

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

И.А. Дятлов

« 5 » апреля 2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической ценности диссертационной работы Яковлева Алексея Константиновича на тему: «Стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Актуальность темы диссертации

Разработка и внедрение в клиническую практику лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека позволило снизить потребность от гемотрансфузий. Лекарственные препараты рекомбинантного эритропоэтина человека применяют при лечении симптоматической анемии при хронической болезни почек у больных, находящихся на диализе, симптоматической анемии почечного генеза, симптоматической анемии, вызванной химиотерапией солидных и гематологических немиелоидных опухолей, анемии, связанной с терапией ВИЧ-инфекции зидовудином, а также для увеличения объема донорской крови, предназначенной для последующей аутотрансфузии. За последние два десятилетия препараты эритропоэтина были использованы более чем у миллиона пациентов преимущественно с хронической почечной недостаточностью и больных ВИЧ-инфекцией.

Лекарственные средства этой группы в России входят в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения». Применение препаратов эритропоэтина служит золотым стандартом в заместительной терапии больных с хронической почечной болезнью, находящихся на гемодиализе. Как правило, такие пациенты вынуждены использовать данные препараты практически пожизненно. Для снижения биологических рисков при использовании подобных препаратов одним из основных показателей качества, отражающим эффективность и безопасность лекарственных препаратов эритропоэтина, является специфическая активность. Точность ее оценки позволяет гарантировать терапевтические возможности данных лекарственных средств. Ошибки, как в сторону завышения, так и в сторону занижения, специфической активности влияют в первом случае - на эффективность препарата при его дозировании, во втором - к развитию гипертонии и тромбоцитоза с ишемией и инфарктом миокарда, инсульту, тромбозу вен и артерий. Специфическую активность препаратов эритропоэтина определяют в сравнении со стандартным образцом. От качества стандартных образцов, а именно от правильности и прецизионности результатов, полученных при их аттестации, зависит эффективность и безопасность применения препарата. Отечественный стандартный образец эритропоэтина отсутствует с 2009 г. Требования к оценке качества лекарственных препаратов эритропоэтина в Российской Федерации на федеральном уровне отсутствовали, в связи с этим нормативная документация препаратов разных производителей отличалась по перечню оцениваемых показателей, методов, используемых для их контроля, а также от требований к качеству, предъявляемых к препаратам эритропоэтина зарубежных производителей, зарегистрированных в РФ.

Диссертационная работа Яковлева А.К. посвящена стандартизации методики определения специфической активности лекарственных препаратов эритропоэтина и включает в себя разработку технологии изготовления стандартного образца, его получение, совершенствование методики контроля специфической активности (обоснование выбора линейных мышей, способа подсчета ретикулоцитов и дизайна методики с применением проточной цитометрии и световой микроскопии), проведение валидации усовершенствованной методики и аттестацию разработанного стандартного образца. Проведенная стандартизация методики позволила повысить ее

точность до приемлемого уровня и гармонизировать отечественные требования к препаратам эритропоэтина по основному показателю качества – специфической активности – с требованиями ведущих зарубежных фармакопей. Разработанная технология изготовления стандартного образца для определения специфической активности эритропоэтина позволила получить стандартный образец, который, в отличие от ранее существовавших отечественных стандартных образцов, характеризуется высокой стабильностью и по аттестованному параметру (диапазон рассчитанной активности и доверительный интервал аттестованной величины) сопоставим со стандартным образцом Европейской фармакопеи.

Таким образом, тема диссертационной работы Яковлева Алексея Константиновича, посвященная стандартизации методики определения специфической активности эритропоэтина, актуальна и представляет значительный научный и практический интерес.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Основу научной новизны результатов, полученных Яковлевым А.К., составляет разработка, впервые в России, сублимационно высушенного стандартного образца специфической активности эритропоэтина и технологии его изготовления и контроля, с стандартизацией методики определения специфической активности эритропоэтина.

Автором освоены значительный объем методик проведения исследования: электрофорез в полиакриламидном геле, капиллярный зонный электрофорез, иммуноблоттинг, работа лабораторными животными и приборным обеспечением. Также освоены технологические приемы по изготовлению препарата с использованием установки для лиофильной сушки.

Автором обоснован выбор исходного материала и экспериментально подтверждена возможность его применения при производстве стандартного образца специфической активности эритропоэтина; экспериментально доказана возможность включения критерия приемлемости результатов испытания – доверительного интервала рассчитанной активности; проведено совершенствование методики.

