

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора фармацевтических наук, Пантюхина Андрея Валерьевича
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 диссертации

Развитие междисциплинарного подхода в создании новых лекарственных средств ведет к объединению исследований различных областей науки – биологии, химии, физики, математики, медицины и фармации. На стыке наук появились новые направления: молекулярная биология, геномика, биоинформатика, медицинская химия, которые легли в основу создания комплексного подхода к созданию оригинальных лекарственных средств. В его основе лежит рациональное применение различного научного инструментария для максимально быстрой и эффективной разработки лекарств. При этом отправной точкой в исследованиях, в первую очередь, служит анализ потребности: наличие неизлечимых заболеваний, отсутствие эффективных лекарств, высокая частота нежелательных побочных эффектов при существующих вариантах лекарственной терапии. Важным стимулом для создания инновационных препаратов может стать открытие новых молекулярных мишеней заболевания.

Цель диссертационной работы **Тарасова Вадима Владимировича** заключается в теоретическом обосновании и экспериментальном подтверждении 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.

Для достижения поставленной цели и решения **задач** исследования было проведено теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение методологии проектирования и фармацевтической разработки инновационного препарата на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа для лечения целиакии. Были изучены современные подходы к экспериментальному моделированию целиакии для изучения специфической активности субстанции. Была разработана схема получения субстанции тритикаин-альфа и экспериментально обоснован оптимальный выбор вспомогательных веществ в процессе получения субстанции. Были разработаны унифицированные и валидированные методики оценки качества субстанции тритикаин-альфа, пригодные для внедрения в производство. Были проведены доклинические исследования токсичности (безопасности) и фармакокинетики рекомбинантного белка тритикаин-альфа. В диссертационной работе научно обоснован выбор лекарственной формы, оптимальных вспомогательных веществ, проведено изучение физико-химических и технологических характеристик действующего и вспомогательных веществ. Разработаны проекты нормативной документации, лабораторный и опытно-промышленный регламенты на готовую лекарственную форму тритикаина-альфа — твердые капсулы.

Научная новизна исследования и полученных результатов. На основании комплекса проведенных теоретических и экспериментальных исследований впервые предложены подходы к проектированию и разработке инновационного лекарственного препарата на основе рекомбинантного белка

тритикаин-альфа, связанные с определением пространства проектных параметров для установления условий процесса при разработке технологии получения и исследования по формированию целевого профиля качества готовой лекарственной формы. Впервые разработаны методики изучения специфической фармакологической активности субстанции и лекарственного препарата при целиакии *in vitro*: определена модельная система, представленная монослоем дифференцированных клеток Caco-2, оптимизирован протокол их культивирования с целью сокращения сроков исследования и повышения достоверности получаемых результатов, подтверждено структурно-функциональное соответствие модельных клеток эпителиоцитам кишечника человека. Определены наиболее показательные и информативные параметры для регистрации его действия на модельную систему. На основании этих данных можно сделать вывод, что рекомбинантный белок тритикаин-альфа является потенциально эффективной фармацевтической субстанцией для создания препаратов для лечения целиакии. Разработанный автором лекарственный препарат — капсулы с тритикаин-альфа — является инновационным и не имеет аналогов, разрешенных для клинического применения на территории РФ.

Научная новизна работы подтверждена получением двух патентов на изобретения РФ (№ 2674763, 2576322), поданы две 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 результатов заключается в формировании направления использования методологии проектирования в качестве перспективного инструмента фармацевтической разработки. Существенно расширены теоретические представления проектирования препаратов на основе рекомбинантных белков.

Практическая значимость данного исследования заключается в разработанных *in vivo* и *in vitro* моделях целиакии, в стандартизации

полученной лекарственной формы по показателям качества, разработке проектов нормативной документации на субстанцию тритикаин-альфа и готовую лекарственную форму — твердые капсулы с тритикаин-альфа, в осуществлении технологического трансфера лабораторных разработок на опытно-производственный участок ООО «АЛЬФА-Т».

Создан гарантированно правильный методологический подход к разработке лекарственного препарата, применение которого в производстве позволяет установить оптимальные критерии приемлемости с возможностью постоянного улучшения и получать препараты с прогнозируемым качеством при сниженных рисках, влияющих на качество продукции.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертационной работы соответствуют специальности 14.04.01 – «Технология получения лекарств». Результаты экспериментальных исследований соответствуют области исследований научной специальности, конкретно пунктам 3, 4, 6 паспорта специальности «Технология получения лекарств».

Личный вклад автора. Автором самостоятельно выбрана тема исследования, сформулированы цель и задачи данной работы; сформирован и реализован план проведения экспериментальных исследований; проведены обработка и анализ экспериментальных данных, на основании которых подготовлены научные публикации и доклады, разработана нормативная документация на лекарственный препарат, сформулированы общие выводы; осуществлено внедрение результатов исследований.

