенных исследований по теме диссертации были представлены и обсуждены на VIII Международной научной конференции, организованной Советом по науке при Фонде Нурсултана Назарбаева и Южно-Казахстанской медицинской академией (Республика Казахстан, 9-10 декабря 2021 года); II Международной Российско-Сербской Конференции молодых ученых (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, 26 апреля 2024 года).

Апробация диссертационной работы состоялась 29 мая 2026 г. на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Протокол № 10 от 29 мая 2026 года.

Личный вклад автора

Автор внёс основной вклад при разработке концепции определения НЕР-1 методом ВЭЖХ-МС/МС. Лично автором обоснованы подходы к выбору внутреннего стандарта – структурного аналога исследуемого пептида – и параметров хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования для инновационного пептида НЕР-1 и внутреннего стандарта. Экспериментальные исследования по разработке и оптимизации методики, включая многостадийный этап пробоподготовки с использованием осаждения образца плазмы крови раствором пропионовой кислоты в метаноле, с последующей ЖЖЭ, упариванием в токе азота, и

дериватизацией пропионовым ангидридом, выполнены автором самостоятельно. Автор лично провел валидацию методики, соответствующей «Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» и гармонизированному руководству ICH M10, обработал и интерпретировал полученные результаты. Автор лично спланировал и провёл эксперимент по определению распределения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в цельной крови человека, а также определил связывание с белками плазмы крови. Подготовка основных публикаций и апробация результатов на научных мероприятиях проведены автором лично.

Внедрение результатов диссертационного исследования в практику

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации внедрены в учебный процесс Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Методы фармакопейного анализа», читаемой студентам по направлениям подготовки 33.05.01 Фармация (акт № 927 от 23.04.2026, Приложение А), и внедрены в научно-практическую деятельность ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (акт б/н от 15.04.2026, Приложение Б) и ООО «Лаборатория Фармацевтических Исследований» (акт б/н от 21.04.2026, Приложение В).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и является фрагментом исследований по теме «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (№ государственной регистрации: 01.2.011.68237).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 5 научных работ, в том числе 3 научные статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, Chemical Abstracts, 2 публикации в сборниках материалов международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа структурно включает введение, обзор литературы, четыре главы экспериментальной части, общие выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы и шесть приложений. В списке литературы перечислены 214 источников, 203 из которых – зарубежные. Текст диссертации изложен на 173 страницах компьютерного текста, содержит 46 рисунков (из них 26 в приложении), 38 таблиц (из них 9 в приложениях). В приложениях вынесены акты внедрения научных результатов в учебный процесс и в работу предприятий, а также масс-спектры дериватизованных производных НЕР-1, расчёты для них, полученные концентрации после многократного введения здоровым добровольцам НЕР-1.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлся инновационный терапевтический тетрадекапептид НЕР-1 – треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата (торговое наименование «Гепон[®]», ООО «Иммафарма», Россия; количественное содержание 100,50%) – аналог фрагмента белка эзрина человека-1 с молекулярной массой 1817 Да, содержащий три остатка лизина, три аргинина и пять остатков глутаминовой кислоты. В качестве внутреннего стандарта (ВС) использовали структурный аналог НЕР-1 – треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-лейцил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамат (ООО «Пептидные технологии», Россия; количественное содержание 98,10%), отличающийся заменой остатка валина на лейцин.

Экспериментальные исследования выполняли с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Nexera с тандемным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (тройной квадруполь, Shimadzu, Япония). При пробоподготовке использовали центрифугу Eppendorf 5418 (Eppendorf, Германия), испаритель в токе азота NDK200-2 (Hangzhou Miu Instruments Co., Китай), ультразвуковую ванну «Сапфир» 1,3 л (ООО «Сапфир», Россия) и термошейкер TS-100 (Biosan, Латвия). В работе применяли дозаторы переменного объёма Eppendorf Research Plus и механические дозаторы BIOHIT (Sartorius Biohit, Финляндия), весы аналитические AUW120D (Shimadzu, Япония), систему водоподготовки Simplicity UV (Millipore, Франция).

В качестве реактивов использовали ацетонитрил класса LC-MS grade (Biosolve, Франция), метанол (х.ч., Химмед, Россия), муравьиную кислоту 98% (PanReac, Испания), пропионовую кислоту 99,84% (BASF, Германия), пропионовый ангидрид >99,8% (Sigma-Aldrich, США), хлороформ 99,9% (Honeywell, Германия), воду деминерализованную типа I (полученную на системе Simplicity UV), а также карбонат и гидрокарбонат натрия (ч.д.а., Химмед, Россия), триэтиламин >99% (TCI, Япония). При скрининге дериватизирующих агентов рассматривали диметиламинонафтален-5-сульфонилхлорид (дансилхлорид), 4-толуолсульфонилхлорид (тозилхлорид), фенилизотиоцианат (ФИТЦ), N-(9H-флуорен-2-илметокси)сукцинимид (Fmoc-OSu), ди-трет-бутилдикарбонат (Boc-ангидрид), бензойный ангидрид, N-(бензилоксикарбонилокси)сукцинимид (Cbz-OSu) (все с содержанием основного вещества $\geq 95\%$, производители Sigma-Aldrich, TCI, Merck, Acros Organics). Расходные материалы включали полипропиленовые центрифужные пробирки объёмом 2 мл, хроматографические виалы из бесцветного стекла с полипропиленовыми вставками и крышками с септой политетрафторэтилен/силикон, а также центрифужные концентраторы Spin-X UF 500 с порогом отсечения по молекулярной массе (MWCO) 5000 Да (CORNING, Великобритания).

Разработка методики количественного определения НЕР-1. Для каждого из восьми рассмотренных дериватизирующих реагентов соблюдали оптимальные условия реакции, обеспечивающие максимально полное взаимодействие с реакционноспособными аминогруппами в молекуле НЕР-1. Оптимальным признан пропионовый ангидрид. Условия дериватизации для получения тетрапропионилированного производного НЕР-1: 5 мкл пропионического ангидрида и 10 мкл пропионовой кислоты в 100 мкл смеси ацетонитрил/вода 1:1 при 60 °С в течение 30 минут. Для образующегося продукта характерен трёхзарядный ион (m/z 681,30) со стабильными переходами при использовании мониторинга множественных реакций (MRM).

