

Тарасов Вадим Владимирович

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ РАЗРАБОТКИ
АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ
ФОРМЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТРИТИКАИН-АЛЬФА
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЦЕЛИАКИИ**

14.04.01 — Технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Москва — 2020

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Научные консультанты:

Краснюк Иван Иванович — доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), заведующий кафедрой фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина;

Свистунов Андрей Алексеевич — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), первый проректор.

Официальные оппоненты:

Сливкин Алексей Иванович — доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии;

Пантюхин Андрей Валерьевич — доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доцент кафедры управления и экономики фармации;

Суслина Светлана Николаевна — доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, заведующий кафедрой общей фармацевтической и биомедицинской технологии.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «17» марта 2021 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации <https://www.sechenov.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 202_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.01,
доктор фармацевтических наук,
профессор



Демина Наталья Борисовна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Развитие междисциплинарного подхода в создании новых лекарственных средств ведет к объединению компетенций исследователей из различных областей науки, таких как биология, химия, физика, математика, медицина и фармация. На стыке наук появились новые направления: молекулярная биология, геномика, биоинформатика, медицинская химия и др., которые легли в основу комплексного подхода к созданию оригинальных лекарственных средств — «драг-дизайну» (от англ. *drug* — лекарственное средство, *design* — проектирование, конструирование). В основе данного подхода 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 лекарственных реакций при применении существующих вариантов лекарственной терапии и др. Важным стимулом для создания новых препаратов может стать открытие новых молекулярных мишеней или новые данные по патогенезу заболевания.

Таким образом, новая разработка лекарственного средства начинается с определения нозологической группы и возможных путей фармакологической коррекции. В ходе работы выявляются наиболее перспективные молекулярные мишени, детально изучается патогенез заболевания, чтобы определить потенциальные характеристики фармакологически активных веществ и сформировать техническое задание для последующей разработки — «драг-дизайна». Далее применяются методы молекулярного моделирования для расчета наиболее перспективных соединений, которые на следующем этапе синтезируются или получают биотехнологическими методами. Зачастую отправной точкой служат соединения с уже изученной активностью, и исследователи идут путем создания модифицированных молекул (так называемые *next-in-class* — препараты, следующие в классе), но при открытии оригинальных мишеней могут разрабатываться совершенно оригинальные молекулы — первые в классе (*first-in-class*). После проведения скрининговых исследований и подтверждения активности субстанции происходит переход к фармацевтической разработке (ФР) и комплексу клинических исследований, где в соответствии с требованиями регуляторных органов необходимо доказать безопасность и эффективность создаваемого лекарственного препарата.

Следует отметить, что современные подходы к ФР направлены на реализацию принципов спланированного качества, или «качества, запланированного при разработке» (Quality-by-Design, QbD). Данные принципы основаны на обязательном проведении масштабных исследований, которые экспериментально подтверждают, позволяют установить или разработать: целевой профиль качества препарата; профиль качества ЛП; критические показатели качества ЛП; пространство проектных параметров; оценку рисков; стратегию контроля. Соблюдение данных принципов позволяет выстроить эффективную работу на данной стадии жизненного цикла препарата и добиваться постоянного повышения качества продукта.

Степень разработанности темы исследования

Данные о заболеваемости целиакией обуславливают актуальность разработки лекарственных средств для терапии. В настоящее время на фармацевтическом рынке в мире и в России не представлены препараты, обладающие глютеназной активностью. Однако разрабатывается ряд средств на основе протеаз рекомбинантного и микробиологического происхождения. За рубежом проводятся клинические исследования следующих препаратов:

- ALV003, Alvine Pharmaceuticals Inc., NCT00959114, Phase 2b;
- Aspergillus Niger Prolyl Endoprotease (AN-PEP), VU University Medical Center, NCT00810654, Phase ½;
- STAN1, Heim Pal Children's Hospital, NCT00962182, Phase ½.

Наиболее изученным и эффективным из перечисленных выше является препарат ALV003 (AlvinePharmaceuticals, США) на основе рекомбинантного аналога глютеназы ячменя EP-B2, на примере которого впервые была продемонстрирована эффективность ферментативной терапии для лечения целиакии. В настоящее время препарат ALV003 успешно прошел вторую стадию клинических испытаний. В связи с недостаточной глютеназной активностью основного действующего вещества (фермент EP-B2) в состав ALV003 дополнительно введена пролилэндопептидаза бактериального происхождения (источник — *Sphingomona scapsulate*), однако интегральная глютеназная активность препарата остается сравнительно невысокой.

Недостатком этих препаратов является низкая скорость ферментативного расщепления глютена и иммунотоксичных проламинов в желудочно-кишечном тракте,

что определяет их сравнительно высокие рекомендуемые дозы и, соответственно, высокую стоимость терапии.

Под руководством А.А. Замятина исследовательская группа Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) биотехнологическими методами из зародышей пшеницы получила фермент тритикаин-альфа, обладающий глютеназной активностью. По экспериментальным данным, активность рекомбинантного тритикаина-альфа *in vitro*, как минимум, в два раза превышает активность прототипа ALV003 (смеси из цистеиновой протеазы ячменя EP-B2 и пролиловой эндопептидазы).

Цель и задачи исследования 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 ЛФ.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Провести теоретическое обоснование и экспериментально подтвердить методологию проектирования и фармацевтической разработки инновационного препарата на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа для лечения целиакии.

2. Изучить современные подходы к экспериментальному моделированию целиакии, на основании которых разработать *in vivo* и *in vitro* модели целиакии для изучения специфической активности субстанции.

3. Разработать схему получения субстанции тритикаин-альфа и экспериментально обосновать выбор оптимальных вспомогательных веществ для процесса лиофилизации, а также технологических параметров процесса получения субстанции.

4. Разработать унифицированные и валидированные методики оценки качества субстанции тритикаин-альфа, пригодные для оценки качества, в том числе при процессе производства субстанции и готовой ЛФ.

5. Провести доклинические исследования рекомбинантного белка тритикаин-альфа, включающие изучение токсичности (безопасности) и фармакокинетики. Определить основные фармакокинетические параметры тритикаина-альфа: максимальной концентрации вещества в сыворотке крови ($C_{\text{тра}}$), времени полувыведения, площади

под фармакокинетической кривой до момента последнего измерения и до бесконечности, расчета скорости всасывания.

6. Научно обосновать выбор ЛФ, экспериментально произвести подбор оптимальных вспомогательных веществ для создания твердых капсул с тритикаином-альфа, провести изучение физико-химических и технологических характеристик действующего и вспомогательных веществ, их влияние на показатели качества ЛП.

7. Установить оптимальный состав и технологию получения с определением пространства проектных параметров для выделения условий процесса производства инновационного лекарственного препарата на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа — твердых капсул.

8. Определить целевой профиль качества (ЦПК) и потенциальные критические показатели качества (КПК) полученной твердой ЛФ.

9. Разработать на основании полученных экспериментальных данных проекты нормативной документации (НД, лабораторный регламент, опытно-промышленный регламент) на готовую лекарственную форму тритикаина-альфа — твердые капсулы.

Научная новизна исследования

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 для 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.

В результате экспериментов *in vitro* и *in vivo* доказана специфическая активность рекомбинантного белка тритикаин-альфа. На основании этих данных можно сделать вывод, что рекомбинантный белок тритикаин-альфа является потенциально эффективной фармацевтической субстанцией для создания ЛП для лечения целиакии. Определены основные фармакокинетические параметры тритикаина-альфа (максимальная концентрация вещества в сыворотке крови ($C_{Tr\alpha}$), время полувыведения, площадь под фармакокинетической кривой до момента последнего измерения и до бесконечности, расчет скорости всасывания).

В ходе исследования был изучен ряд потенциально возможных вспомогательных веществ для проведения процесса сублимации рекомбинантного белка тритикаин-альфа с целью получения стабильной субстанции, определены основные технологические параметры процесса получения субстанции и ЛФ.

Исходя из структуры субстанции — рекомбинантного белка — впервые разработаны методики анализа ЛП, а именно: методика качественного определения рекомбинантного белка тритикаин-альфа в капсулах с помощью ВЭЖХ и методика количественного определения рекомбинантного белка тритикаин-альфа в капсулах с помощью ВСА-реагента (Bicinchoninic Acid Protein Assay). В отношении разработанных аналитических методик была проведена предварительная валидация, что подтвердило корректность их использования для оценки качества ЛП.

Разработанный в рамках данного исследования ЛП — капсулы с тритикаином-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).

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость 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 разработанной *in vivo* и *in vitro* модели целиакии для изучения специфической ЛП для лечения целиакии;
- в проведении стандартизации полученной ЛФ по выбранным показателям качества, разработке проектов НД на субстанцию тритикаин-альфа и готовую лекарственную форму — твердые капсулы с тритикаином-альфа 20 мг;
- в осуществлении технологического трансфера лабораторных разработок для этапа масштабирования на опытно-производственный участок ООО «АЛЬФА-Т».

Определен целевой профиль качества (ЦПК) (quality target product profile — QTPP) ЛП, использование которого гарантирует методологически правильный подход при разработке ЛП.

Показано, что применение подхода QbD в производстве препарата позволяет установить оптимальные критерии приемлемости (с возможностью постоянного улучшения), получать ЛП с прогнозируемым качеством при сниженных рисках, влияющих на качество продукции.

Методология и методы исследования

Методология исследования заключалась в комплексном изучении всех этапов фармацевтической разработки: от выбора мишени и получения субстанции (рекомбинантного белка тритикаин-альфа) до создания готовой лекарственной формы — твердых капсул, а также изучения влияния фармацевтических факторов на биологическую доступность и качество лекарственных препаратов, разработки обобщений, заключений и рекомендаций по их использованию. В ходе проведения исследований применены различные методы молекулярно-биологических, патоморфологических и иммуногистохимических, физико-химических, фармакологических, фармацевтических и технологических испытаний; проведен сравнительный анализ, в том числе документальной базы; использованы математические и статистические методы анализа для обработки результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- теоретические основы методологии проектирования и фармацевтической разработки инновационного препарата на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа для лечения целиакии;
- результаты экспериментального исследования обоснования выбора оптимальных вспомогательных веществ для процесса лиофилизации, а также технологических параметров процесса получения субстанции с применением подхода QbD;
- подходы к экспериментальному моделированию целиакии, на основании которых разработаны *in vivo* и *in vitro* модели целиакии для изучения специфической активности субстанции;
- результаты доклинических исследований рекомбинантного белка тритикаин-альфа, включающие изучение токсичности (безопасности) и фармакокинетики;
- обобщенные экспериментальные данные по определению оптимального состава и технологии получения с определением пространства проектных параметров для выделения условий процесса производства инновационного лекарственного препарата на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа — твердых капсул.

Достоверность научных положений и выводов

Достоверность полученных результатов подтверждается многократной повторностью экспериментов с применением адекватных методических подходов, отвечающих поставленным задачам исследования. Метрологическое обеспечение использованного в работе лабораторного оборудования подтверждено квалификацией соответствующего уровня. Применимость разработанных методик подтверждена валидационными исследованиями. Результаты экспериментальных исследований статистически обработаны и сопоставлены с данными научной литературы.

Апробация результатов исследования

Основные положения теоретических и экспериментальных исследований представлены и обсуждены на VI International scientific conference (Karlov 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).

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 ЛП, сформулированы общие выводы; осуществлено внедрение результатов исследований.

Внедрение результатов исследования

Осуществлен трансфер технологии ЛП «Тритикаин-альфа, твердые капсулы» на ООО «АЛЬФА-Т» по результатам технологического трансфера лабораторных разработок с утверждением проектов НД на ЛП (Акт внедрения 2019-1В от 15.11.2019). На основании Лицензионного договора от 26.12.2018 № 26/12.18 права на проведение исследований в целях коммерциализации кандидатного лекарственного средства тритикаин-альфа были предоставлены обществу с ограниченной ответственностью «Альфа-Тритикаин» — резиденту Инновационного центра Сколково.