Степень обоснованности и достоверности сформулированных научных положений, выводов и рекомендаций.

Представленные в диссертационном исследовании выводы и рекомендации основаны на глубоком анализе научной литературы и

достаточном объеме экспериментального материала. Все разделы выполнены на современном научном уровне в соответствии с требованиями действующих нормативных документов. В работе использовались современные физико-химические и технологические методы. Результаты исследований обобщены, статистически достоверны и сомнений не вызывают.

Выводы и материалы по внедрению результатов исследования в практику соответствуют цели и задачам исследования, логично вытекают из полученных автором результатов и являются научно обоснованными.

Основные положения теоретических и экспериментальных исследований представлены и обсуждены на VI International scientific conference (Karlovu Vary–Russia, Moscow, 2019, December 24–25); IX Ежегодном международном партнеринг-форуме «Life Sciences Invest. Partnering Russia» (Санкт-Петербург, 7–8 ноября 2019 г.); III Сеченовском Международном Биомедицинском Саммите (SIBS, 2019) (Москва, 2019 г.); III Научной конференции Biotech Club (Москва, ноябрь 2019 г.); XLIII Международной научно-практической конференции «WORLD SCIENCE: PROBLEMS AND INNOVATIONS», 2020 г.

Апробация диссертационной работы проведена «08» сентября 2020 г. на заседании межкафедральной конференции Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертационная работа **Тарасова Вадима Владимировича** выполнена в соответствии с требованиями ВАК РФ ГОСТ Р 7.0.11-2011, имеет традиционное построение, каждая глава посвящена отдельному этапу исследований.

Диссертационная работа изложена на 338 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, пяти 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.

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

По теме диссертации опубликованы две монографии, 15 научных работ, в том числе 2 патента на изобретения Российской Федерации; 10 статей — в изданиях, включенных в Перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук.

Глава 1 Обзор литературы. Обзор посвящен концепции конструирования и разработки препарата на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа. Показано, что разработка инновационных лекарственных средств является комплексным многостадийным процессом, который может начинаться как с открытия новых мишеней или более глубокого изучения патогенеза заболевания, так и с поиска или моделирования новых соединений, способных оказать фармакологически активное воздействие на уже известные механизмы.

Автор показал, что процесс поиска новых фармакологически активных веществ и дальнейшего создания нового лекарственного препарата можно представить схематически в виде совокупности экспериментальных и теоретических процедур, которые представляют собой мультидисциплинарный процесс поиска и разработки и включают множество разноплановых задач, решаемых специалистами в различных областях науки и технологий. После выбора заболевания и возможных механизмов для фармакологического воздействия начинается процесс моделирования и синтеза или биотехнологического получения соединений-кандидатов с потенциальной активностью. Для их изучения разрабатываются новые или применяются уже существующие модели определения специфической активности препарата.

Описаны современные подходы к экспериментальному моделированию целиакии. Показана роль эндопептидаз в протеолизе глютена. Иницирующим фактором, от появления которого в рационе генетически предрасположенных

лиц зависит развитие целиакии, выступает растительный белок глютен — основной компонент эндосперма пшеницы. Ключевыми белковыми компонентами глютена являются глиадины: глютенины и проламины. Подробно рассмотрены научные исследования, в которых достоверно доказано, что развитие целиакии провоцируют именно вышеуказанные глиадины. При этом, другие составные компоненты глютена, такие как белки мембран, углеводы или липиды, альбумины и глобулины, в развитии заболевания не участвуют.

Как известно, протеолиз белков в организме человека обеспечивается с помощью пяти основных протеиназ: пепсина, трипсина, химотрипсина, эластазы и карбоксипептидазы. При этом белок проходит последовательно стадии денатурации, гидролиза до пептидов, а затем аминокислот, которые и всасываются щеточной каймой апикальной поверхности энтероцитов тонкого кишечника и попадают в кровь. Однако, многочисленные исследования позволили установить, что смесь этих протеиназ не способна обеспечить полный гидролиз глиадинов. Это связывают с высоким содержанием в составе последних остатков пролина. Известно, что на щеточной кайме энтероцитов имеется пролилэндопептидаза, способная обеспечивать гидролиз пептидов глиадина по карбоксильной группе остатка пролина и обеспечивать последующее расщепление другими экзопептидазами. У пациентов с целиакией понижена активность пролилэндопептидазы, вследствие чего концентрация олигопептидов, содержащих пролин и глутамин, у них заметно выше, чем у здоровых людей, что и приводит к накоплению у щеточной каймы энтероцитов тонкого кишечника продуктов неполного гидролиза глиадинов, их последующему и активному проникновению в слизистую оболочку и развитию патологии.

