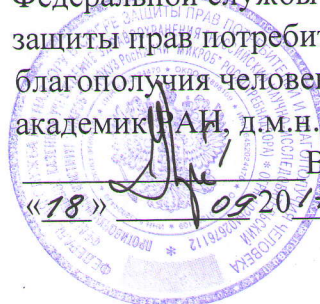


УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
академик РАН, д.м.н., профессор
В.В. Кутырев



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального казенного учреждения здравоохранения
«Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека
(ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора)**

Диссертация «Совершенствование биотехнологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), выполнена в лаборатории профилактических иммуноглобулинов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

В период подготовки диссертации соискатель Абрамова Елена Геннадьевна работала в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в должности заведующего лаборатории профилактических иммуноглобулинов отдела профилактических препаратов.

В 1985 г. Абрамова Е.Г. окончила Томский государственный университет, биологический факультет по специальности «Микробиология».

Научный консультант: Никифоров Алексей Константинович, доктор биологических наук, кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора по экспериментальной и производственной работе Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб».

Диссертационная работа Абрамовой Елены Геннадьевны является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, соответствующей паспорту специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность темы и состояние проблемы

Достигнутый на настоящее время уровень развития науки и техники диктует необходимость применения современных биотехнологических решений для промышленного выпуска иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), к которым относится гетерологичный антирабический иммуноглобулин (АИГ). АИГ производства ФКУЗ

РосНИПЧИ «Микроб» является самым востребованным ИЛП в Российской Федерации из всех зарегистрированных отечественных гетерологичных иммуноглобулинов и сывороток против различных бактериальных и вирусных инфекций. Столь высокая востребованность препарата объясняется широким распространением бешенства – одного из самых опасных заболеваний в мире. Несмотря на предпринимаемые меры по ограничению распространения бешенства и усиление мер профилактики среди диких и домашних животных, повсеместно ликвидировать данное заболевание до сих пор не удается. По данным ВОЗ, ежегодно в мире от бешенства умирают до 70 тыс. человек, половина из них – дети до 15 лет. В России также отмечается напряженная эпизоотическая ситуация по бешенству, тенденций к улучшению нет. Бешенство среди животных регистрируется практически во всех федеральных округах России, наиболее неблагоприятными являются регионы Центрального, Приволжского и Южного федеральных округов. Ежегодно на территории нашей страны регистрируется от 839 до 7633 случаев бешенства животных, а за период с 1975 по 2014 гг. в России зафиксировано 489 случаев смертей людей от бешенства, что составляет в среднем 12,5 случаев в год.

Из-за абсолютной летальности бешенства вопросы постэкспозиционной профилактики заболевания имеют исключительно важное значение, а практическую значимость антирабических препаратов невозможно переоценить. По данным ВОЗ, более 15 млн человек в мире ежегодно получают антирабическое лечение, что позволяет предотвращать сотни тысяч случаев смерти от бешенства. В медицинские учреждения Российской Федерации ежегодно в связи с контактами с больными или подозрительными на бешенство животными обращаются 430–470 тыс. человек, больше половины из них получают направление на специфическое антирабическое лечение. На сегодняшний день гетерологичный АИГ производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» является единственным отечественным зарегистрированным лекарственным средством пассивной иммунизации, минимизирующим риск заболевания людей бешенством при укусах опасной локализации.

Гетерологичный АИГ, по мнению экспертов ВОЗ, является безопасной и вполне приемлемой альтернативой гомологичному АИГ из иммунной сыворотки крови человека, что обусловлено качественной очисткой иммуноглобулиновой фракции в результате применения современных технологий. До 1999 г. Российская Федерация не располагала собственным производством АИГ, выпуск препарата был локализован на территории Украины (Харьков, «Биолек»). Резкий подъем уровня заболеваемости бешенством среди диких и домашних животных в 90-е гг. и, как следствие, возросшее количество обращающихся за антирабической помощью людей выявили необходимость организации производства отечественного АИГ. В 1999 г. по поручению Главного государственного санитарного врача Российской Федерации (№ 2510/12020-99-26 от 09.11.99 г.) и решению Межведомственной комиссии Совета Безопасности Российской Федерации по охране здоровья населения (№ 1 от 24.10.2000 г.) в РосНИПЧИ «Микроб» были начаты экспериментальные разработки по получению гетерологичного АИГ, а в 2004 г. институт приступил к серийному выпуску препарата.

