

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Бибикова Дмитрия Николаевича на тему «Разработка новых методических приемов культивирования, концентрирования, лиофилизации и методов оценки качества вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология.

### **Актуальность темы диссертации**

Туляремия относится к зоонозным природно-очаговым инфекциям, распространена, практически, на всех континентах Северного полушария в различных климатических зонах с разнообразными ландшафтами. Впервые упоминание о туляремийной инфекции появилось в 1818 г., при обнаружении на острове Хонсю (Япония) заболевания «заячья болезнь». В 1911 г. бактериолог Мак-Кой описал у сусликов чумоподобное заболевание, а в 1912 совместно с Чепиным выделили возбудитель, который назвали туляремийная палочка/*Francisella tularensis*. В России впервые инфекция была обнаружена преимущественно в сельской местности Астраханской, Рязанской, Тюменской и Воронежской областях в 1926-1928 гг. и сопровождалась крупными эпидемическими вспышками среди людей. Наибольший рост заболеваемости туляремии отмечался в военные годы (1944-1945 гг.), последняя вспышка наблюдалась в 2013 г. на территории Ханты-Мансийского автономного округа. Развитию эпидемий туляремии, как правило, способствовало огромное размножение мышевидных грызунов и отсутствие своевременных профилактических мероприятий. В связи с широким распространением и длительным функционированием природных очагов инфекции, характеризующимися изменениями эпизоотического и эпидемического проявления в современных условиях, туляремия продолжает оставаться актуальной проблемой для здравоохранения.

Значительные успехи в борьбе с туляремией связаны с проведением профилактических мероприятий. В настоящее время в России для профилактики туляремии применяется вакцина туляремийная живая (АО НПО «Микроген» филиал в г. Омск) на основе вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ.

Рекомендации ВОЗ относительно общих требований к качеству вакцин, касаются, прежде всего, их безопасности (низкая реактогенность) и специфической активности (вызывать развитие иммунологических реакций, обеспечивающих устойчивость организма к патогенным микроорганизмам). Помимо этого вакцины должны быть стабильными и устойчивыми к условиям хранения в течение срока годности. Учитывая вышеизложенное работа, проводимая в этом направлении, является актуальной и своевременной.

### **Достоверность и новизна исследования и полученных результатов**

Большой объем исследований с применением комплекса современных методов позволил автору решить поставленные задачи и достичь цели, а также обосновать положения, выводы и рекомендации. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах.

Новизна результатов исследования не противоречит основным сведениям, полученным другими исследователями. Высокая степень достоверности и обоснованности полученных данных и выводов диссертации не вызывает сомнения и подтверждает правильность выбора методических подходов. Степень достоверности полученных данных основана на использовании большого фактического материала, с применением современных информативных методов исследования.

Достоверность результатов, подтвержденная приведенными таблицами и рисунками, а также статистической обработкой, не вызывает сомнения и показывает правильность выбора методических подходов.

### **Степень новизны, обоснованности научных исследований, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационная работа Бибикова Д.Н. является законченной научно-квалификационной работой, в которой автором разработан принципиально новый подход к технологическому процессу производства туляремийной вакцины, заключающийся в глубинном культивировании штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, в концентрировании микробных клеток методом тангенциальной фильтрации; сублимационного высушивания биомассы вакцины во флаконах; предложен и экспериментально обоснован новый качественный и количественный состав среды высушивания, состоящей из трегалозы; декстрана и хитозана; а также показана эффективность применения иммунохимических и молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности препарата и электрооптического метода для определения жизнеспособности микробных клеток в препарате.

Требованиям научной новизне отвечают исследования по разработке технологических параметров (температура, продолжительность, степень аэрации и скорость перемешивания) производственного процесса глубинного культивирования штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в жидкой питательной среде на основе гидролизата фибрина (сухой гидролизат фибрина 5 %, глюкоза 1 %, пантотенат кальция 0,005 %, натрия хлорида 0,5 %, цистеин 0,1 %, pH  $7,2 \pm 0,1$ ), позволяющих обеспечивать увеличение микробной биомассы в 17-24 раза.

