«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор Абдулганиева Д.И.

_____ Абдулганиева Д.И.

«28» февраля 2021 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертационную работу Тарасова Вадима Владимировича на тему: «Теоретические и экспериментальные основы разработки активной фармацевтической субстанции и лекарственной формы на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа для лечения целиакии», представленную в диссертационный совет ДСУ.208.002.01 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.01 – Технология получения лекарств

Актуальность темы выполненной работы

Актуальной задачей современной фармацевтики является разработка лекарственных препаратов для терапии неизлечимых заболеваний, к которым

относится целиакия (глютеновая энтеропатия) – хроническая генетически детерминированная аутоиммунная Т-клеточно-опосредованная энтеропатия. Распространенность целиакии в популяции варьирует от примерно 1:100 до 1:300 в разных частях мира. Единственным методом лечения целиакии и профилактики ее осложнений в настоящее время является строгая пожизненная безглютеновая диета. В настоящее время ведутся исследования по разработке препаратов для заместительной терапия на основе ферментов, способных расщеплять глютены и продукты их неполного гидролиза в желудочно-кишечном тракте до неиммуногенных и нетоксичных пептидов.

Такие препараты в настоящее время на фармацевтическом рынке в России не представлены. Перспективными объектами для разработки лекарственных средств данной направленности действия являются папаин-подобные цистеиновые протеиназы, выделенные из растительных семян, что связано с наличием у них эндопептидазной активности. Ферменты могут осуществлять гидролиз пептидов глютена белка пшеницы, а также родственных запасных белков ржи и ячменя. В настоящее время имеются данные о разработке за рубежом ряда средств на основе протеаз рекомбинантного и микробиологического происхождения и клинических исследованиях препаратов.

Однако отмечается, что для них характерна низкая скорость ферментативного расщепления глютена и иммунотоксичных проламинов в желудочно-кишечном тракте, в связи с чем рекомендуются сравнительно высокие дозы, что делает лечение более затратным.

Целью исследования являются теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение методологии проектирования и разработки инновационного лекарственного препарата на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа для лечения целиакии с учетом исследований по формированию целевого профиля качества готовой лекарственной формы.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа выполнена в соответствии темой государственного задания и планом научно-исследовательской работы ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Государственным контрактом от 28.08.2015 № 14.N08.11.1037 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», грантом Российского научного фонда № 16-15-10410, грантом Фонда содействия инновациям (Соглашение от 21.03.2019 № 2851ГС1/45385), исследовательской работой общества с ограниченной ответственностью «Альфа-Тритикаин».

Научная новизна исследования и полученных результатов

Диссертационная работа Тарасова В.В. является самостоятельным исследованием, научные положения, результаты и выводы логичны и обоснованы, что позволяет считать их значимыми для науки и практики. Разработанные методики валидированы, полученные результаты статистически обработаны с применением программного обеспечения Excel и Origin 6.1.

Научная новизна подтверждается использованием современных методов анализа (ВЭЖХ, электрофорез в полиакриламидном геле, метод молекулярной гибридизации) и оценки фармакологической активности на моделях *invitro*.

Впервые автором экспериментально произведена разработка фармацевтической субстанции рекомбинантного белка тритикаин-альфа, в частности, выбор состава криопротектора для стабилизации в процессе лиофилизации, разработана технологическая схема процесса получения субстанции и определены критические параметры процесса.

Разработаны показатели оценки качества фармацевтической субстанции с учетом особенностей ее получения (лиофилизат рекомбинантного белка), биологической активности (протеолитическая активность) и перорального пути введения. Проведена предварительная валидация разработанных методик количественного определения, что подтвердило правильность их использования для оценки качества.

Впервые предложены методики оценки специфической фармакологической активности субстанции и лекарственного препарата при целиакии *in vitro*: обоснована модельная система – монослой дифференцированных клеток Caco-2, соответствующих эпителиоцитам кишечника человека, оптимизирован протокол проведения экспериментальных исследований. Определены наиболее показательные и информативные параметры для регистрации действия тритикаин-альфа на модельную систему: уровень трансэпителиального сопротивления, выход белка зонулина, пролиферативная активность клеток, а также модельный токсический агент – модельный пептид p31-43 (альмабион), относящийся к группе токсичных глиадиновых пептидов.