По данным ВОЗ, частота нежелательных реакций в ответ на введение АИГ животного происхождения составляет 1–2 %. В Российской Федерации, по сведениям Российской базы данных АИС-Росздравнадзор-Фармаконадзор, за последние 7 лет ежегодно регистрируется от 6 до 58 случаев нежелательных реакций на введение гетерологичного АИГ, что составляет от 0,015 до 0,145 % от общего количества пациентов, получивших

антирабическую помощь в виде комбинации вакцины и иммуноглобулина. Учитывая, что производство иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб» развернуто по восстановленной технологии, разработанной в 70-е годы прошлого века, биотехнологическая схема выпуска препарата в настоящее время требует внедрения современных решений, способствующих повышению безопасности данного лекарственного средства.

Важнейшей научно-практической задачей, способствующей повышению качества гетерологичного АИГ, является внедрение в производство препарата культуральных технологий. На сегодняшний день при получении иммунной сыворотки в качестве антигена для иммунизации продуцентов используют фиксированный вирус бешенства органо-тканевого происхождения. Из-за возможного риска развития побочных реакций у пациентов после инъекции антирабического иммуноглобулина, полученного по данной технологии, ВОЗ рекомендует отказаться от использования органо-тканевого антигена в производстве антирабических препаратов. В качестве альтернативного варианта рекомендовано использование культурального антигена на основе вируса бешенства, репродуцированного на клеточных культурах. Производство гомологичного АИГ, осуществляемое в экономически развитых странах, связано с использованием культуральных антирабических вакцин для иммунизации доноров. Что касается гетерологичного АИГ, производимого, помимо России, в развивающихся странах, есть положительный опыт применения культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов в таких странах, как Турция, Индия, Таиланд. Надо отметить, что в Российской Федерации более 30 лет назад создана база промышленного производства культуральных антирабических вакцин, для приготовления которых используются различные штаммы фиксированного вируса бешенства, полученные путем адаптации вакцинных штаммов к различным клеточным системам. Вакцинный штамм фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» является уникальным и используется в Российской Федерации только для производства антирабического иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб», что говорит об отсутствии сведений об особенностях его адаптации и репродукции на клеточных культурах.

При репродукции фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на культуре клеток возникает необходимость в оценке содержания вируса в культуральном рабическом антигене в сравнении с органо-тканевым антигеном, а также динамики накопления вируса бешенства на стадиях культивирования. Традиционно применяемый метод титрования вируса на белых мышцах с определением инфекционной дозы ЛД₅₀ является трудоемким, длительным (не менее 14 сут) и предполагает использование большого количества лабораторных животных и патогенного биологического агента. В связи с этим актуальны исследования по разработке альтернативных подходов *in vitro*, позволяющих количественно оценить содержание вируса в антигенном материале без использования животных. Одним из таких подходов к количественной оценке вирусов является использование полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов (ПЦР-РВ). Применение в производственной практике указанного методического подхода позволит стандартизировать получаемые серии культурального рабического антигена, кроме того, преимуществом является возможность исследования инактивированного антигенного материала. В биотехнологии производства профилактических иммунобиологических препаратов данный подход успешно используется для количественного определения протективного антигена у вакцинных штаммов вирусов кори, краснухи и эпидемического

паротита, для количественной оценки содержания антигена Е вируса клещевого энцефалита в клеточной культуре.