Впервые для производства живой туляремийной вакцины разработана технологическая процедура концентрирования микробных клеток методом тангенциальной фильтрации. Новыми являются данные по предложенной технологии сублимационного высушивания микробной биомассы во флаконах с применением подобранного качественного и количественного состава (трегалоза; декстран и хитозан); по использованию электрооптического метода для определения жизнеспособности микробных клеток, позволяющего в процессе выращивания оперативно в динамике анизотропии поляризуемости определять жизнеспособность микробной биомассы. Для определения показателя «подлинность» экспериментальной туляремийной вакцины обоснована возможность применения иммунохимических и молекулярно-генетических методов контроля.

Научная новизна подтверждена Патентом на изобретение RU 2716505 C1 (Приоритет 12.03.2020) «Способ получения лиофилизата вакцины туляремийной живой».

Работа выполнена в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» в рамках научно-исследовательских тем 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов», 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы», 83-2-20 «Совершенствование этапов производства и методов контроля лечебно-профилактических и диагностических препаратов в РосНИПЧИ «Микроб».

### **Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций**

Проведенные исследования имеют большое теоретическое и практическое значение и посвящены разработке и совершенствованию технологических этапов получения живой туляремийной вакцины.

Разработаны состав жидкой питательной среды и технологические параметры глубинного аппаратного культивирования производственного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ; методические приемы концентрирования туляремийного микроба тангенциальной фильтрацией; состав среды высушивая и параметры лиофилизации живой туляремийной вакцины; лабораторный регламент на производство «Вакцина туляремийная живая лиофилизат, утвержденный директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 17 января 2019 г. Показана возможность использования электрооптического метода при определении жизнеспособности микробных клеток; предложен алгоритм применения молекулярно-генетических и иммунохимических методов для определения подлинности экспериментальных серий туляремийной вакцины (полимеразная цепная реакция с электрофоретическим учетом результатов и дот-иммуноанализа с белком А, конъюгированным с золотыми наночастицами).

Результаты проведенной работы нашли свое отражение при разработке следующих нормативно-методических документов:

1. Методические рекомендации «Концентрирование туляремийного микроба методом тангенциальной фильтрации», одобренные Учёным советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 1 от 7 марта 2017 г.) и утверждённые директором института 7 марта 2017 г.;

2. Методические рекомендации «Ллиофилизация живой туляремийной вакцины», одобренные Учёным советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 3 от 27 апреля 2018 г.) и утверждённые директором института 28 апреля 2018 г.

3. Методические рекомендации «Электрооптический мониторинг жизнеспособности вакцинного штамма туляремийного микроба», одобренные Учёным советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 3 от 5 ноября 2020 г.) и утверждённые директором института 5 ноября 2020 г.

Теоретическая значимость исследования обоснована возможностью использования в производстве живой туляремийной вакцины новых этапов технологических процессов и методических приемов контроля качества лекарственного препарата. Изложенные в диссертации результаты исследований могут использоваться в сфере развития технологических процессов получения живых бактериальных вакцин.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих в себя материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов, списка используемых литературных источников, включающего 173 наименования. Работа изложена на 160 страницах и иллюстрирована 24 рисунками, 30 таблицами.

#### **Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати конференции**

Результаты диссертационной работы представлены в докладах на ежегодных научно-практических конференциях РосНИПЧИ «Микроб», на Всероссийских и международных научно-практических конференциях, на V международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов.

Материалы диссертации используются в лекциях на курсах подготовки кадров, для слушателей профессиональной переподготовки и повышения квалификации.

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 15 работ, из них 4 статьи в журналах из «Перечня изданий, которые входят в международные реферативные базы данных и системы цитирования и в соответствии с пунктом 5 правил формирования перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук», 4 статьи в журналах из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук», 6 публикаций в сборниках и материалах конференций.

#### **Содержание диссертации, ее завершенность**

Во введении диссертации обоснована актуальность исследований; приведены научная новизна; теоритическая и практическая значимость; положения, выносимые на защиту; сведения об апробации и публикациях. Пять поставленных задач соответствуют цели работы и положениям, выносимым на защиту.

Литературный обзор включает в себя в достаточном объеме анализ информации и данных по биологическим и технологическим аспектам получения вакцинных препаратов, регламентированными на сегодняшний момент способами (аппарат АКМШ, процессы культивирования микроорганизмов в зависимости от их питательных потребностей (подпитка, отъемно-доливной метод, непрерывное или диализное культивирование и др.) с описанием методов концентрирования микробной биомассы и технологических подходов к лиофилизации бактериальных и вирусных вакцин различного наименования.