Разработаны и внедрены учебные пособия: кафедры фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акт внедрения от 01.10.2019); кафедры биотехнологии Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акт внедрения от 04.10.2019); Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акт внедрения от 22.10.2019); кафедры фармацевтической технологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акт внедрения от 20.11.2019).

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».

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

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-Три-тикаин».

Объем и структура диссертации

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.

Публикации

По теме диссертации опубликованы две монографии, 15 научных работ, в том числе 2 патента на изобретения Российской Федерации; 2 заявки на международное изобретение; 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследовании использована фармацевтическая субстанция — оригинальный рекомбинантный белок тритикаин-альфа (цистеиновая протеиназа папаинового типа), представляющий собой смесь белков, включающую полипептид с молекулярной массой ~42 кДа. В первичную структуру включены:

- комплекс аминокислотной последовательности продомена тритикаина-альфа с протеиназным доменом тритикаина-альфа;
- продукты автокаталитического протеолиза: полипептид с молекулярной массой ~30 кДа (в первичной структуре содержит аминокислотную последовательность протеиназного домена тритикаина-альфа) и пептиды с молекулярной массой ~11—12 кДа (отщепленные последовательности продомена тритикаина-альфа).

Вспомогательные вещества (ВВ) фармакопейного качества и реактивы соответствовали требованиям нормативной документации (НД).

Экспериментальные данные получены с применением физико-химических, химических, технологических, методов и оборудования, приведенных в Государственной

фармакопее. Оценка технологических характеристик фармацевтических субстанций (ФС), образцов капсульных масс и ЛП проводилась согласно методикам ГФ. Для качественного и количественного определения ФС, ЛП использованы методики, разработанные в ходе собственных исследований.

Результаты исследования

Концепция конструирования и разработки ЛП на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа

Разработка инновационных лекарственных средств — комплексный многостадийный процесс, 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 до создания нового ЛП (Рисунок 1).

Данная схема представляет собой мультидисциплинарный процесс поиска и разработки ЛП и включает множество разноплановых задач, решаемых специалистами в различных областях науки и технологий. После выбора мишени 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 существующие модели определения специфической активности. Отобранные соединения переходят на этап доклинических исследований специфической активности и безопасности соединения (в части общетоксического действия), при необходимости структура молекулы дорабатывается. В ходе изучения специфической активности выясняют степень воздействия в отношении целевого заболевания (мишени, патологического процесса), а также устанавливают и (или) подтверждают механизм действия лекарственного вещества (ЛВ). При проведении доклинических токсикологических исследований устанавливают характер и выраженность повреждающих действий на организм лабораторных животных, в том числе определяют переносимые и токсичные дозы ЛВ, ЛД₅₀, выявляют подверженные наибольшему воздействию со стороны ЛВ органы и системы

организма с детальной оценкой произошедших патологических процессов, а также изучают зависимость доза / токсический эффект.



Рисунок 1 — Схема разработки инновационного лекарственного средства

Далее осуществляются отбор одной или нескольких молекул для наиболее полного изучения и характеристики, выбор наиболее подходящей лекарственной формы и переход к этапу фармацевтической разработки (ФР) препарата. Для повышения эффективности и ускорения процесса ФР, а также снижения материальных и временных издержек на последующих этапах в сфере разработки лекарственных средств была использована концепция «качества, запланированного при разработке» (Quality-by-Design; далее — QbD).

Для соблюдения принципов QbD необходимо определить целевой профиль качества препарата (ЦПКП), установить критические показатели качества (КПК), пространство проектных параметров и потенциальных критических характеристик качества (КХК) субстанции, вспомогательных веществ и ЛП. На основании проведенной работы была проведена общая оценка рисков, разработана стратегия контроля и управления жизненным циклом препарата.

Полученные в ходе ФР экспериментальные данные и собранная аналитическая информация являются основой для управления рисками и валидации технологических процессов в серийном производстве лекарственного препарата.

Результаты собственных исследований

Получение рекомбинантного белка тритикаин-альфа

Ранее в лаборатории молекулярной биологии и биохимии Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) были получены плазмиды pET-Triticain- α и pQE-Triticain- α -GM для экспрессии в *E.coli* полноразмерного тритикаина-альфа и его усеченного варианта без сигнального пептида и гранулин-подобного домена, соответственно, в обоих случаях содержащие последовательность из 6 His в N-терминальной области рекомбинантного белка. Следует отметить, что наличие последовательности, состоящей из шести гистидинов (His-tag), позволяет использовать простой технологичный способ очистки рекомбинантного белка методом хелатной хроматографии. Кроме того,

была получена плаزمида pQE-PDTriticain- α , содержащая ген, кодирующий только последовательность протеазного домена тритикаина-альфа.

Белок тритикаин-альфа в усеченной форме SEQ ID NO: 2 (shortTRIT- α) получают при помощи рекомбинантной экспрессии в бактериальных клетках. (Технология получения описана в патенте RU 2 603 054 C2.)

Выбор криопротектора для лиофилизации тритикаин-альфа

Получение новой субстанции на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа без вспомогательных веществ в процессе лиофилизации оказалось невозможным, так как, с одной стороны, полученный лиофилизат не соответствовал показателям, изложенным в ГФ XIV издания, и, с другой стороны, в процессе лиофилизации возможна денатурация и (или) агрегация белка, вызывающая потерю протеолитических свойств. В связи с вышеизложенным необходимо было подобрать криопротектор для получения стабильного лиофилизата рекомбинантного белка тритикаин-альфа с целью создания нового лекарственного препарата в форме твердых капсул.

Субстанцию тритикаин-альфа получали по технологии на основании Патента RU 2 603 054 C2. Рекомбинантный белок тритикаин-альфа, сконцентрированный на ячейке Amicon с мембраной PM-10 (Millipore), замораживали при температуре -70°C (не менее 2 ч) и проводили лиофилизацию в течение 24 ч при температуре испарителя -50°C и вакууме 0,03—0,04 миллибар. К сублимационно высушенному рекомбинантному белку тритикаин-альфа (0,02 г) добавляли воду очищенную. Затем в раствор вводили вспомогательные вещества в соотношениях, указанных в Таблице 1, и проводили сушку при условиях, указанных выше.

Критериями выбора криопротектора и его количества являются: внешний вид лиофилизата, способность полученного лиофилизата к измельчению, влагосодержание и возможные продукты распада рекомбинантного белка методом ВЭЖХ. Полученные результаты представлены в Таблице 1.

В результате исследования было выявлено, что оптимальными характеристиками обладали смеси тритикаина-альфа в сочетании с криопротектором поливинилпирролидоном (ПВП) (составы № 6—8): при содержании ПВП в смесях ниже 25% увеличивалась волокнистость сублимированного продукта, он не разрушался при надавливании.

Важным фактором, влияющим на качество лиофилизата, является влагосодержание лиофилизата. Влагосодержание во всех образцах не превышало 3%.

Следует также отметить, что в процессе лиофилизации продуктов распада белка не обнаружено, на хроматограммах четко выражены только две группы пиков в области времени выхода (удерживания) — «11,66—12,22» и «13,31—13,79» мин, которые соответствуют характерным особенностям биотехнологической субстанции — рекомбинантному белку тритикаин-альфа.

Таким образом, на основании проведенных исследований для дальнейшего изучения нами был выбран состав № 6, содержащий 25% ПВП: тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении (50 : 25 : 25) или (2 : 1 : 1).

Таблица 1 — Экспериментальные составы смеси тритикаина-альфа и крипротекторов и результаты исследований

№ п/п	Состав смеси / соотношение компонентов (%)	Внешний вид	Способность к измельчению	Возможные про-дукты разложения
1	Тритикаин-альфа (100%)	Лиофилизированная субстанция, во-локнистая	Отсутствует	Отсутствуют
2	Тритикаин-альфа : маннитол (90 : 10)	Лиофилизированная субстанция в виде таблеток, волокнистая	Незначительная	Отсутствуют
3	Тритикаин-альфа : маннитол (75 : 25)	Лиофилизированная субстанция в виде таблеток, кристаллическая, с отдель-ными включениями волокон	При измельчении наблюдается волокнистость материала	Отсутствуют
4	Тритикаин-альфа : маннитол (50 : 50)	Лиофилизированная субстанция в виде таблеток, кристаллическая	При измельчении материал пылит, образуя очень мелкую фракцию	Отсутствуют
5	Тритикаин-альфа : маннитол (25 : 75)	Лиофилизированная субстанция в виде таблеток, кристаллическая	При измельчении материал пылит, образуя очень мелкую фракцию	Отсутствуют
6	Тритикаин-альфа : маннитол : ПВП (50 : 25 : 25)	Лиофилизированная субстанция в виде таблеток, кристаллическая	Материал хрупкий, измельчается быстро, получается однородный порошок	Отсутствуют
7	Тритикаин-альфа : маннитол : ПВП (50 : 30 : 20)	Лиофилизированная субстанция в виде таблеток, кристаллическая	Материал хрупкий, плотный, измельчается с большим усилием, получается однородный порошок	Отсутствуют
8	Тритикаин-альфа : маннитол : ПВП (50 : 40 : 10)	Лиофилизированная субстанция в виде таблеток, кристаллическая	Материал хрупкий, плотный, измельчается с большим усилием, получается однородный порошок	Отсутствуют

Изучение физико-химических и технологических свойств субстанции

Активная фармацевтическая субстанция белка тритикаина-альфа — лиофилизат (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1) — однородная, волокнистая масса от белого до серовато-белого цвета с неоднородными частицами (данные микроскопического анализа) с преобладанием фракции менее 0,25—0,50 мкм.

Исследование технологических характеристик тритикаина-альфа проводили в соответствии с требованиями общих фармакопейных статей, представленных в ГФ XIV издания. Полученные данные представлены в Таблице 2.

Таблица 2 — Технологические характеристики субстанции белка тритикаин-альфа (средний показатель $\pm SN$, $n = 5$)

Показатель	Размерность	Значение
Сыпучесть	г/с	10,9±0,2
Угол естественного откоса	град	36,6±0,3
Насыпная плотность (до уплотнения)	г/см ³	0,435±0,10
Насыпная плотность (после уплотнения)	г/см ³	0,531±0,12
Пористость	%	74,59±0,75
Коэффициент Hausner	—	1,31±0,078
Индекс Карра	—	17,9±0,092
Содержание влаги	%	2,490±0,241

Из представленных данных следует, что лиофилизат субстанции тритикаин-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1) обладает хорошей сыпучестью, что подтверждают и индексы прессуемости (индекс Carr и Hausner). Значение индекса прессуемости в диапазоне 16—20 указывает на хорошую сыпучесть, о чем свидетельствует и значение коэффициента Hausner выше 1,25.

На основании приведенных исследований была разработана технологическая схема получения субстанции рекомбинантного белка тритикаин-альфа (Рисунок 2). Были установлены и описаны критические точки процесса производства субстанции тритикаин-альфа, а также проведена оценка рисков влияния тритикаина-альфа на критические показатели качества лекарственного препарата.

