

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора фармацевтических наук, профессора, заведующей кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Калениковой Елены Игоревны на диссертацию Яичкова Ильи Игоревича «Разработка методик количественного определения в плазме и проведение фармакокинетических исследований лекарственных препаратов микофеноловой кислоты, метилдопы и мебеверина, содержащих потенциально нестабильные функциональные группы», представленной на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук в диссертационный совет Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности 14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология

### **Актуальность**

Фармакокинетические исследования проводятся в рамках доклинических и первой фазы клинических испытаний оригинального лекарственного препарата, при подтверждении биоэквивалентности воспроизведённого лекарственного препарата, а также после регистрации препарата для оценки влияния различных факторов на его фармакокинетические параметры. Наиболее востребованным видом данных исследований является изучение биоэквивалентности, при этом доля испытаний биоэквивалентности среди всех видов клинических испытаний в последние 5 лет остается относительно стабильной: на уровне 35-36%.

Для получения точных и объективных результатов исследований биоэквивалентности и фармакокинетики необходимо использование надёжных биоаналитических методик. Требования к методикам, применяемым при данных видах исследований, строго регламентированы российскими и зарубежными руководствами (EMA, FDA).

Некоторые лекарственные вещества содержат в структуре нестабильные функциональные группы и могут разрушаться при отборе крови, отделении плазмы, хранении образцов, их замораживании и

размораживании или в процессе анализа. Основными причинами разложения молекул анализируемых веществ являются окисление и гидролиз. Примерами легкоокисляющихся соединений являются фенолы, легкогидролизующихся – глюкурониды.

Для проведения исследования автором были выбраны лекарственные вещества, содержащие потенциально нестабильные функциональные группы: микофеноловая и деметилированная мебевериновая кислота, которые содержат один фенольный гидроксил, и метилдопа, содержащая два фенольных гидроксильных. Лекарственные препараты микофеноловой кислоты, микофенолат натрия и микофенолата мофетил обладают высоковариабельной фармакокинетикой вследствие энтерогепатической рециркуляции фенольного глюкуронида микофеноловой кислоты. Деметилированная мебевериновая кислота является основным метаболитом миотропного спазмолитика мебеверина, для которого, несмотря на полувековую историю, отсутствует единый подход к изучению фармакокинетики. Исследования биоэквивалентности таблеток метилдопы как отечественного, так и зарубежного производства на территории Российской Федерации ранее не проводились. Таким образом, фармакокинетическое изучение перечисленных препаратов и совершенствование методических подходов к его проведению, включая аналитический, актуальны и востребованы.

Необходимым условием проведения фармакокинетических исследований лекарственных средств является наличие валидированных достаточно чувствительных и селективных способов определения лекарственных веществ и их метаболитов в биологических образцах. В настоящее время предпочтительным для этих целей методом является хроматография с масс-спектрометрическим детектированием. Этот метод обладает высоким уровнем чувствительности и селективности, что позволяет проводить обнаружение следовых количеств изучаемых соединений во всех видах биологических объектов.

Обязательной частью валидации методики является изучение стабильности определяемого вещества в плазме, сыворотке или нативной крови. Данная процедура гарантирует сохранность образцов в процессе транспортировки и последующего хранения. На настоящий момент подходы к разработке методик для анализа в биологических жидкостях веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы и образующих нестабильные метаболиты, не были опубликованы и их выявление является актуальной задачей, которую решает автор представленного исследования.

### **Научная новизна**

С помощью разработанных биоаналитических методик автором проведено изучение биоэквивалентности таблеток микофенолата натрия, метилдопы и фармакокинетики капсул мебеверина. В диссертации Яичкова И.И. впервые предложены методические подходы к определению в биологических жидкостях лекарственных веществ, содержащих нестабильные функциональные группы и/или образующих нестабильные метаболиты.

