

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, директора по инновациям в биотехнологии Публичного Акционерного Общества «Институт стволовых клеток человека», Красильникова Игоря Викторовича на диссертационную работу Голощаповой Евгении Олеговны на тему: «Разработка фармакопейных стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры субстанций интерферонов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

Актуальность темы диссертационного исследования

Одной из актуальных проблем в фармацевтической отрасли в настоящее время является разработка стандартных образцов для оценки качества лекарственных средств. В соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ XIV издания) ОФС.1.7.1.0007.15 «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» и международными требованиями необходима оценка подлинности рекомбинантного белка: биологическая активность и структура белка должны быть подтверждены пригодными методами в сравнении со стандартным образцом (СО). Фармакопейным методом оценки первичной структуры рекомбинантного белка является метод пептидного картирования, позволяющий с точностью до одной аминокислоты охарактеризовать аминокислотную последовательность белка. В связи с этим применение стандартного образца CRS (Стандартный образец EDQM), кат. № I0320301 (безметиониновая форма формы рЧИФН альфа-2b) в качестве стандартного образца сравнения при пептидном картировании для метиониновой формы некорректно, так как пептидные карты данных белков различаются. Отечественными производителями рЧИФН бета-1b подтверждение подлинности методом пептидного картирования не проводится, рассмотрение стандартного образца рЧИФН бета-1a CRS (кат. № Y0001101) в качестве стандартного образца сравнения при разработке методики пептидного картирования рЧИФН бета-1b в силу структурных

различий данных белков некорректно. В связи с этим диссертационная работа Голощаповой Евгении Олеговны «Разработка фармакопейных стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры субстанций интерферонов» является актуальной и оригинальной, имеет важное практическое значение для фармацевтической отрасли.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В результате проведенного Голощаповой Е.О. 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%). Автором также 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 впервые разработан и охарактеризован фармакопейный стандартный образец метиониновой формы рЧИФН альфа-2b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования (ФСО 3.2.00433), который представляет собой замороженный раствор (концентрация 1 мг/мл, объем розлива 0,5 мл) с аттестованной характеристикой в виде абсолютного времени удерживания четвертого пика 33,8–37,0 мин, относительного времени удерживания первого пика 0,61–0,66,

второго пика 0,74–0,78, третьего пика 0,90 – 0,95, пятого пика 1,02–1,03, шестого пика 1,03–1,04, седьмого пика 1,37– 1,43, восьмого пика 1,51–1,59.

Впервые автором разработан и охарактеризован фармакопейный стандартный образец рчИФН бета-1b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования (ФСО 3.2.00447), который представляет собой лиофилизат рчИФН бета-1b без стабилизаторов белковой природы (0,25 мг/флакон) с аттестованной характеристикой в виде абсолютного времени удерживания третьего пика 42,0– 43,2 мин, относительного времени удерживания первого пика 0,61– 0,66, второго пика 0,68– 0,73, четвертого пика 1,04–1,06, пятого пика 1,14–1,15, шестого пика 1,22 –1,24, седьмого пика 1,29 –1,30.

Впервые в исследовании диссертант разработал методику 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. На основе данной методики впервые был разработан ФСО рчИФН бета-1b и установлена его аттестованная характеристика.

Важным результатом является то, что автором экспериментально показана возможность применения разработанных ФСО метиониновой формы рчИФН альфа-2b и рчИФН бета-1b для оценки подлинности вновь выпускаемых серий субстанций разными фармацевтическими предприятиями, а также установлен срок годности данных ФСО (2 года) в результате исследования их стабильности в режиме реального времени.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность результатов диссертационной работы Голощаповой Е.О. обусловлена большим объемом результатов экспериментальных исследований, использованием современных биологических и физико-химических методов испытаний, в том числе высокоэффективной

жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения, корректной статистической обработкой данных.

Положения, выносимые на защиту, в полной мере аргументированы. Выводы научно обоснованы, подтверждены результатами экспериментальных данных и соответствуют содержанию работы.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость диссертационного исследования Голощаповой Е.О. состоит в том, что разработанные фармакопейные стандартные образцы метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b позволяют унифицировать и стандартизовать подтверждение подлинности первичной структуры новых серий фармацевтических субстанций рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b разных производителей. Благодаря этому, повышается уровень оценки качества лекарственных препаратов на основе рЧИФН альфа и рЧИФН бета, широко используемых в медицинской практике. Это позволяет рассматривать актуальность разработки и создания данных ФСО.

Разработанная автором методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b может быть использована фармацевтическими предприятиями для оценки подлинности первичной структуры новых серий субстанций рЧИФН бета-1b на этапе готовой субстанции, не содержащей стабилизаторов белковой природы, или на этапе полупродукта до добавления вспомогательных веществ белковой природы, что представляет собой практическую значимость диссертационной работы Голощаповой Е.О. Кроме того, разработанная методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b с применением фермента «эндопротеиназа Glu-C» и ацетатного буферного раствора 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 и рЧИФН бета-1b внедрены в практическую деятельность отечественных фармацевтических компаний ООО «Фармапарк», АО «Генериум», ООО НПП «Фармаклон».

