

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора химических наук, главного научного сотрудника, Мирошникову Константину Анатольевичу на диссертационную работу **Яковлева Алексея Константиновича** на тему: «Стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа А.К. Яковлева, представленная на защиту, посвящена разработке метода изготовления стандартного образца эритропоэтина, стандартизации методики определения специфической активности эритропоэтина, используемой отечественными производителями, в соответствии с требованиями европейской фармакопеи, ее валидации, а также аттестации стандартного образца специфической активности эритропоэтина. Проведенное исследование имеет очевидную актуальность и практическую значимость.

Степень новизны, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автор разработал технологию изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина (обосновал выбор состава вспомогательных веществ и оптимизировал условия лиофилизации). По разработанной технологии изготовлен стандартный образец специфической активности эритропоэтина ОСО 42-28-437-2017, который в отличие от ранее существующих отечественных стандартных образцов, характеризуется стабильностью в течение 5 лет, а по точности аттестованного параметра значительно превосходит их (доверительный интервал рассчитанной активности от 94,5 – 105,8).

Для определения специфической активности лекарственных препаратов эритропоэтина автором усовершенствован биологический метод *in vivo* на нормоцитемических мышцах с учетом особенностей использования

отечественными производителями. Обоснован выбор линий мышей и способ подсчета ретикулоцитов, теоретически и экспериментально обоснован дизайн методики. Впервые в Российской Федерации на модели методики определения специфической активности эритропоэтина был предложен методический подход к валидации биологического метода *in vivo*. Благодаря стандартизации методики и установленным валидационным характеристикам методики стало возможным в соответствии с международными требованиями впервые ввести в отечественную методику определения специфической активности препаратов эритропоэтина критерий приемлемости результатов испытаний в отношении прецизионности: доверительный интервал рассчитанной активности.

Таким образом, достигнутый уровень стандартизации методики и проведенная валидация позволили гармонизировать отечественные требования к методике определения специфической активности эритропоэтина с требованиями ведущих Фармакопей мира.

Достоверность и апробация результатов исследования

Проведённая работа идеологически целостна. Для достижения конечного результата был скомпонован обоснованный план исследований, разделенный на логичные экспериментальные этапы. Используемые А.К. Яковлевым методы исследования обеспечили выполнение поставленных задач и статистическую достоверность полученных данных. Совокупность экспериментальных результатов позволяет оценить работу А.К. Яковлева как законченный труд с обоснованными выводами и научно-практическими рекомендациями.

Основные положения и выводы диссертации отражены в 12 печатных работах, в том числе в 4 статьях в рецензируемых научных изданиях. Апробация работы проведена в виде представления на ряде научных конференций. Опубликованные материалы и автореферат диссертационной работы А.К. Яковлева «Стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина» отражают содержание диссертации.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Материал диссертации А.К. Яковлева изложен на 140 страницах текста и включает введение (включающее разделы «материалы и методы»), обзор литературы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список использованных литературных источников (150 источников), и справочное приложение. Работа иллюстрирована 36 таблицами и 28 рисунками.

Во введении автором обоснована цель исследований и определены задачи, сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту. Изложение методов исследования и статистической обработки дано очень чётко, не вызывает сомнений возможность повторения исследований и воспроизведения результатов с использованием приведенных в диссертации протоколов.

Обзор литературы представляет собой изложение современных данных об эритропоэтине – широко используемом в медицине цитокине. Рассмотрены сведения о его химической структуре, биологии действия, создании лекарственных препаратов на основе эритропоэтина. Во второй части литературного обзора приведены данные об основных формах рекомбинантного эритропоэтина, применяемых в современной фармакологии, различиях в способах синтеза, степени гликозилирования, фармакокинетики. В заключительной части описаны проблемы стандартизации методов определения специфической активности лекарственных форм эритропоэтина, неидентичность требований, предъявляемые к препаратам эритропоэтина в национальных фармакопеях, изложена необходимость унификации фармакологических стандартов в России. Детально обоснована цель исследования – создание отечественного стандартного образца эритропоэтина для определения активности и медицинских физико-химических показателей. Обзор литературы характеризуется широтой рассмотренного материала и хорошей структурированностью.

Часть диссертации «Результаты собственных исследований» разделена на главы «Разработка технологии изготовления стандартного образца специфической

активности эритропоэтина», «Совершенствование методики определения специфической активности эритропоэтина», «Валидация методики определения специфической активности эритропоэтина» и «Аттестация стандартного образца специфической активности эритропоэтина».

