

Заключение комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по кандидатской диссертации Голощаповой Евгении Олеговны на тему: «Разработка фармакопейных стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры субстанций интерферонов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.6. – Биотехнология.

Научный руководитель:

Устишникова Ольга Борисовна – кандидат биологических наук (14.00.36 – аллергология и иммунология), начальник лаборатории биохимии медицинских иммунобиологических препаратов Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ, Москва).

Диссертационная работа Голощаповой Е.О. соответствует специальности: 1.5.6. – Биотехнология (биологические науки).

Работа посвящена разработке фармакопейных стандартных образцов (ФСО) для подтверждения подлинности структуры молекулы рЧИФН альфа-2b (метиониновая форма) и молекулы рЧИФН бета-1b, разработке требований к кандидатам в ФСО, установлению аттестованной характеристики ФСО, установлению срока годности ФСО на основе исследования стабильности в режиме реального времени.

В ходе диссертационного исследования разработаны требования к кандидату в ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b, включающие наиболее полную оценку качества субстанции производителем в соответствии с требованиями международных документов; форму выпуска, удобную для применения и пригодную для условий хранения; соответствие аминокислотной последовательности молекулы теоретическим данным (не менее 95%).

Разработаны требования к кандидату в ФСО рЧИФН бета-1b, включающие отсутствие в составе вспомогательных веществ белковой или иной природы, потенциально влияющих на профиль пептидной карты; стабильность раствора ФСО; соответствие требованиям спецификации на субстанцию за исключением показателей, изменяемых направленно (формы выпуска, pH и т.д.); соответствие аминокислотной последовательности молекулы теоретическим данным (не менее 95%).

Диссертантом разработан и охарактеризован фармакопейный стандартный образец метиониновой формы рЧИФН альфа-2b, представляющий собой замороженный раствор в стерильных полипропиленовых криопробирках вместимостью 1 мл, соответствующих требованиям USP VI, объем розлива 0,5 мл, концентрация 1 мг/мл. Проведена оценка качества ФСО в соответствии с разработанной спецификацией, включая исследование аминокислотной последовательности молекулы ФСО (покрытие 100%) и подтверждение наличия дисульфидных связей методом масс-спектрометрии.

С применением методики Европейской Фармакопеи (07/2015:1110) установлена аттестованная характеристика разработанного фармакопейного стандартного образца метиониновой формы рЧИФН альфа-2b в виде абсолютного времени удерживания четвертого пика (пика с максимальной интенсивностью) и относительного времени удерживания семи основных пиков.

Для разработанного и аттестованного ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b составили сопроводительную документацию (паспорт, инструкцию по применению, макеты этикеток). Инструкция по применению включает описание методики применения разработанного ФСО с указанием производителя и каталожного номера трипсина, с которым проводили аттестацию.

Диссертантом разработан и охарактеризован фармакопейный стандартный образец рЧИФН бета-1b, представляющий собой лиофилизат рЧИФН бета-1b без стабилизаторов

белковой природы во флаконах формата 2R из стекла I гидролитического класса (0,25 мг/флакон). Проведена оценка качества ФСО рЧИФН бета-1b в соответствии с разработанной спецификацией, включая исследование аминокислотной последовательности молекулы ФСО рЧИФН бета-1b (покрытие более 97%) и подтверждение наличия дисульфидной связи.

Впервые разработана методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b с применением фермента «эндопротеиназа Glu-C» и ацетатного буферного раствора для оценки подлинности первичной структуры молекулы с изучением ее специфичности и прецизионности.

С применением разработанной методики пептидного картирования рЧИФН бета-1b установлена аттестованная характеристика разработанного фармакопейного стандартного образца рЧИФН бета-1b в виде абсолютного времени удерживания третьего пика (пика с максимальной интенсивностью) и относительного времени удерживания шести основных пиков.

Для разработанного и аттестованного ФСО рЧИФН бета-1b составили сопроводительную документацию (паспорт, инструкцию по применению, макеты этикеток). Инструкция по применению включает описание методики применения разработанного ФСО с указанием производителя и каталожного номера трипсина, с которым проводили аттестацию.

На основании анализа полученных пептидных карт экспериментально показана возможность применения разработанных фармакопейных стандартных образцов с установленной аттестованной характеристикой для оценки подлинности вновь выпускаемых серий субстанций разных производителей.