В направлении внедрения альтернативных технологий *in vitro* на этапах производства и контроля антирабического иммуноглобулина актуальны исследования, направленные на оптимизацию разработанной в РосНИПЧИ «Микроб» тест-системы с использованием наночастиц коллоидного золота, позволяющей определять активность антирабических сывороток и иммуноглобулина в дот-иммуноанализе. Выделение из вируса бешенства культурального происхождения основного иммуногена – гликопротеида и его использование при конструировании диагностикума и постановке дот-иммуноанализа направлено на выявление в исследуемых образцах антител вируснейтрализующей направленности, что позволит оценить *in vitro* специфическую активность иммунных сывороток и иммуноглобулина.

Одной из задач, решение которой способствует улучшению качества комбинированного антирабического лечения, является разработка стабильной лекарственной формы, обеспечивающей сохранность спецификационных свойств антирабического иммуноглобулина при транспортировании и хранении. В настоящее время препарат выпускается в форме раствора для инъекций, недостатками которой является сравнительно небольшой срок годности (1,5 года), низкая термостабильность и необратимость процессов биодegradации при несоблюдении температурного режима хранения или транспортирования. Безусловно, разработка технологии получения лиофилизированного антирабического иммуноглобулина обеспечит стабильность данного лечебно-профилактического средства в условиях длительного транспортирования, что актуально для Российской Федерации в связи со значительной протяженностью ее транспортных путей, а также позволит полностью удовлетворить потребность организаций Минздрава Российской Федерации в столь востребованном препарате за счет увеличения срока годности.

Одним из актуальных современных направлений совершенствования технологии производства гетерологичного АИГ является переход к использованию на этапах очистки и стерилизации полуфабриката отечественных фильтрационных материалов с сохранением показателей качества целевого продукта, что позволит минимизировать зависимость от импортных фильтрационных материалов и снизить себестоимость препарата. В РосНИПЧИ «Микроб» разработана уникальная каскадная система очистки и стерилизации раствора иммуноглобулина с использованием различных мембранных и глубинных фильтров, главным образом, импортных. В связи с этим представляются актуальными исследования по разработке альтернативной схемы фильтрации с использованием отечественных мембранных и глубинных фильтров и их оценке по следующим критериям: удаление эндотоксина и гемпигмента, пропускная способность и стерильность раствора иммуноглобулина после фильтрации с подбором наиболее подходящих условий для осветления, депирогенизации и стерилизации раствора иммуноглобулина.

В совершенствовании комбинированной профилактики бешенства в Российской Федерации за счет улучшения качества гетерологичного АИГ важную роль играет оптимизация методов контроля коммерческих серий препарата, в частности, расширение перечня спецификационных показателей. Кроме того, в настоящее время отсутствует отраслевой стандартный образец (ОСО) специфической активности АИГ. Для контроля специфической активности препарата на предприятии-изготовителе обязательным является наличие Международного стандартного образца иммуноглобулина человеческого против

бешенства либо стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности АИГ, аттестованного против указанного Международного стандарта ВОЗ. В связи с этим актуальными являются исследования по разработке и аттестации СОП специфической активности АИГ.

Таким образом, разработка комплекса научно обоснованных современных биотехнологических решений по оптимизации производства и совершенствованию качества антирабического иммуноглобулина чрезвычайно важна как с научной точки зрения, так и с позиций практического здравоохранения. Решение этой проблемы имеет важное народно-хозяйственное значение и будет способствовать обеспечению Российской Федерации отечественным иммунобиологическим лекарственным средством для постэкспозиционной профилактики бешенства. Проведенные исследования согласуются с целями и задачами Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года, утвержденной Правительством РФ от 24 апреля 2012 г. N 1853п-П8.

В связи с вышеизложенным, актуальность исследований, направленных на совершенствование технологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина, представляется очевидной.

Исследования выполнены в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» в период с 2006 по 2016 гг. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)» и отраслевых НИР: 26-2-05 «Разработка и внедрение в производство новых медицинских иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики возбудителей опасных инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы» (2005–2009 гг., номер госрегистрации 0120.0504663); 40-2-09 «Оптимизация технологических этапов производства МИБП и разработка новых препаратов для диагностики ООИ» (2009–2014 гг., номер госрегистрации 0120.0853923); 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов» (2014–2016 гг., номер госрегистрации 01201457722).