Автором установлено, что гидролиз фенольного глюкуронида и ацилглюкуронида микофеноловой кислоты при фармакокинетически значимых концентрациях в плазме незначителен, что позволяет обходиться без добавления буферных растворов для стабилизации pH. Впервые разработаны и валидированы методики определения микофеноловой кислоты в плазме с применением ГХ-МС и ВЭЖХ-МС, сопоставимые по чувствительности с ВЭЖХ-МС/МС. Автор впервые предложил способ стабилизации метилдопы в плазме крови. Впервые при ВЭЖХ-МС/МС-определении мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови для пробоподготовки был применён метод осаждения белков без концентрирования. Подтверждено отсутствие обратной конверсии фенольного глюкуронида деметилированной мебевериновой кислоты в

процессе хранения, и его фрагментации в процессе масс-спектрометрического детектирования.

### **Теоретическая и практическая значимость темы**

В диссертационном исследовании проведено обобщение данных литературы о результатах исследований фармакокинетики мебеверина в различных лекарственных формах, биоэквивалентности препаратов микофенолата мофетила, метилдопы и проанализированы достоинства и недостатки использованных в них биоаналитических подходов. Представлен подробный анализ имеющихся на сегодняшний день сведений о стабилизации лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях. Предложенные автором методические подходы к разработке биоаналитических методик определения лекарственных веществ, содержащих в структуре фенольные гидроксилы и метаболизирующихся путём глюкуроновой конъюгации, могут быть использованы при анализе и других групп нестабильных соединений.

Разработанные автором методики определения микофеноловой кислоты, метилдопы и метаболитов мебеверина в плазме внедрены в практическую деятельность биоаналитических лабораторий ООО «Квинта-аналитика Ярославль» и Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского».

Методики количественного определения микофеноловой кислоты в плазме с применением ВЭЖХ-МС и ГХ-МС также внедрены в практическую деятельность химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая наркологическая больница» для проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

### **Объём и структура диссертации**

Диссертационная работа Яичкова И.И. изложена на 180 страницах машинописного текста, содержит 50 рисунков и 66 таблиц, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования,

5 глав, обсуждения результатов исследования, общих выводов, 6 приложений. Список литературы включает 192 источников, в том числе 144 иностранных.

**В обзоре литературы** проведен глубокий анализ имеющихся методик определения микофеноловой кислоты, метаболитов мебеверина и метилдопы с указанием их основных недостатков, а также особенностей фармакокинетики их лекарственных препаратов. Автором выявлены основные приёмы, используемые в настоящее время для предотвращения разложения веществ в пробах биологических жидкостей. Дана подробная характеристика фенольных соединений и глюкуронидов лекарственных веществ, их химических свойств, факторов, влияющих на их стабильность.

**В главе «Материалы и методы»** дан полный перечень оборудования, стандартных образцов и реактивов, использованных в ходе исследования. Приведено описание процесса приготовления основных и рабочих растворов, калибровочных образцов и образцов контроля качества определяемых веществ. Перечислены проводимые при валидации испытания и критерии их приемлемости, изложен порядок проведения аналитического цикла. Описан дизайн исследований биоэквивалентности препаратов микофенолата натрия и метилдопы, а также фармакокинетики препарата мебеверина.

**В третьей главе** подробно описан процесс разработки методик определения в плазме крови микофеноловой кислоты, мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот, метилдопы с использованием современных физикохимических методов анализа – ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-МС, ГХ-МС. Разработанные методики валидированы по принципу соответствия установленным критериям приемлемости биоаналитических методик по требованиям Европейского медицинского агентства, FDA, Руководства по экспертизе лекарственных средств НЦЭСМП. Автор последовательно и логично описывает процедуру выбора условий хроматографического разделения, масс-спектрометрического детектирования и подготовки проб для анализа изучаемых веществ; затем обосновывает

выбор антикоагулянта и, в случае исследования метилдопы, выбор комбинации антиоксиданта и антикоагулянта. Разработанные методики обладают высокой чувствительностью, селективностью при минимальных временных затратах на пробоподготовку. Новизна и оригинальность полученных результатов подтверждены рядом патентных свидетельств. Необходимо также отметить высокий уровень квалификации соискателя в области аналитических исследований на сложном программируемом оборудовании, каким являются высокоэффективный жидкостный и газовый хроматографы в сочетании с масс-спектрометрами в качестве детектора.

