

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертационную работу

**Комарова Тимофея Николаевича** на тему:

**«Методологические основы биоаналитических исследований препаратов для терапии новой коронавирусной инфекции»**, представленную в диссертационный совет 21.2.063.01, созданный на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки)

### **Актуальность темы**

В связи с постигшей мировое сообщество пандемией коронавирусной инфекции (COVID-19) жизнь жителей планеты Земля разделилась на «до и после» и человечество столкнулось с необходимостью решения целого ряда задач в кратчайшие сроки. COVID-19 – особо опасное заболевание, поскольку его симптоматика на начальной стадии похожа на ОРВИ, но при неблагоприятном течении оно способно вызывать тяжелые осложнения в виде сепсиса, иммунной аутовоспалительной реакции по типу цитокинового шторма и острой дыхательной недостаточности, которые в свою очередь, могут приводить к смерти больного. Согласно статистическим данным, летальным в мире оказывался каждый сотый случай заболевания. Высокий уровень заболеваемости новой коронавирусной инфекцией связан преимущественно с аэрогенным механизмом передачи возбудителя, характерным для ОРВИ. В настоящее время, несмотря на спад заболеваемости, с достаточной степенью вероятности сохраняется опасность возникновения новых вспышек, связанная с высокой подверженностью вируса к мутациям, а также его высокой контагиозностью. В связи с этими

обстоятельствами, актуальной и перспективной является проблема разработки лекарственных средств для лечения COVID-19. С целью обеспечения населения современными препаратами, применяемыми при терапии коронавирусной инфекции, в 2020 году постановлением правительства в Российской Федерации был утверждён порядок ускоренной регистрации лекарственных средств этой группы. Важным этапом при регистрации лекарственных средств является разработка биоаналитических методик с целью изучения фармакокинетики в рамках проведения клинических испытаний.

Диссертационная работа Комарова Т. Н. посвящена выработке методологического подхода к проведению биоаналитических исследований препаратов, применяемых в терапии новой коронавирусной инфекции, разработке и валидации биоаналитических методик и их апробации для оценки фармакокинетических параметров изучаемых препаратов с помощью разработанных методик.

Таким образом, актуальность тематики диссертационной работы соискателя сомнений не вызывает.

### **Научная новизна**

Базовым научным достижением оппонируемой научно-квалификационной работы является разработка нового направления, сочетающего новизну разработанных биоаналитических методик с оценкой рисков на отдельных этапах разработки и способов их снижения, что полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. В частности, автором предложены собственные методологические подходы, представленные в виде схем, для выбора биологической матрицы, внутреннего стандарта, способа пробоподготовки, аналитического метода, а также обобщены и сформулированы основные алгоритмы разработки методик хроматографического разделения и детектирования лекарственных средств в биологических матрицах при проведении фармакокинетических



исследований препаратов. Диссертантом впервые научно обоснован алгоритм выбора внутреннего стандарта на основании физико-химических свойств изучаемых соединений с учётом иных сопутствующих факторов. Предложен подход к снижению рисков при проведении разработки биоаналитических методик, таких как, ресурс хроматографической колонки, трудовая и временная затратность, озвучены экологические аспекты, что подтверждает риск-ориентированность предлагаемых методологических подходов. Описываемые алгоритмы являются обобщением экспериментальных данных, представленных автором в виде результатов разработки биоаналитических методик определения лекарственных средств, применяемых в этиотропной терапии COVID-19 и валидированных в соответствии с актуальными требованиями Евразийского Экономического Союза, действующими в Российской Федерации.

Разработанные методики впервые апробированы автором для изучения фармакокинетики инфузионной лекарственной формы фавипиравира, пероральных комбинированных лекарственных форм молнупиравира и фавипиравира, фавипиравира и соли цинка в рамках оценки применимости разработанных методик при проведении фармакокинетических исследований.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Предложенные методологические подходы и алгоритмы применимы на различных этапах разработки биоаналитических методик при проведении исследований фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных средств. При разработке данных алгоритмов автор опирался на риск-ориентированный подход, актуальный не только в условиях пандемии, но и в целом в фармацевтической разработке, поскольку он позволяет оценить критические аспекты разработки биоаналитических методик, снизить риски при проведении исследований, оптимизировать и сэкономить ресурсы.