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации

Личный вклад автора заключается в персональном участии при определении направлений, планировании и выполнении исследований по освоению технологии масштабного культивирования вируса бешенства на перевиваемой линии клеток Vero и разработке соответствующей производственно-технологической документации; по конструированию и совершенствованию тест-системы для определения антирабических антител *in vitro* с использованием наночастиц коллоидного золота; по освоению технологии выпуска антирабического иммуноглобулина в новой форме – лиофилизата для приготовления раствора для внутримышечного введения и исследованию его свойств; по изучению эффективности и внедрению в производство антирабического иммуноглобулина фильтрационных материалов отечественного производства. Часть исследований выполнена в соавторстве с сотрудниками ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» к.б.н. С.В. Генераловым, к.б.н. Ж.В. Матвеевой, к.б.н. Н.А. Осинной, к.м.н. И.В. Тучковым, к.б.н. Н.А. Шараповой, к.м.н. М.Н. Киреевым, д.б.н. А.В. Комиссаровым, к.б.н. О.А. Лобовиковой, к.м.н. И.В. Шульгиной, к.б.н. О.А. Волох, а также сотрудниками Института химии растворов Российской академии наук (г. Иваново).

Степень достоверности результатов проведенных исследований работы основана на значительном объеме экспериментальных исследований и полученных результатов, их статистической обработке и соответствии теоретическим данным. Исследования проведены на аттестованном оборудовании, все используемые контрольно-измерительные приборы прошли метрологическую поверку. Выводы диссертации теоретически и экспериментально обоснованы и соответствуют цели и задачам исследования.

Научная новизна

Научная новизна диссертационного исследования заключается в следующем:

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

Экспериментально обоснованы технологические параметры масштабного культивирования производственного штамма фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero суспензионным, псевдосуспензионным и роллерным методами. Разработана оригинальная методика очистки и концентрирования культурального вируса бешенства тангенциальной ультрафильтрацией.

Впервые в отечественном производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина для иммунизации продуцентов предложено использование рабического антигена на основе культурального вируса бешенства штамма «Москва 3253» взамен органо-тканевого антигена.

Разработаны оригинальные методические подходы для количественной оценки содержания вируса бешенства штамма «Москва 3253» в вирусном материале с помощью полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов. Приоритетность исследований подтверждена получением патентов на изобретение № 2511029 РФ «Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* TG1(pRV_{Moscow3253}G-L) для получения ПЦР-стандартов и набор ПЦР-стандартов для определения концентрации штамма вируса бешенства «Москва 3253» в рабическом антигене», опублик. 10.04.2014, бюл. № 10 и № 2511440 РФ «Способ количественного определения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», опублик. 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 титра вируснейтрализующих антител. 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», опублик. 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 обоснована технология лиофильного высушивания гетерологичного антирабического иммуноглобулина и его F(ab')₂-фрагментов в условиях промышленного

производства препарата и получена на ее основе новая форма выпуска антирабического иммуноглобулина – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения.

Получены сведения о тепловых свойствах раствора гетерологичного антирабического иммуноглобулина, позволяющие обосновать конечную температуру замораживания препарата. Научно обоснован выбор оптимального лиопротектора и изучены основные свойства лиофилизатов гетерологичного 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 и теоретическая значимость работы

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 крупная народно-хозяйственная проблема по обеспечению населения отечественным высококачественным иммунобиологическим лекарственным препаратом для пассивной профилактики бешенства, что способствует повышению экономического суверенитета государства.

Разработана оригинальная технология масштабного культивирования производственного штамма вируса бешенства «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 гены G-L-области генома вируса бешенства «Москва 3253», депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Разработана технология лиофильного высушивания гетерологичного 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. За счет снижения расхода потребляемой электроэнергии экономический эффект от внедрения новой технологии с использованием современного сублимационного оборудования Power Dry 9000 составит 362247,6 руб. в год.