В **четвертой главе** представлены результаты, полученные в ходе исследований биоэквивалентности препаратов микофенолата натрия в форме таблеток, покрытых оболочкой, таблеток метилдопы и изучения фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением. Установлено отсутствие биоэквивалентности тестируемого и референсного препаратов микофенолата натрия, биоэквивалентность препаратов метилдопы, определены фармакокинетические параметры метаболитов мебеверина – мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот. Доказано, что оценку биоэквивалентности препаратов мебеверина можно проводить по деметилированной мебевериновой кислоте как основному метаболиту, концентрации которого в плазме в несколько раз выше уровней мебевериновой кислоты. Здесь же приводятся результаты перекрёстной валидации методик определения микофеноловой кислоты с использованием методов ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-МС и ГХ-МС, а также результаты изучения обратной конверсии глюкуронидов микофеноловой кислоты на образцах плазмы, полученных от крыс после введения препарата. Все проведенные исследования выполнены корректно, тщательно и в полном соответствии с требованиями нормативной документации. полученные результаты не вызывают сомнений в достоверности.

В **пятой главе** на основании проведенных исследований автором сформулированы подходы, применяемые при разработке методик

определения веществ, содержащих в структуре нестабильные функциональные группы и образующих нестабильные метаболиты, в плазме крови.

В **обсуждении** приводятся сопоставление характеристик разработанных методик определения микофеноловой кислоты мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот, метилдопы в плазме крови с опубликованными ранее методиками анализа данных соединений, описываются их основные преимущества и даётся обоснование пригодности их применения для исследований биоэквивалентности. Проводится анализ возможных причин неэквивалентности тестируемого и референтного препарата микофенолата натрия. Автором также даётся описание основных стадий биоаналитических исследований.

Достоверность полученных соискателем результатов не вызывает сомнений: исследования проводились с использованием современных инструментальных методов анализа и валидированных методик, первичные данные подвергались адекватной статистической обработке. Результаты диссертационной работы достаточно полно представлены в профильных периодических научных изданиях и обсуждены на российских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 5 в изданиях, рекомендованных ВАК, 2 коллективные монографии, а также получены 3 решения о выдаче патента.

Вопросов к работе не имею. В качестве замечания можно высказать пожелание на кинетических кривых изученных препаратов и их метаболитов привести разброс для средних значений концентрации в каждой временной точке, что наглядно демонстрирует уровень вариабельности данных.

### **Заключение**

Суммируя вышесказанное можно заключить, что по актуальности, новизне, уровню выполнения, объему, научной и практической ценности полученных результатов диссертационная работа Яичкова Ильи Игоревича «Разработка методик количественного определения в плазме и проведение

фармакокинетических исследований лекарственных препаратов микофеноловой кислоты, метилдопы и мебеверина, содержащих потенциально нестабильные функциональные группы» полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пункты 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор Яичков Илья Игоревич заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология.

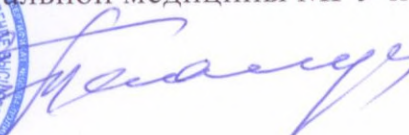
Официальный оппонент



Каленикова Елена Игоревна,  
доктор фармацевтических наук по специальностям  
14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология,  
14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия,  
профессор, заведующая кафедрой фармацевтической химии,  
фармакогнозии и организации фармацевтического дела  
факультета фундаментальной медицины,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова»

119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т, дом 27, корп. 1  
Тел. +7 (495) 932-99-11  
[info.fbm.msu.ru](mailto:info.fbm.msu.ru); [eikaleni@fbm.msu.ru](mailto:eikaleni@fbm.msu.ru)

Подпись Е.И.Калениковой подтверждаю

Декан факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова  
академик РАН  В.А. Ткачук





## СОГЛАСИЕ ОППОНЕНТА

Я, Каленикова Елена Игоревна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» даю своё согласие выступить в качестве официального оппонента по диссертации Яичкова Ильи Игоревича «Разработка методик количественного определения в плазме и проведение фармакокинетических исследований лекарственных препаратов микофеноловой кислоты, метилдопы и мебеверина, содержащих потенциально нестабильные функциональные группы» на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.06 –фармакология, клиническая фармакология.

Согласна на обработку моих персональных данных.

Не являюсь членом экспертного совета ВАК.