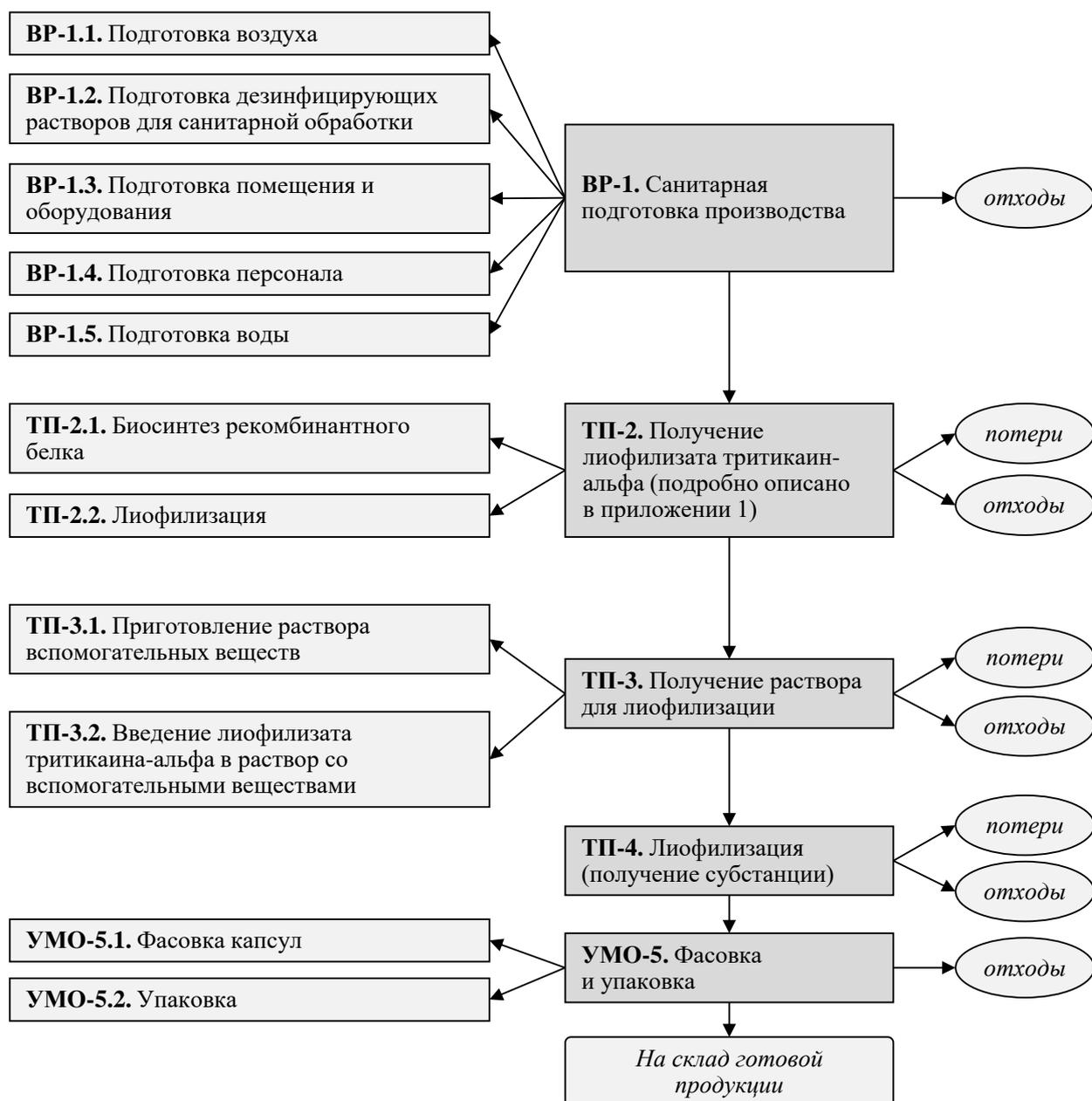


Рисунок 2 — Технологическая схема получения субстанции рекомбинантного белка тритикаин-альфа

Определение показателей качества субстанции тритикаин-альфа

При разработке перечня методик оценки качества ФС исходили из особенностей получения субстанции (рекомбинантный белок), ее физических и биологических свойств (лиофилизат), предполагаемого пути введения (пероральный).

Для характеристики подлинности препарата «Субстанция тритикаин-альфа» был разработан метод ВЭЖХ с использованием градиентной системы элюирования и детекцией при длине волны 280 нм. В процессе частичного автопротеолиза тритикаина-альфа

установлены оригинальные фрагменты по времени выхода, что позволило предложить их для определения подлинности.

Норма показателя «Подлинность» должна соответствовать следующим параметрам:

- сумма площадей 1-й группы пиков (11,66—12,22 мин) при анализе ВЭЖХ не должна превышать 10,5%. В этой группе должны присутствовать пики с усредненными временами выхода (мин): 11,709; 11,856; 11,990; 12,156 (σ не более 5%);
- сумма площадей 2-й группы пиков (13,31—13,79 мин) должна находиться в диапазоне 75—96%. В этой группе должны присутствовать пики с усредненными временами выхода (мин): 13,338; 13,550; 13,749 (σ не более 5%).

На Рисунке 3 приведены хроматограммы опытных образцов ФС серий ТА/3-1, на которых четко выражены две группы пиков в области времени выхода (удерживания) 11,66—12,22 и 13,31—13,79 мин, которые соответствуют характерным особенностям биотехнологической субстанции — рекомбинантному белку тритикаин-альфа.

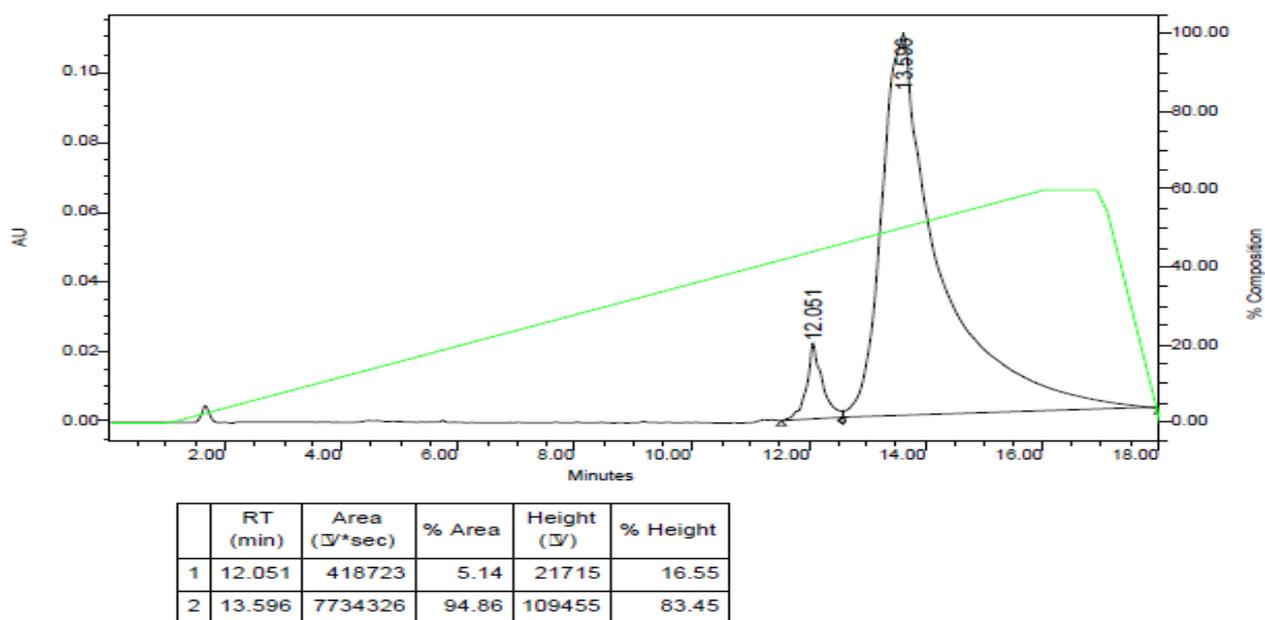


Рисунок 3 — Хроматограмма опытного образца субстанции серии ТА/3-1 (времена удерживания двух групп пиков находятся в диапазонах времени выхода, характерных для рекомбинантного белка тритикаин-альфа)

Содержание остаточной ДНК штамма-продуцента *E.coli* определяли методом молекулярной гибридизации (по МУК 4.1/4.2.588-96, п. 6, с. 15). Для введения биотиновой метки в ДНК *E.coli* и визуализации результатов гибридизации использовали коммерческие наборы (BiotinDecaLabel™ DNA LabelingKit, Fermentas, Литва, КО651; BiotinChromogenicDetectionKit Fermentas, Литва, КО661) соответственно.

Содержание остаточной ДНК штамма-продуцента *E.coli* во всех опытных образцах ФС серий составляло до 3,6 пг ДНК/мг белка, что не превышает нормативные значения.

Содержание остаточных белков штамма-продуцента *E.coli* определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора *E.coli* (HostCellProteins CygnusTechnologies, Inc. USA, Catalog #F410) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Значение содержания остаточных белков штамма-продуцента *E.coli* во всех опытных образцах ФС серий ТА/3-1 составляло до 4,5 нг/мг белка, что не превышает нормативные значения.

Для определения количественного содержания белка в субстанции были разработаны методика измерения концентрации белка с использованием набора BCA-kit и методики BCA1 (Sigma-Aldrich, США, кат. №BCA1-1КТ).

Набор состоит из раствора бицинхониновой кислоты (Sigma-Aldrich, США, кат. № B9643-1L), 4%-ного раствора меди сульфата (2+) (Sigma-Aldrich, США, кат. № C2284-25ML) и стандартного раствора белка — бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США, кат. № BCA1-1КТ).

Готовили растворы опытных образцов ФС серий путем растворения соответствующих лиофилизатов в натрий-фосфатном буфере (PBS) с заданной концентрацией в диапазоне 0,2—1 мг/мл и подтверждали ее методом BCA.

Ферментативная активность опытных образцов ФС серий оценивалась путем вычисления удельной протеолитической активности ФС на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа. Рекомбинантный белок тритикаин-альфа способен гидролизовать пептидные субстраты, конъюгированные с 7-амино-4-метилкумарином (АМК), с последующим определением продуктов гидролиза по интенсивности флуоресценции свободного АМК. Измерение интенсивности флуоресценции АМК проводили на спектрофлуориметре при длине возбуждения флуоресценции 360 нм и длине испускания 460 нм. В качестве модельного субстрата был выбран пептид валин-лейцин-пролин-глутамин-АМК (VLPQ-АМК). Данная методика определения ферментативной активности ФС была разработана и валидирована на первом этапе исследований. За единицу удельной протеолитической активности принимают такое количество фермента, которое за 1 мин при 25°C гидролизует субстрат в количестве, соответствующем 1 мкМ свободного АМК в пересчете на 1 мг испытуемого препарата. Ферментативная активность опытных образцов ФС серий составила 0,030—0,033 мкМ/мин/мг, т.е. соответствует нормативным значениям.

Изучение условий хранения и стабильности субстанции

Стабильность субстанции рекомбинантного белка тритикаин-альфа изучали в условиях долгосрочного хранения в предполагаемой упаковке — стеклянных контейнерах (укупорка — резиновые пробки; обжим — алюминиевые колпачки). Рекомендуемые условия хранения: «В сухом защищенном от света месте при температуре от 4 до 8°C».

При изучении стабильности субстанции в условиях долгосрочного хранения существенных изменений показателей качества не обнаружено. Таким образом, на данный момент мы можем рекомендовать срок годности субстанции два года в сухом защищенном от света месте при температуре от 4 до 8°C.

Доклинические исследования рекомбинантного белка тритикаин-альфа

В отечественной нормативной документации, регулирующей порядок проведения доклинических исследований, отсутствуют методики, рекомендованные для оценки специфической активности фармацевтических средств, предназначенных для терапии целиакии. Для проведения испытаний *in vitro* была использована модель на основе дифференцированных энтероцитоподобных клеток перевиваемой колоноректальной карциномы человека линии Сасо-2, воспроизводящая основные патогенетически значимые элементы целиакии. Эффективность терапевтического действия тритикаина-альфа оценивали по его способности нейтрализовать токсические эффекты глютена и его ферментных гидролизатов на культивируемые клетки Сасо-2, а также способности тритикаина-альфа в клеточных моделях проводить расщепление глиадиновых пептидов и других ключевых токсических компонентов глютена.

