



«Утверждаю»

Директор
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»
(ФИЦ Биотехнологии РАН)
Доктор биологических наук
Алексей Николаевич Федоров



«28» сентября 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук о научно-практической ценности диссертационной работы 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 (биологические науки)

Актуальность темы выполненной работы

Обеспечение фармацевтического рынка необходимым количеством лекарственных средств на основе интерферонов (ИФН) в настоящее время возможно благодаря применению технологии рекомбинантной ДНК. Эта технология позволяет создавать модифицированные продукты, которые могут отличаться своими свойствами от их природных аналогов, или абсолютно новые продукты.

В настоящее время на фармацевтическом рынке представлены лекарственные средства, содержащие в качестве основного действующего вещества рекомбинантные человеческие интерфероны (рчИФН) альфа -2a, альфа-2b, бета-1a, бета-1b и гамма-1b.

В соответствии с требованиями нормативной документации, необходимо подтверждение подлинности рекомбинантного белка: биологическая активность и структура белка должны быть подтверждены пригодными методами в сравнении со стандартным образцом (СО).

Метод пептидного картирования является чувствительным и экономически приемлемым методом определения подлинности. В большинстве случаев данный метод позволяет определить разницу в один аминокислотный остаток. Таким образом, применение стандартного образца

CRS (Стандартный образец EDQM), кат. № 10320301, представляющего собой безметиониновую форму рчИФН альфа-2b, в качестве стандартного образца сравнения при пептидном картировании для метиониновой формы рчИФН альфа-2b, некорректно. Отечественными производителями рчИФН бета-1b подтверждение подлинности методом пептидного картирования не проводится, что на сегодняшний день не соответствует актуальным фармакопейным требованиям. Кроме того, рассмотрение стандартного образца рчИФН бета-1a CRS (Стандартный образец EDQM), кат. № Y0001101, в качестве стандартного образца сравнения при разработке методики пептидного картирования рчИФН бета-1b в силу структурных различий данных белков также некорректно.

Применение отечественным производителем при подтверждении подлинности структуры фармацевтической субстанции рчИФН гамма-1b методом пептидного картирования стандартного образца CRS (Стандартный образец EDQM), кат. № 10320330, представляющего собой субстанцию рекомбинантного интерферона гамма-1b, является корректным.

Таким образом, диссертационная работа Голощаповой Евгении Олеговны посвящена актуальной проблеме решения значимых вопросов, связанных с разработкой фармакопейных стандартных образцов (ФСО) рчИФН альфа-2b (метиониновая форма) и рчИФН бета-1b для оценки подлинности структуры соответствующих фармацевтических субстанций, что имеет практическое значение для фармацевтической отрасли.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе впервые представлены разработанные 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 представлены впервые разработанные 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%).

В ходе исследования 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.

Разработана и предложена методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b для оценки подлинности первичной структуры молекулы. Методика предполагает использование фермента «эндопротеиназа Glu-C» и ацетатного буферного раствора.

На основании полученных пептидных карт автором экспериментально показана возможность применения разработанных фармакопейных стандартных образцов с установленной аттестованной характеристикой для оценки подлинности субстанций в практической деятельности разных фармацевтических компаний.

В ходе работы 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 – 2 года, в течение которого профиль пептидной карты и время удерживания пиков стабильны.

Сформулированные автором положения, выводы и практические рекомендации имеют научное обоснование и соответствуют результатам проведенного диссертационного исследования.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Работа выполнена в рамках государственных заданий ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России на осуществление прикладных научных исследований и разработок в период с 2015 года по настоящее время при проведении следующих научно-исследовательских работ:

- Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств (№ госрегистрации 115111740007);
- Научное обоснование перспективных направлений совершенствования методологии экспертизы лекарственных средств (№ госрегистрации ГР АААА-А18-118021590049-0);
- Разработка перспективных направлений совершенствования экспертизы качества, эффективности и безопасности биологических лекарственных препаратов и стандартизация методов их оценки (№ госрегистрации 121022000147-4).

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

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)) позволят унифицировать и стандартизовать подтверждение подлинности первичной структуры новых серий фармацевтических субстанций разных производителей методом пептидного картирования. Благодаря этому, повысится уровень оценки качества лекарственных препаратов на основе рЧИФН альфа и рЧИФН бета, широко используемых в медицинской практике.