Разработанные биоаналитические методики являются частью исследований фармакокинетики при проведении регистрационных процедур

для изучаемых препаратов, что подтверждается их применением при изучении фармакокинетики фавипиравира (лиофилизат для приготовления раствора для инфузий), комбинированной формы молнупиравира и фавипиравира, комбинированной формы фавипиравира и соли цинка. Оценка фармакокинетики для указанных лекарственных препаратов была проведена впервые в мире, что подтверждает высокий уровень проводимого исследования.

Полученные результаты внедрены в деятельность ряда российских и зарубежных вузов при проведении научно-исследовательских работ и разработок, фармацевтических предприятий, осуществляющих разработку лекарственных средств, контрактно-исследовательских организаций, биоаналитических лабораторий и клинических центров на этапах планирования исследований фармакокинетики и биоэквивалентности, что подтверждается 15 актами внедрения. Важно отметить, что результаты диссертационной работы используются в процессе обучения иностранных студентов на русском, английском и французском языках, а также внедрены в научно-исследовательскую, проектную и научно-практическую деятельность бакалавров, магистрантов, аспирантов, докторантов. Проведённые автором исследования в части разработки и валидации биоаналитических методик, а также оценки фармакокинетических параметров, включены в регистрационные досье на изучаемые лекарственные препараты, по которым получены регистрационные удостоверения, а сами препараты включены в действующие в Российской Федерации методические рекомендации по терапии COVID-19, что подтверждает решение в данной работе важной и социально значимой государственной задачи.

#### **Личный вклад автора**

Диссертация является самостоятельным научным трудом Т. Н. Комарова, что подтверждается участием автора на всех этапах исследования. Личный вклад автора заключается в постановке цели и задач исследования,



планировании дизайна работы, составлении литературного обзора, основой которого является обобщение информации по биоаналитическим исследованиям четырех лекарственных средств этиотропной терапии COVID-19 (фавипиравира, молнупиравира, нирматрелвира, ритонавира), разработке и валидации методик определения изучаемых веществ в биологических жидкостях, проведении фармакокинетических расчётов, обобщении полученных результатов в виде алгоритмов и деревьев решений, выработке методологического подхода. Публикации по теме исследования подготовлены автором лично и в соавторстве. Многочисленные выступления на конференциях различных уровней также подтверждают высокую степень (более 90%) личного участия автора в исследовании.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций**

Работа Комарова Т. Н. выполнена на высоком научно-экспериментальном уровне. Информационный поиск биоаналитических методик препаратов для лечения COVID-19 и последующий сравнительный анализ литературных источников предшествовал исследованию, которое выполнено согласно рекомендациям нормативной документации. Общий подход к проведению исследований соответствует общепринятым мировым принципам. Результаты подтверждены значительным объемом экспериментальных данных, полученных на основе современных физико-химических методов (ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС), которые полностью соответствуют поставленным целям и задачам. Статистическая обработка проведена с использованием актуальных методов математической статистики. Описательная статистика фармакокинетических параметров автором была рассчитана с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Для корреляционно-регрессионного анализа диссертант использовал программу IBM SPSS Statistics, версия 23,0). Выводы и рекомендации логично вытекают из результатов эксперимента.

Практические и методологические рекомендации предложены исходя из содержания работы и 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 работ, среди которых 20 статей в изданиях, включенных в международную базу данных Scopus (в т.ч. в журналах Q1), также 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 полноту исследования.

### **Соответствие диссертации паспорту специальности**

Научные положения диссертационной работы полностью соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно пункту 4 направления исследований: «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**

Диссертационная работа изложена на 396 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, восьми глав экспериментальной части, посвященной собственным исследованиям, заключения, списка сокращений, списка литературы и приложений. Обобщенные данные содержатся в 143 таблицах, работа иллюстрирована 65 рисунками. Список литературы включает 342 источника, из них почти 70% – на иностранных языках.