В результате экспериментальных исследований было показано, что опытный образец рекомбинантного белка тритикаин-альфа является потенциально эффективным для терапии целиакии, так как при воздействии токсичного глиадинового пептида р31-43 после его инкубации с исследуемой фармацевтической субстанцией на дифференцированный монослой модельных клеток Сасо-2 количественные значения анализируемых параметров достоверно не отличаются от значений в отрицательном контроле.

Стабильность тритикаина-альфа в условиях имитации желудочного сока

Изучение стабильности при пероральном применении рекомбинантного белка тритикаин-альфа проводили в модельных экспериментах, воссоздавая условия желудочной и кишечной среды за счет подбора соответствующих значений рН и ферментного состава.

Протеолитическая активность ферментов предварительно подтверждалась в экспериментах с расщеплением бычьего сывороточного альбумина. В результате проведенных исследований было показано, что белок тритикаин-альфа относительно стабилен на протяжении 30 мин в кислой среде в присутствии пепсина (рН 3,0; температура 37°C). При этом в данных условиях зафиксирована максимальная глютеназная активность тритикаина-альфа (Рисунок 4).

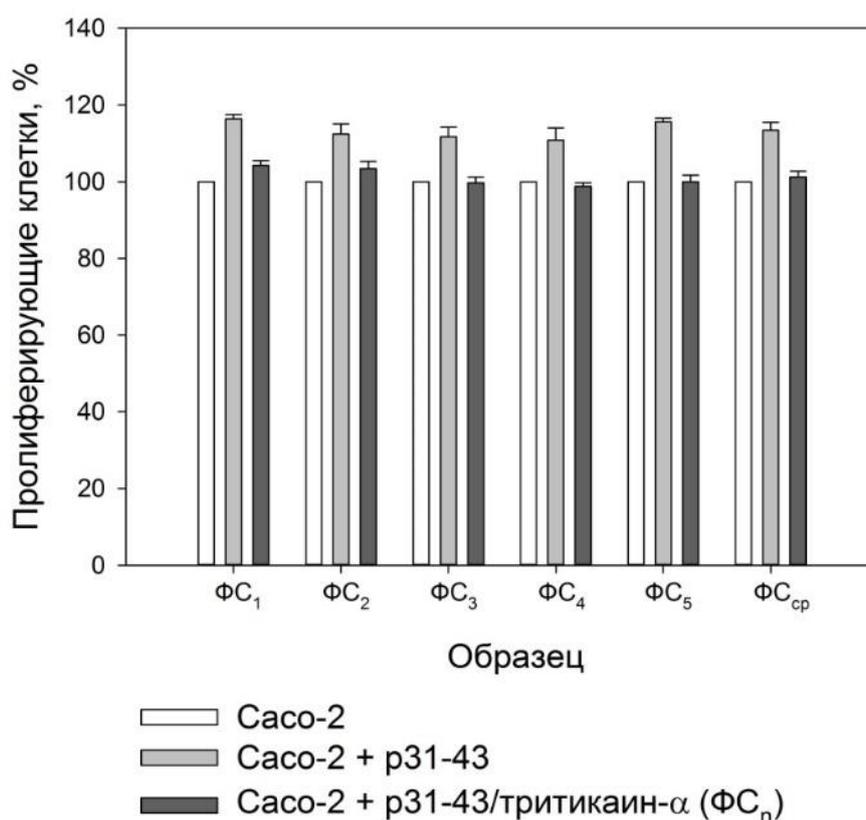


Рисунок 4 — Проллиферативная активность клеток линии Сасо-2 (интактные клетки — Сасо-2) токсичного глиадинового пептида p31-43 (Сасо-2+p31-43) и пептида p31-43, обработанного исследуемой субстанцией тритикаин-альфа (Сасо-2+p31-43/тритикаин-альфа)

Вместе с тем в слабощелочной среде в присутствии трипсина (рН 8,0; температура 37°C) белок полностью расщепляется в течение 15 мин (Рисунок 5). В результате можно отметить устойчивость и эффективность тритикаина-альфа в условиях пищеварительного процесса в желудке, при котором зафиксирована максимальная активность белка в расщеплении токсических компонентов клейковины, что показывает возможность ферментативной терапии целиакии с применением данного белка.

Гидролизаты глютена, инкубированные с пепсином и трипсином, приводят к значительной потере проницаемости клеток Сасо-2 по сравнению с контролем (клетки

без обработки) и по сравнению с клетками, обработанными гидролизатами глютен тритикаин-альфа, пепсином и трипсином после 24 ч инкубации.

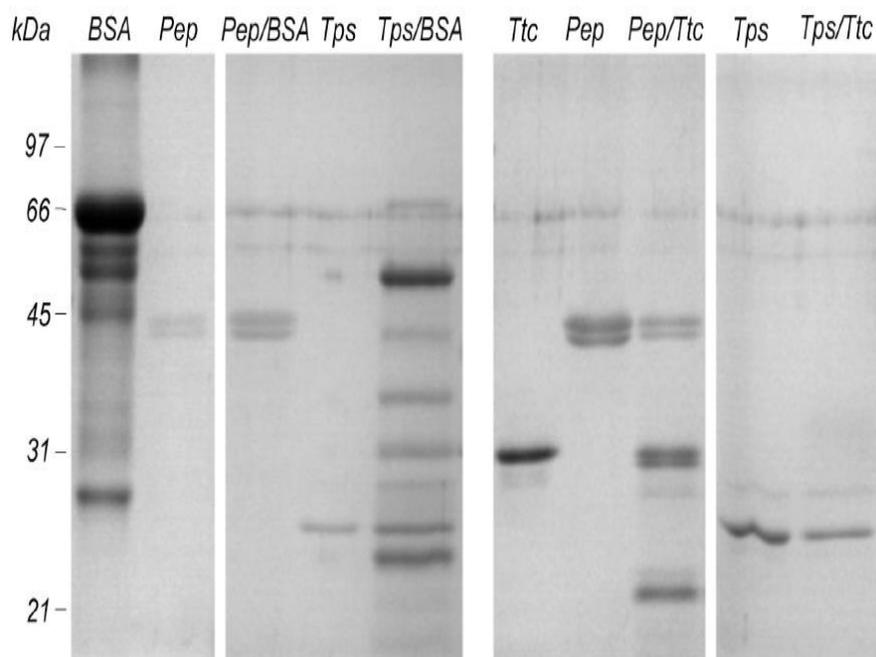


Рисунок 5 — Электрофорез в полиакриламидном геле БСА (BSA) и тритикаина-альфа (Ttc). Условия: массовое соотношение BSA : Ttc — 1 : 1; инкубирование с пепсином (Pep) при pH 3,0 на протяжении 30 мин, либо с трипсином (Tps) при pH 8,0 — 15 мин. Отметки стандартов молекулярной массы (кДа/kDa) указаны в левой колонке

Экспериментальные исследования по расщеплению клейковины рекомбинантным белком тритикаин-альфа показывают, что происходит протеолиз основных токсических компонентов (пептидов глиадина), которые отвечают за развитие воспалительной реакции при употреблении глютен пациентами с целиакией. Моделирование активности и изучение стабильности тритикаина-альфа в среде желудочно-кишечного тракта при различной температуре и pH показало перспективность применения фермента в качестве потенциального средства перорального применения для терапии целиакии.

Оценка специфической фармакологической активности тритикаина-альфа на модели целиакии *in vivo*

Для исследования специфической активности тритикаина-альфа *in vivo* необходимо было смоделировать целиакию на грызунах. Большинство современных моделей заболеваний животных с нарушенной регуляторной функцией Т-клеток основаны на дефиците CD4⁺/CD25⁺ Т-клеток (Treg), который приводит к полиорганным воспалительным заболеваниям, при этом наиболее сильно поражаются поверхности слизистой оболочки,

прежде всего, кишечника. Это объясняется узнаванием микробных антигенов в слизистых оболочках эффекторными Т-клетками. Показано, что перенос Т-клеток лимфопеническим мышам способствует индукции антиген-специфического иммунитета и самопроизвольному развитию органоспецифического аутоиммунного заболевания. Поэтому мы предположили, что распознавание пищевого глютена переносимыми глиадином сенсibilизированными CD4⁺ Т-клетками будет стимулировать дуоденит / энтерит у мышей-реципиентов. Для блокирования противовоспалительного фенотипа лимфоцитов и ремиссии активацию лимфоцитов проводили с использованием IFN- γ , TNF α . IFN- γ активирует макрофаги, которые, в свою очередь, секретируют TNF- α и матриксные металлопротеиназы (ММР), такие как ММР-12 и ММР-13, повреждающие энтероциты и плотные межклеточные контакты. В кишечных миофибробластах как TNF- α , так и IFN- γ стимулируют экспрессию протеолитических ММР-1 и ММР-3. Такое высвобождение и активация ММР индуцируют протеолиз внеклеточного матрикса, что приводит к изменению структуры кишечника, наблюдаемой при целиакии.

Суть исследования специфической активности тритикаина-альфа заключается в расщеплении экзогенных пептидов глютена и, тем самым, блокированию начального этапа иммунологического каскада целиакии. Для стандартизированной оценки патологических изменений используется классификация Marsh-Oberhuber, включающая три типа повреждения эпителия, характеризующиеся увеличением числа межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ).

У мышей контрольной группы значение МЭЛ в основном не выходит за пределы порогового. У мышей позитивного контроля отмечается выраженное повышение числа МЭЛ, статистически значимое при сравнении с контрольной группой (p для различия медиан $\ll 0,05$). При применении тритикаина-альфа в дозе 4 мг/животное количество МЭЛ ниже, различие с контрольной группой статистически значимо ($p < 0,05$). Применение тритикаина-альфа в дозе 20 мг/животное также приводит к снижению количества МЭЛ, однако существенных различий с дозой 4 мг не наблюдается. Различие между группой 20 мг и контрольной группой статистически значимо ($p < 0,05$) (Рисунок 6).

Таким образом, применение тритикаина-альфа в дозе 4 и 20 мг/животное 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. Стадирование процесса снижается с уровня March 2 до уровня Marsh 3 по классификации Marsh-Oberhuber.

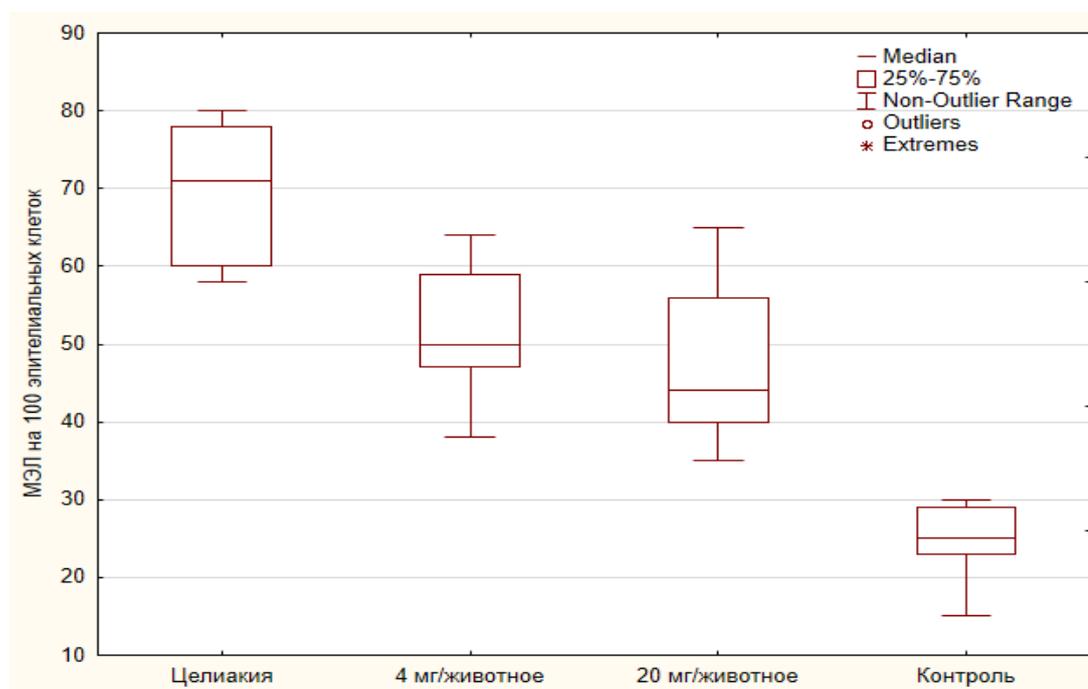


Рисунок 6 — Количество МЭЛ на 100 эпителиоцитов у животных. В ходе статистического анализа обнаружены достоверные различия между группой «Целиакия» и группой «4 мг/животное» ($p = 0,004$, критерий Манна-Уитни), а также между группой «Целиакия» и группой «20 мг/животное» ($p = 0,001$, критерий Манна-Уитни). Из данных специфической активности *in vivo* минимальная эффективная доза для мышей — 4 мг/животное, или 80 мг/кг

Дальнейшие токсикологические испытания проводили исходя из данной терапевтической дозы, так как прямой пересчет с человеческой терапевтической дозы на животную для данного препарата некорректен. В результате было показано, что тритикаин-альфа не всасывается при пероральном пути введения и не оказывает системного действия. Исследования различных типов токсических эффектов показали их отсутствие, а также высокую степень безопасности препарата.