Диссертантом разработана технология изготовления стандартного образца специфической активности эритропоэтина, а именно обоснован выбор состава вспомогательных веществ (трегалоза – 4,0 %, бычий сывороточный

альбумин – 0,2 %, натрия хлорид – 0,12 %) и оптимизированы условия лиофилизации (замораживание при температуре минус 45 °С в течение трех часов, первичное высушивание при температуре минус 40 °С и давлении 100 мТорр в течение 6 ч, вторичное высушивание при температуре 20 °С и давлении 30 мТорр в течение 3 ч). По разработанной технологии изготовлен лиофилизированный стандартный образец специфической активности эритропоэтина, предназначенный для контроля качества препаратов эритропоэтина по показателям подлинность, специфическая активность (метод *in vivo* на нормоцитемических мышцах) и удельная активность. Разработанный стандартный образец в отличие от существующих отечественных стандартных образцов, характеризуется стабильностью в течение не менее 5 лет, а по точности аттестованного параметра (специфическая активность) и величине доверительного интервала рассчитанной активности (от 94,5 – 105,8) превосходит их. Апробация разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина (ОСО 42-28-437-2017) с зарегистрированными лекарственными препаратами отечественных производителей подтвердила, что ОСО 42-28-437-2017 позволяет получать сопоставимые результаты в разных лабораториях и обеспечивает стандартность дозирования лекарственных препаратов эритропоэтина при их клиническом применении. Таким образом, разработанный стандартный образец имеет большую практическую ценность с учетом роста санкций и необходимости импортозамещения.

Автором проведена успешная стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина (обоснован выбор линии мышей, количество используемых в испытании животных (по 8 мышей линии Balb/C или F1(CBAxС57BL) для каждого уровня, способ подсчета ретикулоцитов и дизайн методики (экспериментальным исследованием точности на отдельных уровнях определен диапазон применения), благодаря чему установлен диапазон специфической активности и введен новый критерий приемлемости результатов испытаний – доверительный интервал рассчитанной активности (от 64 до 156 %, при $P=0,95$)), что позволило повысить требования к точности по показателю «специфическая активность» до международного уровня.

Впервые в Российской Федерации проведена валидация биологического метода *in vivo* и предложены новые методические подходы для определения чувствительности методики.

Несомненной заслугой автора стало документальное оформление стандартизированной методики определения специфической активности эритропоэтина в виде двух Общих фармакопейных статей (ОФС), впервые введенных в Государственную фармакопею Российской Федерации: «Эритропоэтины» ОФС 1.7.1.0016.18 и «Определение специфической активности препаратов эритропоэтина» ОФС 1.2.4.0017.18, в которых представлены требования и условия определения специфической активности препаратов рекомбинантного эритропоэтина с использованием нормоцитемических мышей. Достигнутый уровень стандартизации свидетельствует о гармонизации усовершенствованной методики с требованиями Европейской Фармакопеи (ЕФ), обоснованности ее нормативов и предложенных методических подходов к оценке валидационных характеристик.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа Яковлева А.К. выполнена в рамках научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации по теме НИР «Научное обоснование методов оценки качества, эффективности и безопасности иммунобиологических лекарственных препаратов и их стандартизация» (№ государственной регистрации 01201275293) и «Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств» (№ государственной регистрации 1151117400073).

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

Значительная практическая ценность работы определяется возможностью использования разработанного автором стандартного образца специфической активности эритропоэтина (ОСО 42-28-437-2017) отечественными производителями лекарственных препаратов рекомбинантного эритропоэтина человека и учреждениями, проводящими экспертизу и контроль качества лекарственных средств, который по точности аттестованного значения не уступает стандартному образцу Европейской фармакопеи, но значительно выгоден по экономическим соображениям. Разработанный стандартный

образец может быть применен в качестве эталона для аттестации стандартного образца предприятия. Разработан комплект документации на стандартный образец (паспорт, макет первичной и вторичной упаковки, «Инструкция на научно-техническую продукцию отраслевой стандартный образец специфической активности эритропоэтина»).

Общая фармакопейная статья «Определение специфической активности препаратов эритропоэтина» внедрена в систему государственной стандартизации в области контроля качества лекарственных препаратов эритропоэтина (Государственная Фармакопея РФ XIV издания, ОФС.1.2.4.0017.18). Фармакопейная статья «Эритропоэтины» (ОФС.1.7.1.0016.18) предусматривает определение специфической активности по разработанной ОФС.1.2.4.0017.18.

Достоверность результатов исследования не вызывает сомнения. Работа основана на большом объеме материала и современных методах сбора и обработки информации с использованием биологического метода, физико-химических и иммунохимических методов исследования.

