

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Шмарова Максима Михайловича 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

Ген эритропоэтина клонирован в 1983 году, а в 1985 году начались клинические исследования первого лекарственного препарата рекомбинантного эритропоэтина человека. Ежегодно публикуется более 800 статей, посвященных эритропоэтину, что указывает на интерес и актуальность темы диссертации. Лекарственные препараты эритропоэтина широко и длительно применяются для патогенетической терапии анемии, а при хронической болезни почек практически пожизненно, поэтому 14 зарегистрированных в РФ препаратов эритропоэтина входят в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения». Из применяемых и вновь регистрируемых в РФ лекарственных препаратов эритропоэтина более 50% зарубежных, которые контролируют по требованиям соответствующих фармакопей. В связи с этим, качество препаратов особенно важно. Основным показателем качества (эффективности и безопасности) лекарственных препаратов эритропоэтина, является специфическая активность, точность ее оценки гарантирует терапевтические возможности данных лекарственных средств. Специфическую активность лекарственных препаратов эритропоэтина определяют в сравнении со стандартным образцом, поэтому эффективность и безопасность их применения зависит от качества стандартных образцов. Отечественный стандарт эритропоэтина на момент начала диссертационной

работы Яковлева Алексея Константиновича отсутствовал, методики определения специфической активности эритропоэтина российских производителей различались между собой и не были гармонизированы с методиками и требованиями зарубежных производителей. Российские препараты эритропоэтина стандартизовали по международным стандартам или стандартным образцам организаций, а федеральный уровень стандартизации в стране отсутствовал 10 лет.

Таким образом, диссертационная работа Яковлева А.К., посвященная стандартизации методики определения специфической активности лекарственных препаратов эритропоэтина, своевременна и актуальна, поскольку представляет большую научную и практическую важность для суверенитета страны, значимость которой постоянно растет в условиях роста санкций и необходимости импортозамещения как препаратов, так и стандартных образцов.

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

В результате выполнения диссертационной работы сделаны новые выводы: разработана технология изготовления сухого стандартного образца специфической активности эритропоэтина, по разработанной технологии изготовлен лиофилизированный стандартный образец, предназначенный для контроля качества препаратов эритропоэтина по показателям подлинность, специфическая активность и удельная активность, который, характеризуется стабильностью и точностью аттестованных параметров, превосходящих ранее разработанные отечественные стандартные образцы. Впервые в РФ стандартизована методика определения специфической активности эритропоэтина (проведен выбор мышей и способ подсчета ретикулоцитов, обоснован дизайн методики) и введен новый критерий приемлемости результатов испытаний: доверительный интервал рассчитанной активности. Внедрение усовершенствованной методики в Государственную фармакопею РФ позволило достичь международного уровня точности по показателю

специфическая активность. Все выводы работы полностью соответствуют поставленным задачам, отражают содержание работы и указывают, что основная цель работы достигнута. Научные положения, выносимые на защиту, в полной степени отражены в результатах и выводах диссертации, соответствуя паспорту заявленной специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Теоретическая и практическая значимость работы

В диссертационной работе Яковлева А.К. предложены оригинальные методические подходы для определения чувствительности методики и оценки прецизионности (в качестве меры прецизионности при логнормальном преобразовании первичных данных доказана возможность использования антилогарифма полуширины доверительного интервала). Результаты апробации этих методов, проведенной автором, подтверждают их пригодность при оценке валидационных характеристик.

Ценность полученных автором результатов для науки и практики состоит в оптимизации и стандартизации методики определения специфической активности эритропоэтина, включая использование разработанного стандартного образца, что позволило повысить ее точность и гармонизировать отечественные требования к препаратам эритропоэтина с международными по основному показателю качества. Обоснован новый методический подход и критерий приемлемости оценки прецизионности биологического метода.