Программа исследований по разработке твердой лекарственной формы с тритикаином-альфа

Для разработки стабильной лекарственной формы рекомбинантного белка тритикаин-альфа — твердых капсул, была составлена и реализована программа экспериментальных исследований, учитывающая требования концепции QbD, которая представлена на Рисунке 7.



Рисунок 7 — Этапы исследовательской программы по разработке твердых лекарственных форм с тритикаином-альфа

Разработка оптимального состава твердых капсул с рекомбинантным белком тритикаин-альфа

Комбинации лиофилизата тритикаин-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1) с вспомогательными веществами (в соотношении 1 : 2) представлены в Таблице 3.

Перемешивание субстанции и вспомогательных веществ проводили в смесителе *Glatt* (мод. TMG, серии *Mini* Германия) при следующих режимах: скорость вращения мешалки 50—100 об./мин, чоппера — 500—1000 об./мин. Содержание тритикаина-альфа в одной капсуле должно составлять 20 мг. Оценку качества полученных композиций проводили по следующим показателям: однородность, сыпучесть, насыпная плотность (до и после уплотнения), угла естественного откоса (Таблица 3).

Таблица 3 — Технологические характеристики комбинаций тритикаина-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1) и вспомогательных веществ ($\pm SN$, $n = 5$)

Комбинации (в соотношении 1 : 2)	Свободная насыпная плотность, кг/м ³	Предельная насыпная плотность, кг/м ³	Сыпучесть, г/с	Угол естественного откоса, град	Индекс Карра	Коэффициент Хауснера
Тритикаин-альфа, маннитол, ПВП	435,80± 13,10	531,04± 13,02	10,09±1,12	36,6±2,53	17,9	1,21
Тритикаин-альфа, маннитол, ПВП+клептоза	392,60± 13,30	529± 13,08	16,03±1,12	31,9±2,55	18,4	1,34
Тритикаин-альфа, маннитол, ПВП + ликатаб С	583,4± 13,05	662,3± 13,52	12,7±1,02	32,5±2,53	12,9	1,13
Тритикаин-альфа, маннитол, ПВП + PROSOLV® SMCC 90	394,80± 13,10	451,2± 13,02	6,06±1,12	39,6±253	11,63	1,25
Тритикаин-альфа, маннитол, ПВП + МКЦ 102	603,4± 13,05	692,1± 13,52	12,3±1,12	30,3±2,53	12,86	1,15

Как следует из данных, приведенных в Таблице 3, показатели качества комбинации тритикаина-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1) с клетчаткой составляли: сыпучесть — $16,1 \pm 0,02$ г/сек, угол естественного откоса — $36,6 \pm 0,05^\circ$, индекс Карра — 18,4. Данные результаты свидетельствуют об ухудшении технологических характеристик субстанции. При смешивании тритикаина-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1) с силикатированной микрокристаллической целлюлозой (PROSOLV®SMCC 90) сыпучесть составила $6,9 \pm 0,1$ г/сек, а угол естественного откоса — $33,2 \pm 0,06^\circ$ при индексе Карра — 11,63. Показатели качества комбинаций тритикаина-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1) с ликатабом С и МКЦ-102 улучшают технологические характеристики ФС и незначительно отличаются друг от друга.

Полученные данные подтверждают целесообразность использования таких вспомогательных веществ, как МКЦ-102, ликатаб С и силикатированная микрокристаллическая целлюлоза (PROSOLV®SMCC 90) в получении смеси для капсулирования, поскольку они улучшают технологические характеристики лиофилизата тритикаин-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1).

Подбор соотношения ликатаба С, МКЦ 102 и «полуфабриката» начинали с соотношения 1 : 1 : 1, а затем увеличивали количество вспомогательных веществ с шагом 1 по ликатабу С и с шагом 2 — по микрокристаллической целлюлозе. Были исследованы соотношения: «полуфабрикат» : ликатаб С : МКЦ 102 = (1 : 1 : 1); (1 : 2 : 4); (1 : 3 : 6).

Оценку качества полученных композиций проводили по следующим показателям: однородность, сыпучесть, насыпная плотность (до и после уплотнения), угла естественного откоса (Таблица 4).

Как видно из Таблицы 4, все составы обладают хорошей сыпучестью. Следует отметить, что увеличение количества МКЦ 102 от 1 до 3 частей (составы № 1, 3, 4 и 5 соответственно) приводит к уменьшению угла естественного откоса и увеличению сыпучести смеси. Наилучшие результаты наблюдаются у состава № 5.

Таблица 4 — Технологические характеристики полученных образцов ($\pm SN$, $n = 5$)

№ п/п	Комбинации/соотношения	Насыпная плотность до уплотнения, кг/м ³	Насыпная плотность после уплотнения, кг/м ³	Сыпучесть, г/с	Угол естественного откоса, град	Индекс Карра	Коэфф. Хауснера
1	Тритикаин-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1)+МКЦ 102 (1 : 2)	603,4± 13,05	692,1± 13,52	12,3±1,12	30,3±2,53	12,86	1,15
2	Тритикаин-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1 + ликатаб С (1 : 2)	583,4± 13,05	662,3± 13,52	12,7±1,22	32,5±2,53	12,9	1,13
3	Тритикаин-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП (2 : 1 : 1) : ликатаб С: МКЦ 102 (1 : 1 : 1)	535,4± 13,15	653,2± 13,13	12,6±1,3	32,9±2,56	14,8	1,22
4	Тритикаин-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП (2 : 1 : 1) : ликатаб С : МКЦ 102 (1 : 2 : 4)	577,1± 13,21	655,1± 13,09	14,6±1,2	31,9±2,57	12,6	1,15
5	Тритикаин-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП (2 : 1 : 1) : ликатаб С : МКЦ 102 (1 : 3 : 6)	571,2± 13,13	658,4± 13,15	16,8±1,2	29,1±2,53	11,8	1,11

Для подтверждения однородности дозирования массы для наполнения капсул исследование проводили после перемешивания в течение 5, 10, 15 и 60 мин в смесителе, оценивая количественное содержание тритикаина-альфа в 1 г массы после перемешивания спектрофотометрическим методом с раствором бицинхониновой кислоты (BCA).

Таблица 5 — Содержание тритикаина-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1) в 1 г капсулированной массы в процессе перемешивания, мг/г (средний показатель $\pm SN$, $n = 5$)

№ состава	Содержание тритикаина-альфа в 1 г капсулированной массы, мг/г			
	после 5 мин	после 10 мин	после 15 мин	после 60 мин
1	19,6 \pm 0,780	20,4 \pm 1,02	20,1 \pm 1,005	20,3 \pm 1,015
2	19,7 \pm 0,685	20,1 \pm 1,005	20,6 \pm 1,030	20,4 \pm 1,020
3	19,2 \pm 0,845	20,6 \pm 0,980	20,7 \pm 1,035	20,4 \pm 1,020
4	19,4 \pm 0,770	20,6 \pm 0,880	20,5 \pm 1,000	20,6 \pm 1,030
5	20,1 \pm 1,055	20,7 \pm 1,035	20,4 \pm 1,020	20,9 \pm 1,045

Результаты, представленные в Таблице 5, свидетельствуют о том, что после 10 мин перемешивания показатель «однородность дозирования» тритикаина-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1) практически не меняется для всех составов. Предположительно, это является следствием хорошей сыпучести смесей и оптимальным временем перемешивания. Таким образом, установленные экспериментальным путем 10 мин можно считать оптимальным временем перемешивания.

Изучение показателя «Растворение» разработанной лекарственной формы

Изучение профилей растворения капсул с тритикаином-альфа выполняли по ОФС 42-0003-04 «Растворение». В качестве среды растворения использовали 0,1 Н раствор соляной кислоты, так как растворение ЛФ будет происходить в желудке. Количественное содержание белка проводили спектрофотометрическим методом с раствором бицихонинновой кислоты (ВСА). Усредненные профили растворения наглядно представлены на Рисунке 8.

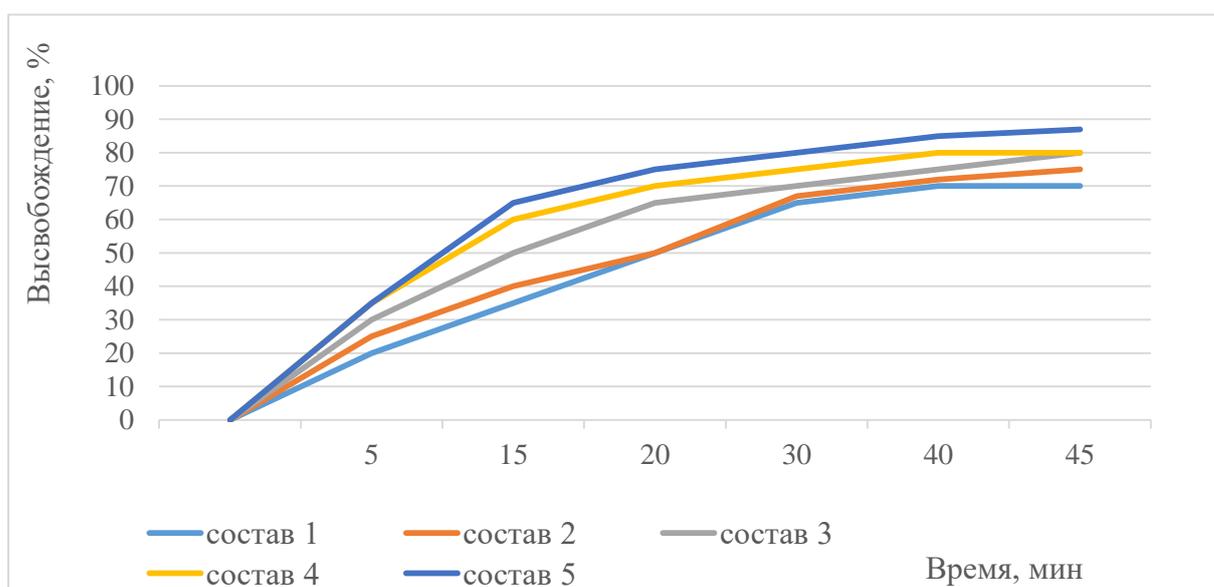


Рисунок 8 — Профиль высвобождения тритикаина-альфа из исследуемых образцов

Как можно заметить, тритикаин-альфа равномерно высвобождается из всех образцов капсул. Состав № 1 имеет самый низкий профиль высвобождения (70% за 45 мин) и не соответствует требованиям ГФ XIV изд. Составы № 2, 3 и 4 имеют близкие значения профиля высвобождения действующего вещества. Однако наилучший профиль растворения дает состав № 5 (тритикаин-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП в соотношении 2 : 1 : 1) : ликатаб С : МКЦ 102 (1 : 3 : 6)).