В первой главе обоснован выбор образцовой субстанции эритропоэтина для изготовления стандартного образца, проведена его базовая физико-химическая характеристика оценкой концентрации белковой составляющей, электрофоретической чистоты и пропорциональное содержание изоформ по данным капиллярного электрофореза. Основным достижением этой части работы А.К. Яковлева является разработка метода лиофилизации стандартного препарата, использующего более доступные и дешёвые крио-аддитивы, и обеспечивающего более длительное хранение по сравнению и имеющимися образцами. Разработаны технологическая и биологическая схемы изготовления стандартного образца.

Следующие главы посвящены стандартизации и валидации методики определения специфической активности эритропоэтина. Разработанный метод моделирует клиническое применение препаратов рекомбинантного эритропоэтина и соответствует международным и европейским стандартам. По критериям доверительного интервала рассчитанной активности разработаны рекомендации по типу лабораторных животных и достаточному количеству параллельных измерений. Проверочные эксперименты подтверждают специфичность, правильность и прецизионность разработанной методики определения специфической активности эритропоэтина с использованием предложенного стандартного образца.

Разработанный стандартный образец специфической активности эритропоэтина аттестован в межлабораторных исследованиях. По результатам аттестации разработан комплект документации на стандартный образец. Разработанная методика положена в основу общих фармакопейных статей «Эритропоэтины» ОФС.1.7.1.0016.18 и «Определение специфической активности

препаратов эритропоэтина» ОФС.1.2.4.0017.18. Резюмирование и обсуждение результатов исследований представлено в разделе «Заключение».

Пять выводов работы полностью соответствуют поставленным в начале работы задачам, точно отражают содержание работы, и позволяют считать основную цель работы достигнутой. Научные положения, выносимые на защиту, в полной степени отражены в результатах работы и соответствуют паспорту заявленной специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Приоритет научных исследований А.К. Яковлева и их новизна закреплены разработкой официальной документации на стандартный образец, практических рекомендаций и двух ОФС.

В целом, диссертационная работа А.К. Яковлева отличается логичной схемой проведенных исследований, качественными иллюстрациями, поясняющими результаты экспериментов. Обращает на себя внимание глубочайшая статистическая обработка получаемых результатов, необходимая для практического внедрения разработанной методики. Не вызывает сомнений практическая значимость проведенной работы – фактически, полученные результаты можно непосредственно использовать при тестировании выпускаемых препаратов эритропоэтина.

При изучении текста диссертации возникает ряд вопросов:

1. Аргументированно предлагаемый в качестве стандартного образца препарат альфа-эритропоэтина принадлежит к конкретной партии конкретного производителя. Даже если всю эту партию использовать для приготовления стандартных образцов, то количество таких образцов будет ограничено. Какие исследования, описанные в диссертационной работе, потребуются для выбора и сертификации нового стандартного образца?
2. Насколько применимо определение специфической активности эритропоэтина, проводимое с помощью разработанной методики, для препаратов с дополнительным сиапированием? Такие препараты эритропоэтина нового поколения обладают более длительной циркуляцией в

кровоотоке но, как правило, имеют иную фармакокинетику и могут отличаться по формальной специфической активности.

3. При описании тестирования препаратов различных производителей в таблицах 5 и 35 не указано, какие препараты зашифрованы под номерами 1, 2 и т.д.

Замечания

Некоторое удивление вызывают приведенные в части «Введение» экспериментальные протоколы. Хотя это не противоречит требованиям, предъявляемым к структуре диссертационного манускрипта, более привычным и логичным было бы выделение отдельной части «Материалы и методы», тем более что разработка и оптимизация методологии являются важными пунктами, выносимыми на защиту.

Высказанные замечания, однако, не носят принципиального характера и не умаляют достоинств работы.

Заключение

Диссертационное исследование **Яковлева Алексея Константиновича** «Стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина», выполненное под руководством д.м.н., профессора Меркулова Вадима Анатольевича, является завершенной научно-квалификационной работой, содержит новое решение актуальной научной задачи – получение отечественного стандартного образца препарата рекомбинантного эритропоэтина и стандартизованной методики определения специфической активности эритропоэтина.

По актуальности, новизне, методическому уровню и практической значимости результатов, объему проведенных исследований, диссертационная работа Яковлева Алексея Константиновича «Стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина» полностью соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в

редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335, от 02 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 года № 1024, от 01 октября 2018 года № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Яковлев Алексей Константинович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Официальный оппонент,
Заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН» (ИБХ РАН),
117991, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,
тел. +7 (495) 335-55-88, e-mail: kmi@ibch.ru
доктор химических наук

Константин Анатольевич Мирошников

25.04.19

Подпись Константина Анатольевича Мирошникова заверяю:

Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»
доктор физико-математических наук



Владимир Александрович Олейников