Несмотря на сугубо прикладной характер работы, направленной на совершенствование системы контроля качества в интенсивно развивающемся кластере биотехнологии рекомбинантных белков, выполнена она на достаточном теоретическом (методологическом) уровне. В основном теоретическая значимость диссертационного исследования заключается в том, что доказана необходимость проведения стандартизации определения специфической активности для установления единых правил с целью повышения эффективности и безопасности лекарственных форм

эритропоэтина при их клиническом применении, обобщен опыт гармонизации отечественных методик, обоснован алгоритм гармонизации и в целом на типовом примере препаратов цитокинов успешно апробирован методологический подход валидации и стандартизации биологических методов в РФ.

Значимость работы для практики подтверждена внедрением на федеральном уровне стандартного образца специфической активности эритропоэтина, использование которого отечественными производителями лекарственных препаратов эритропоэтина и учреждениями, проводящими экспертизу и контроль качества лекарственных средств, позволяет корректно оценивать результаты разных лабораторий и соответствия препаратов требованиям нормативной документации при их регистрации.

Работа реализована разработкой комплекта документации на стандартный образец и двумя общими фармакопейными статьями, включенными в XIV Государственную фармакопею РФ.

Практическая значимость работы подтверждена двумя актами: акт внедрения от 3 декабря 2018 г. в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России и актом внедрения от 16 января 2019 г. ООО «Фармапарк».

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов, обоснованность выводов по результатам диссертационного исследования не вызывает сомнений, подтверждена валидацией методики на международном уровне и определяется большим объемом исследований, включающем более 2000 лабораторных животных с корректным применением современных статистических методов оценки значимости показателей и параметров качества иммунобиологических препаратов с использованием программного обеспечения, хорошо иллюстрированы таблицами и графическими изображениями.

Основное содержание работы отражено в 12 научных публикациях, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, 4 – в других, одни тезисы – в

рецензируемом издании, 3 – в материалах конференций. Основные результаты диссертационной работы доложены на двух отраслевых научных конференциях и национальном международном конгрессе «Человек и лекарство». Опубликованные материалы и автореферат диссертационной работы отражают содержание диссертации. Автору принадлежит ведущая роль в экспериментальных и теоретических исследованиях.

Диссертация апробирована на заседании ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 5 от 04.12.2018 г).

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа Яковлева А.К. состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований с обсуждениями полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 150 работ, из них 30 работ отечественных и 120 работ зарубежных авторов, и приложений. Текст диссертации изложен на 140 страницах машинописного текста и содержит 36 таблиц и 28 рисунков.

Во введении автором обоснована актуальность темы исследования, определены и сформулированы его цель и задачи, констатирована научная новизна, теоретическая и практическая значимость, внедрение результатов исследования, а также представлены основные положения, выносимые на защиту, методология и методы исследования.

Обзор литературы (1 глава) изложен со знанием изучаемой проблемы на современном уровне и соответствует теме исследований. Ссылки на источники достоверны, научная информация по проблеме, как в нашей стране, так и за рубежом представлена сведениями последних лет. Автором подробно и полно проанализированы вопросы структуры, свойств и механизма действия эритропоэтина, представлена характеристика зарегистрированных лекарственных препаратов эритропоэтина разных

поколений, проведен анализ методик используемых отечественными производителями лекарственных препаратов эритропоэтина указывая на проблемы их стандартизации.

На основании проведенного анализа литературы Яковлев А.К. объективно и целенаправленно спланировал проведение собственных исследований.

Во второй главе представлены результаты собственных исследований по разработке технологии изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина. Обоснован выбор кандидата в стандартный образец специфической активности эритропоэтина и проведена оценка его качества. В ходе выполнения исследований усовершенствована стадия получения лиофилизированной формы стандартного образца (оптимизирован состав стабилизирующего буфера и подобраны технологические параметры процесса сублимации). Разработаны технологическая и биологическая схемы изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина.

