

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

Комарова Тимофея Николаевича

«Методологические основы биоаналитических исследований препаратов для терапии новой коронавирусной инфекции»,
представленную на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки)

Актуальность темы

COVID-19 – особо опасное инфекционное заболевание, распространение которого имело стремительный, циклический характер на протяжении нескольких лет. На сегодняшний день доказана высокая способность данного вируса к мутации, при этом основные группы штаммов имеют различную контагиозность и вирулентность, а вызываемое ими заболевание может иметь различную степень тяжести и нести различные риски возникновения осложнений. Несмотря на общую тенденцию к снижению заболеваемости, нельзя полностью исключать вероятность возникновения новых штаммов, в том числе устойчивых к существующим на сегодняшний день вакцинам, способных вызывать новые локальные или повсеместные вспышки данного заболевания.

С самого начала пандемии ученые всего мира искали возможность проведения этиотропной фармакотерапии коронавирусной инфекции. Клинически испытывалась возможность применения различных существующих противовирусных лекарственных средств, таких как, например, комбинация лопинавира с ритонавиром, не доказавшая эффективности. Также изучалась возможность применения иных противовирусных лекарственных средств в терапии COVID-19, создание новых лекарственных форм, изучение новых комбинаций. В связи с огромным значением данной проблемы для мирового здравоохранения и мировой экономики в целом, во всем мире, в том числе и в Российской Федерации, во время пандемии были введены нормы, регламентирующие процедуру ускоренной регистрации и внедрения в клиническую практику соответствующих лекарственных средств. Опираясь на вышесказанное, можно отметить, что проводимые в рамках данной процедуры исследования имеют неоспоримо высокое социально-экономическое значение не только для медицинской и фармацевтической науки, но и для государства в целом.

Тема представленной диссертации посвящена выработке аналитических подходов для проведения исследований фармакокинетики лекарственных средств, применяемых в терапии коронавирусной инфекции, в условиях пандемии, хотя, безусловно, является актуальной и в постпандемийный период. Представленные алгоритмы и выработанные т. н. деревья решений позволяют значительно оптимизировать процесс проведения биоаналитических исследований на этапе клинических испытаний, призванных подтвердить эффективность и безопасность изучаемых препаратов и являющихся одним из основных этапов процедуры регистрации лекарственных средств.

Научная новизна

В работе изложены впервые разработанные методики количественного определения исследуемых лекарственных веществ (в т.ч. при совместном присутствии), валидированные по действующим нормам ЕАЭС и апробированные при проведении фармакокинетических исследований. Автором предложен и экспериментально подтвержден методологический подход к проведению аналитического этапа исследований фармакокинетики нескольких лекарственных средств, применяемых в терапии COVID-19. Проведена алгоритмизация разработанного подхода, представленная в форме деревьев принятия решений. Предложен собственный алгоритм выбора способа пробоподготовки биологических жидкостей, подбора внутреннего стандарта, разработки методик хроматографического анализа и детектирования исследуемых веществ в биологических жидкостях. В рамках проведения апробации разработанных методик впервые определены фармакокинетические параметры инфузионной лекарственной формы фавипиравира, комбинированной лекарственной формы фавипиравира и цинка, комбинированной лекарственной формы молнупиравира и фавипиравира.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты проведенных автором исследований применены в рамках проведения исследований фармакокинетики, подтверждающих эффективность и безопасность изучаемых препаратов при осуществлении процедуры регистрации данных препаратов, что подтверждается внедрением результатов в состав соответствующего модуля регистрационных досье, по которым получены удостоверения о государственной регистрации лекарственных средств. Зарегистрированные по результатам исследования препараты широко внедрены в клиническую практику, в т. ч. при проведении терапии в условиях отделений реанимации и интенсивной терапии стационаров, например, лиофилизат фавипиравира для приготовления раствора для инфузий. Результаты проведенных

фармакокинетических расчетов позволят оптимизировать условия дозирования данного препарата.

Предложенные алгоритмы проведения биоаналитических исследований при выполнении исследований фармакокинетики могут быть применены в аналитической практике при проведении различных фаз клинических исследований не только лекарственных средств, применяемых в терапии новой коронавирусной инфекции, но и гораздо более широкого круга лекарственных средств, в том числе инновационных молекул. Представленные алгоритмы и т.н. деревья решений позволяют значительно оптимизировать ресурсы при проведении разработки биоаналитических методик, что имеет важное социально-экономическое значения для народного хозяйства.