Несомненный интерес представляют главы, посвященные культивированию туляремиального микроба и изучению его основных физиологических свойств (концентрация, период удвоения, средний возраст популяции, гетерогенность). При этом проанализированы литературные источники, начиная с 60-х годов прошлого

столетия и заканчивая современными подходами к использованию питательных сред с различными композициями.

Анализ литературных данных позволил Дмитрию Николаевичу обосновать необходимость научного подхода для решения поставленной задачи, а именно: совершенствовать и разработать новые биотехнологические этапы получения живой туляремийной вакцины.

В главе 2 «Материалы и методы» изложены методические приемы, с помощью которых решены поставленные задачи. Работа выполнена на представительном материале с применением современных и информативных методов исследования (микробиологические, биологические, иммунохимические, физико-химические, молекулярно-генетические, биотехнологические, световая и атомно-силовая микроскопия, статистические). Объектами для исследования служили штаммы *F. tularensis* 15НИИЭГ и *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840, биотехнологические процессы включающие оптимизацию культивирования штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ с подбором питательных сред, концентрирование микробной биомассы методом тангенциальной фильтрации, проведение электронно-оптического мониторинга физиологического состояния бактерий, лиофилизация препарата с применением разработанной среды высушивания и оценка качества (подлинность, жизнеспособность) экспериментальных серий вакцины. Объем фактического материала является достаточным для проведения статистической обработки результатов.

В главе 3 «Совершенствование условий получения биомассы штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ» автором показана возможность применения для культивирования туляремийного микроба ферментативного гидролизата фибрина (ФГФ), имеющего необходимые физико-химические характеристики, а именно: общий азот –  $14,76 \pm 0,03$  %; аминный азот –  $7,39 \pm 0,03$  %; процент расщепления белка –  $50,7 \pm 1,7$  %; содержание пептона –  $53,7 \pm 1,5$  %; сухой остаток –  $8,78 \pm 0,2$  %; хлориды –  $0,22 \pm 0,01$  %; влажность –  $2,4 \pm 0,2$  %; pH –  $6,9 \pm 0,2$ , содержащего необходимый набор аминокислот и не требующего введения стимуляторов. При этом глубинное аппаратное культивирование штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в жидкой питательной среде на основе ФГФ обеспечивало увеличение биомассы в 17-24 раза по сравнению с питательными средами на основе панкреатического гидролизата рыбной муки и экстракта пекарских дрожжей.

Автором убедительно показана возможность концентрирования полученной микробной биомассы методом тангенциальной фильтрации и обоснованы параметры сублимационного высушивания с применением предложенной средой высушивания для получения микробной суспензии с характеристиками, позволяющими использовать для получения готовой формы вакцины. Несомненный практический интерес представляет сравнительное изучение седиментационного, центробежного и фильтрационного методов концентрирования биомассы *F. tularensis* 15 НИИЭГ показавшее, что использование тангенциальной фильтрации позволяет 10-кратно увеличить концентрацию микробов в суспензии, в объеме исходного материала  $1,0 \text{ дм}^3$  в течение 1 ч.

Глава 4 «Ллиофилизация бактерий *F. tularensis* 15 вакцинного штамма НИИЭГ» посвящена наиболее важному этапу технологического процесса - лиофилизации, от которого зависит качество и стандартность лекарственного

препарата в процессе длительного хранения. В ходе проведенных исследований автором, основываясь на полученных результатах, из пяти вариантов сред высушивания, вариант А: трегалоза – 0,1, декстран – 0,0002, агар-агар – 0,0025; вариант В: трегалоза – 0,1, декстран – 0,0002; вариант С: трегалоза – 0,1, декстран – 0,01, агар-агар – 0,0025; вариант D: трегалоза – 0,1, декстран – 0,02; вариант Е: трегалоза – 0,1, декстран – 0,0, хитозан – 0,02., для проведения дальнейших исследований была предложена композиция, состоящая из суспензии культуры вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ –  $(10 \pm 5) \times 10^9$  м.к. и вспомогательных веществ (среда высушивания) трегалоза – 0,1 г; декстран – 0,01 г; хитозан – 0,02 г.

