

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Абрамовой Елены Геннадьевны на тему: «Совершенствование биотехнологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы диссертационного исследования

Бешенство - типичная зоонозная инфекция, к которой восприимчивы все виды диких и домашних животных. В нашей стране с обширными лесными массивами и наличием диких зверей почти постоянно наблюдаются эпизоотии бешенства. В целом в заболеваемости бешенством, наряду с лисицами, возросла роль кошек, отмечаются случаи нападения волков на людей, в некоторых республиках источником инфекции остаются собаки.

Один из наиболее надежных способов предупреждения и ликвидации очагов бешенства - эффективная диагностика инфекции и своевременное применение качественных иммунобиологических лекарственных препаратов, к числу которых относится антирабический иммуноглобулин (АИГ) из сыворотки крови лошади, применяемый для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей. Данный препарат необходим для исключения летальности инфицированных вирусом бешенства людей. В РосНИПЧИ «Микроб» производство АИГ развернуто по восстановленной технологии, разработанной в 70-е годы прошлого века, в связи с чем необходимо совершенствование биотехнологических процессов производства, способствующих повышению безопасности данного лекарственного препарата.

Согласно приказу Роспотребнадзора от 28.12.2017 г., № 1204, необходимо принять меры по обеспечению медицинских организаций, оказывающих антирабическую помощь населению, неснижаемым запасом

антирабических иммунобиологических препаратов. Поэтому актуальной задачей является разработка комплекса научно-обоснованных современных биотехнологических решений для оптимизации технологии промышленного производства и совершенствования качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

Представленные в диссертационной работе Абрамовой Елены Геннадьевны исследования направлены на разработку технологии масштабного культивирования вакцинных штаммов опасных вирусных инфекций на модели *virus fixe* «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero, получение экспериментально-производственных серий АИГ с использованием культуральных технологий с последующим анализом специфических показателей, выделение и очистку гликопротеида вируса бешенства «Москва 3253» и оптимизацию способа определения *in vitro* специфической активности как сывороток, так и иммуноглобулинов антирабических в дот-иммуноанализе с наночастицами коллоидного золота, разработку модульной системы очистки и стерилизации АИГ на основе материалов отечественного производства, разработку экспериментально-производственной технологии новой формы выпуска противовирусных иммуноглобулиновых лекарственных препаратов – лиофилизата для приготовления раствора для внутримышечного введения на модели антирабического иммуноглобулина и его F(ab)₂-фрагментов, совершенствование методов контроля качества препарата для стандартизации серий препарата.

Диссертация написана в традиционной форме и состоит из Введения, Обзора литературы (две главы), Описания материалов и методов, 7 глав Собственных исследований, Заключение, Выводов и Списка литературы, состоящего из 565 источников, 297 из которых – зарубежные. Диссертация изложена на 289 страницах машинописного текста и иллюстрирована 39 таблицами, 57 рисунками (включая качественные блок-схемы технологических процессов).

В главах 1 и 2 (обзор литературы) описаны данные научных публикаций отечественных и зарубежных авторов по современным особенностям распространения бешенства в мире и РФ, антирабическим препаратам в РФ и за рубежом, достижениям и перспективам, а также по актуальным тенденциям развития биотехнологии производства противовирусных иммунобиологических лекарственных средств.

В главе 3 Абрамовой Е.Г. описаны материалы и методы, используемые для исследования. В качестве штаммов применяли производственный штамм *virus fixe* «Москва 3253» и контрольные штаммы фиксированного вируса бешенства CVS. В качестве животных продуцентов и для проведения контроля использованы лошади рысистой породы, кролики породы «Шиншила», белые мыши беспородные и линии BALB/с, морские свинки.

При выполнении работы соискателем использованы основные методы: биотехнологические, биохимические, биофизические, физико-химические, вирусологические, микробиологические, биологические, иммунохимические, молекулярно-генетические.

Статистическую обработку данных Абрамова Е.Г. осуществляла с применением стандартных методик по Ашмарину И.П. и Воробьеву А.А., при использовании программ Statistica 6, Microsoft Office Excel 2003.

Глава 4 посвящена научно-методическим основам технологии масштабного получения производственного штамма фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero. Автором отработаны условия адаптации вируса бешенства «Москва 3253» к клеткам перевиваемой линии Vero, дано экспериментальное обоснование оптимальных технологических параметров масштабного культивирования производственного штамма вируса бешенства суспензионным и псевдосуспензионным способами в биореакторе, роллерным способом, а также разработаны биотехнологические приемы по очистке и концентрированию вирусного материала. Соискателем дан сравнительный анализ эффективности накопления клеток Vero и вируса бешенства «Москва

3253» при масштабном культивировании *in vitro*, а также разработана система мероприятий по предупреждению контаминации микоплазмами клеточной культуры и готового продукта, полученного с применением культуральных технологий.