Пробоподготовка плазмы крови: к 200 мкл образца добавляли 10 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта и 420 мкл 1:20 (по объёму) раствора пропионовой кислоты в метаноле, перемешивали, центрифугировали (15 мин, 15294 g); отбирали супернатант и проводили ЖЖЭ после прибавления 800 мкл хлороформа; водную фазу упаривали в токе азота досуха, после чего для дериватизации прибавляли 10 мкл пропионовой кислоты, 5 мкл пропионического ангидрида и 100 мкл смеси ацетонитрил–вода (1:1), перемешивали и выдерживали при 60 °С в течение 5 мин на ультразвуковой ванне; реакционную смесь упаривали и сухой остаток перерастворяли в 100 мкл воды I типа.

Хроматографическое разделение выполняли на колонке XBridge C18 (4,6×50 мм, 5 мкм; Waters, США) с предколонкой Phenomenex SecurityGuard C18 (4×3,0 мм, 5 мкм) при 40 °С в

градиентном режиме (элюент А: 0,1% муравьиная кислота в воде; элюент В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле; программа: 0–2 мин 10→22% В, 2,0–2,4 мин 22→100% В, 2,4–3,6 мин 100% В, 3,6–4,1 мин 100→10% В, 4,1–5,5 мин 10% В; скорость потока 1,0 мл/мин). Объем вводимой пробы — 7 мкл; времена удерживания НЕР-1 и внутреннего стандарта составили около 1,72 и 1,93 мин соответственно. Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли в режиме положительной ионизации электрораспылением (ESI) при напряжении на капилляре +5 кВ. Детектирование целевых соединений осуществляли по m/z . Для НЕР-1: 681,30 → 73,95; 681,30 → 84,00; 681,30 → 101,90; 681,30 → 140,10. Для ВС: 686,00 → 74,10; 686,00 → 84,05; 686,00 → 102,00; 686,00 → 140,00.

Валидация методики проведена в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности в рамках ЕАЭС (Решение ЕЭК № 85 от 03.11.2016) и руководством ICH M10. по следующим параметрам: селективность, линейность, правильность и прецизионность, степень извлечения, эффект матрицы, нижний предел количественного определения, стабильность. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения Lab Solutions (Ver. 5.91), Shimadzu Corporation.

Распределение в цельной крови и связывание с белками плазмы. Методику, используемую для оценки коэффициента распределения «кровь/плазма» (R_b) НЕР-1, предварительно верифицировали на модельном веществе индапамиде (Edmond Pharma S.r.l., Италия; 98,3%) с внутренним стандартом долутегавиром натрия (Micromol, Германия; 99,39%), получив значение $R_b \sim 5,7$, согласующееся с литературными данными. Для НЕР-1 R_b определяли косвенным методом: цельную кровь инкубировали с НЕР-1 при 37 °С в течение 60 мин при двух уровнях концентраций – 100 и 500 нг/мл. Отбирали аликвоты (объемом 660 мкл) в нулевой временной точке непосредственно после перемешивания, через 10, 20, 30, 45 и 60 мин, отделяли плазму и анализировали по разработанной методике. Связывание с белками плазмы исследовали методом ультрафильтрации на центрифужных концентраторах Spin-X UF 500 (MWCO 5000 Да).

Апробация в клиническом исследовании. Разработанная методика применена в рамках исследования по протоколу № Нерон-19-Р-I-2021 (версия 1.1 от 27.05.2022). Проанализированы 180 образцов плазмы крови 10 здоровых добровольцев, получавших препарат подкожно и внутримышечно в дозе 4 мг дважды в сутки в течение 10 дней. Качество аналитических серий контролировали по образцам контроля качества (КК) (уровни L, LM, M, H); отклонения не превышали $\pm 15\%$. Основные фармакокинетические параметры рассчитаны с использованием программного обеспечения MS Excel с расширением для проведения фармакокинетического анализа PKSolver.

Разработка методики количественного определения исследуемого тетрадекапептида в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

Разработка методики проводилась с учётом физико-химических свойств НЕР-1: выраженной гидрофильности (рассчитанный коэффициент распределения октанол/вода = $-10,7$), наличия трёх остатков лизина, трёх аргинина и немодифицированного N-конца, что определяет образование многозарядных ионов при ионизации электрораспылением и затруднённую фрагментацию в режиме MRM. Целевыми характеристиками аналитической методики являлись: устойчивое удерживание на ОФ сорбенте, возможность детектирования в режиме MRM с НПКО не выше 5 нг/мл, приемлемая степень извлечения ≥ 50 % и компенсация матричного эффекта.

На первом этапе изучено поведение нативного НЕР-1 в условиях положительной ESI и ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C18 300 Å (50×4,6 мм, 5 мкм). Установлено, что пептид практически не удерживается на колонке, а фрагментация многозарядных ионов (m/z 455,5; 607,1; 909,6) в ячейке соударений тройного квадруполя не позволяет получить воспроизводимые MRM-переходы. В связи с этим принято решение о необходимости предварительной дериватизации молекулы.

Проведён скрининг восьми дериватирующих агентов, способных взаимодействовать с первичными аминогруппами НЕР-1 (N-конец и ϵ -аминогруппы лизина). Сравнительная характеристика полученных дериватов НЕР-1 и их аналитические особенности представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика дериватирующих агентов при взаимодействии с НЕР-1

Дериватирующий агент	Обнаруженное число замещённых групп	Наличие устойчивых MRM-переходов	Примечание
Дансилхлорид	3–4	Нет	Многозарядные ионы не фрагментируются
Тозилхлорид	3–4	Да	Соотношение продуктов трудно контролируется; затруднено воспроизведение результатов в плазме крови
ФИТЦ	3–4	Да	Аналогично тозилхлориду – нестабильный выход в биообразцах
Fmoc-OSu	1–4	Да	Интенсивность сигнала недостаточна для низких концентраций; неполное замещение

Продолжение Таблицы 1

Вос-ангидрид	1–4	Да	Интенсивность сигнала недостаточна; неполное замещение
Cbz-OSu	1–4	Да	Низкая чувствительность сигнала в MRM-режиме
Бензойный ангидрид	1–4	Нет	Не удалось получить достоверной фрагментации продуктов
Пропионовый ангидрид	3–4	Да	Преимущественно тетразамещённое производное; воспроизводимая фрагментация; интенсивный сигнал

Наилучшие результаты получены с пропионовым ангидридом: в кислой среде при 60 °C образуется преимущественно тетрапропионилированное производное НЕР-1 с молекулярной массой 2042 Да (Рисунок 1), трёхзарядный ион которого (m/z 681,30) даёт стабильные и интенсивные MRM-переходы: 681,30 → 73,95; 84,00; 101,90; 140,10 (Рисунок 2).