В третьей главе автором представлены материалы по совершенствованию методики определения специфической активности эритропоэтина. Экспериментально подтверждена возможность использования мышей линий (Balb/C и F1 (CBA^xC57BL)); показано, что использование беспородных мышей не обеспечивает получение результатов, соответствующих установленным требованиям. Проведена сравнительная оценка точности используемых при подсчете ретикулоцитов методов: проточной цитометрии и световой микроскопии. Результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, по характеристикам точности лучше по сравнению со световой микроскопией: смещение в 3 раза меньше, а прецизионность в два раза выше. При обосновании схемы методики, исходя из полученных результатов оценки внутрилабораторной прецизионности, было сделано заключение о целесообразности схемы методики с тремя уровнями доз 20, 40 и 80 МЕ/мл. В данном диапазоне применения методики

сохраняется удовлетворительная точность. Установлен диапазон рассчитанного значения от 80 до 125 % и введен критерий приемлемости результатов – доверительный интервал рассчитанной активности от 64 до 156 %.

В четвертой главе представлены результаты проведенного валидационного исследования с обработкой экспериментальных данных и оценкой валидационных параметров. Полученные результаты позволили признать пригодность усовершенствованной методики с использованием разработанного стандартного образца, на мышах линий Balb/C и CBAxС57BL. Достигнутый уровень стандартизации позволяет судить о гармонизации усовершенствованной методики с требованиями ЕФ, обоснованности предложенных нормативов и методических подходов к оценке валидационных характеристик.

В пятой главе представлено решение задачи по аттестации стандартного образца специфической активности, приведены результаты исследований по установлению аттестуемой характеристики, изучению стабильности и определению срока годности. Приведены сведения о разработке нормативно-технической документации (паспорта, инструкции по применению, макета первичной и вторичной упаковки). Разработанный стандартный образец специфической активности эритропоетина ОСО 42-28-437-2017 аттестован (со степенью достоверности 95 %) в межлабораторных исследованиях: специфическая активность составила 2400 МЕ, доверительный интервал (94,5 - 105,8 %). По результатам изучения стабильности стандартного образца установлен срок годности 5 лет при температуре хранения минус 20 °С, с возможностью его продления по результатам мониторинга стабильности.

Проведённая работа целостна и имеет прикладной характер, выполнена на современном высоком теоретическом уровне. Достижение конечного результата обеспечено правильным четким алгоритмом исследований, разделенным на логичные экспериментальные этапы (задачи) в соответствии

с национальными и международными требованиями к валидации биологических методик оценки качества лекарственных препаратов. Исползованные методы исследования обеспечили выполнение поставленных задач и статистическую достоверность полученных данных. Совокупность экспериментальных результатов позволяет оценить работу А.К. Яковлева как завершённый труд с обоснованными выводами и важными для биотехнологии научно-практическими рекомендациями.

Принципиальных замечаний по содержанию работы нет.

Рекомендации:

По материалам диссертации имеются следующие рекомендации:

1. В диссертации многократно упоминаются термины «полицитемические и нормоцитемические мыши», поскольку эти термины не являются общеупотребительными, следовало бы привести их определение в тексте диссертации.

2. Для большей наглядности следовало бы привести фотографии лиофилизированного стандартного образца эритропоэтина при совершенствовании стадии лиофилизации и дополнить приложения к диссертационной работе изображением готового отраслевого стандартного образца специфической активности эритропоэтина.

Заключение

Диссертационная работа Яковлева Алексея Константиновича «Стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии), является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских работ, профессора Меркулова Вадима Анатольевича, содержащей решение актуальной научно-практической задачи по стандартизации методики определения специфической активности эритропоэтина.

По своей актуальности, новизне, методическому уровню и практической значимости результатов, объему проведенных исследований, диссертационная работа Яковлева Алексея Константиновича на тему: «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 биотехнологии
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор биологических наук

29.04.2019г.



Шмаров Максим Михайлович

123098, Российская Федерация, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18;
тел. +7 (499) 193-30-01; e-mail mshmarov@yahoo.com

Подпись Шмарова Максима Михайловича заверяю:

Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии
и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Кандидат биологических наук



Кожевникова Людмила Кондратьевна