

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

комиссии диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора Российской Федерации по докторской диссертации **Абрамовой Елены Геннадьевны** на тему: «Совершенствование биотехнологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Соответствие специальности, по которой совету предоставлено право защиты.

Диссертация Абрамовой Елены Геннадьевны выполнена на современном научно-методическом уровне с использованием широкого спектра методов исследований: биотехнологических, вирусологических, биологических, иммунохимических, молекулярно-генетических, биохимических, физико-химических, биофизических. Комиссия считает, что разработка комплекса научно обоснованных современных биотехнологических решений для оптимизации технологии промышленного производства и повышения качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина, представленных в данной диссертационной работе, имеют важное значение для исследований в направлении совершенствования биотехнологий производства противовирусных иммуноглобулиновых препаратов, улучшения качества оказываемой населению антирабической помощи и обеспечения лекарственной независимости Российской Федерации.

Члены комиссии считают, что диссертация Абрамовой Елены Геннадьевны полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г, в редакции постановления Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г., предъявляемым к докторским диссертациям, и рекомендуется к защите по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных автором.

По теме диссертации опубликовано 46 печатных работ, 18 из которых представлены в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК; получены три патента; внесены изменения в фармакопейную статью предприятия Р N002639/01-250210 на иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций.

Значимость материалов диссертации для науки и практики.

Научная новизна

Научно обоснован комплекс биотехнологических решений для оптимизации производства и улучшения качества отечественного гетерологичного антирабического иммуноглобулина, применяемого для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей.

Разработаны технологические параметры масштабного культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero с использованием суспензионного, псевдосуспензионного и роллерного методов. Разработана оригинальная методика очистки и концентрирования культурального *virus fixe* тангенциальной ультрафильтрацией.

Экспериментально обосновано применение в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина культурального рабического антигена на основе *virus fixe* «Москва 3253» на этапе иммунизации продуцентов взамен органо-тканевого антигена.

Разработаны оригинальные методические подходы для количественной оценки содержания *virus fixe* «Москва 3253» в вирусном материале с применением полимеразной

цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов. Научная новизна подтверждена патентами на изобретения № 2511029 РФ «Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* TG1(pRV_{Moscow3253}G-L) для получения набора ПЦР-стандартов и набор ПЦР-стандартов для определения концентрации штамма вируса бешенства «Москва 3253» в рабическом антигене», опубл.10.04.2014, бюл. № 10 и № 2511440 РФ «Способ количественного определения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», опубл. 10.04.2014, бюл. № 10.

Экспериментально обоснованы условия получения очищенного гликопротеида из концентрированного культурального вируса бешенства «Москва 3253» для конструирования высокоспецифичной иммунохимической тест-системы с использованием наночастиц коллоидного золота для оценки активности антирабических сывороток и иммуноглобулина. Приоритетность исследований подтверждена получением патента на изобретение № 2360252 РФ «Диагностикум и тест-система для определения активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* методом дот-иммуноанализа», опубл. 27.06.2009, бюл. № 18.

Разработана оригинальная модульная система очистки и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина баромембранными методами с использованием фильтрационных материалов отечественного производства, внедренная в промышленный выпуск препарата (промышленный регламент ПР № 01898109-47-15).

Научно обоснованы технологические параметры сублимационного высушивания в промышленных условиях антирабического иммуноглобулина и его F(ab')₂-фрагментов и получена новая форма выпуска гетерологичного антирабического иммуноглобулина – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения.

Получены сведения о тепловых свойствах раствора антирабического иммуноглобулина и обоснована конечная температура замораживания препарата. Научно обоснован выбор оптимального лиопротектора и доказана стабильность свойств лиофилизированного антирабического иммуноглобулина при длительном хранении.

Получены данные о молекулярных параметрах антирабического иммуноглобулина, что позволит расширить перечень показателей качества препарата, включенных в спецификацию фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на антирабический иммуноглобулин.