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Полученные автором результаты представлены в открытой печати в достаточном объеме: 4 статьи в рецензируемых изданиях, 2 статьи – в других изданиях, 3 тезисов – в материалах конференций.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы

Автором проведен анализ международных и отечественных нормативных требований, а также требований нормативной документации производителей субстанций рЧИФН альфа, рЧИФН бета и рЧИФН гамма для выявления проблемных вопросов оценки подлинности их структуры. Автор разработала требования к кандидатам в фармакопейные стандартные образцы метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b, непосредственно принимала участие на всех этапах экспериментальной работы, разработала методику пептидного картирования для подтверждения подлинности первичной структуры молекулы рекомбинантного интерферона бета-1b, осуществила обобщение всех экспериментальных данных и статистическую обработку результатов.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Структура диссертационной работы Голощаповой Е.О. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка используемой литературы, включающего 150

источников, а также приложения. Материалы диссертационной работы изложены на 127 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 26 таблицами и 42 рисунками.

В разделе «Введение» автор представляет актуальность выбранного направления исследования и описывает степень разработанности темы, формулирует цель и задачи работы, а также научную новизну. В ходе исследования использован комплекс современных биологических и физико-химических методов испытаний, в том числе высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия. Сформулированы основные положения, выносимые на защиту, и обоснована достоверность полученных результатов. Диссертант лично принимал активное участие на всех этапах экспериментального исследования, систематизировал полученные данные.

В первой главе «Обзор литературы» автором проанализирована номенклатура лекарственных средств на основе интерферонов и обозначены проблемные вопросы оценки подлинности структуры рекомбинантных интерферонов альфа и бета, входящих в состав фармацевтических субстанций.

Раздел «Результаты собственных исследований» включает две главы.

Во второй главе автор описывает разработку и аттестацию фармакопейного стандартного образца метиониновой формы рекомбинантного интерферона альфа-2b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования, установление его срока годности на основании изучения стабильности в режиме реального времени.

В третьей главе представлена разработка и аттестация фармакопейного стандартного образца рекомбинантного интерферона бета-1b для оценки подлинности первичной структуры молекулы методом пептидного картирования, установление его срока годности на основании изучения стабильности в режиме реального времени. Также представлена разработка и валидация методики пептидного картирования

рекомбинантного интерферона бета-1b, которую применяли для установления аттестованной характеристики данного ФСО.

В разделе «Заключение» автор анализирует полученные данные, сопоставляя с известными данными, подчеркивая актуальность и практическую значимость разработки ФСО метиониновой формы интерферона альфа-2b и интерферона бета-1b.

Выводы диссертационной работы достоверны, убедительны, соответствуют поставленным целям и задачам.

Автореферат диссертационного исследования Голощаповой Е.О. отражает содержание, результаты и выводы работы в полном объеме, соответствует тексту диссертации, в достаточной степени иллюстрирован рисунками и таблицами.

Соответствие специальности

По тематике, методам исследования, объектам исследования, основным положениям и выводам, сформулированным автором, диссертация полностью соответствует специальности 1.5.6. – биотехнология.

Необходимо отметить, что диссертационная работа Е.О. Голощаповой выполнена на высоком методическом уровне с применением современных биологических и физико-химических методов. Следует отметить логическую последовательность изложения материалов диссертационной работы и тщательность изложения результатов. Единственное замечание при чтении диссертации заключается в оформлении рис.1. Диссертант привел аминокислотную последовательность рч ИФН альфа-2b вместе с рчИФН альфа-2a, что усложнило восприятие текста, в последующих рисунках аминокислотные последовательности интерферонов диссертантом разнесены. Это единственное замечание по оформлению работы, которое никак не снижает научной и практической ценности работы.

Замечания и пожелания:

1. В диссертационной работе, по моему мнению, не хватает материала по пептидному картированию исследуемых ФСО с применяемыми стандартами других стран, чтобы оценить возможность применения полученных образцов в качестве международного стандарта.

2. При валидации метода пептидного картирования рчИФН бета-1b с применением фермента «эндопротеиназа Glu-C» и ацетатного буферного раствора для оценки подлинности первичной структуры молекулы не показано влияние на результат различных партий фермента, что может оказывать влияние на процесс проведения валидации.

Однако следует отметить, что указанные выше замечания не принципиальны и не снижают высокого уровня диссертационной работы Е.О. Голощаповой, которая является самостоятельным законченным научным исследованием, результаты которого имеют практическую значимость.

Заключение

Диссертационная работа Голощаповой Евгении Олеговны на тему «Разработка фармакопейных стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры субстанций интерферонов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – биотехнология, выполненная под руководством кандидата биологических наук Устинниковой Ольги Борисовны, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной проблемы, имеющей важное значение для обеспечения фармацевтического рынка эффективными и безопасными лекарственными препаратами – разработаны фармакопейные стандартные образцы для подтверждения подлинности структуры молекулы рчИФН альфа-2b (метиониновая форма) и молекулы рчИФН бета-1b с изучением возможности их применения для оценки качества субстанций разных производителей.

Диссертационная работа Голощаповой Евгении Олеговны по своей актуальности, новизне и практической значимости соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018, № 426 от 20.03.2021, № 1539 от 11.09.2021, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 751 от 26.05.2020), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Голощапова Евгения Олеговна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – биотехнология.

Официальный оппонент:

Директор по инновациям в биотехнологии
Публичного Акционерного Общества
«Институт стволовых клеток человека»
(119333, г. Москва, ул. Губкина, дом 3, стр. 2,
Телефон +7 (495) 646-80-76 (доб. 185), e-mail: kiv06@mail.ru)

доктор биологических наук

Игорь Викторович Красильников

18.10.2022.

Подпись И.В. Красильникова заверяю:



Директор по науке

Публичного Акционерного Общества
«Институт стволовых клеток человека»
(119333, г. Москва, ул. Губкина, дом 3, стр. 2,
Телефон +7 (495) 646-80-76 (доб. 185), e-mail: frolova@nextgene.ru)

Кандидат биологических наук

Фролова Мария Евгеньевна