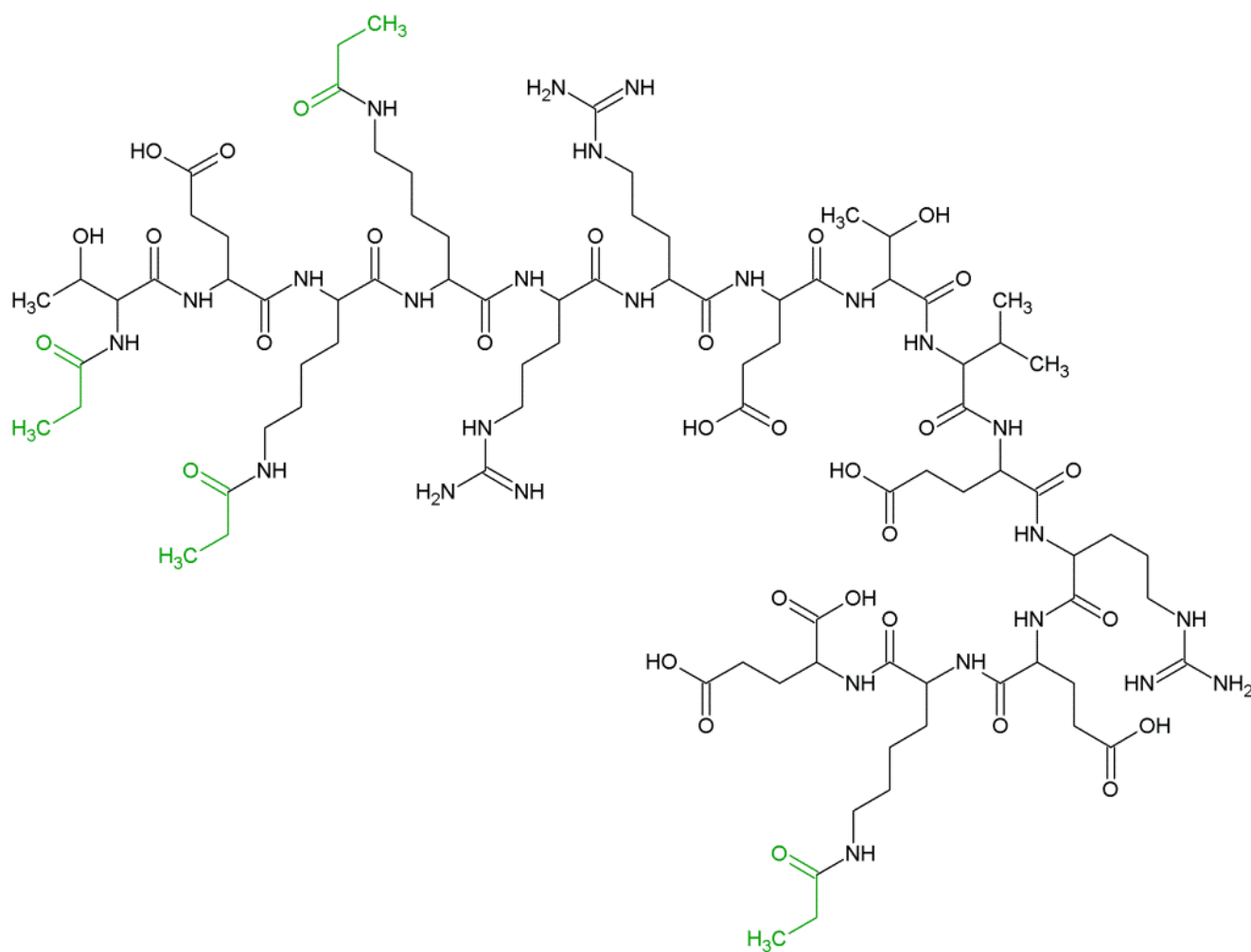


Рисунок 1 – 1,3,4,13-тетрапропионилированное производное НЕР-1

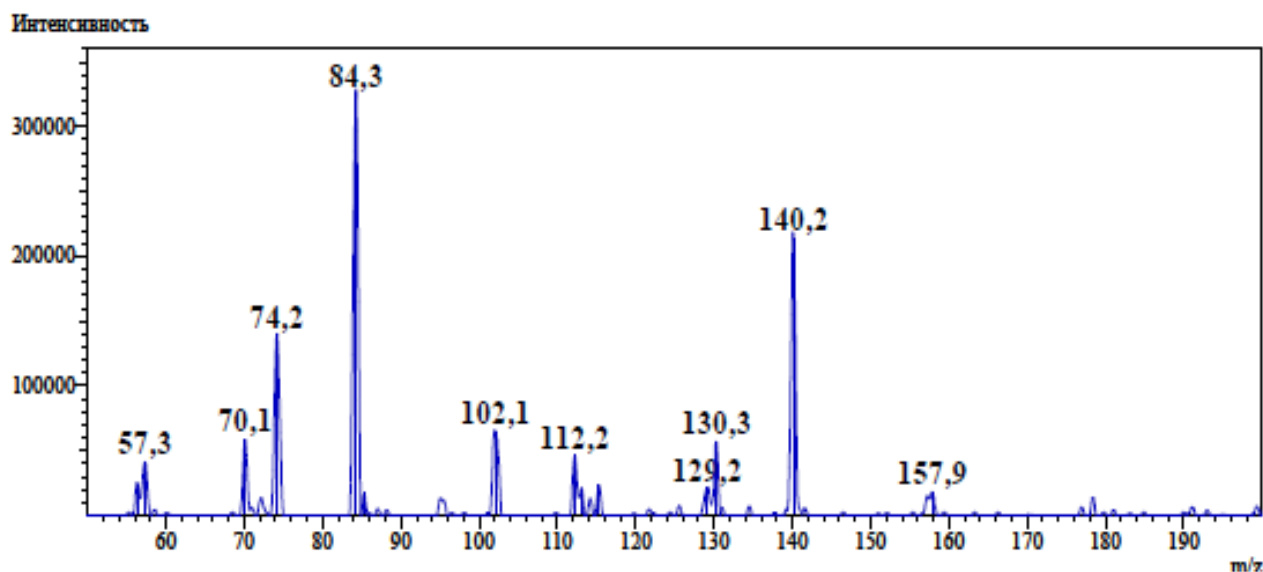


Рисунок 2 – Масс-спектр фрагментации иона m/z 681,6 тетрапропионилированного производного НЕР-1 до автоматической оптимизации MRM-переходов

