

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 докторской диссертации Устинниковой Ольги Борисовны на тему: «Совершенствование методологии оценки физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности: 1.5.6. - биотехнология

Научный консультант: Волкова Рауза Асхатовна, доктор биологических наук (03.00.23 - биотехнология), начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Диссертационная работа посвящена совершенствованию методологии контроля качества биологических лекарственных препаратов путем разработки новых и актуализации существующих нормативных документов, включающих требования к оценке подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных терапевтических белков и требований к процедуре аттестации стандартных образцов, а также разработке стандартных образцов, предназначенных для оценки подлинности структуры рекомбинантных фактора свертывания крови VII активированного и интерферонов (альфа и бета) и разработке унифицированных методик контроля актуальных вспомогательных веществ - полисорбата 80, аминокислот и алюминия.

Проведенный О.Б. Устинниковой научный анализ современного состояния оценки подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций высоко востребованных рекомбинантных терапевтических белков позволил разработать классификацию и фармакопейные требования к оценке подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных факторов свертывания крови, фармакопейные требования к номенклатуре контролируемых показателей качества рекомбинантных терапевтических белков модифицированных PEG и фармакопейные требования к оценке подлинности первичной структуры рекомбинантных интерферонов альфа-2b и бета-1b. Разработанные фармакопейные требования гармонизированы с международными требованиями и отражают специфику отечественных производителей. Показано, что при оценке подлинности структуры рекомбинантного интерферона альфа-2b необходимо учитывать наличие N-концевого метионина и использовать стандартный образец аналогичной структуры; при оценке подлинности структуры рекомбинантного интерферона бета-1b необходимо учитывать его существенные структурные отличия от рекомбинантного интерферона бета-1a, связанные с этим физико-химические свойства и использовать стандартный образец аналогичной структуры; оценка качества рекомбинантных терапевтических белков модифицированных PEG должна включать характеристики используемого полимерного реагента, побочных продуктов производства, исходного белка и PEG-модифицированного белка по показателям, характеризующим степень модификации, позиционные изомеры, родственные соединения и посторонние примеси. Разработанные требования изложены в форме общих фармакопейных статей,

предназначенных для Государственной фармакопеи Российской Федерации и имеющих статус «вводится впервые».

Анализ нормативно-правовых документов, регулирующих требования к стандартным образцам биологических лекарственных препаратов, выявил отсутствие требований к аттестации стандартных образцов, предназначенных для подтверждения подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных терапевтических белков. Разработанные О.Б. Устинниковой требования, представленные в виде универсального алгоритма, предназначены для разработки индивидуальных программ аттестации, не зависят от наличия международных стандартных образцов и унифицируют требования к материалам по стандартным образцам, представляемым в регистрационном досье на препарат, что оптимизирует процесс регистрационной и пострегистрационной экспертизы.

В ходе выполнения данного исследования, на основании разработанного алгоритма, впервые были разработаны индивидуальные программы аттестации рекомбинантных интерферонов альфа-2b, бета-1b и рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa активированного. Программы реализованы аттестацией фармакопейных стандартных образцов: рекомбинантного интерферона альфа-2b, содержащего N-концевой метионин - ФСО.3.2.00433; рекомбинантного интерферона альфа-2b, не содержащего N-концевой метионин - ФСО.3.2.00456; рекомбинантного интерферона бета-1b - ФСО.3.2.00477, предназначенных для оценки подлинности аминокислотной последовательности методом пептидного картирования, а также и стандартного образца предприятия рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa, предназначенного для оценки подлинности аминокислотной последовательности и профиля гликозилирования. Разработана и защищена патентом методика пептидного картирования рекомбинантного интерферона бета-1b, включающая условия ферментативного гидролиза, учитывающие стабильность данного белка при кислых значениях pH и позволяющие, в комплексе с последующим высокоэффективным хроматографическим разделением, контролировать подлинность первичной структуры данного белка (Патент на изобретение РФ № 2780675).

