

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, руководителя лаборатории молекулярной биотехнологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Шмарова Максима Михайловича 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**

Обеспечение фармацевтического рынка необходимым количеством лекарственных средств, в том числе на основе интерферонов (ИФН), получаемых ранее из труднодоступных природных источников, в настоящее время возможно благодаря использованию технологии рекомбинантной ДНК. Действующие вещества лекарственных средств, получаемых с помощью технологии рекомбинантной ДНК, представляют собой белки и пептиды, а также их производные. В настоящее время на фармацевтическом рынке представлены лекарственные препараты на основе рекомбинантных человеческих ИФН (рчИФН), которые широко применяются в медицинской практике. В соответствии с отечественными и международными требованиями биологическая активность и структура рекомбинантного белка должны быть подтверждены пригодными методами в сравнении со стандартным образцом (СО). Фармакопейным методом оценки структуры рекомбинантного белка является метод пептидного картирования, позволяющий с точностью до одной аминокислоты охарактеризовать аминокислотную последовательность белка. При этом применение стандартного образца CRS (Стандартный образец EDQM) кат. № I0320301, представляющего собой безметиониновую форму рчИФН альфа-2b, в качестве СО сравнения при пептидном картировании для метиониновой формы рчИФН альфа-2b некорректно. В нормативной документации производителей методика пептидного картирования с использованием соответствующего СО для подтверждения подлинности структуры рчИФН бета-1b отсутствует. Применение стандартного образца рчИФН бета-1a CRS (Стандартный образец EDQM) кат. № Y0001101, в качестве СО сравнения при пептидном картировании рчИФН бета-1b некорректно. В связи с этим

диссертационная работа Е.О. Голощаповой, направленная на разработку фармакопейных стандартных образцов (ФСО) рЧИФН альфа-2b (метиониновая форма) и рЧИФН бета-1b, является актуальным направлением исследования, способствующим унификации и стандартизации методик оценки подлинности структуры субстанций.

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

В результате данной работы автором 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%). 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, рН и т.д.); соответствие аминокислотной последовательности молекулы теоретическим данным (не менее 95%).

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 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.

Автор впервые 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. Необходимо отметить, что с применением разработанной методики впервые был аттестован ФСО рЧИФН бета-1b.

В результате проведенного исследования для обоснования разработки ФСО метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b автором экспериментально показана возможность применения данных ФСО с установленной аттестованной характеристикой для оценки подлинности вновь выпускаемых серий субстанций в практической деятельности разных фармацевтических предприятий. Изучена стабильность разработанных ФСО в режиме реального времени для установления их срока годности (2 года), в течение которого профиль пептидной карты и время удерживания пиков стабильны.

Представленные в работе данные свидетельствуют о высоком потенциале и практической ценности использования разработанных ФСО в деятельности фармацевтических компаний.

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

Достоверность результатов диссертационной работы Голощаповой Е.О. обусловлена использованием современных биологических и физико-химических методов, большим объемом экспериментальных данных и их корректной статистической обработкой.

Положения, выносимые на защиту, аргументированы, выводы подтверждены экспериментальными данными и научно обоснованы, соответствуют содержанию представленной работы.

#### **Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы**

Разработанные в рамках данной работы фармакопейные стандартные образцы открывают новые возможности для унификации и стандартизации подтверждения 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.

Особый практический интерес представляет собой разработанная методика пептидного картирования рчИФН бета-1b, которая 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. При этом 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). В результате разработки методики получены новые данные, подтверждающие способность фермента «эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8» гидролизовать рчИФН бета-1b в ацетатном буферном растворе рН 4,50-4,57, что дополняет современные представления о пептидном картировании рекомбинантных белков.

Значимым практическим результатом работы является доказанная возможность использования разработанных фармакопейных стандартных образцов (ФСО 3.2.00433 (ОСО 42-28-433)) и (ФСО 3.2.00447 (ОСО 42-28-447)) 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. В связи с этим разработанные ФСО внедрены в практическую деятельность фармацевтических компаний ООО «Фармапарк», АО «Генериум», ООО НПП «Фармаклон».

#### **Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях**

По теме диссертации Голощаповой Е.О. опубликованы 9 научных работ, из которых 4 – статьи в рецензируемых изданиях, 2 статьи – в других изданиях, а также представлены 3 тезисов – в материалах конференций.

#### **Личный вклад автора в разработку научной проблемы**

Автором сформулированы цель и задачи исследования, проведена значительная часть лабораторных исследований, разработана методика пептидного картирования рекомбинантного интерферона бета-1b для оценки подлинности первичной структуры молекулы, выполнено обобщение всех результатов экспериментальной работы и проведена статистическая обработка данных.

## Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка используемой литературы, приложения. Общий объем диссертации, включая 26 таблиц и 42 рисунка, составляет 127 страниц. Список литературы состоит из 36 отечественных и 114 зарубежных источников.

*Во введении* обоснована актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования, представлены материалы исследования, описаны основные физико-химические методы исследования.