Личный вклад автора

Диссертационная работа является частью многолетних исследований автора в рамках направления, в котором Комаров Т. Н. работает более 10 лет, начиная с подготовки им кандидатской диссертации. При подготовке докторской диссертации автором обобщен и структурирован обширный собственный опыт проведения биоаналитических исследований на примере актуальной проблемы медицинской и фармацевтической науки настоящего времени.

Автором лично собран огромный массив как практического материала по результатам разработки и валидации биоаналитических методик, оценки фармакокинетических параметров, так и теоретического, заключающегося в структурировании и обобщении экспериментальных данных в виде представленных алгоритмов и методологических рекомендаций к проведению биоаналитических исследований, выходящих далеко за рамки рассматриваемой темы. Также автором подготовлен ряд публикаций, в т. ч. в соавторстве, в журналах международного уровня, а результаты исследования доложены на различных научно-практических конференциях с международным участием. Степень личного вклада автора составляет более 90%.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Обоснованность научных положений, выводов и практических рекомендаций подтверждается приведёнными экспериментальными данными. В ходе выполнения исследования применялось современное оборудование, экспериментальные результаты были обработаны с применением актуальных методов математической статистики. Общий подход к проведению исследований соответствует общепринятым мировым принципам.

Практические и методологические рекомендации исходят из содержания работы, а также опираются на многолетний опыт автора, подтверждаемый рядом

публикаций в различных научно-практических журналах, включённых в международные базы данных. Научные положения, изложенные в работе, имеют важное теоретическое и практическое значение для фармацевтической науки и практики.

Публикации

По теме работы опубликовано 26 научных трудов, среди которых 20 статей в изданиях, включенных в международную базу данных Scopus (в т.ч. в журналах Q1 и Q3), в том числе 16 статей в журналах из перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации, утвержденного ВАК Минобрнауки России, а также главы в двух монографиях. Публикации полностью отражают содержание выполненного автором исследования.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Научные положения диссертационной работы полностью соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно п. 4: «Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы».

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация построена в классическом стиле и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы и экспериментальную часть, состоящую из глав со 2-й по 8-ю, главу 9, обобщающую и формулирующую методологические подходы к проведению биоаналитических исследований, и заключение, содержащее перечень выводов по результатам исследования.

В обзоре литературы рассмотрены различные подходы к лечению коронавирусной инфекции, обоснована новизна объектов исследования и приведены их фармакологические и физико-химические свойства, определяющие существующие методы их определения в биообъектах. На основании анализа нормативной документации, определяющей порядок ускоренной регистрации лекарственных средств, и международной нормативной документации по проведению исследований фармакокинетики и биоэквивалентности обоснована актуальность методологического совершенствования биоаналитических исследований применительно к таким препаратам с целью их оптимизации и последующей ускоренной регистрации.

Глава 2 посвящена разработке и валидации методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ для изучения фармакокинетики препарата при инфузионном введении. Подробно описаны использованные материалы и метод, необходимые аналитические процедуры, близостью физико-химических характеристик обоснован выбор внутреннего стандарта – ралтегравира. Изложены этапы проведения валидации разработанной методики, чувствительность которой и аналитический диапазон от 250 нг/мл позволяет использовать ее для изучения фармакокинетики фавипиравира при инфузионном введении.

В главе 3 приводятся процедура и результаты изучения фармакокинетики арепливира – инновационного препарата фавипиравира в инъекционной лекарственной форме. Анализируемые образцы плазмы были получены от добровольцев, включенных в клиническое исследование I фазы для нового препарата, что свидетельствует о высокой практической значимости исследования автора. Соискателем не только были определены концентрации фавипиравира в биоматериале, но и рассчитаны необходимые фармакокинетические параметры, а также установлена линейность его фармакокинетики в диапазоне доз 400-1800 мг. Результаты, полученные автором, подтвердили пригодность разработанной методики и позволили перейти к последующим фазам клинических исследований этого нового препарата.