Далее оптимизирована пробоподготовка плазмы крови. Прямая дериватизация НЕР-1 в супернатанте после осаждения белков метанолом приводила к образованию побочного продукта – метилового эфира НЕР-1, что нарушало линейность сигнала. Было решено удалить метанол из пробы до стадии дериватизации. Оптимизированная схема пробоподготовки включала осаждение белков 4,76% раствором пропионовой кислоты в метаноле, центрифугирование, жидкость-жидкостную экстракцию хлороформом, отбор и упаривание водной фазы в токе азота досуха (удаление метанола), дериватизацию пропионовым ангидридом в смеси ацетонитрил/вода (1:1) в кислой среде (10 мкл пропионовой кислоты) при 60 °С в течение 5 мин, повторное упаривание и перерастворение в 100 мкл воды I типа.

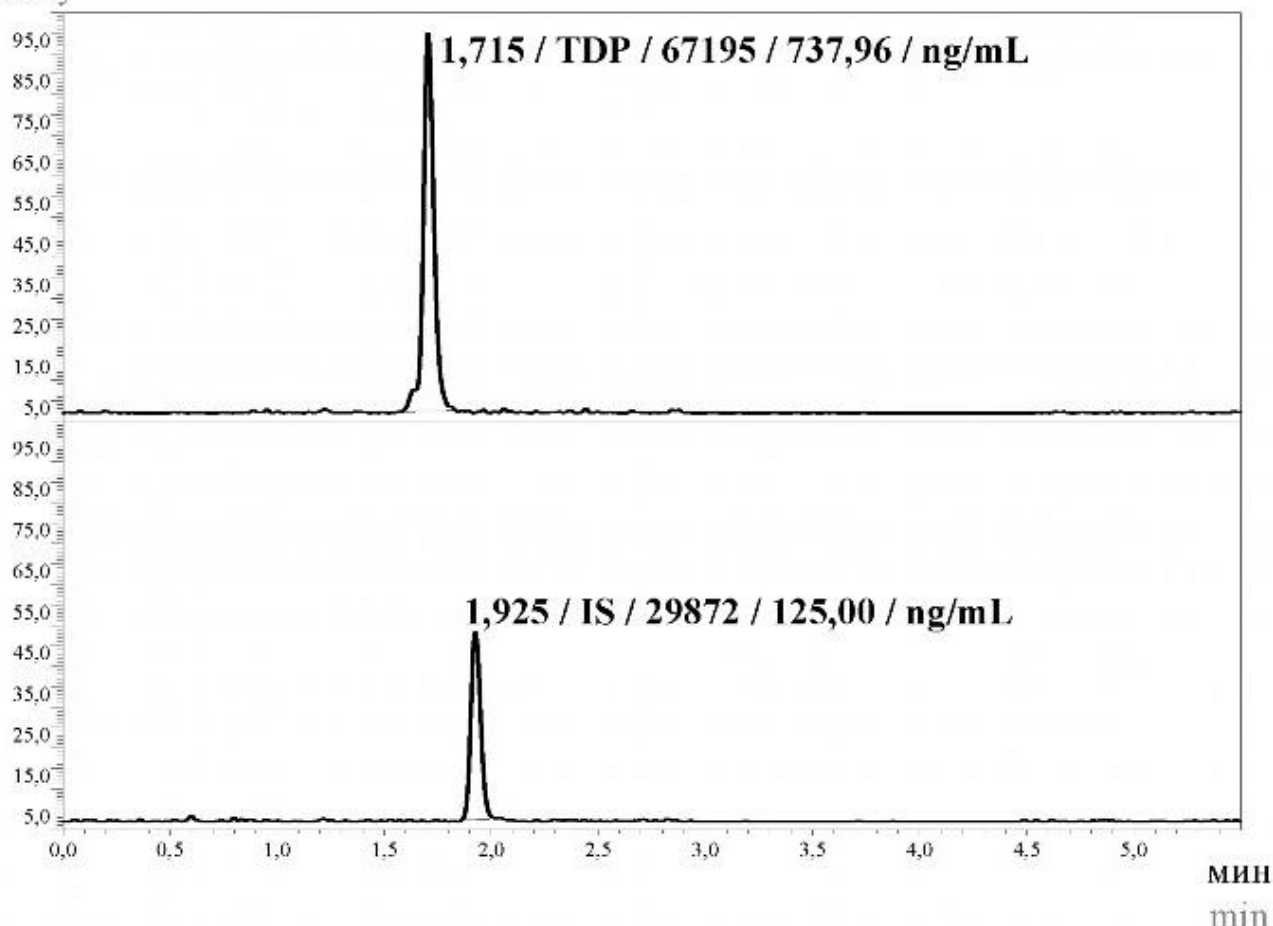
В качестве внутреннего стандарта использовали структурный аналог НЕР-1, отличающийся заменой остатка валина на лейцин. Такой выбор обусловлен необходимостью максимально близкого соответствия ВС и исследуемого вещества по физико-химическим свойствам, что позволяет максимально скомпенсировать потери на всех этапах пробоподготовки. Замена валина на лейцин незначительно увеличивает гидрофобность и не влияет на заряд молекулы, благодаря чему ВС и НЕР-1 ведут себя сходным образом в условиях анализа. Для обоих соединений были получены тетрапропионилированные производные, для трёхзарядного иона ВС (m/z 686,00) по аналогии с НЕР-1 были подобраны MRM-переходы $686,00 \rightarrow 74,10$; $686,00 \rightarrow 84,05$; $686,00 \rightarrow 102,00$; $686,00 \rightarrow 140,00$. Типичная хроматограмма тетрапропионилированного производного НЕР-1 и ВС представлена на Рисунке 3.