Практическая значимость

Настоящее исследование имеет выраженное прикладное значение и направлено на разработку современных биотехнологических решений по совершенствованию качества и оптимизации существующей технологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина – лекарственного средства, включенного в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения. Внедрение в производство иммунобиологических лекарственных препаратов предложенных решений вносит весомый вклад в развитие здравоохранения и укрепление санитарно-эпидемиологического благополучия Российской Федерации. Решена важная народно-хозяйственная проблема по обеспечению населения отечественным высококачественным иммунобиологическим лекарственным препаратом для пассивной профилактики бешенства, что способствует лекарственной независимости государства.

Разработана оригинальная технология масштабного культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero и обоснованы предложения по ее внедрению в производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина. В производственных условиях по усовершенствованной технологии получены 3 экспериментально-производственные серии антирабического иммуноглобулина, показатели качества которых соответствуют требованиям фармакопейной статьи предприятия Р N002639/01-250210 (акты межлабораторных испытаний образцов антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади, иммунизированной культуральным рабическим антигеном,

экспериментально-производственных серий № 01, 02, 03, утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 28.08.2014 г.).

Предложенные инновационные альтернативные технологии *in vitro* для количественного определения вируса бешенства и антител к нему позволяют сократить количество животных для проведения контрольных тестов, что способствует снижению себестоимости препарата. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* TG1(pRV_{Moscow3253}G-L), содержащий фрагмент G-L-области генома *virus fixe* «Москва 3253», депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Разработана технология получения лиофилизата антирабического иммуноглобулина, апробированная в экспериментально-производственных условиях, что позволяет рекомендовать ее для промышленного выпуска препарата. Выпуск лиофилизированного иммуноглобулина позволит в два раза увеличить срок годности и повысить стабильность свойств препарата при хранении и транспортировании. По разработанной технологии получены 3 экспериментально-производственные серии лиофилизированного антирабического иммуноглобулина и 3 экспериментальные серии лиофилизированных F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина, показатели качества которых соответствуют требованиям фармакопейной статьи предприятия Р N002639/01-250210 (акты межлабораторных испытаний образцов лиофилизированного иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади экспериментально-производственных серий № 0101, 0102, 0103; акты межлабораторных испытаний образцов лиофилизированных F(ab')₂-фрагментов иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади экспериментальных серий № 01, 02, 03, утвержденные директором института 10.06.2014 г.). Разработанные технологические решения с использованием нового современного лиофильного оборудования позволят сократить энергопотребление производства на 55730,4 кВт в год при выпуске препарата объемом 400 л. Экономический эффект от внедрения новой технологии с использованием современного сублимационного оборудования составит 362247,6 руб. в год за счет снижения энергозатрат.

Исследование молекулярных параметров антирабического иммуноглобулина позволит расширить перечень показателей качества препарата и включить в спецификацию фармакопейной статьи предприятия новый раздел «молекулярные параметры» с целью совершенствования контроля производственных серий иммуноглобулина.

На модели антирабического иммуноглобулина разработана оригинальная модульная система очистки и стерилизации его полуфабриката с использованием фильтров отечественного производства, что позволило свести к минимуму зависимость от импортных фильтрационных материалов и снизить объемы финансовых затрат на приобретение расходных материалов на 216508,25 руб. в год при серийном выпуске препарата объемом 400 л. С применением усовершенствованной технологии выпущены 6 коммерческих серий антирабического иммуноглобулина общим объемом 400 л на сумму более 39 млн руб. На все серии получены сертификаты соответствия, разрешающие выпуск препарата в гражданский оборот (орган по сертификации лекарственных средств ООО «Центр ЭКСПЕРТФАРМ», г. Москва). Препарат реализован в лечебно-профилактические учреждения 68 субъектов Российской Федерации и применяется в настоящее время для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей.