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 для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей по настоящее время.

По материалам диссертационного исследования разработана следующая нормативная документация: комплект стандартных операционных процедур на основные технологические операции по получению культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов, проекты изменений в ФСП Р N002639/01-250210 и промышленный регламент ПР № 01898109-26-10 на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций (одобрены Ученым советом РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 7 от 13.11.2014 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.).

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) и промышленный регламент ПР № 01898109-47-15 на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций» (ведомость изменений № 1 к ПР № 01898109-47-15, утверждена директором РосНИПЧИ «Микроб» 12.12.2016 г.).

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

По материалам проведенных исследований разработаны следующие методические рекомендации:

«Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного 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-производителей 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 гетерологичного 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.

Теоретическая значимость исследования заключается в научном обосновании целесообразности внедрения в производство новых культуральных, фильтрационных, сублимационных технологий, направленных на повышение качества и стабильности гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Представленный в работе экспериментально-практический материал является теоретической основой для исследований в направлении совершенствования биотехнологий производства противовирусных иммуноглобулиновых препаратов. Материалы диссертации используются при чтении лекций на курсах профессиональной переподготовки и усовершенствования врачей и биологов по особо опасным инфекциям при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»; при чтении лекций в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. По теме диссертационной работы опубликовано 46 работ, в том числе 18 статей в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук». Получены 3 патента на изобретения.

Положения, выносимые на защиту.

1. Экспериментально обоснованная технология культивирования производственного штамма фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на перевиваемой клеточной линии Vero суспензионным, псевдосуспензионным и роллерным методами позволяет получить культуральный рабический антиген для иммунизации продуцентов, по антигенным свойствам не уступающий органо-тканевому.

2. Разработанные методические подходы с использованием полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов позволяют количественно оценивать содержание вируса бешенства «Москва 3253» в материале для иммунизации продуцентов.

3. Специфический иммуноглобулин, полученный с использованием культуральных технологий, по спецификационным показателям соответствует требованиям нормативной документации на антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади.

4. Выделение из очищенного и концентрированного культурального вируса бешенства основного антигенного компонента – гликопротеида и использование его в качестве реагента при конструировании диагностикума с наночастицами коллоидного золота позволяет выявлять вируснейтрализующие антитела в антирабических препаратах *in vitro* в дот-иммуноанализе.

5. Использование в производстве модульной системы очистки и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина на основе отечественных фильтрационных материалов обеспечивает выпуск стандартных и качественных серий антирабического иммуноглобулина в соответствии с требованиями нормативной документации при снижении себестоимости.

6. Экспериментально обоснованная технология позволяет получать в производственных условиях гетерологичный антирабический иммуноглобулин и его $F(ab')_2$ -фрагменты в новой форме – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения, сохраняющей спецификационные свойства в течение 3 лет и имеющей преимущество по показателю «Молекулярные параметры» при длительном хранении.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Генералов, С.В. Получение препарата $F(ab')_2$ -фрагмента антирабического иммуноглобулина с использованием иммобилизованного пепсина / С.В. Генералов, *Е.Г. Абрамова*, А.К. Никифоров, Е.М. Храмова, И.А. Шепелев, Л.В. Савицкая, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Н.Н. Кочкалова, М.Н. Киреев // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2008. – № 3. – С. 53–56.

2. Шарапова, Н.А. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе / Н.А. Шарапова, *Е.Г. Абрамова*, А.К. Никифоров, Л.В. Савицкая, Л.Н. Минаева, Т.А. Михеева, М.В. Галкина, Я.М. Краснов // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2010. – № 1. – С. 63–66.