Проведенные комплексные исследования показали, что состав № 5 (тритикаин-альфа (тритикаин-альфа : маннитол : ПВП (2 : 1 : 1) : ликатаб С : МКЦ 102 (1 : 3 : 6)) обладает удовлетворительными технологическими свойствами, необходимыми для получения твердых капсул, стабильных в процессе производства. Однако для создания необходимой массы капсулы и для улучшения насыпной массы в состав смеси были внесены некоторые изменения в сторону увеличения соотношения ингредиентов и был получен конечный вариант (полуфабрикат): ликатаб С : МКЦ 102 = 1 : 3,4 : 6,8. В дальнейшем отработку технологии получения капсулы проводили с указанным составом.

Разработка технологии получения капсул с рекомбинантным белком

В процессе разработки твердых лекарственных препаратов необходимо решить основную задачу — обеспечить равномерное распределение действующих и вспомогательных веществ с различными физико-химическими и технологическими свойствами, в том числе в процессе перемешивания. В связи с этим нами была проведена оценка возможности смешивания порошкообразных материалов, входящих в состав рецептуры исследуемой смеси в смесителе Glatt (мод. TMG, серии Mini, Германия). Смешение основных ингредиентов осуществляли в смесителе Glatt при следующих режимах: скорость вращения мешалки — 50—100 об./мин, чоппера — 500—1000 об./мин, загрузка — 250 г в чашу, вместимостью 1000 мл (~1/4 от объема чаши смесителя).

Сначала загружали МКЦ 102 как более кристаллическую смесь и перемешивали 5 мин, затем вводили ликатаб С и перемешивали 20 мин, добиваясь равномерного распределения. Время перемешивания и качество распределения предварительно оценивали в модельном опыте при использовании ликатаба С, окрашенного красной меловой аэрозольной краской (производитель *Dupli-Color*). Оценку проводили визуально.

Затем в смесь при перемешивании и увеличенных скоростях вращения (чоппера — до 1000 об./мин, мешалки — до 100 об./мин) вводили субстанцию — лиофилизат тритикаина-альфа, которую не подвергали предварительному измельчению, и стеарат магния. Смешивание осуществляли в смесителе в течение 5 мин, затем скорость вращения чоппера уменьшали до исходной — 500 об./мин. Перемешивание продолжали в течение 5 мин. Температура смеси за указанное время оставалась постоянной и составляла $+20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Принимая во внимание природу действующего вещества — белок, а также отсутствие лабораторных смесителей с охлаждаемой поверхностью, параллельно был проведен эксперимент с использованием охлажденных до $-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ смеси МКЦ 102 и ликатаба С.

Возможные продукты разложения оценивали методом ВЭЖХ. Полученные хроматограммы представлены на Рисунках 9 и 10.

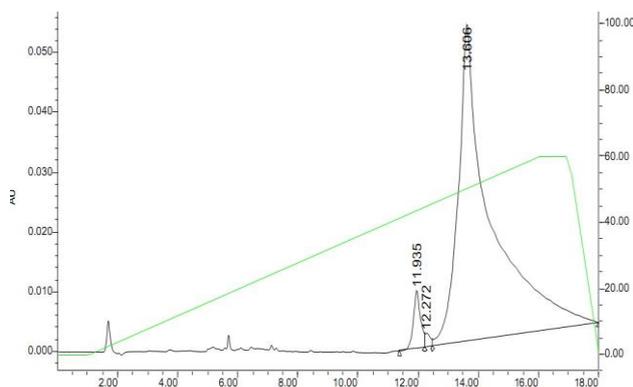


Рисунок 9 — Хроматограмма подлинности белка с возможными продуктами его разложения в исследуемой массе для капсулирования, полученной при перемешивании ингредиентов при температуре $+20^{\circ}\text{C}$

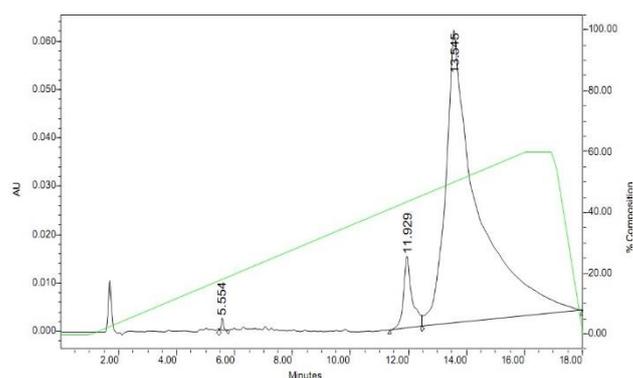


Рисунок 10 — Хроматограмма подлинности белка с возможными продуктами его разложения в исследуемой массе для капсулирования, полученной при перемешивании отдельных ингредиентов (МКЦ 102 и ликатаба С) при охлаждении — температуре $-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$

Как следует из Рисунков 9 и 10, на хроматограммах четко выражены две группы пиков в области времени выхода около 11,80—12,30 и 13,50—13,80 мин, что подтверждает подлинность тритикаина-альфа, и отсутствие следов разложения рекомбинантного белка тритикаин-альфа при различных способах получения массы для капсулирования. Оценку качества полученной смеси проводили по следующим показателям: однородность дозирования, сыпучесть, насыпной массы, содержания влаги (до перемешивания и после).

Таблица 6 — Технологические характеристики образцов, полученных при различных температурных параметрах перемешивания

№ п/п	Показатель качества	Тритикаин-альфа : маннитол : ПВП (2 : 1 : 1) : ликатаб С : МКЦ 102 (1 : 3, 4 : 6, 8)	
		Перемешивание при температуре +20°C±1°C	Охлаждение вспомогательных веществ до -20°C±2°C и дальнейшее перемешивание
1	Внешний вид	Однородная волокнистая масса, от белого до серовато-белого цвета порошок	Однородная волокнистая масса, от белого до серовато-белого цвета порошок
2	Сыпучесть, г/с	16,8±0,2	16,9±0,2
3	Угол естественного откоса, °	29,1±0,13	27,9±0,19
4	Свободная насыпная плотность, кг/м ³	571,42±0,13	588,6±3,05
5	Предельная насыпная плотность, кг/м ³	658,14±0,15	629,1±0,14
6	Коэффициент Хауснер	1,31	1,35
7	Индекс Карра	16,4	17,2
8	Влажность	2,81±0,21	2,89±0,18
9	Однородность дозирования	20,05±2,00	20,01±2,00

Как видно из данных Таблицы 6, технологические показатели практически не отличаются. Содержание белка во всех точках смеси укладывается в диапазон 20,00±2,00 мг.

Таким образом, для дальнейшего изучения технологических свойств массы при капсулировании использовали образцы, полученные при перемешивании компонентов при температуре +20°C.

Технологическая схема получения капсул с тритикаином-альфа

Результатом проведения комплекса экспериментальных исследований, описанных в предыдущих разделах, стала разработка состава капсул с рекомбинантным белком тритикаин-альфа, приведенного в Таблице 7.

Таблица 7 — Состав лекарственного средства на одну капсулу

Состав (из расчета на одну капсулу)	мг
Действующее вещество	
Рекомбинантный белок тритикаин-альфа (ФС)	20
Вспомогательные вещества	
Маннит (D-маннитол)	10
Поливинилпирролидон м.м.12600 (ПВП)	10
Целлюлоза микрокристаллическая 102 (МКЦ 102)	122
Ликатаб С (мальтодекстрин)	61
Магния стеарат	2
Масса капсулы	85
Общая масса лекарственного препарата	310,00

На основании проведенных исследований была разработана технологическая схема получения нового ЛП «Тритикаин-альфа, капсулы 20 мг» (Рисунок 11).

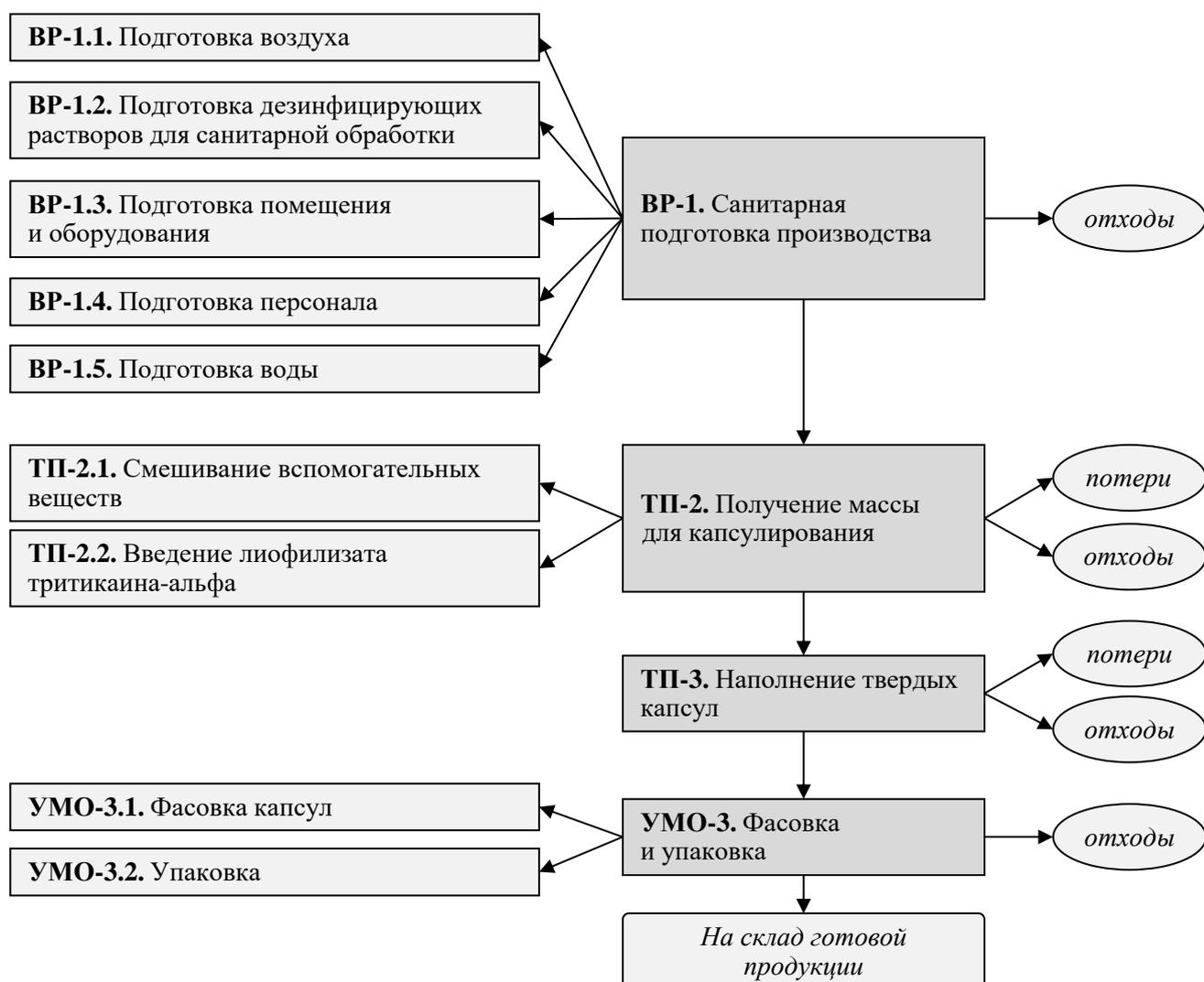


Рисунок 11 — Технологическая схема получения капсул с рекомбинантным белком тритикаин-альфа

Определение показателей качества капсул с рекомбинантным белком тритикаин-альфа

В ходе исследования были разработаны и валидированы методики оценки качества лекарственного препарата «Капсулы с рекомбинантным белком тритикаин-альфа», составлена спецификация на ЛП и проведен анализ.