В обзоре литературы диссертант подробно описал патоморфогенез целиакии. Показано, что изучение заболевания на протяжении нескольких десятилетий привело к существенному прогрессу в объяснении патогенеза и

формулированию иммунопатологической теории, обладающей в настоящее время наиболее убедительной доказательной базой.

Диссертант подробно рассматривает механизм врожденного иммунного ответа под воздействием глиаина, при котором происходит трансформация лимфоцитов. Рассмотрены современные подходы к экспериментальному моделированию целиакии. Так, при разработке новых лекарственных средств одним из ключевых инструментов изучения специфической активности является моделирование патологического процесса заболевания. Патогенез целиакии, связанный с иммунопатологическими процессами, выражается в серьезных отличиях у различных типов лабораторных животных и требует дополнительных исследований в моделях *in vitro*, позволяющих собрать больше экспериментальных данных. Основными недостатками известных в настоящее время клеточных моделей целиакии являются низкая чувствительность и недостаточная точность при регистрации повреждающего действия продуктов неполного гидролиза глютена на клетки кишечника человека.

В обзоре литературы диссертантом представлена методологически обоснованная концепция создания инновационного лекарственного препарата, одним из ключевых этапов является изучение специфической активности, которое возможно после анализа и моделирования патогенеза соответствующего заболевания. Особенностью патогенеза целиакии выступает его вариабельность у разных видов животных, связанная с различиями в наследственно обусловленном нарушении расщепления глютена в кишечнике, что значительно осложняет возможность создания моделей *in vivo* для проведения скрининговых исследований. В связи с этим, крайне важно, по мнению автора, разработать видоспецифическую клеточную модель целиакии для проведения предварительных исследований *in vitro*.

Глава 2 Материалы и методы. В главе подробно приведены сведения об основном объекте исследований, перечне вспомогательных веществ, их свойствам, принципам подбора и соответствие нормативной документации.

Представлены физико-химические, микробиологические, биофармацевтические и аналитические методы исследований, а также статистические методы анализа.

Глава 3 Разработка состава и технологии получения субстанции тритикаин-альфа является основной главой работы, в которой приводятся результаты исследований по разработке лекарственной формы системного действия. В начале главы приведена подробная методика получения рекомбинантного белка тритикаин-альфа. Дана программа исследований, направленных на решение поставленных задач. Обоснован выбор криопротекторов для процесса лиофилизации рекомбинантного белка тритикаин-альфа.

В главе отражены результаты выбора вспомогательных веществ, основанные на физико-химических свойствах препарата. С помощью биофармацевтических исследований обосновывается их состав. Приводится оценка физико-химических показателей и показателей качества разработанной лекарственной формы с учетом современных требований фармакопей.

При фармацевтической разработке новой лекарственной формы тритикаин-альфа — твердых капсул — проведено изучение физико-химических и технологических характеристик субстанции, экспериментально обоснован выбор оптимального состава вспомогательных веществ и технологических параметров производства.

Для использования субстанции, получаемой в соответствии с разработанным лабораторным регламентом, были определены параметры, характеризующие качество полученной субстанции, и методы контроля этих параметров как для оценки качества готового продукта в процессе синтеза, так и в процессе изучения стабильности. Данные методы были пригодны для серийного контроля и однозначной оценки ее основных характеристик. При разработке перечня методик оценки качества автор исходил из особенностей получения субстанции (рекомбинантный белок), ее физических и биологических свойств (лиофилизат), а также предполагаемого пути введения

(пероральный). Изучение стабильности субстанции рекомбинантного белка тритикаин-альфа проводилось в условиях долгосрочного хранения в предполагаемой упаковке (контурная ячейковая упаковка из пленки поливинилхлоридной и фольги алюминиевой печатной).

Глава заканчивается 9 выводами, полностью отражающих полученные результаты.

Глава 4 посвящена доклиническим исследованиям рекомбинантного белка тритикаин-альфа. Изучение фармакокинетики препарата было проведено в режиме однократного введения пероральным путем, показанным для клинического применения. В качестве тест-системы, в первую очередь, использованы крысы, признанные наиболее подходящим видом, исходя из специфики питания. При исследовании общетоксического действия в качестве тест-систем для установления параметров острой и хронической токсичности тритикаина-альфа были использованы два вида лабораторных животных: беспородные белые мыши и беспородные белые крысы, являющиеся стандартными объектами токсикологических исследований.

При установлении параметров острой токсичности в режиме однократного введения соблюдался принцип использования высоких доз, обеспечивающий необходимый запас надежности оценки безопасности. При выборе спектра исследуемых доз в хроническом эксперименте учитывался рекомендованный для системного применения принцип испытания нескольких дозировок, минимальная из которых приближается к эффективной терапевтической дозе, рекомендуемой для клинического изучения, а максимальная предполагает выявление возможных токсических эффектов и даже гибель части животных и может быть определена из данных по острой токсичности

Глава заканчивается подробными выводами, резюмирующими полученные результаты.