3. *Абрамова, Е.Г.* Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина – итоги первых пяти лет / *Е.Г. Абрамова*, А.К. Никифоров, О.А. Лобовикова, С.А. Еремин, Ю.Г. Васин, Т.А. Михеева, И.М. Жулидов, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Л.В. Савицкая, А.Г. Селезнева, Р.А. Свинцов, С.В. Генералов, И.В. Шульгина // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2010. – № 3. – С. 58–62.

4. *Абрамова, Е.Г.* Определение молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина методом гель-фильтрации / *Е.Г. Абрамова*, А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, Н.Н. Кочкалова, С.В. Генералов, А.Г. Селезнева, Л.В. Савицкая, Ю.В. Иванов // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2010. – № 4. – С. 54–57.

5. *Абрамова, Е.Г.* Получение лиофилизированного препарата антирабического иммуноглобулина и исследование его основных свойств / *Е.Г. Абрамова*, Н.Н. Кочкалова, А.К. Никифоров, А.Ю. Бутырский, Ю.В. Иванов, Н.В. Сеницына, Т.А. Михеева, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Л.В. Савицкая, С.В. Генералов, М.Н. Киреев, Н.А. Шарапова // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2011. – № 2 (108). – С. 75–78.

6. Генералов, С.В. Клеточные культуры в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина / С.В. Генералов, *Е.Г. Абрамова*, А.К. Никифоров, Ж.В. Матвеева // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2011. – № 4 (110). – С. 76–80.

7. Кочкалова, Н.Н. Определение эвтектической температуры и исследование тепловых параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина методами электропроводности и дифференциальной сканирующей калориметрии / Н.Н. Кочкалова, А.К. Никифоров, Н.Г. Манин, *Е.Г. Абрамова* // **Биотехнология**. – 2011. – № 5. – С. 80–84.

8. Генералов, С.В. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена / С.В. Генералов, *Е.Г. Абрамова*, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, А.К. Никифоров, О.А. Лобовикова, Л.В. Савицкая, Л.Н. Минаева, М.В. Галкина, Т.А.

Михеева, А.В. Комиссаров, М.Н. Киреев // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2012. – № 2 (112). – С. 78–81.

9. Кочкалова, Н.Н. Оптимизация формы выпуска и потребительской тары иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади / Н.Н. Кочкалова, **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, О.А. Лобовикова, Л.В. Савицкая, С.А. Бадарин, С.В. Генералов, Н.И. Костылева, Н.А. Шарапова, Ю.В. Иванов // **Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАН**. – 2012. – № 5 (87). – Ч. 1. – С. 236–238.

10. Шарапова, Н.А. Выделение гликопротеида из фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» и конструирование на его основе диагностикума для дот-иммуноанализа / Н.А. Шарапова, М.Н. Киреев, **Е.Г. Абрамова**, С.В. Генералов, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, Н.Е. Терешкина, Е.А. Михеева, Л.В. Савицкая, А.В. Гаева, А.К. Никифоров // **Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАН**. – 2012. – № 5 (87). – Ч. 1. – С. 347–350.

11. Генералов, С.В. Культуральный антиген в технологии получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, А.К. Никифоров, О.А. Лобовикова, Р.А. Свинцов, А.В. Разживин, Л.В. Савицкая, М.В. Галкина, Т.А. Михеева, А.В. Комиссаров, М.Н. Киреев // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2012. – № 4 (114). – С. 65–69.

12. Генералов, С.В. Оптимизация условий масштабированного культивирования фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в культуре клеток Vero / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, Л.В. Савицкая, О.А. Лобовикова // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2014. – № 2. – С. 101–103.

13. Матвеева, Ж.В. Разработка способа количественной оценки содержания фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в рабическом антигене / Ж.В. Матвеева, **Е.Г. Абрамова**, С.В. Генералов, Н.В. Майоров // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова**. – 2014. – Т. 10, № 2. – С. 12–17.

14. Матвеева, Ж.В. Получение рекомбинантного штамма и набора ПЦР-стандартов для количественного определения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в рабическом антигене // Ж.В. Матвеева, И.В. Тучков, **Е.Г. Абрамова**, Н.В. Майоров // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова**. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 50–53.