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке XBridge C18 (4,6×50 мм, 5 мкм) с предколонкой Phenomenex SecurityGuard C18 в градиентном режиме. Данный сорбент

превосходил колонки Jupiter C18 300 Å (50×4,6 мм, 5 мкм) и Zorbax SB-C18 150 мм × 2,1 мм, 5 мкм по разделению от интерферирующих пиков и селективности.

Интенсивность

Intensity



Примечание: хроматограмма тетрапропионилированного производного НЕР-1 – сверху, тетрапропионилированного производного ВС – снизу. Указанные подписи к хроматографическим пикам отражают: время удерживания (мин.) /кодовое название/ площадь пика/ найденную концентрацию для исследуемого вещества и добавленную для ВС, нг/мл

Рисунок 3 – Типичная хроматограмма тетрапропионилированного производного НЕР-1 и ВС

Таким образом, использование пропионового ангидрида позволило преодолеть фундаментальные ограничения нативного НЕР-1 – отсутствие удерживания на ОФ-колонках и невозможность MRM-детектирования. Многостадийная пробоподготовка обеспечила удаление мешающих компонентов, линейность сигнала и чувствительность на уровне 5 нг/мл, а использование ВС, являющегося близким структурным аналогом (гомологом), обеспечило компенсацию матричного эффекта и потерь при пробоподготовке, что было подтверждено при последующей валидации методики.

Валидация методики количественного определения исследуемого тетрадекапептида в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

Валидацию биоаналитической методики проводили в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности в рамках ЕАЭС (Решение ЕЭК № 85 от 03.11.2016) и гармонизированным руководством ICH M10.

Анализ восьми индивидуальных источников матрицы, включая гемолизную и хилёзную плазму, показал, что сигнал в образцах интактной плазмы на времени удерживания НЕР-1 не превышал 11,29 % от сигнала на уровне НПКО, для внутреннего стандарта – не более 3,83 %. Специфичность подтверждена разрешением (не менее 2) между аналитом и потенциально мешающими компонентами; эффективность хроматографической системы (число теоретических тарелок) составляла не менее 4324, фактор асимметрии пика находился в диапазоне 1,05–1,34.

Линейность. В диапазоне 5,00–1000,00 нг/мл коэффициент детерминации R^2 превышал 0,99 (весовой коэффициент $1/C^2$). Отклонения концентраций градуировочных образцов от номинальных значений не превышали 9,69 % на всех уровнях, что удовлетворяет критериям приемлемости. Градуировочный график представлен на Рисунке 4.

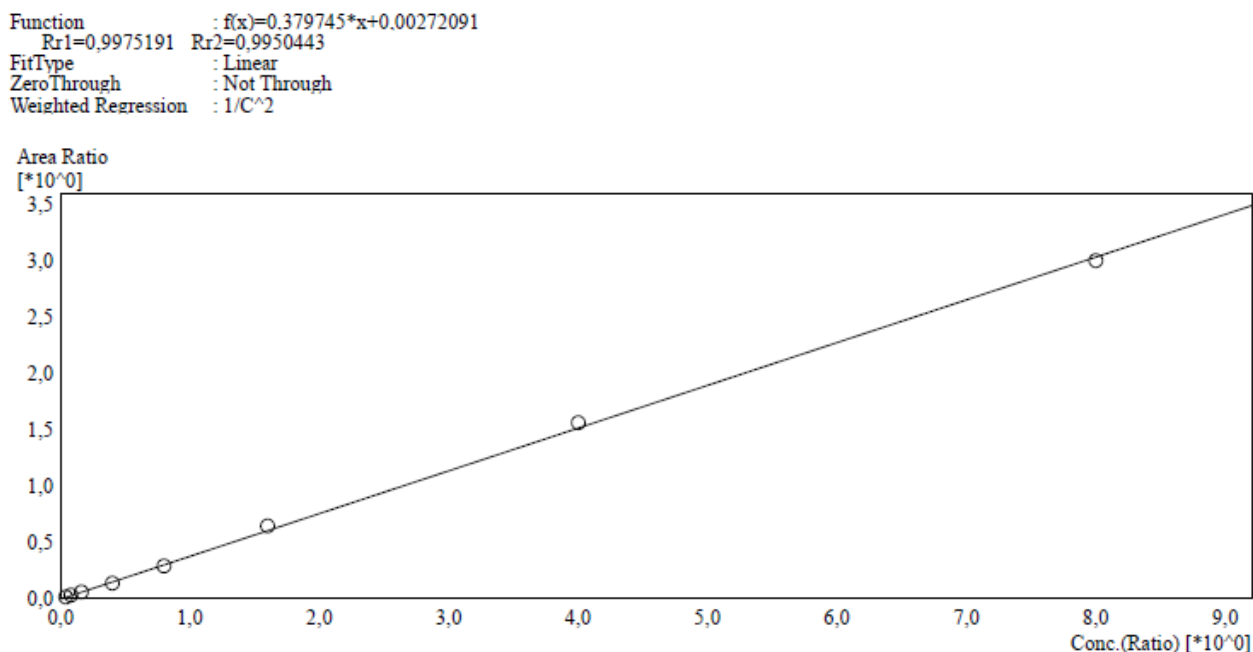


Рисунок 4 – Градуировочный график первого валидационного цикла

Правильность и прецизионность. На уровнях LLOQ, L, LM, M и H относительная ошибка (E) внутри циклов составляла от –4,40 до +10,24 %, относительное стандартное отклонение

(RSD) – от 1,24 до 12,33 %. Межцикловые значения E находились в пределах 0,55–4,00 %, RSD – 3,45–9,38 %. Все показатели не превышали допустимых ± 15 % (± 20 % для НПКО).

Эффект матрицы. Наблюдалось ионное усиление примерно в 3 раза как для НЕР-1, так и для внутреннего стандарта. Нормализованный по внутреннему стандарту фактор матрицы (Mf^H) составил в среднем 1,01 на низком уровне и 1,11 на высоком; относительное стандартное отклонение Mf^H не превышало 7,08 %, что подтверждает эффективную компенсацию матричного влияния.