Таблица 8 — Спецификация на лекарственный препарат «Тритикаин-альфа, капсулы 20 мг»

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Твердые капсулы из гипромеллозы размера 0, крышечка — бесцветная, корпус — бесцветный, содержимое капсулы — лиофилизированный порошок белого цвета
Подлинность	Электрофорез в полиакриламидном геле (ГФ XIV)	Молекулярные массы трех основных пиков: ~ 11—12 кДа; ~30 кДа и ~42 кДа (сравнение с маркерами известной молекулярной массы)
Подлинность	ВЭЖХ	На хроматограмме: Сумма площадей 1-й группы пиков (время удерживания 11,80—12,30 мин) не должна превышать 10,5%. Сумма площадей 2-й группы пиков (время удерживания 13,50—13,80 мин) должна находиться в интервале 75,0—96,0%
Распадаемость	ОФС 1.4.2.0013.15	Не более 30 мин
Растворение	ОФС 1.4.2.0014.15	За 45 мин в раствор 0,1 Н хлористоводородной кислоты должно перейти не менее 80% лекарственного вещества
Однородность дозирования массы	ГФ XIV	От 85 до 115%
Микробиологическая чистота	ГФ XIV, ОФС.1.2.4.0002.15	Категория 3А
Количественное определение	Спектрофотометрический метод ВСА (с использованием бицинхоиновой кислоты)	От 18,0 до 22,0 мг тритикаина-альфа

С целью определения подлинности нами было проведено исследование ЛФ методом электрофореза в полиакриламидном геле по ОФС.1.2.1.0023.15.

Результаты исследования представлены на Рисунке 12. Электрофореграмма тритикаина-альфа в составе ЛФ характеризуется тремя основными полосами — размером ~11–12 кДа, ~30 кДа и ~42 кДа. Такое свойство рекомбинантного тритикаина-альфа — аутокаталитическое расщепление — было использовано нами для разработки методики его качественного определения.

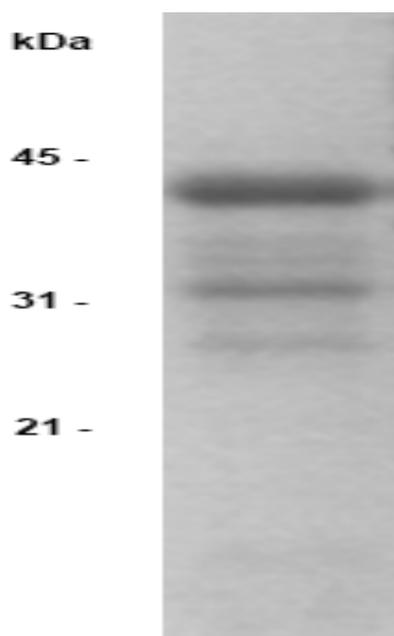


Рисунок 12 — Электрофореграмма тритикаина-альфа из лекарственного препарата — капсулы с рекомбинантным белком тритикаин-альфа

Поскольку рекомбинантный белок тритикаин-альфа подвержен автопротеолизу при проведении рефолдинга и концентрирования, применить метод ВЭЖХ для количественного определения белка не представляется возможным. Однако было доказано, что в процессе частичного автопротеолиза рекомбинантного тритикаина-альфа образуются фрагменты со временем удерживания, характерным для данной субстанции. Сравнительное изучение хроматограмм рекомбинантного тритикаина-альфа как фармацевтической субстанции, так и в составе ЛП (капсул), показало, что метод ВЭЖХ можно применять для идентификации подлинности белка в лекарственной форме. На Рисунке 13 представлены примеры хроматограмм тритикаина-альфа из соответствующего ЛП, имеющие сходную структуру: четко выражены две группы пиков в области времени выхода около 11,80—12,30 и 13,50—13,80 мин.

Эти характерные особенности определения тритикаина-альфа из ЛП методом ВЭЖХ были использованы нами для разработки методики определения подлинности тритикаина-альфа в ЛП методом ВЭЖХ.

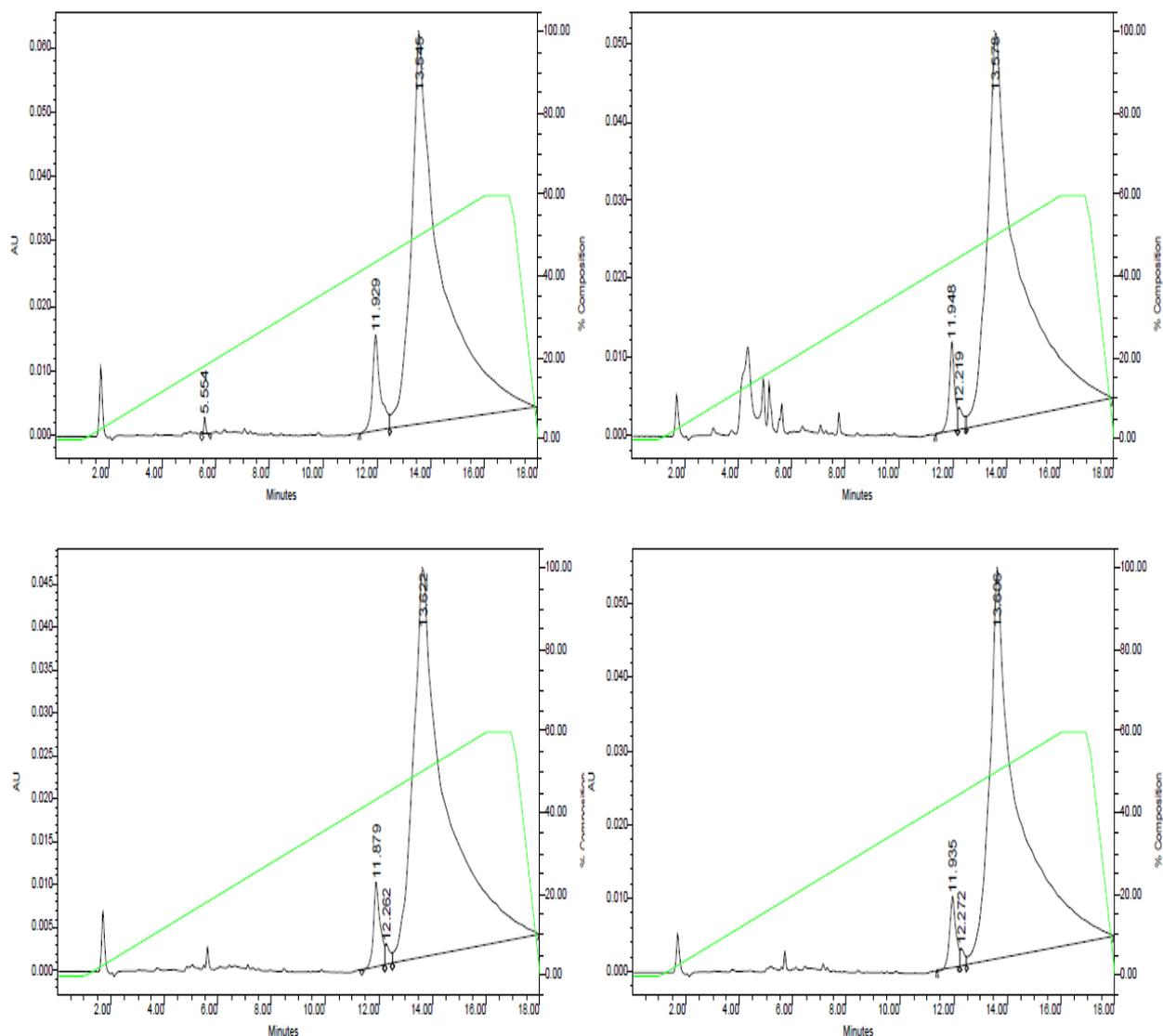


Рисунок 13 — Типичные хроматограммы тритикаина-альфа из ЛП — капсул с рекомбинантным белком тритикаин-альфа

В связи с тем, что метод ВЭЖХ для количественного определения использовать невозможно, нами был предложен способ определения белка спектрофотометрическим методом с раствором бицинхониновой кислоты (BCA) при длине волны 562 нм (спектрофотометр Smart Spec3000 (Bio Rad, США).

Определение содержания белка тритикаина-альфа в капсулах проводят по калибровочному графику (Рисунок 14). Норма содержания белка в ЛП составляет от 18,0 до 22,0 мг белка.

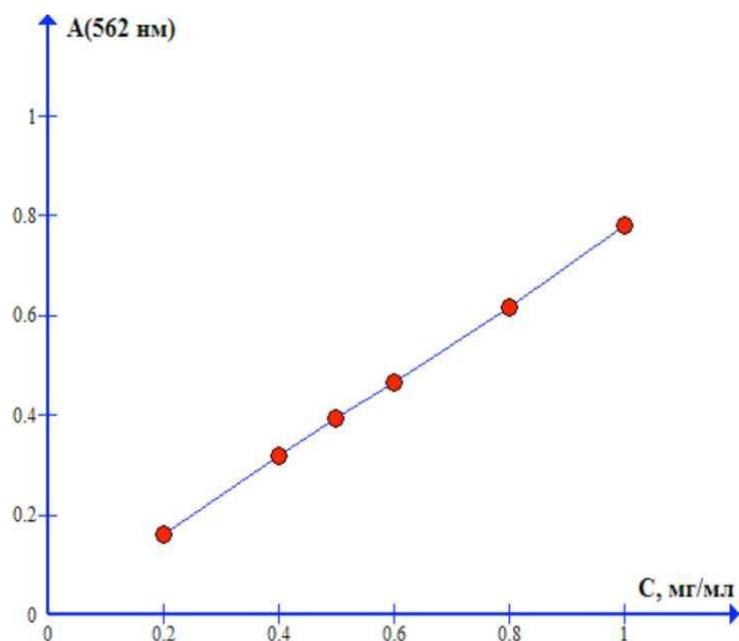


Рисунок 14 — Калибровочный график — зависимость оптической плотности BSA от концентрации

При этом нами были установлены метрологические характеристики количественного определения белка. Результаты представлены в Таблице 9.

Таблица 9 — Метрологические характеристики методики количественного определения рекомбинантного белка тритикаин-альфа в капсулах

f	X	S ²	S	P, %	t _{9p(f)}	ΔX	E ₁ , %	E ₂ , %	E ₃ , %
8	0,006	0,0095	95	2,12	2,26	0,1032	±2,98	±2,76	±2,58

Из представленных данных (табл. 9) видно, что ошибка при единичном определении составляет ±2,98%, при анализах: в двух повторностях — ±2,76%, в трех — ±2,58%.

Изучение условий хранения и стабильности лекарственного препарата

Стабильность твердых капсул с тритикаином-альфа изучали в условиях долгосрочного хранения в предполагаемой упаковке (контурная ячейковая упаковка из пленки поливинилхлоридной и фольги алюминиевой печатной). Рекомендуемые условия хранения: «В сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C».

Условия испытаний (изучение стабильности в естественных условиях):

- Температура $2^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Относительная влажность $60\% \pm 5\%$
- Температура $8^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Относительная влажность $60\% \pm 5\%$.

Контроль показателей качества осуществляли через 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 месяцев.

Изучение стабильности проводилось в соответствии с требованиями ОФС 1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств».

Перед закладкой на хранение и в процессе естественной (долгосрочной) стабильности контроль препарата проводили по показателям качества, которые могут измениться в процессе хранения: внешний вид, содержание примесей, микробиологическая чистота, растворение и количественное содержание действующего вещества.

При изучении стабильности препарата в условиях долгосрочного хранения существенных изменений показателей качества не обнаружено. Таким образом, на данный момент мы можем рекомендовать срок годности два года в условиях 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.