*Первая глава* освещает проблемные вопросы оценки подлинности структуры рекомбинантных интерферонов альфа и бета, входящих в состав фармацевтических субстанций, в том числе отсутствие международных стандартных образцов для оценки подлинности первичной структуры молекул рекомбинантного интерферона альфа-2b (метиониновая форма) и интерферона бета-1b, отсутствие методики пептидного картирования интерферона бета-1b в Европейской Фармакопее и нормативной документации производителей данного типа субстанций. Представлены субстанции и препараты интерферонов, зарегистрированные в Российской Федерации, а также требования международных и отечественных документов к оценке их качества.

*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. Представлена разработка требований к кандидату в фармакопейный стандартный образец, обоснование его выбора и формы выпуска, результаты оценки его качества. Приводит подробные данные по установлению аттестованной характеристики ФСО в виде диапазонов абсолютного и относительного времени удерживания характеристических пиков. В качестве подтверждения установленного срока годности ФСО (2 года) приводит данные результатов оценки его стабильности в режиме реального времени. Автор демонстрирует возможность применения разработанного ФСО для оценки подлинности субстанций разных производителей.

*Третья глава* посвящена разработке ФСО рекомбинантного интерферона бета-1b для оценки подлинности первичной структуры методом пептидного картирования. Представлена разработка требований к кандидату

в фармакопейный стандартный образец, обоснование его выбора и формы выпуска, результаты оценки его качества. Автор предлагает разработанную в рамках данной работы методику пептидного картирования рекомбинантного интерферона бета-1b для оценки подлинности первичной структуры, так как методика пептидного картирования интерферона бета-1b в Европейской Фармакопее и нормативной документации производителей субстанций отсутствует. В качестве подтверждения пригодности разработанной методики автор описывает оценку ее специфичности и прецизионности (валидация). Приводит подробные данные по установлению аттестованной характеристики ФСО в виде диапазонов абсолютного и относительного времени удерживания характеристических пиков с применением разработанной методики. В качестве подтверждения установленного срока годности ФСО (2 года) приводит данные результатов оценки его стабильности в режиме реального времени. Автор демонстрирует возможность применения разработанного ФСО для оценки подлинности субстанций разных производителей.

*Выводы* обоснованы и подтверждены полученными результатами. Сформулированы практические рекомендации, которые важны для отечественного здравоохранения.

Автореферат отражает основное содержание диссертации, иллюстрирован рисунками и таблицами, которые описывают значимые результаты работы.

Обобщая сказанное, можно отметить, что представленная работа является исследованием обладающим новизной, выполненным в целом корректно и на высоком методическом уровне, результаты которого представляют собой практический интерес, что дает возможность сделать заключение о высоком уровне научной и профессиональной подготовки соискателя.

### **Соответствие специальности**

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

В процессе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие замечания:

- в обсуждении результатов работы не приведены обоснования использования для выбора фермента и отработки условий пептидного картирования рчИФН бета-1b образца 6 (рчИФН бета-1b, субстанция, не содержащая стабилизаторы белковой природы производства ЗАО «Биокад»), тогда как кандидатом в ФСО был выбран полупродукт рчИФН бета-1b производства АО «Генериум», отобранный на финальной стадии очистки до добавления стабилизатора белковой природы – ЧСА;

- в работе не была показана возможность применения разработанных ФСО для оценки подлинности вновь выпускаемых серий субстанций рекомбинантных человеческих ИФН зарубежных производителей.

Также в качестве дискуссии хотелось бы задать автору вопрос. Исходя из приведенных в работе результатов, для методики пептидного картирования важной характеристикой является источник и активность соответствующего протеолитического фермента. Как могут быть использованы разработанные и аттестованные ФСО в условиях снятия с производства указанного в методике фермента или отказа производителя поставлять этот фермент в Россию?

Отмеченные замечания не носят принципиального характера и не снижают положительную оценку диссертационной работы.

### **Заключение**

Подводя итог, отмечу, что, несмотря на сделанные замечания, диссертационная работа Голощаповой Евгении Олеговны на тему «Разработка фармакопейных стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры субстанций интерферонов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – биотехнология, является завершенной научно-квалификационной работой, которая 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:**

Руководитель лаборатории молекулярной биотехнологии  
федерального государственного бюджетного учреждения  
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии  
и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18,  
Телефон +7 (495) 193-61-35, e-mail: [mshmarov@gamaleya.org](mailto:mshmarov@gamaleya.org))

доктор биологических наук



Максим Михайлович Шмаров

19.10.2022

*Подпись М.М. Шмарова заверяю:*

Ученый секретарь

федерального государственного бюджетного учреждения  
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии  
и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18,  
Телефон +7 (499) 193-71-71, e-mail: [kozhevnikova@gamaleya.org](mailto:kozhevnikova@gamaleya.org))

кандидат биологических наук

Людмила Кондратьевна Кожевникова