Степень извлечения. Степень извлечения НЕР-1 на уровнях L, M и H составила в среднем 51, 50 и 62 % соответственно; нормализованная по внутреннему стандарту степень извлечения – 95, 92 и 90 % с относительным стандартным отклонением не более 8,53 %.

НПКО. Минимальная концентрация НЕР-1 в плазме, определяемая с приемлемыми правильностью и прецизионностью, установлена на уровне 5,00 нг/мл. Сигнал на этом уровне более чем в 5 раз превышал сигнал холостого образца.

Перенос пробы. После ввода образца с концентрацией на верхнем пределе количественного определения (ВПКО) 1000 нг/мл сигнал в последующем образце интактной плазмы для НЕР-1 не превышал 13,67 % от сигнала НПКО, для внутреннего стандарта – 2,75 %, что отвечает критериям приемлемости.

Стабильность. Краткосрочная (настольная) стабильность подтверждена в течение 24 ч: отклонения концентраций на уровнях L и H составили –12,23 и –4,60 % соответственно. Постпрепаративная стабильность в автоматическом пробоотборнике (24 ч) характеризовалась отклонениями от –10,37 до +10,93 %. После трёх циклов замораживания-размораживания среднее отклонение на низком уровне составило –14,20 %, на высоком – 7,96 %. Долгосрочная стабильность при –30 °C подтверждена на протяжении 67 сут: на низком уровне отклонения не выходили за пределы от –14,67 до +3,89 %, на высоком – от –13,56 до –4,22 %. При –80 °C стабильность подтверждена в течение 19 сут (отклонения от –13,54 до +3,16 %). Стабильность исходных и рабочих растворов НЕР-1 и внутреннего стандарта подтверждена на протяжении 56 сут; отклонения не превышали $\pm 13,71$ %.

Все валидационные параметры полностью соответствовали критериям приемлемости, установленным Правилами ЕАЭС и руководством ICH M10, что позволило признать методику пригодной для анализа исследуемых образцов плазмы крови добровольцев.

Определение распределения в цельной крови и связывания с белками плазмы исследуемого тетрадекапептида

Методику оценки коэффициента распределения R_b верифицировали на модельном веществе индапамиде с известным $R_b \sim 5,7$. После инкубации цельной крови с индапамидом (60 нг/мл) при 37 °С и последующего определения концентраций в плазме, эритроцитарной массе и цельной крови прямыми и косвенными способами было установлено, что согласующиеся с литературой результаты дают как прямой (среднее значение R_b составило 5,66, RSD 5,41 %) так и косвенный способ, основанный на сравнении концентрации вещества в плазме после инкубации в цельной крови с номинальной концентрацией (среднее значение R_b составило 5,97, RSD 5,11 %).

Показатель R_b для НЕР-1 определяли косвенным способом. Концентрации НЕР-1 в плазме оставались стабильными на протяжении всего времени инкубации. Средние значения концентраций при номинальных 100 и 500 нг/мл составили 156,19 нг/мл (RSD 4,60 %) и 788,58 нг/мл (RSD 4,97 %) соответственно. Рассчитанный R_b составил $0,64 \pm 0,03$ и не зависел от концентрации. Поскольку R_b существенно меньше единицы, НЕР-1 преимущественно находится в плазме и не накапливается в эритроцитах, что обосновывает выбор плазмы в качестве матрицы для фармакокинетических исследований.

Степень связывания с белками плазмы определяли методом ультрафильтрации с использованием центрифужных концентраторов. Предварительно оценили неспецифическое связывание НЕР-1 с мембраной фильтра; оно составило 1,55 %, что находится в пределах погрешности аналитической методики и не требовало коррекции. Установлено, что НЕР-1 связывается с белками плазмы крови человека на 89,6 %. Высокая степень связывания в сочетании с выраженной гидрофильностью пептида объясняет преимущественное нахождение пептида в плазме и будет ограничивать его объём распределения и почечный клиренс свободной фракции.

Апробация разработанной методики в клиническом исследовании

Разработанная и валидированная методика применена в рамках исследования по протоколу № Нерон-19-Р-I-2021 (версия 1.1 от 27.05.2022). Проанализированы образцы плазмы крови, отобранные у 10 здоровых добровольцев, получавших препарат подкожно или внутримышечно в дозе 4 мг дважды в сутки в течение 10 дней. В дни 1 и 10 забор крови осуществляли до введения и через 0,50, 1, 2, 4, 6 и 12 ч после инъекции (по 7 точек); в дни 8 и 9

– до введения и через 12 ч (по 2 точки). Всего проанализировано 180 образцов. Качество каждой аналитической серии контролировали по образцам КК на уровнях L, LM, M и H; отклонения не превышали $\pm 15\%$.

На основе полученных данных с помощью пакета PKSolver (Excel) рассчитывали основные фармакокинетические параметры. Усреднённые результаты для подкожного и внутримышечного путей введения приведены ниже на рисунках 5 и 6.

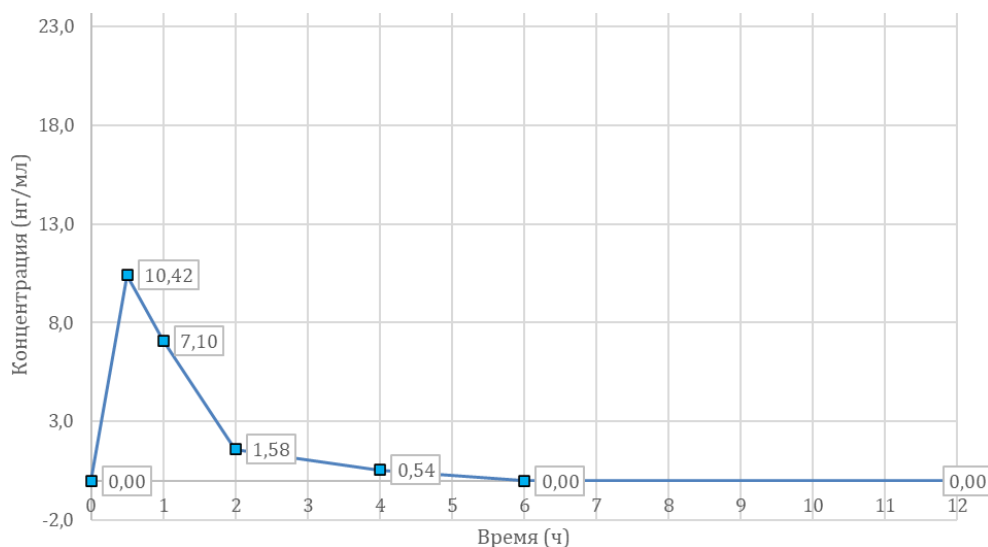


Рисунок 5 – Усреднённая фармакокинетическая кривая НЕР-1 в плазме крови здоровых добровольцев при подкожном введении пациентам в дозе 4 мг два раза в день на протяжении 10 дней; для каждой точки $n = 10$, для точки «0» – 14