Глава 4 содержит описание процедуры разработки и валидации методик количественного определения фавипиравира и β -N4-гидроксицитидина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. β -N4-гидроксицитидин – активный метаболит пролекарства молнупиравира, короткоживущего в крови препарата и имеющего перспективы применения внутрь в комбинации с фавипиравиром. Пероральный путь введения с ограниченной биодоступностью определил необходимость разработки для фавипиравира более чувствительной, чем ВЭЖХ-УФ, методики. Выбор внутреннего стандарта для фавипиравира пал на фавипиравир- $^{13}\text{C}_3$ как более коммерчески доступный в сравнении с дейтерированным производным. В главе приведены все аналитические этапы разработки методики: оборудование, приготовление растворов и калибровочных образцов, хранение объектов исследования, подбор условий хроматографического разделения и детектирования, результаты полной валидации разработанной методики. Достигнутая чувствительность определения составила от 50 нг/мл даже при пробоподготовке методом осаждения белков метанолом, сопровождающейся разведением анализируемого образца.

При разработке методики ВЭЖХ-МС/МС для определения β -N4-гидроксицитидина в качестве внутреннего стандарта был выбран прометазин на

основании схожести физико-химических характеристик. Проведенная по всем необходимым параметрам валидация методики показала ее пригодность для изучения фармакокинетики препаратов молнупиравира, в т.ч. высокую чувствительность на уровне НПКО 10 нг/мл при соотношении сигнал/шум равном 15. Методика применена для изучения фармакокинетики препарата «Эсперавир», капсулы 200 мг.

Глава 5 посвящена изучению фармакокинетики фавипиравира в комбинации с цинка глюконатом в форме таблеток на первой фазе клинического исследования препарата Арепливир Цинк. Доказана пригодность разработанной методики для фармакокинетических исследований. Результаты сравнения кинетических данных с таковыми у препарата сравнения Арепливир показали отсутствие значимого влияния цинка на фармакокинетику фавипиравира.

В главе 6 приведены аналитическая процедура и результаты изучения фармакокинетики молнупиравира на первой фазе клинических исследований препарата Эсперавир, капсулы 200 мг, для оценки применимости разработанной методики. Несмотря на небольшое количество добровольцев (4 человека), по полученным значениям концентраций β -N4-гидроксицитидина в плазме крови после приема 800 мг молнупиравира были рассчитаны фармакокинетические параметры, что дало возможность перехода на последующий этап клинических исследований Эсперавира.

Глава 7 предоставляет описание разработки и валидации методик совместного определения нирматрелвира и ритонавира, фавипиравира и β -N4-гидроксицитидина в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Актуальность этой части исследования определена показанной эффективностью комбинации нирматрелвира и ритонавира в лечении COVID-19 и необходимостью изучения фармакокинетики нового комбинированного препарата фавипиравира и молнупиравира. В результате разработана и валидирована высокочувствительная методика определения нирматрелвира от 50 нг/мл и ритонавира от 5 нг/мл плазмы, имеющая перспективы к еще большему повышению чувствительности благодаря высокому соотношению сигнал/шум. Методика применена для изучения фармакокинетики комбинированного препарата препарат Скайвир, таблетки 300 мг.

При разработке методики совместного определения фавипиравира и β -N4-гидроксицитидина соискатель столкнулся с проблемой одновременного ВЭЖХ-анализа двух веществ с сильно различающейся гидрофильностью-липофильностью: разница $\log P$ более 3 и переходит через ноль. Удачный выбор

типа сорбента и хроматографической колонки Shim-pack GWS позволил успешно решить эту задачу с некоторой потерей чувствительности, не ограничившей ее использование, и провести исследование фармакокинетики комбинации молнупиравира с фавипиравиром, таблетки, 400мг+400 мг.

В главе 8 представлены результаты применения разработанной методики на первой фазе клинического исследования для оценки взаимного влияния молнупиравира и фавипиравира в составе комбинированного препарата на фармакокинетику друг друга. Сравнение рассчитанных фармакокинетических параметров компонентов при приеме монопрепаратов и комбинированного препарата показало отсутствие их взаимного влияния, а аналитическая методика ВЭЖХ-МС/МС доказала свою применимость для фармакокинетических исследований.