Доктор фармацевтических наук  
по специальности 14.03.06 - Фармакология,  
клиническая фармакология, 14.04.02-  
Фармацевтическая химия, фармакогнозия,  
профессор, заведующая кафедрой  
фармацевтической химии, фармакогнозии  
и организации фармацевтического дела  
факультета фундаментальной медицины  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»



Каленикова  
Елена Игоревна

Подпись Калениковой Елены Игоревны заверяю

Специалист по кадрам  Ю. ЯКОВЛЕВА

119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т, дом 27, корп. 1  
Тел. +7 (495) 932-99-11  
Адрес электронной почты: eikaleni@fbm.msu.ru

### СВЕДЕНИЯ ОБ ОППОНЕНТЕ

по диссертации Яичкова Ильи Игоревича «Разработка методик количественного определения в плазме и проведение фармакокинетических исследований лекарственных препаратов микофеноловой кислоты, метилдопы и мебеверина, содержащих потенциально нестабильные функциональные группы» на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

ФИО оппонента	<b>Каленикова Елена Игоревна</b>
Учёная степень	Доктор фармацевтических
Шифр и наименование специальности, по которой защищена диссертация	14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология, 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия
Учёное звание (по специальности, кафедре)	профессор
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Занимаемая должность	заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины
Почтовый индекс, адрес	119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т, дом 27, корп. 1
Телефон	+7 (495) 932-88-14, +7 (495) 932-99-11
Адрес электронной почты	info.fbm.msu.ru; eikaleni@fbm.msu.ru
Список основных публикаций оппонента по профилю диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kalenikova, E.I. Tissue-Level Dynamics and Redox State of Coenzyme Q10 in Rats After Intravenous Injection of Ubiquinol / Kalenikova E.I., Gorodetskaya E.A., Obolenskaya O.N. [и др.] // <i>Pharmaceutical Chemistry Journal</i>. - 2018. - С. 1-4. DOI <a href="https://doi.org/10.1007/s11094-018-1882-6">10.1007/s11094-018-1882-6</a></li> <li>2. Каленикова, Е.И. Доклиническое изучение фармакокинетики инновационной лекарственной формы убихинола для внутривенного введения / Е.И. Каленикова, Е.А. Городецкая, О.Ю. Куляк [и др.] // <i>Химико-фармацевтический журнал</i>. - 2017. - Т. 51., № 11. - С. 3-7.</li> <li>3. Куляк, О.Ю. Валидация методики количественного определения убихинола в плазме крови крыс с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием / О.Ю. Куляк, Е.А. Городецкая, В.Г. Макаров, Е.И. Каленикова [и др.] // <i>Технологии живых систем</i>. - 2017. - Т. 14, № 5. - С. 51-56.</li> <li>4. Сизова, Ж.М. Взаимосвязь клинимоорфофункциональных параметров сердца и концентрации коэнзима Q10 в плазме крови у больных с хронической сердечной недостаточностью ишемической этиологии / Ж.М. Сизова, В.Л. Захарова, К.А. Алибейли, О.С. Медведев, Е.И. Каленикова [и др.] // <i>Клиническая геронтология</i>. - 2016. - Т.</li> </ol>

	<p>22, № 1-2. - С. 8-13.</p> <p>5. Каленикова, Е.И. Биофармацевтический анализ коэнзима Q10 (Убидекаренона) / Каленикова Е.И., Токарева М.Г., Городецкая Е.А. [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. - 2016. - Т. 50, № 11. - С. 53-56.</p>
--	---

Доктор фармацевтических наук  
по специальности 14.03.06 - Фармакология,  
клиническая фармакология, 14.04.02 –  
Фармацевтическая химия, фармакогнозия,  
доцент, заведующая кафедрой  
фармацевтической химии, фармакогнозии и  
организации фармацевтического дела  
факультета фундаментальной медицины  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»



Каленикова  
Елена Игоревна

119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т, дом 27, корп. 1  
Тел. +7 (495) 932-88-14  
Адрес электронной почты: info.fbm.msu.ru

*Подпись Е.И. Калениковой заверено.*

СПЕЦИАЛИСТ ПО КАДРАМ *Евдокия Ю. Яковлева*