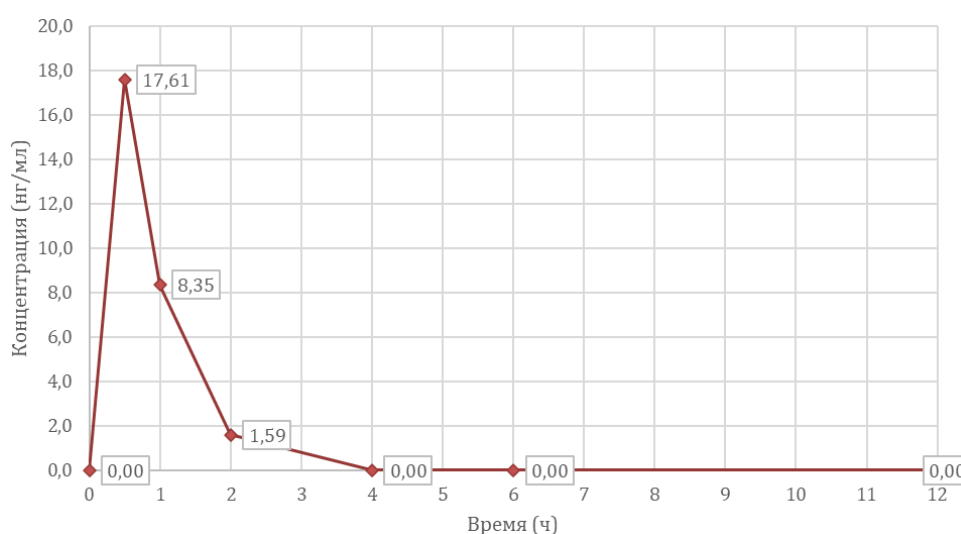


Рисунок 6 – Усреднённая фармакокинетическая кривая НЕР-1 в плазме крови здоровых добровольцев при внутримышечном введении пациентам в дозе 4 мг два раза в день на протяжении 10 дней, для каждой точки $n = 10$, для точки «0» – 14

Максимальная концентрация ($C_{\max}$) при п/к введении составила 10,42 нг/мл, при в/м – 17,61 нг/мл; время достижения максимальной концентрации – 0,50 ч в обеих группах. Период полувыведения ($t_{1/2}$) – 0,81 и 0,43 ч соответственно. Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» – 13,45 и 15,86 нг·ч/мл; площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время», рассчитанная в интервале времени от 0 до бесконечности – 14,08 и 16,84 нг·ч/мл. Остаточная площадь составила 4 и 6 %. Константа скорости терминальной элиминации составила 0,86 и 1,61 ч⁻¹. Объём распределения – 332,74 и 147,15 л; общий клиренс – 286,18 и 237,32 л/ч.

Полученные данные впервые характеризуют фармакокинетику НЕР-1 у человека и подтверждают пригодность разработанной методики для биоаналитического сопровождения клинических исследований. Быстрое достижение $C_{\max}$ и короткий период полувыведения согласуются с ожидаемым поведением немодифицированного гидрофильного пептида. Более высокие значения $C_{\max}$ при внутримышечном введении обусловлены лучшей васкуляризацией мышечной ткани. Эти результаты будут уточнены в ходе дальнейших расширенных исследований.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведён анализ литературных данных о физико-химических свойствах пептида НЕР-1 и современных подходах к количественному определению терапевтических пептидов, теоретически обоснован и экспериментально подобран метод количественного определения – ВЭЖХ-МС/МС, возможные условия пробоподготовки, включающие осаждение белков, ЖЖЭ и применение дериватизации. Дериватизация позволяет увеличить время удерживания в ОФ режиме, а также достичь стабильных MRM, что для многих немодифицированных терапевтических пептидов может представлять значительные сложности.

2. Разработана оригинальная методика ВЭЖХ-МС/МС для количественного определения пептида НЕР-1 в плазме крови человека. Применена впервые для НЕР-1 дериватизация пропионовым ангидридом, позволившая получить тетрапропионилированное производное с высокоэффективными MRM-переходами (m/z 681,30 → 73,95 m/z , 681,30 → 84,00 m/z , 681,30 → 101,90 m/z , 681,30 → 140,10 m/z). Оптимизирована многоступенчатая пробоподготовка, включающая осаждение белков, ЖЖЭ хлороформом, упаривание, дериватизацию и перерастворение, что обеспечило высокую чистоту экстрактов, стабильность аналита и последующее эффективное определение методом ОФ ВЭЖХ-МС/МС.

3. Проведена полная валидация разработанной методики в соответствии с требованиями Правил ЕАЭС и руководства ICH M10. Было подтверждено соответствие методики установленным критериям приемлемости по следующим параметрам: селективность, градуировочная кривая (5,00–1000,00 нг/мл, коэффициент детерминации $R^2 > 0,99$), правильность и прецизионность, эффект матрицы, степень извлечения и НПКО. Также было доказано отсутствие переноса пробы. Установлена стабильность НЕР-1 в плазме крови при различных условиях хранения (в течение 24 ч при комнатной температуре, после 3 циклов замораживания-размораживания, до 67 суток при температуре $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), а также стабильность стандартных растворов в течение 56 суток.