В результате экспериментов *in vitro* и *in vivo* впервые доказана специфическая активность рекомбинантного белка тритикаин-альфа: способность расщеплять белковые компоненты клейковины (α-глиадин, γ-глиадин, ω-глиадин и глютенин).

Установлена минимальная эффективная доза для мышей. Исследованы параметры безопасности: оценена острая токсичность, показано отсутствие хронической токсичности, аллергизирующего действия, влияния на гуморальное звено иммунитета, потенциальной мутагенной и канцерогенной активности, доказана репродуктивная и эмбриональная безопасность субстанции тритикаин-альфа.

На основе экспериментальных исследований в рамках концепции Quality-by-Design (QbD) впервые разработана стабильная лекарственная

форма рекомбинантного белка тритикаин-альфа – твердые капсулы, являющиеся инновационным препаратом.

Научную новизну работы подтверждают патенты на изобретения РФ (№2674763, 2576322) и приоритетные заявки на международное изобретение (PCT/RU2018/050123 от 05.10.2018, PCT/RU2018/050071 от 25.06.2018).

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Автором предложена и экспериментально апробирована методология проектирования препарата на основе рекомбинантного белка, которая может быть применена в качестве перспективного инструмента для эффективного проведения научных исследований и фармацевтической разработки аналогичных препаратов. Продемонстрировано, что использование подхода QbD в производстве препарата позволяет установить оптимальные критерии приемлемости (с возможностью постоянного улучшения), получать лекарственный препарат с прогнозируемым качеством при сниженных рисках.

Практическую значимость данного исследования подтверждают разработанные *in vivo* и *in vitro* модели целиакии для изучения специфической активности лекарственных препаратов на основе протеолитических ферментов с эндопептидазной активностью.

Разработаны критерии оценки качества и проекты нормативной документации на субстанцию тритикаин-альфа и готовую лекарственную форму. Для качественного анализа рекомендована методика на основе ВЭЖХ, которая предназначена для идентификации рекомбинантного белка тритикаин-альфа как в субстанции, так и в лекарственном препарате. Для количественного определения содержания рекомбинантного белка тритикаин-альфа разработана методика с использованием BCA-реагента.

Проведен технологический трансфер лабораторных разработок для проведения масштабирования на опытно-производственный участок ООО «АЛЬФА-Т».

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен выбор темы исследования, сформулированы цель и задачи; разработан и реализован план проведения экспериментальных исследований; осуществлены обработка и анализ экспериментальных данных, на основании которых подготовлены научные публикации и доклады, разработана нормативная документация на лекарственный препарат, сформулированы общие выводы; внедрены результаты исследований.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные Тарасовым В.В. в ходе выполнения диссертационной работы результаты могут быть использованы как в практической фармации, так и при проведении научных исследований, в частности при разработке лекарственных препаратов на основе рекомбинантного белка, а также препаратов с протеолитической активностью для лечения целиакии. Кроме того, перспективным следует считать их использование в курсах биотехнологии, фармацевтической технологии и фармацевтической химии в профильных учебных заведениях.

Результаты данной работы изложены в учебных пособиях и используются в учебном процессе кафедры фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина, кафедры биотехнологии Института трансляционной медицины и биотехнологии, Института молекулярной медицины, кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

В учебном процессе кафедры фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина также используются материалы монографий:

Жизненный цикл лекарственных средств // П.М. Гершович, А.Н. Лукашев, В.А. Мануйлов, А.А. Свистунов, Н.В. Чуракова, Я.О. Устюгов, В.В.

Тарасов, Р.А. Иванов, В.А. Меркулов, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир, В.Д. Мосягин, В.Б. Иванов, Д.В. Горячев, А.А. Замятнин. — М.: Лаборатория знаний, 2018. — 95 с.