### Анализ диссертации по главам



*Введение* содержит все необходимые блоки: актуальность темы исследования, цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость и внедрение результатов исследования, основные положения, выносимые на защиту, методологию и методы исследования, достоверность научных положений и выводов а также, информацию о соответствии паспорту научной специальности и связи с проблемным планом фармацевтических наук, об апробации результатов исследования и публикациях по теме диссертационной работы, личном вкладе автора. Краткие сведения об объеме и структуре диссертации позволяют сделать вывод о проведении масштабного исследования.

*Глава 1* посвящена обзору литературы и в ней, помимо характеристики новой коронавирусной инфекции и принципов фармакотерапии COVID-19, отражаются сведения о нормативной документации, регламентирующей проведение исследования. Внутреннюю часть обзора занимают сведения об объектах исследования – фавипиравире, молнупиравире, нирматрелвире и ритонавире: приведены их структурные формулы и систематические названия, охарактеризованы некоторые свойства. Необходимо отметить, что все соединения, кроме фавипиравира относятся к категории хиральных лекарственных средств и для них автором в названиях уточняется конфигурация всех центров хиральности. Особую ценность литературного обзора представляют сводные таблицы, отражающее современное состояние аналитической базы по каждому из объектов исследования. Именно путем сравнительного анализа этих сведений, диссертантом выбрано базовое направление исследования и отражено в выводах, которыми заканчивается глава.

*Экспериментальная часть* состоит из восьми глав (главы 2–9), в каждой из которых сочетается традиционное изложение «материалов и методов», с одной стороны и «результатов и их обсуждения», с другой. В основу структурирования этих глав автором положен принцип систематизации по исследуемым препаратам. Такой стиль изложения

материала не является классическим вариантом диссертационных работ, но вполне оправдан, учитывая особенности разработки биоаналитических методик, в частности систему кодировки образцов.

Главы 2, 4 и 7 посвящены разработке и валидации методик в плазме крови человека: инфузионной лекарственной формы фавипиравира (глава 2), фавипиравира и В-D-N4-гидроксицитидина (метаболита молнупиравира) (глава 4), а также совместного попарного определения нирматрелвира и ритонавира; фавипиравира и В-D-N4-гидроксицитидина (глава 7). В этих главах базовым методом для разработки методик послужил метод ВЭЖХ, единственный на сегодняшний день адекватный поставленным в диссертационной работе целям и задачам. При этом автором учитывается уровень возможных концентраций лекарственного средства в крови пациента и варьируется способ детектирования. Так для инфузионной формы фавипиравира диссертантом используется УФ-детектор (глава 2), а для пероральных форм, когда, в значительной степени на концентрацию вещества в кровяном русле влияет биодоступность, применяется масс-спектрометрический способ детектирования, в котором источником ионизации является электроспрей. Следует отметить, что в главе 4 в качестве внутреннего стандарта (ВС) автор предлагает изотоп-меченый фавипиравир- $^{13}\text{C}_3$ , а для анализа В-D-N4-гидроксицитидина в качестве элюента многокомпонентную подвижную фазу, включающую среди прочих компонентов два органических растворителя – ацетонитрил и метанол. В главе 7 диссертантом разрабатывалась методика, пригодная для изучения фармакокинетики комбинированного препарата фавипиравира и молнупиравира. В связи с этим, должна была быть решена непростая с хроматографической точки зрения задача, связанная с разделением фавипиравира, имеющего липофильный характер и В-D-N4-гидроксицитидина (метаболита молнупиравира) – соединения гидрофильной природы. Автор успешно справился с этой нетривиальной ситуацией, путем



использования современного типа энд-кэпированной хроматографической колонки, наполненной сорбентом C18 марки ShimPack GWS.

В соответствии с требованиями нормативной документации, перечисленной автором на С. 14-15 автореферата, а также на С. 97, 133 и 188 диссертационной работы, все разработанные биоаналитические методики были валидированы по всем основным параметрам: селективность, калибровочная кривая, перенос пробы, точность (внутрицикловая и межцикловая), прецизионность (внутрицикловая и межцикловая), степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, эффект матрицы (для ВЭЖХ-МС/МС методик), стабильность. Все полученные данные отражены в таблицах в диссертации, а обобщающая сопоставительная картина в автореферате на С. 34–36.

