

## ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора фармацевтических наук Суслиной Светланы Николаевны  
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 выполненного исследования**

В последнее время мировая медицинская практика стала уделять все больше внимания борьбе с достаточно редкими заболеваниями, такими, как например целиакия. В рассматриваемой диссертационной работе проведен полный цикл фармацевтической разработки от создания инновационной фармацевтической субстанции – рекомбинантного белка **тритикаин-альфа** до его терапевтически адекватной лекарственной формы, что однозначно, является, актуальным для фармацевтической науки. Особую значимость имеет комплекс проведенных автором исследований по стандартизации рекомбинантного лекарственно средства.

Актуальность проведенного исследования методологически базируется также на современных мировых подходах фармацевтической разработки, принципах GMP и рекомендациях ICH.

Упор, сделанный в своем исследовании Тарасовым В.В. на такие критерии, как целевой профиль качества препарата, критические показатели качества препарата, пространство проектных параметров, оценка рисков и

стратегия контроля позволяет с высокой долей вероятности прогнозировать успех исследования, что и было подтверждено полученными результатами.

В связи, с вышеизложенным, можно сделать вывод о том, что не смотря на, высокий интерес ученых и разработчиков к вопросам получения рекомбинантных лекарственных средств для лечения целиакии диссертационная работа Тарасова В.В. является актуальной. Все поставленные задачи исследования закономерны, а их решение в процессе выполнения работы позволило достигнуть цель, заключающуюся в создании рекомбинантного лекарственного препарата для лечения целиакии.

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

Диссертация выполнена на современном уровне, использованы официальные и оригинальные методики анализа, адекватное оборудование. Автором проделан достаточный объем практической работы, которая отвечает целям и задачам исследования; выводы по главам и общие, вытекают из фактологического логично систематизированного материала.

Подтверждением высокого научного уровня работы служит апробация на конференциях различного уровня, а также достаточное количество публикаций по теме исследования, которые опубликованы в рецензируемых журналах, индексируемых базой РИНЦ.

### **Достоверность и новизна исследования, полученных результатов**

Достоверность полученных результатов определяется, прежде всего, достаточным объемом выполненных исследований. Обоснованность и достоверность выбранного объекта исследования тритикаин-альфа и лекарственной формы для него объясняется в 1 главе работы. Автором проведен достаточный блок исследований, включающий валидационные характеристики используемых методов анализа, в том числе оригинальных, разработанных автором. Показана их валидность и достоверность, что с уверенностью подтверждает правильность выбранного подхода фармацевтической разработки.

Проведен практически полный объём доклинических исследований – изучена специфическая активность *in vitro* и *in vivo*. Изучены токсикологические показатели, аллергизирующее действие, репродуктивная и эмбриональная токсичность, а также мутагенные и канцерогенные свойства.

Разработана технология получения твердых желатиновых капсул, содержащих лиофилизат субстанции тритикаин-альфа.

Полученные в ходе проведения исследований научные результаты позволили существенно расширить теоретические представления проектирования препаратов на основе рекомбинантных белков. Научная новизна подтверждена 2 патентами. Поданы 2 международных заявки. Разработанный в рамках данного исследования ЛП — капсулы с тритикаином-альфа — является инновационным и не имеет аналогов, разрешенных для клинического применения на территории РФ.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Автором предложена оригинальная технология синтеза субстанции тритикаин-альфа, проведена ее стандартизация по требованиям ГФ 14 издания и установлен срок годности субстанции.

Блок исследования по фармацевтической разработке твердой лекарственной формы представлен технологией получения твердых желатиновых капсул, в качестве наполнителя которых выступает лиофилизат субстанции с включением вспомогательных веществ, что в свою очередь, позволило придать оптимальные технологические свойства, а также провести последующую стандартизацию с установлением сроков годности.

В результате проведенной автором работы разработаны проекты нормативной документации на фармацевтическую субстанцию и лекарственную форму. Проведена валидация аналитических методик.

Осуществлен трансфер технологии лекарственного препарата «Тритикаин-альфа, твердые капсулы» на промышленную площадку.

Разработаны учебные пособия, которые используются в Институте фармации им. А.П. Нелюбина, Институте трансляционной медицины и биотехнологии и Институте молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

### **Содержание и структура диссертации**

Диссертация состоит из 338 страниц машинописного текста, включает введение, обзор литературы, пять глав собственных исследований, общих выводов, списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 67 таблицами и 53 рисунками. Список литературы включает 244 источника, в том числе 78 – на иностранных языках.