Полученные автором результаты внедрены в работу Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 03 декабря 2018 г.). Стандартный образец используется при подтверждении соответствия лекарственных препаратов требованиям нормативной документации, а также в рамках проведения экспертизы качества лекарственных препаратов по заданиям Министерства здравоохранения Российской Федерации. Разработанный стандартный образец успешно применяется отечественным производителем лекарственных препаратов эритропоэтина ООО «Фармапарк» (акт внедрения от 16 января 2019 г.).

Диссертантом опубликовано 12 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях. Основные результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на 3 российских и международных научно-практических конференциях различного уровня.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Цель и задачи исследования, поставленные автором, основные положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют выводам, представленным в диссертации.

Полученные результаты диссертационного исследования Яковлева А.К. могут быть использованы при аттестации стандартных образцов предприятия. Разработанный стандартный образец ОСО 42-28-437-2017 может быть использован другими отечественными производителями лекарственных препаратов эритропоэтина при их производстве и оценке качества.

Использование в методике ОФС.1.2.4.0017.18 разработанного стандартного образца специфической активности эритропоэтина производителями лекарственных препаратов эритропоэтина и учреждениями, проводящими экспертизу и контроль качества лекарственных средств, позволит получать достоверные значения специфической активности, необходимые для прогноза их клинического применения.

Замечания и вопросы:

1. Почему при выборе состава стабилизирующего буфера препарата ОСО 42-28-437-2017 выбраны всего три компонента и оптимизация состава была применена только к трегалозе?
2. Почему при современных подходах к выбору упаковки при сушке использованы ампулы, а не флаконы, являющиеся более прочными, технологичными, эргономичными и практичными?
3. Почему при выборе субстанции эритропоэтина в качестве основы ОСО 42-28-437-2017 выбран Рэпоэтин СП? Вывод о выборе не вытекает четко из таблицы 7, так как обе субстанции кандидата срабатывали 50/50 со стандартом Европейской фармакопеи (на альфа + бета эритропоэтины). Совершенно понятно, почему не сработал Эпоэтин бета на стандарт альфа.
4. Почему для создания препарата и оптимизации условий его получения была применена только одна серия препарата – серия № 1320914? Для сравнения необходимо иметь хотя бы три серии.
5. В эксперименте на животных для определения специфической активности использовали три концентрации препарата (10, 20 и 40 МЕ/животное); в каждой группе по 8 животных (стр. 56), а в эксперименте в разделе «Обоснование дизайна методики» (стр. 74) изучение прецизионности провели в 6 независимых экспериментах на мышах линии Balb/C (n=288) по схеме, изменяющей факторы, которые могут оказывать

влияние на точность методики. Каждый эксперимент включал три уровня доз: 20, 40 и 80 МЕ/мл, по 8 повторов, а на стр. 78-79 использовали 5 концентраций от 10 до 160 МЕ/мл, и в результате кривую построили в диапазоне: 20-80 МЕ/мл. В результате возникает вопрос: а что же произошло на 60 МЕ/мл – этой концентрации нет ни в одном эксперименте? Эта же тенденция прослеживается и в экспериментах по исследованию специфичности (стр. 85). Кроме того в этом эксперименте присутствует контрольный стандартный образец Еврофармакопеи (ориентир на который не был принят во внимание при первом выборе субстанции (альфа, а не бета).

6. Не очень понятен выбор срока годности и температуры хранения, исходя из полученных данных табл. 35 разницы по показателям хранения нет при плюс 4 и минус 20° Цельсия.

Вопросы и замечания не умаляют значимости представленного диссертационного исследования.

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 03.01.06 «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Автореферат и его содержание соответствуют ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

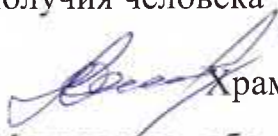
Результаты исследований Яковлева А.К. обсуждены, отзыв одобрен на заседании ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Протокол № 3 от 05.04.2019 года).

Заключение

Диссертационная работа Яковлева Алексея Константиновича на тему: «Стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - «биотехнология (в том числе, бионанотехнологии)» является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по стандартизации методики определения специфической активности эритропоэтина, имеющей существенное значение для развития медицины и здравоохранения.

Диссертационная работа Яковлева Алексея Константиновича «Стандартизация методики определения специфической активности эритропоэтина» по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований 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)».

Заместитель директора по качеству и развитию
Федерального бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека
кандидат медицинских наук



Храмов Михаил Владимирович

142279, Российская Федерация, Московская обл., Серпуховский р-н, пос.
Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: +7 (4967) 36-00-17, e-mail: Khramov@obolensk.org

Подпись Храмова Михаила Владимировича заверяю:

Ученый секретарь
Федерального бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека
доктор биологических наук



Коломбет Любовь Васильевна

« 5 » апреля 2019