*Главы 3, 5 и 6* связаны с апробацией разработанных методик для изучения фармакокинетики в рамках I фазы клинического исследования: инфузионной лекарственной формы фавипиравира (глава 3), фавипиравира в комбинации с цинка глюконатом в виде пероральной лекарственной формы – таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 200 мг + 70 мг (глава 5), молнупиравира – капсулы 200 мг (глава 6). Апробация методик проводилась поэтапно и включала клинический, аналитический этапы исследования и этап сравнения полученных фармакокинетических параметров с литературными данными. Результаты продемонстрировали возможность осуществления перехода к последующим фазам клинических исследований препаратов «Арепливир®», «Арепливир® Цинк») и «Эсперавир®»

*Глава 8* отличается сопоставительным характером изложения и в ней автор оценивает взаимное влияние молнупиравира и фавипиравира на фармакокинетику в рамках I фазы клинического исследования.

*Глава 9* является заключительным аккордом диссертационной работы соискателя. Именно в этой главе сконцентрированы все наработки и обобщены в виде схем подходы к выбору биологического объекта исследования, хроматографического метода, внутреннего стандарта, способа

пробоподготовки, а также в ней приведены схемы разработки биоаналитических хроматографических методик с различными способами детектирования (масс-спектрометрического, УФ-спектрофотометрического). Все вышеперечисленные блоки послужили основой, разработанного автором методологического подхода биоаналитических исследований препаратов для терапии COVID-19.

*Список сокращений* занимает три страницы и в нем расшифровано 87 сокращений, использованных в диссертационной работе.

*Список литературы* имеет очень редкую особенность. В связи с возникновением вызовов, связанных с распространением заболевания COVID-19, которое впервые было зарегистрировано в 2019 году, практически все литературные источники, приведенные в списке литературы были опубликованы за последние 5 лет.

*Приложение* содержит 15 актов внедрения результатов диссертационной работы в научно-исследовательскую, образовательную и проектную деятельность.

**Автореферат** представляет собой конспективное изложение диссертационной работы, построен по классическому образцу и соответствует высокой степени обобщения результатов. В основе структурирования автореферата в экспериментальной части диссертант использовал принцип систематизации по этапам исследования: валидационный и фармакокинетический. Основной объем автореферата занимает краткая информация по главе 9, являющейся квинтэссенцией диссертационной работы.

В целом, диссертационная работа и автореферат соответствуют актуальным требованиям ГОСТа Р.7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации».

**Достоинства и недостатки по содержанию, оформлению, общая оценка диссертации**



Главное достоинство оппонируемой работы связано с ее социально значимым уклоном и практико-ориентированным характером. Практическая направленность работы подтверждается 15 актами внедрения. Результаты диссертационной работы Комарова Т. Н. были включены в регистрационные досье на 4 лекарственных препарата этиотропной терапии COVID-19.

Несомненной умственной «изюминкой» работы является идея сочетанного воплощения бианалитического и риск-ориентированного подходов при разработке методик количественного определения лекарственных средств и их метаболитов в биожидкостях.

Текст изложения в диссертационной работе соответствует научному стилю изложения. Диссертация, хорошо иллюстрирована рисунками, содержащими, в качестве доказательной базы, спектральную и хроматографическую первичную документацию. Кроме того, часть рисунков отражает результаты фармакокинетических исследований, а рисунки заключительной 9 главы представляют собой оригинальные авторские схемы, поясняющие методологические основы биоаналитических разработок.

Отмечая несомненно положительное впечатление от работы, следует обсудить некоторые **вопросы и замечания, возникшие при оппонировании.**

1. В литературном обзоре в информационном блоке 1.4. «Обзор фармакологических, химических свойств исследуемых препаратов» целесообразно было бы добавить и характеристику физико-химических свойств, в частности растворимость, как крайне важный показатель при разработке аналитических методик.
2. Вторая группа вопросов связана с разработкой биоаналитической методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ.
  - Часто в хроматографии конечный результат зависит от выбора ВС. Какие еще соединения были опробованы в качестве кандидатов на

ВС при разработке и валидации методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ до того, как на эту роль был отобран ралтегравир?