Рекомендации по организации производства, оценке качества, проведению доклинических и клинических исследований генотерапевтических лекарственных препаратов // П.М. Гершович, А.Н. Лукашев, В.А. Мануйлов, А.А. Свистунов, Н.В. Чуракова, Я.О. Устюгов, В.В. Тарасов, Р.А. Иванов, В.А. Меркулов, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир, В.Д. Мосягин, В.Б. Иванов, Д.В. Горячев, А.А. Замятнин. — М.: Лаборатория знаний, 2018. — 95 с.

Вышеуказанные результаты могут быть использованы в деятельности фармацевтических компаний для дополнительной подготовки сотрудников, а также при реализации научно-практических задач.

Характеристика публикаций по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы две монографии, 18 научных работ, в том числе 2 патента на изобретения Российской Федерации; 2 монографии, 2 заявки на международное изобретение; 10 статей опубликовано в изданиях, включенных в Перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук.

Содержание диссертации и ее завершенность

Диссертационная работа включает 5 глав, изложена на 338 страницах, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, общих выводов, списка литературы (включает 244 источника, в том числе 78 — на иностранных языках) и приложений. Работа иллюстрирована 67 таблицами и 53 рисунками.

Во введении автором отражена актуальность исследования, представлена научная новизна, сформулированы цели и задачи исследования,

практическая и теоретическая значимость работы, положения, выносимые на защиту, результаты апробации и внедрения.

В первой главе представлена концепция конструирования и разработки инновационного лекарственного препарата на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа. Охарактеризованы современные подходы к экспериментальному моделированию целиакии, а также отражена роль эндопептидаз в протеолизе глютена. Подробно описан иммунопатогенез целиакии и комплекс механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа. Уделено внимание роли токсичных и иммуногенных глиалиновых пептидов в развитии заболевания, роли интерлейкина 15, хемокинового рецептора CXCR3 в реализации эффектов глиадиновых пептидов при целиакии. Автором описаны современные подходы к экспериментальному моделированию целиакии на животных (модели *in vivo*) и клеточные модели (модели *in vitro*), выявлена необходимость разработки видоспецифической клеточной модели патологического состояния для проведения предварительных исследований *in vitro*.

Во второй главе описаны объекты исследования и методы проведения исследования. Использованные вспомогательные вещества, реактивы и материалы соответствуют требованиям нормативной документации.

В третьей главе представлены данные о разработке состава и технологии получения субстанции тритикаин-альфа. Отражены результаты получения рекомбинантного белка тритикаин-альфа, анализа его структуры и свойств. Представлены результаты выбора оптимальной комбинации криопротекторов для процесса лиофилизации. Приведены данные о физико-химических и технологических свойствах субстанции, прогнозирующие возможность ее использования для разработки твердых лекарственных форм. Предложен целевой профиль качества для разработки лекарственного препарата, проведена оценка рисков влияния субстанции тритикаин-альфа на критические показатели. Представлена разработанная технологическая схема

получения субстанции рекомбинантного белка тритикаин-альфа, нормы качества, результаты изучения условия хранения и срока годности.

Четвертая глава посвящена доклиническим исследованиям рекомбинантного белка тритикаин-альфа.В ней отражены результаты оценки специфической фармакологической активности рекомбинантного белка тритикаин-альфа в модели *in vitro.* В главе представлены данные о разработке модели целиакиии изучении специфической активности тритикаин-альфа *in vivo*. Автором проведено исследование фармакокинетических параметров рекомбинантного белка тритикаин-альфа. Приведены результаты общетоксического и аллергизирующего действия тритикаин-альфа, репродуктивной и эмбриональной токсичности, мутагенных и канцерогенных свойств субстанции.Результаты исследования острой токсичности позволили отнести субстанцию тритикаин-альфа к IV классу «Малотоксичные» лекарственных веществ для перорального пути введения и к VI классу «Относительно нетоксичные» для внутривенного пути введения.