Первая глава диссертационной работы посвящена обзору литературных источников (отечественных и зарубежных) по вопросам современного состояния исследований препаратов на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа для лечения целиакии. Критический анализ литературных данных стал прочной базой стратегии научных исследований автора, что в свою очередь позволило методологически обосновать и представить концепцию разработки инновационного лекарственного препарата.

Для создания модели целиакии Тарасовым В.В. подробно изучены механизмы ее возникновения. Подробно описан комплекс механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа, в результате которого формируется иммунопатогенез целиакии с характерной клинической картиной заболевания. Доказано, что именно глиадины, входящие в состав глютена, провоцируют развитие данного заболевания. Установлены аминокислотные последовательности большинства токсичных и иммуногенных глиадиновых пептидов.

Вторая глава содержит описание объектов исследования, методов и методик, используемых автором при проведении исследований.

В третьей главе приведены результаты практических исследований, в части, изучения субстанции тритикаин-альфа, ее синтеза и анализа.

Предложена технологическая схема получения стабильной фармацевтической субстанции тритикаин-альфа, полученной из лиофильно высушенного рекомбинантного белка тритикаин-альфана основе биотехнологического процесса в клетках-продуцентах (*E.coli*), модифицированных специфической плазмидой, с последующим выделением в результате одноэтапной очистки аффинной хроматографией и фракционированием полученного продукта с целью выделения биологически активных фракций белка с последующей лиофилизацией.

Предложен оптимальный состав криопротекторов, обеспечивающих стабильность субстанции следующего состава: маннитол (маннит) и поливинилпирролидон (ПВП) в соотношении тритикаин-альфа: маннитол: ПВП (2 : 1 : 1).

Впервые разработаны методики анализа субстанции: качественного и количественного определения рекомбинантного белка тритикаин-альфа. Для качественного анализа применяется методика на основе ВЭЖХ, которая предназначена для идентификации подлинности рекомбинантного белка тритикаин-альфа как в субстанции, так и в лекарственном препарате. Для количественного определения содержания рекомбинантного белка тритикаин-альфа разработана методика с использованием ВСА-реагента.

В четвертой главе описаны исследования по доклиническому изучению тритикаин-альфа. Впервые разработаны оригинальные *in vivo* и *in vitro* модели целиакии для изучения специфической активности субстанции. Исследования *in vitro* показали, что основные белковые компоненты клейковины, а именно  $\alpha$ -глиадин,  $\gamma$ -глиадин,  $\omega$ -глиадини глютеин восприимчивы к протеолитическому расщеплению тритикаином-альфа.

Изучение специфической активности *in vivo* показало, что минимальная эффективная доза для мышей составляет 80 мг/кг. Применение тритикаин-альфа в дозе 4 и 20 мг/жив позволяет снизить МЭЛ до уровня, в 2 раза превышающего норму (по сравнению с 2,5-кратным превышением в позитивном контроле), а также уменьшить визуальную выраженность патоморфологических признаков целиакии в кишечном биоптате.

Результаты исследования острой токсичности в изученном диапазоне позволяют отнести субстанцию тритикаин-альфа к IV классу «Малотоксичные» лекарственных веществ для перорального пути введения.

При изучении хронической токсичности автором не выявлено случаев отсроченного развития патологических изменений в организме лабораторных животных, что подтверждено данными лабораторных исследований крови и патоморфологического анализа.

В пятой главе соискателем проведена модернизация этапов подбора вспомогательных веществ, перспективных для создания твердых капсул с тритикаин-альфа с научно-методологической концепцией разработки.

Изучены технологические характеристики вспомогательных веществ (сыпучесть, однородность дозирования, насыпная масса, стабильность субстанции) и технологических параметров (время перемешивания, условия перемешивания) для создания сыпучих порошкообразных смесей и последующего дозирования в капсулы. Доказана совместимость вспомогательных веществ с субстанцией.

Изучены критические характеристики состава и параметров процесса производства, определена стратегия контроля – внутрипроизводственный контроль, спецификации на лекарственный препарат, а также связанные с этим методы и частота мониторинга и контроля.

Определены показатели качества, разработаны и валидированы методики определения показателей качества нового препарата. Разработан проект нормативной документации на капсулы с тритикаин-альфа по 20 мг. Определены сроки годности и условия хранения, которые составляют два года в условиях естественного хранения в контурной ячейковой упаковке из пленки поливинилхлоридной и фольги алюминиевой печатной в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C.

### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации**

Несомненным достоинством диссертационной работы Тарасова В.В., является очень узкая, целевая тематика по созданию одного единственного

препарата, но выполненная на полную глубину от теоретического обоснования эффективности предполагаемой рекомбинантной субстанции к ее созданию включая масштабирование, стандартизацию, полный комплекс доклинических испытаний и разработку лекарственной формы для прима внутрь.

В целом работа оценивается положительно, однако при ее изучении возникли некоторые замечания:

- литературный обзор изобилует констатацией общеизвестных положений, касающихся в целом фармацевтической разработки, на наш взгляд было бы целесообразно уделить немного внимания социальной значимости решаемой проблемы целиакии;
- главы собственных исследований изобилуют ссылками на источники литературы, что свидетельствует о возможности размещения текстового материала в литературном обзоре;
- на некоторых рисунках, в частности 3.2., 3.5 и др. отсутствует указание масштаба изображений, нет их и в комментариях;
- странным выглядит использование ситового анализа для фармацевтической субстанции с размером частиц 0,2-2 мкм;
- на технологических схемах отсутствуют контрольные точки производства;
- не удачна, на наш взгляд разноплановость в подаче графического материала в виде гистограмм, по различным разделам – их унификация была бы желательна;
- желательно, чтобы схема синтеза фармацевтической субстанции была представлена по типу оформления технологических процессов – в виде технологической схемы синтеза.
- таблицы данных по хранению и установлению срока годности разработанной субстанции и лекарственного препарата избыточны и могли бы перенесены в приложения;
- не все сокращения, используемые автором приведены им в списке сокращений.

Хотелось бы также получить ответы автора на возникшие по тексту вопросы:

1. Какова социальная значимость разработки препарата для лечения целиакии, на фоне существующих подходов к лечению и имеющихся препаратов?
2. Можно ли оценить стоимость получаемой субстанции тритикаин-альфа и сравнить ее со стоимостью иных генноинженерных продуктов?
3. Требуется уточнение использованная методика исследования *in vitro* для изучения удельной протеолитической активности лекарственных

- 130
- средств. Эта методика была полностью разработана вами или же вы использовали общеизвестную методику?
4. Почему при выборе способа получения стабильной субстанции не рассматривается метод распылительного высушивания, а только лишь лиофилизация? Изучалась ли такая технология? Если нет, то почему?
  5. На основании каких экспериментальных данных вами был выбран интервал влагосодержания 3%, и как в эксперименте содержание влаги контролировалось в процессе лиофилизации?
  6. Чем обоснован выбор смесителя Glatt модели TMG, серии Mini (Германия) и указанные режимы смешивания: скорость вращения мешалки 50–100 об./мин, чоппера— 500–1000 об./мин?
  7. Чем обоснован выбор температурного режима хранения для готовой формы 2-8°C?

Также в рецензируемой работе встречаются опечатки и неудачные выражения и обороты.

Следует отметить, что отмеченные недостатки субъективны, а вопросы носят уточняющий характер и по сути не снижают ценности выполненной диссертационной работы Тарасова В.В.

#### **Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации**

Содержание автореферата полностью соответствует и отражает основные положения диссертации, и также, как диссертация Тарасова В.В., полностью соответствует паспорту специальности 14.04.01 – Технология получения лекарств.

#### **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 формы на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа для лечения целиакии» по специальности 14.04.01 – «Технология получения лекарств» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в развитии соответствующего




научного направления по разработке новых лекарственных форм препаратов для лечения редких заболеваний, что 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».

Официальный оппонент:

доктор фармацевтических наук (14.04.01 – Технология получения лекарств), доцент, заведующая кафедрой общей фармацевтической и биомедицинской технологии

Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

 Суслина Светлана Николаевна

Почтовый адрес: Россия, 117198, г. Москва,

ул. Миклухо-Маклая, д.6

Тел.: +7 (495) 434-53-00

Факс: +7(495) 433-95-88

Адрес сайта: [old.rudn.ru](http://old.rudn.ru)

Подпись Суслиной Светланы Николаевны заверяю

Ученый секретарь

Ученого Совета медицинского института

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

Министерства науки и высшего образования

Российской Федерации

 к.ф.н. доцент Максимова Т.В.

26.02.2021