4. Обоснован выбор плазмы в качестве оптимальной матрицы для фармакокинетических исследований на основании определения коэффициента распределения «кровь/плазма» НЕР-1 и преимущественного его связывания с белками плазмы с использованием разработанной и верифицированной методики. Впервые установлено, что R_b для НЕР-1 составляет 0,64 и не зависит от концентрации НЕР-1 в плазме крови. Обосновано использование пропионовой кислоты, как модификатора осадителя, на этапе подготовки биообразца к анализу.

5. Проведена апробация разработанной и валидированной методики в клиническом исследовании для 3 группы, включавшей 10 здоровых добровольцев. Подтверждена пригодность методики для решения практических задач фармакокинетики и оптимизации режима дозирования препарата Гепон®.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы разработана и валидирована методика количественного определения НЕР-1 в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Оптимизирована пробоподготовка плазмы крови, способствующая чувствительному и селективному анализу благодаря ступенчатой очистке образца с последующей дериватизацией, упариванием и перерастворением. Разработанная методика полностью соответствует современным регуляторным требованиям и может быть рекомендована для применения в лабораториях, осуществляющих фармакокинетические исследования препарата Гепон®. Полученные данные о распределении пептида в крови и его связывании с белками плазмы служат научной основой для доказательства рационализации выбора биологической матрицы и способа пробоподготовки исследуемого вещества.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанная и валидированная методика количественного определения пептида треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС рекомендуется для внедрения в практику лабораторий, осуществляющих биоаналитические и фармакокинетические исследования, поскольку она обеспечивает высокую чувствительность, селективность и воспроизводимость, полностью соответствует современным регуляторным требованиям и может быть легко масштабирована для рутинного клинического применения. Предложенный подход, включающий использование дериватизации для улучшения хроматографических и масс-спектрометрических характеристик аналита, а также оптимизированную многоступенчатую пробоподготовку, может служить основой для разработки аналогичных методик для других терапевтических пептидов, особенно тех, которые обладают высокой гидрофильностью, слабым удерживанием в ОФ хроматографической системе или низкой эффективностью фрагментации при ионизации ESI. Адаптация разработанных принципов позволит существенно сократить время и ресурсы при создании новых биоаналитических методов для широкого спектра пептидных лекарственных средств.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанная и валидированная методика количественного определения треонил-глутамил-лизил-лизил-аргинил-аргинил-глутамил-треонил-валил-глутамил-аргинил-глутамил-лизил-глутамата в плазме крови человека пригодна для рутинного применения в рамках дальнейших фармакокинетических исследований данного препарата. Полученные данные о фармакокинетике НЕР-1 подтверждают пригодность разработанной методики и представляют собой основу для её использования в последующих исследованиях. Перспективным направлением дальнейшего изучения является ВЭЖХ-МС/МС-анализ профиля метаболизма НЕР-1 в биоматрицах для раскрытия механизмов его биотрансформации.

Разработанный методологический подход обладает возможностью применения к иным биологическим тканям и органам, что позволит масштабировать исследования кинетики распределения и элиминации пептида на системном уровне.

Успешная реализация подхода, основанного на дериватизации для улучшения хроматографических и масс-спектрометрических характеристик пептида, открывает перспективы для разработки аналогичных биоаналитических методик для других пептидных

препаратов, особенно тех, которые обладают высокой гидрофильностью, слабым удерживанием в ОФ хроматографической системе или низкой эффективностью фрагментации. Создание библиотеки оптимизированных протоколов дериватизации для различных классов терапевтических пептидов может стать самостоятельным научным направлением.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Современный подход к анализу олигопептидов методом ВЭЖХ-МС/МС / **М.А. Токарева**, Е.С. Мельников, Т.А. Родина, Г.В. Раменская // **Вестник Южно-Казахстанской медицинской академии**. – 2021. – № 4 (94). – С. 32-33.

2. Подходы к дериватизации олигопептидов при анализе методом ВЭЖХ-МС/МС / **М. А. Токарева**, Е. С. Мельников, Г. В. Раменская // VIII Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств»: сборник трудов / под общей редакцией А. С. Беленовой, А. А. Гудковой. — Воронежский государственный университет. — Воронеж, 2022. — С. 517-521.

3. Разработка и валидация методики определения тетрадекапептида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС / **М. А. Токарева**, Е. С. Мельников, М. В. Белова, Е. Н. Фишер, Т. А. Родина, И. Е. Шохин // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2024. – Т. 13. – №. 2. – С. 171-180. DOI: 10.33380/2305-2066-2024-13-2-1783. [Scopus].

4. Derivatizing Agent Selection for Hydrophilic Lysine- and Arginine-Containing Tetradecapeptide Analysis in Human Plasma by RP HPLC-MS/MS / **М. А. Tokareva**, E. S. Melnikov, E. N. Fisher, T. A. Rodina, I. E. Shohin, M. V. Belova // **Analytica**. — 2025. — № 6 (3). — 23. DOI: 10.3390/analytica6030023. [Web of Science, Scopus].

5. Изучение особенностей распределения терапевтического олигопептида в цельной крови человека *in vitro* / **М. А. Токарева**, Е. С. Мельников, И. П. Ремезова, М. В. Белова // **Естественные и технические науки**. – 2026. – Т. 216. – №. 5. – С. 151-160. [CAS].

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВС – внутренний стандарт

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

ЕАЭС – Евразийский экономический союз

ЕЭК – Евразийская экономическая комиссия

ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция

КК – контроль качества

НПКО – нижний предел количественного определения

ОФ – обращённо-фазовый

ФИТЦ – фенилизотиоцианат

Вос – трет-бутилоксикарбонил

Cbz – карбоксибензил

C_{max} – максимальная концентрация

E – относительное отклонение

ESI – ионизация электрораспылением (electrospray ionization)

Fmoc – флуоренилметоксикарбонил (защитная группа)

HEP-1 – фрагмент пептида человека эзрина-1 (Human Ezrin Peptide 1)

ICH – Международный совет по гармонизации (International Council for Harmonisation)

Mt^H – нормализованный по внутреннему стандарту фактор матрицы

MRM – мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring)

MWCO – порог отсека по молекулярной массе (molecular weight cut-off)

m/z – отношение массы к заряду

R_b – коэффициент распределения «кровь/плазма»

RSD – относительное стандартное отклонение (relative standard deviation)

t_{1/2} – период полувыведения