Полученные в результате данной работы новые данные о способности фермента «эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8» гидролизовать рЧИФН бета-1b в ацетатном буферном растворе (рН 4,50-4,57), дополняют современные представления о пептидном картировании рекомбинантных белков.

Разработанная методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b обеспечит возможность оценки подлинности первичной структуры новых серий субстанций рЧИФН бета-1b фармацевтическими предприятиями на этапе готовой субстанции, не содержащей стабилизаторов белковой природы, или на этапе полупродукта до добавления вспомогательных веществ белковой природы. При этом разработанная методика пептидного картирования рЧИФН бета-1b с применением фермента «эндопротеиназа Glu-

С) и ацетатного буферного раствора позволяет выявлять специфичные фрагменты молекулы, отличающие данный белок от рЧИФН бета-1а, 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 фармацевтических компаний ООО «Фармапарк» и АО «Генериум» (акт внедрения от 18.03.2022), а также ООО НПП «Фармаклон» (акт внедрения от 16.09.2021).

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикаций в рецензируемых изданиях

Достоверность работы обеспечена доступностью данных диссертационного исследования в достаточном объеме, наличием подробной информации об используемых методах исследования с указанием источников литературы для описания экспериментальной части работы. В работе использованы современные биологические и физико-химические методы исследования, в том числе высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия высокого разрешения, с применением статистической обработки полученных результатов. Эксперименты проведены в достаточных повторях и с соответствующими контролями, проведена надлежащая статистическая обработка результатов.

Разработанные фармакопейные стандартные образцы метиониновой формы рЧИФН альфа-2b и рЧИФН бета-1b внедрены в практическую деятельность фармацевтических компаний ООО «Фармапарк» и АО «Генериум» (акт внедрения от 18.03.2022), ООО НПП «Фармаклон» (акт внедрения от 16.09.2021).

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 4 – статьи в рецензируемых изданиях, 2 статьи – в других изданиях, 3 тезисов – в материалах конференций.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Разработанные в результате диссертационной работы Голощановой Е.О. 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 на фармацевтических предприятиях для оценки подлинности первичной структуры молекулы вновь выпускаемых серий субстанций методом пептидного картирования.

Кроме того, использование предложенной методики пептидного картирования в практике фармацевтических предприятий для оценки подлинности первичной структуры молекулы рчИФН бета-1b на этапе готовой субстанции или полупродукта до добавления вспомогательных веществ белковой природы позволит повысить уровень оценки качества для обеспечения эффективности и безопасности лекарственных средств, выпускаемых на основе рчИФН бета-1b.

Соответствие специальности

Тема диссертации, цели, задачи, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности: 1.5.6. – биотехнология.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста, иллюстрирована 26 таблицами и 42 рисунками. Работа представлена следующими структурными элементами: введение, обзор литературы, две главы собственных исследований, заключение о выполненных исследованиях, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, изложен список сокращений, представлен список используемой литературы (150 источников), а также приложение.

Заключение

Диссертационная работа Евгении Олеговны Голощаповой 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 (биологические науки), выполненная под руководством кандидата биологических наук, Ольги Борисовны Устинниковой, является законченным научным исследованием, содержащим важные вопросы и решения, касающиеся разработки фармакопейных стандартных образцов для подтверждения подлинности первичной структуры молекулы метиониновой формы рчИФН альфа-2b и рчИФН бета-1b.

Диссертационная работа Голощаповой Евгении Олеговны на тему «Разработка фармакопейных стандартных образцов для подтверждения подлинности структуры субстанций интерферонов» по актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней»,

утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями 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.

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 (биологические науки) и отзыв обсуждены и утверждены на межлабораторной конференции отдела метаболической инженерии в составе: лаборатория молекулярной биотехнологии, лаборатория инженерной энзимологии, группа молекулярного моделирования и ЦКП промышленной биотехнологии федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) (протокол № 3 от 28 сентября 2022 года).

Отзыв составил:

Старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии
Федерального государственного учреждения «Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук» (Российская Федерация, г. Москва, Ленинский
проспект, д. 33, стр. 2, +7 (495) 954-52-83, info@fbras.ru)

кандидат химических наук

Алексей Валерьевич Липкин

Подпись Липкина Алексея Валерьевича заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук» (Российская Федерация,
г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, +7 (495) 954-52-83,
info@fbras.ru).
кандидат биологических наук



Александр Федорович Орловский