По результатам диссертационного исследования внесены изменения в фармакопейную статью предприятия на антирабический иммуноглобулин Р N002639/01-250210 (ведомость изменений № 4 Р N002639/01-090216 от 09.02.2016 г., утвержденная Министерством здравоохранения Российской Федерации). Проект изменений № 5 в ФСП Р N002639/01-090216 представлен для согласования и утверждения в Департамент государственного регулирования обращения лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации (заявление № 83494 о внесении изменений в

документы, содержащиеся в регистрационном досье, от 27.04.2017 г.).

Проведенные научные исследования явились основанием для переработки соответствующих разделов при пересмотре промышленного регламента ПР № 01898109-47-15 на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций (утвержден директором РосНИПЧИ «Микроб» 28.12.2015 г.) и изменений к ПР № 01898109-47-15 (ведомость изменений № 1 к ПР № 01898109-47-15, утверждена директором РосНИПЧИ «Микроб» 12.12.2016 г.).

По материалам проведенных исследований разработаны следующие методические рекомендации:

«Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологического антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 1 от 09.04.2009 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 10.04.2009 г.;

«Культивирование фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на перевиваемой клеточной линии Vero», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 5 от 23.09.2010 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 24.09.2010 г.;

«Определение уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках лошадей-продуцентов и человека в непрямом варианте дот-иммуноанализа с применением неферментного диагностикума», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 3 от 05.05.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 06.05.2011 г.;

«Количественное определение фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в вирусосодержащем материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 10.11.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 10.11.2011 г.;

«Концентрирование инактивированной суспензии культурального фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» методом тангенциальной ультрафильтрации», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 10.11.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 10.11.2011 г.;

«Разработка лиофилизированной формы гетерологического антирабического иммуноглобулина», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 7 от 22.12.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 23.12.2011 г.;

«Культивирование фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» суспензионным методом на перевиваемой клеточной линии Vero», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 23.12.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 24.12.2011 г.;

«Культивирование фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» псевдосуспензионным методом на перевиваемой клеточной линии Vero», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 23.12.2011 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 24.12.2011 г.;

«Выделение гликопротеида из фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 3 от 31.05.2012 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 01.06.2012 г.;

«Культивирование фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на перевиваемой клеточной линии Vero роллерным способом», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 7 от 27.11.2013 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 27.11.2013 г.;

«Проведение баромембранного процесса депирогенизации раствора антирабического иммуноглобулина», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 30.12.2014 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 30.12.2014 г.;

«Стерилизующая фильтрация раствора антирабического иммуноглобулина», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 08.12.2015 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 09.12.2015 г.;

«Предварительная фильтрация и диализ раствора антирабического иммуноглобулина», одобренные Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 22.12.2016 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» 23.12.2016 г.

Предложения о назначении по рассматриваемой диссертации официальных оппонентов и ведущей организации.

Официальными оппонентами предлагается назначить:

1) д-ра биол. наук, проф. Клюкину Валентину Ивановну (зав. отделом иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Федерального агентства научных организаций, Московская область, Щелковский район, поселок Биокомбината);

2) д-ра биол. наук Жарникову Ирину Викторовну (вед. научного сотрудника научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь);

3) д-ра мед. наук Степанова Александра Валентиновича (главного научного сотрудника Научно-исследовательского испытательного центра медико-биологической защиты Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, г. Санкт-Петербург).

Ведущей организацией назначить Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Московская область, г. Сергиев Посад

Члены комиссии диссертационного совета

доктор биол. наук Коломбет Любовь Васильевна

(подпись)

доктор биол. наук Суровцев Владимир Иванович

(подпись)

доктор тех. наук, с.н.с. Похиленко Виктор Данилович

(подпись)

Председатель диссертационного совета

Д 350.002.01 академик РАН, доктор мед. наук, профессор

Дятлов И.А.

Ученый секретарь диссертационного
совета Д 350.002.01, канд. биол. наук

Фурсова Н.К.