Глава 5 диссертационного исследования посвящена разработке состава и технологии получения твердых капсул с рекомбинантным белком тритикаин-альфа.

Диссертантом проведена модернизация этапов подбора вспомогательных веществ для создания сыпучих порошкообразных смесей и последующего дозирования в капсулы. Установлена совместимость вспомогательных веществ с субстанцией. Изучено влияние технологических характеристик полученных смесей и технологических параметров на качество смеси для капсулирования и готовой лекарственной формы. В ходе комплексного исследования предложен оптимальный состав капсул с тритикаином-альфа, подобраны оптимальное соотношение компонентов состава. Впервые разработана технология получения нового инновационного лекарственного препарата с тритикаином-альфа. Предложены основные технологические параметры процесса получения капсул с учетом структуры белка и его физико-химических свойств. Изучены и определены критические характеристики состава и параметров процесса производства, которые дают возможность расширить знания о функциональных характеристиках препарата в широком диапазоне свойств материалов, позволяющих в дальнейшем управлять рисками для качества. Определена стратегия контроля, а именно контроль параметров и характеристик субстанции тритикаин-альфа и вспомогательных веществ, внутрипроизводственный контроль, спецификации на лекарственный препарат, а также связанные с этим методы и частота мониторинга и контроля. В соответствии с современными требованиями определены показатели качества, разработаны и валидированы методики определения показателей качества нового препарата. Разработан проект нормативной документации на капсулы с тритикаином-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.

Диссертация заканчивается 9 выводами, полностью отражающими содержание исследования и полученные результаты.

Общее заключение по диссертации обосновано и соответствует поставленным задачам и положениям, выносимым на защиту. Ссылки на литературные источники, представленные в списке использованной литературы, являются достоверными. Автореферат и опубликованные работы полно отражают основное содержание диссертации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении работы

Диссертационная работа Тарасова Вадима Владимировича тему: «Теоретические и экспериментальные основы разработки активной фармацевтической субстанции и лекарственной формы на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа для лечения целиакии» представляет собой законченное исследование, открывающее практическую перспективу лечения такого тяжелого заболевания, как целиакия.

В целом наряду с положительной оценкой диссертационной работы, при ее изучении возникли некоторые замечания и вопросы, которые считаю целесообразным указать:

1. В работе присутствует устаревшая аббревиатура АФС, ГЛФ и т.д.
2. В 2 главе не всегда указаны производитель и сорт/марка использованного сырья для проведения эксперимента (крахмал, бета-циклодекстрин, ПВП, ПВС и др.) а также марки и производители оборудования (ВЭЖХ, СФ, микроскоп и др.)
3. Согласно спецификации (таблица 3.8.) проводили определение микробиологической чистоты (Категория 2.2). Проводились ли исследования зависимости микробиологических показателей от режимов упаковки и укупорки первичной упаковки?

4. Почему при изучении стабильности субстанции не изучалась альтернативная упаковка -например полимерная? Чем это обосновано?
5. При оценке специфической фармакологической активности *in vitro* вы использовали модель образования токсичных глиадиновых пептидов - синтезированный пептид р31-43 с аминокислотной последовательностью PGQQQPFPPQQPY (альмабион). Как вы контролировали скорость его образования или его концентрацию в опыте?

Также в рецензируемой работе встречаются опечатки и неудачные выражения.

Отмеченные замечания и вопросы не снижают ценности выполненной диссертационной работы Тарасова В.В и не носят принципиального характера.

Заключение

Диссертационная работа **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»** является законченным научным исследованием, в которой содержится решение важной научной проблемы, заключающееся в теоретическом обосновании методологии проектирования и ее экспериментальном подтверждении при разработке инновационного лекарственного препарата для лечения целиакии. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов, полноте изложения материала диссертационная работа соответствует всем требованиям п. 15 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономной образовательном учреждении высшего

образования Первый Московский государственный медицинский университет
имен 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 кафедры управления и экономики фармации
федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Смоленский государственный
медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации *2.02.2021* *АВ*

Пантюхин Андрей Валерьевич

Почтовый адрес: Россия, Смоленская обл.,
г. Смоленск, 214019 ул. Крупской, 28
Телефон: +7 (481) 255 02 75
Официальный сайт: smolgm.ru
E-mail: adm@smolgm.ru

Подпись Пантюхина Андрея Валерьевича заверяю
Начальник управления кадров ФГБОУ ВО
«Смоленский государственный медицинский
университет» Минздрава России



АВ *Т.И. Сидорова*