- При сравнении физико-химических свойств фавипиравира и ралтегравира представляло несомненный интерес сравнение и их спектральных характеристик, в частности максимумов поглощения в УФ-области, учитывая способ детектирования при разработке биоаналитической методики определения фавипиравира с целью исследования фармакокинетики его инфузионной лекарственной формы.
- Поскольку в качестве ВС в этой методике реально был использован ралтегравир калия, в фармакопейной статье (ФС 2.1.0556) на который в разделе растворимость написано «мало растворим в метаноле», почему именно метанол был выбран в качестве растворителя?
- В чем состояла необходимость использования в этой методике двух органических растворителей – ацетонитрила (компонент подвижной фазы и растворитель при приготовлении рабочего стандартного образца фавипиравира) и метанола (растворитель при приготовлении рабочего раствора ВС ралтегравира и растворитель, использованный в пробоподготовке образцов плазмы крови)?

3. Третья группа вопросов и замечаний связана с разработкой биоаналитических методик определения лекарственных средств в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.

- Почти во всех этих методиках в качестве ВС использован прометазин. Какие еще соединения были опробованы в качестве кандидатов на роль ВС?
- Какие из критериев выбора ВС, перечисленных на С. 22 автореферата, были в приоритете у автора при отборе в качестве ВС прометазина?



- Чем обусловлено использование различных органических растворителей (метанола и ацетонитрила) в рамках разработки одной и той же биоаналитической методики? Так в методике, описанной в главе 4, фавипиравир и его изотоп-меченый аналог растворяют в ацетонитриле, в то время как в составе подвижной фазы и для осаждения белков плазмы используется метанол.
  - Чем обусловлено использование различных органических растворителей (метанола и ацетонитрила) для одного и того же соединения в разных методиках? Так, например, в методике, описанной в главе 4, ВС прометазин, в случае отдельного определения  $\beta$ -D-N4-гидроксицитидина растворяют в ацетонитриле, а в методике, описанной в главе 7, случае совместного определения фавипиравира и  $\beta$ -D-N4-гидроксицитидина прометазин растворяют в метаноле, а в составе элюента и содержится ацетонитрил и его же используют для осаждения белков плазмы?
  - В подрисуночных подписях к секторам хроматограммы, особенно на рисунках 15, 16 и 17 в автореферате следовало указать условия детектирования.
4. Вопрос, связанный с терминологией. Автором работы в диссертации и автореферате как в тексте, так и в подписях к рисункам использованы следующие дефиниции «Схема подходов», «Алгоритм», «Дерево принятия решений». Эти определения использованы как синонимы, или при осмыслении результатов автором закладывался какой-то особый смысл при употреблении каждого термина?
5. Некоторые суждения о структурировании диссертационной работы и автореферата.

Полагаю, что вариант структурирования, избранный автором в автореферате, дает более целостное представление о большом объеме проделанной работы и не приводит к неизбежным повторам,

увеличивающим объем, как в случае варианта систематизации материала по исследуемым лекарственным средствам в диссертационной работе.

С другой стороны, в автореферате не так заметна главная сюжетная линия диссертационной работы, заключающаяся во взаимосвязи этапов при разработке биоаналитических методик с сопряженными рисками.

Почему автором выбран различный вариант структурирования материала и какой вариант систематизации, по его мнению, заслуживает более высокой оценки?

6. Ремарка в плане оформления диссертационной работы. Как для автора при написании, так и для читателя более удобна нумерация рисунков и таблиц внутри каждой главы по сравнению со сквозной нумерацией, использованной диссертантом.

7. В тексте диссертационной работы и автореферата имеются отдельные неудачные выражения, стилистические неточности и опечатки.

Вопросы и отдельные замечания не носят принципиального характера, не снижают достоинства диссертационной работы и не влияют на ее общую положительную оценку.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

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 важной научной проблемы, имеющей приоритетное значение для фармации и заключающейся в разработке и внедрении инновационных методологических подходов к проведению биоаналитических исследований с учетом возможных рисков при изучении фармакокинетики лекарственных средств, применяемых в терапии новой коронавирусной инфекции.

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:**

Профессор кафедры химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), доктор фармацевтических наук (3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия), профессор Селиванова Ирина Анатольевна



« 03 » сентября 2024 г.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации «Сеченовский Университет»

Почтовый адрес: 119048, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Телефон: +7(917)504-77-55; e-mail: selivanova\_i\_a@staff.sechenov.ru