Глава 9 обобщает опыт предыдущих глав и формулирует методологические подходы к проведению биоаналитических исследований препаратов на примере применяемых в терапии COVID-19. Автором составлены деревья решений по выбору биологического объекта исследования, хроматографического метода, внутреннего стандарта, способа пробоподготовки, а также примерные схемы разработки методик хроматографического разделения, масс-спектрометрического и УФ-детектирования. Даны подробные рекомендации по выбору типа сорбента и параметров колонки, подбору режима элюирования и объему ввода пробы.

Таким образом, в результате разработки методик определения нескольких противовирусных препаратов для лечения коронавирусной инфекции и проведенных с их применением фармакокинетических исследований автором разработаны методологические подходы к анализу лекарственных средств в крови, плазме крови методами ВЭЖХ с масс-спектрометрическим и УФ-спектрофотометрическим детектированием.

Рекомендации по использованию результатов для науки и практики

Результаты исследования представляют широкий практический интерес для науки и практики. Алгоритмы принятия решений, представленные в работе, разработанные биоаналитические методики могут быть использованы в различных областях биоаналитических исследований, таких как исследования фармакокинетики, токсикологические исследования, терапевтический лекарственный мониторинг, в том числе и для других фармакотерапевтических групп.

Достоинства и недостатки по содержанию, оформлению, общая оценка диссертации

Представленная диссертация является результатом многолетних исследований автора, творчески подходившего к решению каждой встававшей перед ним аналитической задачи. В тексте работы проявляются профессиональная компетентность и увлеченность соискателя. Составленные деревья решений послужат ориентиром для начинающих, и не только, специалистов в области биоаналитики и в дальнейшем могут уточняться и дополняться.

Вопросы, возникшие по существу исследования:

1. В схеме подходов к выбору биологического объекта на стр. 295 вещество, связывающееся с фибриногеном, рекомендуется анализировать в сыворотке крови и выбрать оптимальный активатор свертывания. И, напротив, в отсутствие связывания с фибриногеном рекомендуется выбирать в качестве объекта плазму крови. Поясните, пожалуйста, что Вы имели в виду.
2. По тексту диссертации автор неоднократно объясняет выбор внутреннего стандарта «схожестью физико-химических свойств», не поясняя, в чем сходство, и не приводя ориентировочные пределы такого сходства. Так, например, сходными заявлены фавипиравир и ралтегравир на основании величин pK_a 9,39 и 7,02 и $\log P$ 0,49 и 1,3 (Табл. 10, стр. 62). Каковы критерии и пределы «близости физико-химических свойств»? Та же формулировка присутствует в схеме подходов к выбору внутреннего стандарта на стр. 303: «вещество, близкое к исследуемому по гидрофильно-липофильным, кислотнo-основным свойствам». Насколько близкое? Каков критерий близости? В схемах, предлагаемых в качестве дерева решений, желательна бóльшая определенность при выборе стратегии, более четкие формулировки.

Работа легко читается, изложена хорошим научным языком. Тем не менее, встречаются отдельные неудачные выражения, неточно сформулированные фразы, опечатки, что не влияет на общую положительную оценку диссертации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Опираясь на вышесказанное, можно сделать вывод о том, что диссертационная работа **Комарова Тимофея Николаевича** на тему «Методологические основы биоаналитических исследований препаратов для терапии новой коронавирусной инфекции» является законченным научным исследованием, в котором представлено решение научной проблемы, имеющей важное социально-экономическое значение, а именно разработки

методологических подходов к проведению аналитической части исследований фармакокинетики лекарственных средств, применяемых в терапии COVID-19.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, степени обоснованности научных положений и выводов, представленным публикациям, достоверности научно-практических результатов и выводов диссертационная работа **Комарова Тимофея Николаевича** соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 г. № 101, от 18.03.2023 г. № 415, от 26.10.2023 г. № 1786, от 25.01.2024 г. № 62), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, **Комаров Тимофей Николаевич**, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент:

Заведующая кафедрой фармацевтической химии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
доктор фармацевтических наук
(14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология),
профессор



Каленикова Елена Игоревна

04.09.2024

Адрес: 119991, Российская Федерация,
г. Москва, Ленинские горы, д. 1
Телефон: +79164650251 e-mail: eikaleni@yandex.ru

Подпись проф. Е. И. Калениковой подтверждаю
Директор МНОИ ФГБОУ ВО Московский
государственный университет имени М. В. Ломоносова,
академик РАН



В. А. Ткачук