15. Генералов, С.В. Крупномасштабное культивирование фиксированного вируса бешенства штамма Москва 3253 на перевиваемой линии клеток Vero (B): методы и сравнительный анализ / С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, Р.А. Свинцов // **Биотехнология**. – 2014. – № 5. – С. 38–43.

16. Матвеева, Ж.В. Обнаружение и предупреждение микоплазменной контаминации клеток перевиваемой линии VERO при производстве антирабического иммуноглобулина с использованием культуральных технологий / Ж.В. Матвеева, С.В. Генералов, **Е.Г. Абрамова**, А.В. Фадеева, Н.В. Майоров // **Дезинфекционное дело**. – 2015. – № 1. – С. 54–59.

17. **Абрамова, Е.Г.** Оптимизация депирогенизирующей фильтрации раствора гетерологичного антирабического иммуноглобулина / **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, И.М. Жулидов, А.Г. Селезнева, Л.В. Савицкая, О.А. Лобовикова, С.В. Генералов // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова**. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 34–38.

18. **Абрамова Е.Г.** Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина / **Е.Г. Абрамова**, С.В. Генералов, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов, А.К. Никифоров, А.В. Комиссаров // **Проблемы особо опасных инфекций**. – 2016. – № 2. – С. 95–102.

Патенты

19. Патент на изобретение № 2360252 Российская Федерация. Диагностикум и тест-система для определения активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* методом дот-иммуноанализа / Н.А. Подборонова, **Е.Г. Абрамова**, А.К. Никифоров, Я.М. Краснов, Н.П. Гусева, М.Н. Киреев, В.В. Кутырев. Заявитель и патентообладатель ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Оpubл. 27.06.2009. Бюл. № 18.

20. Патент на изобретение № 2511029 Российская Федерация. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* TG1(pRVMoscow3253G-L) для получения ПЦР-стандартов и набор ПЦР-стандартов для определения концентрации штамма вируса бешенства «Москва 3253» в рабическом антигене / Ж.В. Матвеева, Н.А. Осина, Т.В. Бугоркова, И.В. Тучков, Ю.И. Яшечкин, **Е.Г. Абрамова**, Н.В. Майоров, А.К. Никифоров, В.В. Кутырев. Заявитель и патентообладатель ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Оpubл. 27.06.2009. Бюл. № 18.

21. Патент на изобретение № 2511440 Российская Федерация. Способ количественного определения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» / Ж.В. Матвеева, Н.А. Осина, Т.В. Бугоркова, **Е.Г. Абрамова**, С.В. Генералов, Н.В. Майоров, А.К. Никифоров, В.В. Кутырев. Заявитель и патентообладатель Российская Федерация, от имени которой выступает Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Оpubл. 10.04.2014. Бюл. № 10.

Публикации в сборниках научных и научно-практических конференций – 28.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите

Диссертационное исследование Абрамовой Е.Г. посвящено разработке комплекса современных биотехнологических решений производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Предметом исследования явилась технология производства антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Объектом исследования служили биотехнологические процессы производства антирабического иммуноглобулина: приготовление рабического антигена для иммунизации продуцентов, иммунизация животных и получение специфической сыворотки; осаждение гамма-глобулина; очистка и стерилизация раствора антирабического иммуноглобулина; получение лекарственного препарата в новой форме выпуска; контроль биологических и физико-химических свойств иммунных сывороток и антирабического иммуноглобулина. Теоретической базой диссертационного исследования явились труды отечественных и зарубежных ученых по вопросам постэкспозиционной профилактики бешенства у людей, современной методологии производства антирабических профилактических препаратов в соответствии с рекомендациями ВОЗ, оценки активности вируса бешенства и антител к нему альтернативными методами *in vitro*, технологии лиофильного высушивания лекарственных средств иммуноглобулиновой природы, оценки качества иммунобиологических лекарственных средств, а также материалы нормативной документации по теме, раскрываемой в данной работе.