Оптимизация количественной оценки актуальных вспомогательных веществ в составе биологических лекарственных препаратов реализована разработкой унифицированных методик. Впервые, на основе метода высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия разработана и защищена патентом методика количественного определения глицина (Патент на изобретение РФ № 2700831) и аминокислот в составе их смеси, основанная на использовании доступного для всех производителей УФ-детектирования продуктов хроматографического разделения без получения химических производных аналита, селективно в рамках одного анализа. Впервые, на основе метода эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии, разработана и защищена патентом методика количественного определения полисорбата-80, основанная на использовании доступного для всех производителей УФ-детектирования продуктов хроматографического разделения без получения химических производных аналита (Патент на изобретение РФ № 2812788). Впервые, на основе метода атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией, разработана и защищена патентом методика количественного определения ионов алюминия, основанная на

использовании для электротермической ионизации щелочного гидролизата (Патент на изобретение РФ № 2799235).

Теоретическая значимость исследования заключается в использовании комплексного подхода к совершенствованию методологии оценки физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов, что способствует формированию единой регуляторной платформы обращения лекарственных средств в рамках задач Евразийского экономического союза благодаря наличию гармонизированных фармакопейных требований; обеспечивает технологический суверенитет Российского биофармацевтического рынка благодаря разработке первичных стандартных образцов, предназначенных для контроля подлинности первичной структуры и значимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных терапевтических белков; оптимизирует процесс регистрационной и пострегистрационной экспертизы благодаря унификации контроля качества вспомогательных веществ.

Полученные О.Б. Устинниковой в ходе исследования данные, полученные методом масс-спектрометрического анализа, расширяют представление об аминокислотной структуре пептидов, формирующих характеристические пики на пептидных картах рекомбинантных интерферонов альфа-2b (содержащих и не содержащих N-концевой метионин) и бета-1b, а также на пептидной карте рекомбинантного фактора VII активированного. Расширены представления о возможных вариациях посттрансляционной модификации - N-гликозилирования молекулы рекомбинантного фактора VII активированного.

Полученные результаты внедрены в научную и практическую деятельность ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (акт внедрения ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России от 07.12.2023) и систематизированы в следующих научно-методических изданиях и проектах нормативных документов федерального уровня (фармакопейных статьях), предназначенных для включения в Государственную фармакопею РФ: «Руководство по экспертизе лекарственных средств». Том IV.-М.: Полиграф-Плюс, 2014 - 172 с. Глава 8 - «Разработка биоаналогичных (биоподобных) препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции интерферон бета», Глава 9 - «Разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих в качестве фармацевтической субстанции интерферон альфа»; «Руководство по экспертизе лекарственных препаратов крови», раздел «Рекомбинантные факторы свёртывания крови» и общая фармакопейная статья «Факторы свертывания крови человека (генно-инженерные, рекомбинантные)»; «Руководство по экспертизе иммунобиологических лекарственных препаратов» Глава 11 – «Количественное определение аминокислот в иммунобиологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия» и общая фармакопейная статья «Определение аминокислот в препаратах иммуноглобулинов методом гидрофильного взаимодействия»; «Руководство по экспертизе лекарственных средств для медицинского применения», раздел «Общие требования к экспертной оценке качества лекарственных препаратов на основе рекомбинантных интерферонов альфа, рекомбинантных интерферонов бета и PEG-модифицированных рекомбинантных интерферонов», общие фармакопейные статьи «Интерфероны» и «Пегилированные (конъюгированные) терапевтические белки, полученные с применением технологии рекомбинантной ДНК» и