Общие выводы

1. Теоретически обоснована и экспериментально подтверждена методология проектирования инновационного препарата на основе рекомбинантного белка тритикаин-альфа для лечения целиакии. Методология включает конструирование нового ЛП на основе детального изучения механизмов возникновения заболевания для экспериментального моделирования целиакии как мишени для активного вещества и фармацевтическую разработку, связанную с определением пространства проектных параметров для определения условий процесса при разработке технологии получения и исследований по формированию целевого профиля качества готовой лекарственной формы — твердых капсул.

2. Впервые разработаны оригинальные *in vivo* и *in vitro* модели целиакии для изучения специфической активности субстанции. Изучение специфической активности на разработанных моделях *in vitro* и *in vivo* показывает, что тритикаин-альфа можно признать потенциально эффективным активным веществом для терапии целиакии. Изучение специфической активности *in vivo* показало, что минимальная эффективная доза для мышей — 4 мг/животное, или 80 мг/кг.

3. Впервые предложена технологическая схема получения стабильной фармацевтической субстанции тритикаин-альфа, полученной из лиофильно высушенного рекомбинантного белка тритикаин-альфа. В ходе разработки стабильной фармацевтической субстанции тритикаин-альфа был предложен оптимальный состав криопротекторов, обеспечивающих стабильность субстанции следующего состава: маннитол (маннит) и поливинилпирролидон (ПВП) в соотношении тритикаин-альфа : маннитол : ПВП (2 : 1 : 1). Определен целевой профиль качества (ЦПК) для разработки ЛП, проведена оценка рисков влияния субстанции тритикаин-альфа на критические показатели качества лекарственного препарата.

4. Впервые разработаны и валидированы методики анализа субстанции: качественного и количественного определения рекомбинантного белка тритикаин-альфа и его протеолитической активности. Для качественного анализа применялась методика на основе ВЭЖХ, которая предназначена для идентификации подлинности рекомбинантного белка

тритикаин-альфа как в субстанции, так и в ЛП. Для количественного определения содержания рекомбинантного белка тритикаин-альфа разработана методика с использованием ВСА-реагента (Bicinchoninic Acid Protein Assay).

5. Полученные результаты фармакокинетических исследований свидетельствуют о том, что исследуемое вещество не обнаруживается в сыворотке. Результаты исследования острой токсичности в изученном диапазоне позволяют отнести субстанцию тритикаин-альфа к IV классу «Малотоксичные» лекарственных веществ для перорального пути введения и к VI классу «Относительно нетоксичные» для внутривенного пути введения. В результате изучения алергизирующего действия тритикаина-альфа на морских свинках установлено, что в рекомендуемых для терапевтического использования дозах испытуемая субстанция тритикаин-альфа не формирует гиперчувствительности в общепринятых тестах. При экспериментальном изучении репродуктивной и эмбриональной безопасности тритикаина-альфа не выявлено значимых признаков его повреждающего действия. При изучении потенциальной мутагенной и канцерогенной активности тритикаина-альфа установлено, что субстанция тритикаин-альфа не индуцирует достоверного увеличения доли клеток костного мозга со структурными нарушениями хромосом по сравнению с контрольным уровнем.

6. Проведена модернизация этапов подбора вспомогательных веществ, перспективных для создания твердых капсул с тритикаином-альфа с научно-методологической концепцией разработки. Изучено влияние технологических характеристик полученных смесей (сыпучесть, однородность дозирования, насыпная масса, стабильность субстанции) и технологических параметров (время перемешивания, условия перемешивания) на качество смеси для капсулирования и готовой ЛФ.

7. В ходе комплексного исследования научно обоснован оптимальный состав капсул с тритикаином-альфа. Впервые разработана технология получения нового инновационного лекарственного препарата с тритикаином-альфа. 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.

8. 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 частоту мониторинга и контроля. В соответствии с современными требованиями определены показатели качества, разработаны и валидированы методики определения показателей качества нового ЛП.

9. На основании проведенного комплекса экспериментальных исследований разработаны проекты нормативной документации (НД, ЛР, ОПР) на твердые капсулы с тритикаином-альфа.

Практические рекомендации

Полученные результаты исследований объединяют научно-методологические подходы к созданию лекарственных препаратов на основе рекомбинантных белков, что, в свою очередь, позволяет осуществить эффективную ФР, с учетом современных требований, предъявляемых к таким работам, а также подготовить нормативную и технологическую документацию на ЛП, соответствующую требованиям регуляторных органов.

Разработанная схема получения ЛФ на основе рекомбинантных белков позволяет унифицировать данную группу ФС в плане расширения ассортимента ЛП рекомбинантных белков.

Предложенные и обобщенные данные о технологических, аналитических и фармакологических подходах могут быть использованы в аналогичных исследованиях.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Целесообразно расширить предложенную модель исследования на другие объекты/мишени, в том числе имеющие другую химическую структуру, с целью расширения прикладного характера темы работы.

Потенциальной перспективой для дальнейшей разработки темы также может являться экстраполирование предложенных методов и подходов на другие лекарственные

формы, что с точки зрения фармацевтической технологии является потенциально перспективным.

Создание и развитие универсальной концепции в рамках ФР по требованиям GMP и ICH позволят за счет создания универсальных матриц исследования упростить поисковую работу при создании ЛФ.

Список работ, опубликованный по теме диссертации

1. Мусина, Н.З. Перспективы применения методов клинико-экономического анализа на этапе планирования и организации клинических исследований / Н.З. Мусина, **В.В. Тарасов** // **Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология.** — 2016. — Т. 9. — № 1. — С. 79—83.

2. Трансляционная медицина: нетранслируемые области и стоп-кодоны / Д.В. Ребриков, **В.В. Тарасов** // Вестник Российского государственного медицинского университета. — 2016. — № 6. — С. 4—9.

3. 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. Замятин. — М.: Лаборатория знаний, 2018. — 95 с.

4. Жизненный цикл лекарственных средств / И.В. Ершова, А.А. Мохов, А.Н. Яворский, Ю.В. Олефир, К.А. Кошечкин, В.А. Меркулов, Б.К. Романов, А.А. Свистунов, **В.В. Тарасов**; под ред. Ю.В. Оленина, А.А. Свистунова; Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова. — М. : МИА, 2018. — 277 с.

5. Способ получения лекарственного средства для лечения целиакии и лекарственное средство, полученное этим способом / А.А. Замятин, А.А. Запышная, Л.А. Павлова, Л.В. Савватеева, **В.В. Тарасов**. Патент на изобретение RU 2674763 С1. 13.12.2018.

6. Препарат цистеиновой протеазы пшеницы тритикаин-альфа, полученный в растворимой форме, и способ получения препарата / А.А. Замятнин, **В.В. Тарасов** [и др.]. Патент RU № 267322.
7. Краснюк, И.И. Изучение технологических и физико-химических свойства тритикаин-альфа / И.И. Краснюк, **В.В. Тарасов**, Ж.М. Козлова, О.И. Степанова, И.И. Краснюк (мл.), В.В. Кугач // Вестник фармации. — 2019. — № 1 (83). — С. 53—57.
8. Краснюк, И.И. Выбор криопротектора для лиофилизации тритикаина-α / И.И. Краснюк, **В.В. Тарасов**, Ж.М. Козлова, О.И. Степанова, И.И. Краснюк (мл.), В.В. Кугач // Вестник фармации. — 2019. — № 1 (83). — С. 49—53.
9. Тарасов, В.В. Обоснование выбора лекарственной формы с целью создания нового препарата для лечения целиакии / **В.В. Тарасов**, И.И. Краснюк, Ж.М. Козлова, О.И. Степанова, И.И. Краснюк (мл.) // **Естественные и технические науки**. — 2019. — № 11. — С. 205—209.
10. Козлова, Ж.М. Разработка состава новой лекарственной формы для лечения целиакии / Ж.М. Козлова, И.И. Краснюк, **В.В. Тарасов** // **Медико-фармацевтический журнал «Пульс»**. — 2019. — Т. 21. — № 12. — С. 72—76.
11. Тарасов, В.В. Выбор оптимального состава твердых капсул с тритикаином-альфа / **В.В. Тарасов**, И.И. Краснюк, Ж.М. Козлова // **Медико-фармацевтический журнал «Пульс»**. — 2019. — Т. 21. — № 12. — С. 66—71.
12. Краснюк, И.И. Изучение влияния технологических параметров процесса получения массы для капсулирования с тритикаином-альфа / И.И. Краснюк, **В.В. Тарасов**, Ж.М. Козлова // **Медико-фармацевтический журнал «Пульс»**. — 2019. — Т. 21. — № 10. — С. 131—137.
13. Краснюк, И.В. Разработка экспериментальной модели целиакии in vivo / И.И. Краснюк, **В.В. Тарасов**, А.А. Свистунов // **Медико-фармацевтический журнал «Пульс»**. — 2020. — Т. 22. — № 3. — С. 94—100.
14. Тарасов, В.В. Обоснование выбора вспомогательных веществ для создания капсул с рекомбинантным белком тритикаином-альфа / **В.В. Тарасов**, И.И. Краснюк,

Ж.М. Козлова // **Медико-фармацевтический журнал «Пульс»**. — 2020. — Т. 22. — № 3. — С. 88—93.

15. Краснюк, И.И. (мл.) Разработка новой фармацевтической субстанции — три-тикаин-альфа / И.И. Краснюк (мл.), И.И. Краснюк, **В.В. Тарасов** // **Медико-фармацевтический журнал «Пульс»**. — 2020. — Т. 22. — № 3. — С. 82—87.

16. Краснюк, И.И. Изучение специфической фармакологической активности три-тикаина-а при лечении целиакии / И.И. Краснюк, **В.В. Тарасов**, А.А. Свистунов // **Медико-фармацевтический журнал «Пульс»**. — 2020. — Т. 22. — № 1. — С. 55—61.

17. Тарасов, В.В. Подходы к разработке методики для изучения специфической активности рекомбинантного белка три-тикаина-альфа / **В.В. Тарасов**, А.А. Свистунов, И.И. Краснюк, И.И. Краснюк (мл.), О.И. Степанова, Ж.М. Козлова // Science, Technology and Life — 2019: Proceedings of articles the VI International scientific conference, Czech Republic, Karlovy Vary — Russia, Moscow, 2019, december, 24—25 [Electronic resource] / Editors PHD, Associate Professor N.V. Dronyakina. — Electron. txt. d. (1 file 2,9 MB). — Czech Republic, Karlovy Vary: Skleněný Můstek — Russia, Kirov: MCNIP, 2020. — 1 elektr. opt. drive (CD-ROM). — ISBN 978-80-7534-232-4 + ISBN 978-5-00090-155-7. — Title from disc label. — С. 139—148.

18. Краснюк, И.И. Концепция конструирования и разработки лекарственных препаратов / И.И. Краснюк, И.И. Краснюк (мл.), **В.В. Тарасов**, Ж.М. Козлова // Wordscience: problems and innovations: сб. ст. XLIII Международной научно-практической конференции. В 2 ч. — Пенза, 2020. — С. 278—281.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ВР — British Pharmacopoeia
- QbD — Quality-by-Design
- ВСА — Vincinonic Acid Protein Assay
- АФС, Субстанция, ФС — активная фармацевтическая субстанция
- ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГПМЦ — гидроксипропилметилцеллюлоза
- ГРЛС — Государственный реестр лекарственных средств
- ГФ — Государственная фармакопея Российской Федерации
- ЖКТ — желудочно-кишечный тракт
- ИК — инфракрасная спектроскопия
- ЛВ — лекарственное вещество
- ЛП — лекарственный препарат
- ЛР — лабораторный регламент
- ЛФ — лекарственная форма
- МКЦ — микрокристаллическая целлюлоза
- НД — нормативная документация
- НЭ — нежелательный эффект
- ОПР — опытно-промышленный регламент
- ОФС — общая фармакопейная статья
- ПВП — поливинилпирролидон
- УФ — ультрафиолетовая спектроскопия
- ФР — фармацевтическая разработка
- ЦПК — целевой профиль качества