При выполнении работы применяли биотехнологические, вирусологические, микробиологические, биологические, иммунохимические, молекулярно-генетические, биохимические, физико-химические, биофизические и статистические методы исследования.

Разработан комплекс научно обоснованных современных биотехнологических решений для оптимизации технологии промышленного производства и совершенствования качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей. Разработана технология масштабного культивирования производственного штамма фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero суспензионным, псевдосуспензионным и роллерным методами. Показано, что усовершенствованные технологические приемы по очистке и концентрированию культурального вируса бешенства тангенциальной ультрафильтрацией позволяют получать рабический антиген, по иммуногенным свойствам не уступающий органотканевому антигену. Экспериментально доказана эффективность культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов при получении активных иммунных сывороток. Впервые в промышленных условиях с применением культуральных технологий получены экспериментально-производственные серии усовершенствованного гетерологичного антирабического иммуноглобулина, качественные характеристики которого соответствуют требованиям нормативной документации. Разработаны методические подходы с использованием полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов для количественной оценки содержания *virus fixe* «Москва 3253» в культуральном вирусном материале для последующей направленной иммунизации продуцентов. Отработаны условия выделения и очистки гликопротеида вируса бешенства «Москва 3253» для использования в иммунохимических реакциях. Для оценки специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина *in vitro* предложено использование дот-иммуноанализа с диагностикумами на основе наночастиц коллоидного золота с гликопротеидом вируса бешенства в прямом варианте и с белком А *Staphylococcus aureus* в непрямом варианте. Разработана оригинальная модульная система проведения баромембранных процессов по очистке и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина с использованием фильтроматериалов отечественного производства, внедренная в промышленное производство препарата. Показана экономическая целесообразность новых технологических решений. Впервые разработана экспериментально-производственная технология новых форм выпуска антирабического иммуноглобулина и его F(ab')₂-фрагментов – лиофилизатов для приготовления раствора для внутримышечного введения, апробированная в промышленных условиях. Исследованы качественные характеристики лиофилизатов антирабического иммуноглобулина и его F(ab')₂-фрагментов. Показано соответствие выявленных значений требованиям нормативной документации на коммерческий препарат. В долгосрочных испытаниях доказана стабильность новой формы выпуска и установлен срок годности – 3 года. С целью расширения перечня спецификационных показателей качества антирабического иммуноглобулина исследованы молекулярные параметры антирабического иммуноглобулина жидкой и сухой форм. Выявлено преимущество лиофилизатов антирабического иммуноглобулина по показателю «Молекулярные параметры» при длительном хранении. Разработан и внедрен в производство для проведения контрольных испытаний стандартный образец предприятия (СОП) специфической активности гетерологичного антирабического иммуноглобулина, аттестованный по Международному образцу антирабического иммуноглобулина.

По комплексу методических подходов и исследованных проблем диссертационная работа Абрамовой Е.Г. соответствует специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертация «Совершенствование биотехнологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина» Абрамовой Елены Геннадьевны полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к докторским диссертациям. Данная работа рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заключение принято на расширенном заседании лаборатории профилактических иммуноглобулинов отдела профилактических препаратов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

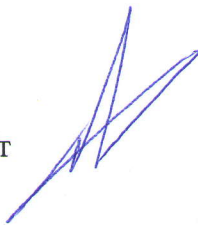
Протокол № 25 от 29 июня 2017 г.

Присутствовало на заседании – 30 чел.

Результаты голосования:

«за» - 30, «против» - нет, «воздержалось» - нет.

Председатель расширенного заседания
заведующий отделом экспериментальных
фармацевтических форм
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», д.б.н., доцент



Комиссаров А.В.

Секретарь расширенного заседания
заведующий лабораторией
диагностических препаратов, к.б.н.



Овчинникова М.В.

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46

E-mail: rusrapi@microbe.ru т.(8452)24-21-31, факс. (8452) 51-52-12