фармакопейная статья «Интерферон человеческий рекомбинантный альфа-2b, субстанция раствор, раствор замороженный»; Руководство «Требования к стандартным образцам в досье на биологические лекарственные средства», раздел 2, подраздел 2.1. «Рекомендации по аттестации стандартных образцов для подтверждения подлинности рекомбинантных терапевтических белков». Разработанный алгоритм аттестации стандартных образцов, предназначенных для оценки подлинности структуры рекомбинантных терапевтических белков, используется АО «ГЕНЕРИУМ» при разработке индивидуальных программ аттестации стандартных образцов предприятия рекомбинантного фактора свертывания крови VIIa на (акт внедрения от 15.09.2021), ООО «НПП «Фармаклон» (акт внедрения от 08.06.2022) и ООО «Фармапарк» (акт внедрения от 20.09.2021) при разработке индивидуальных программ аттестации стандартных образцов предприятия интерферона альфа-2b. Разработанный и аттестованный стандартный образец предприятия для оценки подлинности аминокислотной последовательности и профиля гликозилирования рекомбинантного седьмого активированного фактора свертывания крови используется ООО «МБЦ «ГЕНЕРИУМ» (акт внедрения от 25.04.2019). Разработанный и аттестованный фармакопейный стандартный образец рекомбинантного интерферона альфа-2b, содержащего N-концевой метионин (ФСО 3.2.00433), применяется ООО «Фармапарк» (акт внедрения от 20.09.2021) и ООО «Фармаклон» (акт внедрения от 30.12.2021). Разработанный и аттестованный фармакопейный стандартный образец рекомбинантного интерферона альфа-2b, не содержащего N-концевой метионин (ФСО.3.2.00456), применяется ООО «Ферон» (акт внедрения от 22.01.2024). Разработанный и аттестованный фармакопейный стандартный образец рекомбинантного интерферона бета-1b (ФСО 3.2.00447) применяется АО «ГЕНЕРИУМ» (акт внедрения от 15.09.2021). Разработанная и валидированная методика определения полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах методом эксклюзионной ВЭЖХ применяется при оценке качества препаратов моноклональных антител по показателю качества «Полисорбат 80» ОА «ГЕНЕРИУМ» (акт внедрения от 20.02.2024). Разработанная и валидированная методика селективного определения аминокислот в биологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия» применяется ОА «ГЕНЕРИУМ» при оценке качества препаратов терапевтических рекомбинантных белков, в том числе моноклональных антител по показателям «Количественное содержание аргинина», «Количественное содержание гистидина», «Количественное содержание метионина» (акт внедрения от 22.12.2023).

Достоверность полученных автором результатов обеспечивается значительным объемом проведенных исследований, применением комплекса высокотехнологичных физико-химических методов исследования, использованием широкой номенклатуры медицинских биопрепаратов для подтверждения области применения результатов исследования, получением экспериментальных данных в лаборатории, входящей в состав Испытательного центра, имеющего аккредитацию системы менеджмента качества согласно ГОСТ ISO 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий», необходимую для разработки и аттестации стандартных образцов, имеющих статус фармакопейных. Научные положения и выводы, сформулированные О.Б. Устинниковой логически вытекают из результатов, полученных в ходе исследований.

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

Комиссия не установила в диссертации и автореферате фактов некорректного заимствования материалов без ссылок на первоисточники. Анализ проверки с помощью системы «Антиплагиат» показал, что оригинальный текст составляет 93,86%, самоцитирование –5,77%, цитирование –0,37%.

Материалы диссертации доложены и представлены на 4 международных, всероссийских и региональных научно-практических конференциях.

Диссертация не содержит недостоверных сведений об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. По материалам диссертации опубликовано 23 печатные работы, в том числе 18 статей в рецензируемых изданиях. Получено 4 патента на изобретения РФ.

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета 64.1.004.01.

В качестве **ведущей организации** предлагается утвердить Федеральное казенное учреждение науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора). Согласие ведущей организации имеется.

В качестве официальных оппонентов предлагаются:

Ярыгин Константин Никитич – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук (03.01.04 – биохимия), профессор, заведующий лабораторией клеточной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (ФГБНУ ИБМХ).

Шмаров Максим Михайлович – доктор биологических наук (14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология; 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)), руководитель лаборатории молекулярной биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Бонарцев Антон Павлович – доктор биологических наук (1.5.6 – биотехнология), доцент кафедры биоинженерии и руководителя группы «Медицинские биополимеры» биологического факультета Федерального государственного бюджетного учреждения

высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М.В. Ломоносова).

Заключение: комиссия Диссертационного совета 64.1.004.01 рекомендует диссертацию Устинниковой Ольги Борисовны «Совершенствование методологии оценки физико-химических показателей качества биологических лекарственных препаратов» по специальности 1.5.6. – биотехнология (биологические науки) к приему к защите.

Заключение подготовили члены комиссии Диссертационного совета Д 64.1.004.01:

Председатель:

Главный научный сотрудник
лаборатории клинической микробиологии
и биотехнологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора,
Доктор медицинских наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ

С.С. Афанасьев

Члены комиссии:

Главный научный сотрудник
лаборатории диагностики и
профилактики инфекционных заболеваний
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского
Роспотребнадзора,
Доктор биологических наук

А.М. Затевалов

Главный научный сотрудник
лаборатории клинической микробиологии
и биотехнологии бактериофагов
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

Заведующий кафедрой иммунологии
и биотехнологии МВА имени К.И. Скрябина
Минсельхоза России,
Доктор биологических наук, профессор

Н.В. Пименов