Пятая глава отражает результаты исследований по разработке состава и технологии получения твердых капсул с рекомбинантным белком тритикаин-альфана основе требований концепции Quality-by-Design (QbD). В главе представлена программа исследований по разработке твердой лекарственной формы с тритикаином-альфа. Описаны данные изучения совместимости субстанции тритикаин-альфа со вспомогательными веществами. Автором приведены результаты разработки оптимального состава твердых капсул с тритикаин-альфа и технологии получения капсул, определения показателей качества лекарственного препарата и исследования его стабильности.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Работа посвящена одной из значимых тем – разработке эффективных и безопасных препаратов протеолитических ферментов, способных расщеплять глютены и продукты их неполного гидролиза в желудочно-кишечном тракте до неиммуногенных и нетоксичных пептидов для проведения

патогенетической терапии целиакии. Исследователем рационально проведен анализ потребности при выборе объекта исследования (наличие неизлечимых заболеваний, отсутствие эффективных лекарств).

Следует отметить, что цель исследования и задачи достигнуты благодаря применению современного подхода, направленного на реализацию принципов спланированного качества, что позволило разработать эффективное и безопасное лекарственное средство. Автором учтены при разработке критические показатели качества субстанции, препарата и технологического процесса, проведена всесторонняя оценка специфической активности и потенциальной токсичности, осуществлена разработка норм качества с учетом специфики субстанции и препарата в рамках сквозной стандартизации.

Соблюдение сформулированных и обозначенных автором принципов позволит выстроить эффективную работу на каждой дальнейшей стадии жизненного цикла разработанного препарата на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа и добиваться постоянного повышения качества продукта.

Текст представленной Тарасовым В.В. работы написан с использованием современной научной терминологии. Все результаты научно обоснованы, выводы и заключения логичны.

При прочтении возникли замечания и вопросы:

1. Замечание по структуре работы: на наш взгляд, главу 4 следовало бы разделить на 2: главу, посвященную оценке эффективности белка, тритикаин-альфа, и главу, описывающую оценку безопасности.

2. Возможно, в обзоре литературы следовало бы уделить общим вопросам, касающимся особенностей фармацевтической разработки препаратов на основе белков как фармацевтической субстанции, в частности, препаратов протеолитических ферментов, и представить обобщенный материал по данной теме, осветить вопросы оценки качества данных лекарственных препаратов.

3. Возможно, следовало бы более подробно описать критические точки производства субстанции тритикаин-альфа.

4. В работе встречаются опечатки, отдельные неточности.

Сделанные замечания и вопросы не являются принципиальными, не снижают научную и практическую значимость и общую положительную оценку работы.

Заключение

Таким образом, диссертация Тарасова Вадима Владимировича на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук на тему «Теоретические и экспериментальные основы разработки активной фармацевтической субстанции и лекарственной формына основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа для лечения целиакии» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором осуществлено решение крупной научной проблемы, посвященной – разработке эффективного и безопасного лекарственного препарата на основе рекомбинантного белка для лечения целиакии.

По актуальности, степени научной новизны, теоретической и практической значимости, диссертационная работа соответствует требованиям п. 15 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора от 31.01.2020 г. № 0094/Р, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Тарасов Вадим Владимирович заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.01 – Технология получения лекарств.

Отзыв на диссертационную работу Тарасова Вадима Владимировича заслушан и утвержден на заседании Ученого совета Института фармации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России), протокол № 5 от 25 февраля 2021 г.

Отзыв подготовил:

Директор Института фармации,
руководитель лаборатории по системам доставки лекарств
ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России
кандидат фармацевтических наук
(15.00.01 – Технология лекарств и организация
фармацевтического дела),
доцент _____ Мустафин Руслан Ибрагимович

ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России
420012, Приволжский федеральный округ, РТ, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49
Тел.: +7 (843) 236-06-52, e-mail: rector@kazangmu.ru

Подпись Мустафина Р.И. заверяю.
Ученый секретарь ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор _____Мустафин Ильшат Ганиевич