На основе проведенных исследований стабильности в режиме реального времени экспериментально установлен срок годности разработанных фармакопейных стандартных образцов метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b – в течение 2 лет. В течение данного срока профиль пептидной карты и времена удерживания характеристических пиков стабильны.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что разработанные ФСО метиониновой формы интерферона альфа-2b (ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)) и интерферона бета-1b (ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)) позволяют унифицировать и стандартизировать подтверждение подлинности первичной структуры новых серий субстанций разных производителей. Разработаны и утверждены паспорта на данные ФСО.

Получены новые данные, подтверждающие способность фермента «эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8» гидролизовать рЧИФН бета-1b в ацетатном буферном растворе pH 4,50-4,57, что дополняет современные представления о пептидном картировании рекомбинантных белков.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанная методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b с применением фермента «эндопротеиназа Glu-C» и ацетатного буферного раствора может быть использована фармацевтическими предприятиями для оценки подлинности первичной структуры новых серий субстанций рЧИФН бета-1b на этапе готовой субстанции, не содержащей стабилизаторы белковой природы, или на этапе полупродукта до добавления вспомогательных веществ белковой природы.

В ходе исследования установлено, что разработанная методика позволяет выявлять специфичные фрагменты молекулы, отличающие данный белок от рЧИФН бета-1a, включая N-концевую последовательность, и замену аминокислоты в позиции 16(17).

Разработанные фармакопейные стандартные образцы метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)) и рЧИФН бета-1b (ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)) могут быть использованы в качестве образцов сравнения разными фармацевтическими предприятиями для оценки подлинности первичной структуры новых серий субстанций, что способствует единообразию проведения испытаний и стандартизации требований к показателю «Подлинность» однотипных субстанций разных производителей. Благодаря

этому, повышается уровень оценки качества лекарственных препаратов на основе рЧИФН альфа и рЧИФН бета, широко используемых в медицинской практике.

Разработанные фармакопейные стандартные образцы метиониновой формы рЧИФН альфа-2b (ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)) и рЧИФН бета-1b (ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)) внедрены в работу фармацевтических компаний ООО «Фармапарк» и АО «Генериум» (акт внедрения от 18.03.2022), а также ООО НПП «Фармаклон» (акт внедрения от 16.09.2021).

Диссертационная работа выполнена с использованием совокупности современных методов исследований. Достоверность результатов обеспечена достаточным массивом фактических данных, адекватно сформулированными целями и задачами, корректно проведенным статистическим анализом результатов, обоснованными выводами, положениями, рекомендациями. Научные положения и выводы, сформулированные Голощаповой Е.О., логически вытекают из результатов, полученных в ходе диссертационной работы.

По объему проведенных исследований, их новизне и практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.6- Биотехнология.

Комиссия не установила в диссертации и автореферате фактов некорректного заимствования материалов без ссылок на первоисточники. Отчет о проверке на заимствования с помощью системы «Антиплагиат» на сайте www.antiplagiat.ru показал, что оригинальность текста составляет 94,98%, самоцитирование - 0%, цитирование - 0%, заимствование – 5,02%.

Материалы исследования и основные положения диссертационной работы обсуждались на трех конференциях различного уровня, в том числе с международным участием.

Диссертация содержит достоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых изданиях.

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета 64.1.004.01.

В качестве **ведущей организации** предлагается утвердить Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Согласие ведущей организации имеется.

В качестве **официальных оппонентов** предлагаются:

- Шмаров Максим Михайлович - доктор биологических наук (14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология, 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнология)), руководитель лаборатории молекулярной биотехнологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.
- Красильников Игорь Викторович - доктор биологических наук (03.00.23 - Биотехнология), директор по инновациям в биотехнологии Публичного Акционерного Общества «Институт стволовых клеток человека».

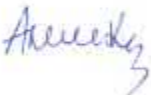
Согласия оппонентов имеются.

Заключение: комиссия Диссертационного совета 64.1.004.01. рекомендует диссертацию Голощаповой Евгении Олеговны «Разработка фармакопейных стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры субстанций интерферонов» по специальности: 1.5.6- биотехнология к приему к защите.

Заключение подготовили члены комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01:

Председатель:

Главный научный сотрудник
лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук, профессор РАН,
член-корреспондент РАН

 А.В. Алешкин

Члены комиссии:

Управляющий директор УК Фармаклон,
доктор медицинских наук, профессор

 А.В. Степанов

Главный научный сотрудник
лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук

 В.М. Лахтин

Главный научный сотрудник
лаборатории иммунобиологических препаратов
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук, профессор

 А.Г. Лютов