В главе 5 представлена разработка количественного молекулярно-генетического способа определения *in vitro* фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» в антигенсодержащем материале. Соискателем проведен подбор ДНК-мишени, праймеров и зонда, получен рекомбинантный штамм и набор ПЦР-стандартов для количественной оценки содержания *virus fixe* «Москва 3253», определено содержание вируса бешенства в инактивированном органно-тканевом и культуральном антигенном материале в ПЦР-РВ с использованием разработанных ПЦР-стандартов.

Глава 6 посвящена совершенствованию методических подходов для определения *in vitro* специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина. Соискателем отработаны технологические приемы выделения гликопротеида из *virus fixe* культурального происхождения для конструирования антигенного диагностикума с наночастицами коллоидного золота, а также разработаны методические приемы определения титра специфических антител в антирабических препаратах в непрямом до-иммуноанализе с применением диагностикума на основе белка А *Staphylococcus aureus* и наночастиц коллоидного золота.

В главе 7 описано получение экспериментально-производственных серий гетерологичного антирабического иммуноглобулина с использованием культуральных технологий. Соискателем проведено исследование биологических и физико-химических показателей АИГ, полученного с применением культурального антигена, в сравнении с фармакопейными показателями, а также разработана производственно-технологическая документация на получение данного препарата.

Глава 8 посвящена разработке модульной системы очистки и стерилизации антирабического иммуноглобулина с применением

фильтрационных материалов отечественного производства. Соискателем изучена целесообразность применения отечественных фильтров патронного и капсульного типов для осветления, депирогенизации и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина. Показана эффективность внедрения фильтрационной технологии с использованием отечественных фильтров в производство АИГ.

В главе 9 представлено научно-экспериментальное обоснование получения новой формы выпуска антирабического иммуноглобулина - лиофилизата для приготовления раствора для внутримышечных инъекций. Соискателем определено влияние лиопротекторов различной природы на качество АИГ в лиофилизированной форме, оптимизированы технологические параметры лиофильного высушивания гетерологичного антирабического иммуноглобулина и его F(ab)₂-фрагментов. Определена эффективность внедрения оптимизированной технологии лиофильного высушивания и представлен анализ показателей качества лиофилизатов АИГ, их стабильность при длительном хранении.

Глава 10 посвящена совершенствованию системы контроля качества антирабического иммуноглобулина. Соискателем разработан стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади, исследованы молекулярные параметры АИГ и обосновано включение раздела «молекулярные параметры» в спецификацию фармакопейной статьи предприятия.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации и автореферате

Высокая степень достоверности и обоснованности полученных результатов и выводов диссертации не вызывает сомнений и показывает правильный выбор методических подходов. Степень достоверности полученных результатов основана на использовании большого фактического материала, полученного на зарегистрированном, прошедшем

метрологическую поверку оборудования с использованием широкого спектра современных научных методов. Все данные получены в повторяющихся экспериментах.

В автореферате диссертационных исследований Абрамовой Е.Г. четко представлены основные положения, выносимые на защиту, связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования, степень достоверности и апробация работы, методология и методы исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, заключение и 9 выводов, которые в достаточной мере аргументированы, отражают содержание диссертации и отвечают цели, задачам исследования.

Полученные Абрамовой Е.Г. данные вносят весомый вклад в разделы биотехнологии, связанные с совершенствованием производства иммунобиологических лекарственных препаратов, в частности – с оптимизацией производства и совершенствованием качества антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади.

Результаты диссертационного исследования представлены на конференциях различного уровня. Полнота изложения материалов диссертации отражена автором в опубликованных 46 научных работах, в том числе 18 статей - в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденного ВАК РФ. Получены три патента на изобретения.

Новизна научных положений, рекомендаций. Теоретическая и практическая значимость.

На основании проведенных Абрамовой Е.Г. исследований разработаны технологические параметры масштабного культивирования *virus fixe* производственного штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero с применением суспензионного, псевдосуспензионного и роллерного методов с последующей эффективной методикой очистки и концентрирования культурального *virus fixe* тангенциальной ультрафильтрацией. Соискателем

обосновано применение в производстве АИГ культурального рабического антигена на основе *virus fixe* «Москва 3253» на этапе иммунизации вместо органо-тканевого антигена. Научная новизна оригинальных методических подходов для количественной оценки содержания *virus fixe* «Москва 3253» в вирусном материале с применением ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов подтверждена двумя патентами на изобретения. Приоритетность исследований соискателя по конструированию высокоспецифичной иммунохимической тест-системы на основе очищенного гликопротеида из концентрированного культурального вируса бешенства «Москва 3253» с использованием наночастиц коллоидного золота для оценки активности антирабических сывороток и иммуноглобулина подтверждена патентом на изобретение.

В промышленный регламент (2015 г.) внесены данные по применению разработанной эффективной модульной системы очистки и стерилизации раствора АИГ с использованием фильтрационных материалов отечественного производства.

Получена новая форма выпуска гетерологичного АИГ путем отработанных параметров сублимационного высушивания (оптимального лиопротектора, температуры замораживания и лиофилизации и т.д.).

В спецификации ФСП на антирабический иммуноглобулин расширен перечень показателей качества препарата за счет полученных соискателем данных о молекулярных параметрах АИГ.

Представленный Абрамовой Е.Г. диссертационный материал является **теоретической** основой для исследований биотехнологических приемов конструирования 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» и в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова».

Практическая значимость диссертационной работы Абрамовой Е.Г. не вызывает сомнений, так как решена важная народно-хозяйственная проблема по обеспечению населения отечественным, эффективным, жизненно необходимым иммунобиологическим лекарственным препаратом для пассивной профилактики бешенства. В производственных условиях по разработанной технологии получены три экспериментально-производственные серии антирабического иммуноглобулина, соответствующие требованиям ФСП.

Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* TG1, содержащий фрагмент G-L-области генома *virus fixe* «Москва 3253», депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Экономический эффект производства АИГ от предложенных соискателем инновационных технологий существенный, так, например, 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. А экономический эффект от внедрения новой технологии с использованием современной лиофильной установки составляет 362247,6 руб. в год за счет снижения энергозатрат. Применение разработанной модульной системы очистки и стерилизации полуфабриката АИГ позволило снизить объемы финансовых затрат на приобретение импортных расходных материалов на 216508,25 руб. в год при серийном выпуске препарата 400 л.

Выпуск лиофилизированного АИГ по разработанной соискателем технологии способствует в два раза увеличить срок годности и повысить стабильность препарата при хранении и транспортировке.

По результатам диссертационного исследования Абрамовой Е.Г. внесены изменения в ФСП на АИГ, а также переработаны и утверждены соответствующие разделы промышленного регламента.

На все серии препарата получены сертификаты соответствия, и препарат реализован в лечебно-профилактические учреждения 68 субъектов РФ.

По материалам проведенных исследований разработано 13 методических рекомендаций, утвержденных на учрежденческом уровне.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы

Основные результаты диссертационной работы получены при **личном** участии диссертанта, что подтверждено научными публикациями. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии при определении направлений, планировании и выполнении исследований по освоению технологии масштабного культивирования вируса бешенства на перевиваемой линии клеток Vero и разработке производственно-технологической документации; по совершенствованию и конструированию тест-системы для определения антирабических антител *in vitro* с использованием наночастиц коллоидного золота; по освоению технологии выпуска антирабического иммуноглобулина в лиофилизированном виде; по изучению эффективности и внедрению АИГ фильтрационных материалов отечественного производства.

Незначительные стилистические ошибки не умаляют достоинств диссертационного исследования. Принципиальных замечаний по работе нет. Так как материал данного диссертационного исследования наукоёмкий с весомым практическим выходом, желательно было бы представить в диссертации и автореферате практические рекомендации, которые полезны биотехнологам, микробиологам, занимающимся производством медицинских иммунобиологических препаратов.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

Диссертационная работа Абрамовой Е.Г. на тему: «Совершенствование биотехнологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина» является законченной научно-квалификационной работой,

в которой содержится решение задачи по оптимизации производства и совершенствованию качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина, имеющего важное народно-хозяйственное значение для обеспечения РФ отечественным эффективным иммунобиологическим лекарственным средством для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей.

По актуальности, научной новизне полученных результатов, теоретической и практической значимости, методическому и методологическому уровню, содержанию диссертационная работа Абрамовой Е.Г. отвечает требованиям пунктов 9 – 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции Постановления Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 г.), соответствует паспорту специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), а её автор, Абрамова Елена Геннадьевна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по искомой специальности.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник научно - производственной лаборатории
препаратов для диагностики особо опасных и других
инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный
институт Роспотребнадзора *Ирина* Ирина Викторовна Жарникова

Адрес: 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15.
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел: (865-2)26-03-12. E-mail: stavnipchi@mail.ru

Подпись Ирины Викторовны Жарниковой **заверяю:**

начальник отдела кадров ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт Роспотребнадзора

В.В. Демченко