Дмитрием Николаевичем в процессе исследований оптимизированы параметры температурного режима (полное замораживание – минус 40 °С, нижняя и верхняя эвтектическая температура – минус 35 °С и минус 25 °С) сублимационного высушивания, позволяющие производить лиофилизат туляремийной вакцины, соответствующий регламентирующим нормам по показателям «Описание», «Остаточная влажность», «Растворимость», «Седиментационная устойчивость», «Вакуум», «рН», «Потеря в массе при высушивании».

Следует подчеркнуть целенаправленный подход соискателя при выполнении поставленных задач. На следующем этапе в главе 5 «Разработка альтернативных подходов к контролю качества препарата на этапах получения лиофилизата вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ» представлены данные исследований по обоснованию применения альтернативных методов контроля, позволяющие оценивать основные показатели на промежуточных этапах производства туляремийной вакцины и в готовом препарате. Опытным путем установлена возможность применения электрооптического мониторинга для экспрессного анализа показателя «Жизнеспособность» микробных клеток *F. tularensis* на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата туляремийной вакцины. Показана применимость иммунохимических и молекулярно-генетических методов контроля культур для определения показателя «Подлинность» туляремийной вакцины.

#### **Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы.**

Основные результаты диссертационной работы получены при личном участии диссертанта, что подтверждено научными публикациями. Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, в выполнении микробиологических, иммунологических, иммунохимических, молекулярно-генетических, статистических исследований, анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях.

#### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

В автореферате диссертационной работы Бибикова Д.Н. представлены положения, выносимые на защиту, выводы, личный вклад автора в проводимое исследование, степень достоверности и апробация работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимости, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Работа производит положительное впечатление, написана литературным языком, хорошо читается. Принципиальных замечаний нет. Имеющиеся погрешности, касающиеся неточности некоторых выражений, например, сухая и лиофилизат; в некоторых случаях встречаются технические опечатки, не по системе СИ обозначения, не влияют на высокую положительную оценку работы.

К Дмитрию Николаевичу имеются следующие вопросы:

1. Ваш подход к обоснованию спецификации по показателям качества полуфабриката и экспериментальных серий туляремийной вакцины? На Ваш взгляд, достаточно показателей для оценки качества вакцины, изложенных в ГФ РФ, ФС. 3.3.1.0019.15 «Туляремийная вакцина живая» или потребуются включение в спецификацию дополнительных показателей?

2. Проводился в исследованиях анализ сравнительных данных оценки качества туляремийной вакцины, полученной предложенными Вами изменениями и регламентирующим способом? Выявлены ли различия по нормам и, если выявлены, то в каких пределах?

3. Предложенная Вами среда высушивания применялась ранее при лиофилизации других иммунобиологических препаратов?

4. Какие данные по долгосрочному изучению стабильности туляремийной вакцины, подтверждающие ее стабильность по показателям (жизнеспособность, диссоциация, иммуногенность и др.), имеются на данный момент?

5. Планируется внедрение предложенных Вами изменений в регламентирующий технологический процесс производства живой туляремийной вакцины, и что для этого предпринимается?

### Заключение

Диссертационная работа Бибикова Д. Н. на тему «Разработка новых методических приемов культивирования, концентрирования, лиофилизации и методов оценки качества вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ» является законченным научно-квалификационным самостоятельным исследованием, в котором обоснована теоретическая значимость исследования; научно подтверждена необходимость использования новых технологических процессов производства и методических подходов оценки качества живой туляремийной вакцины, которые будут иметь важное научно-практическое и теоретическое значение при исследованиях по разработке технологических процессов получения живых бактериальных вакцин.

По актуальности, объему, новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Бибикова Д. Н. на тему «Разработка новых методических приемов культивирования, концентрирования, лиофилизации и методов оценки качества вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ» соответствует требованиям п. 9. Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени

кандидата биологических наук, а ее автор Бибиков Дмитрий Николаевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент

Главный эксперт  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Научный центр  
экспертизы средств медицинского  
применения» Минздрава России,  
доктор медицинских наук,  
старший научный сотрудник

Сяпина  
Васильевна

Лидия

25.08.2021 г.

Юридический адрес:

127051, г. Москва,  
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2  
Тел: +7 (499) 190-18-18, доб. 6592  
E-mail: Sяarina@expmed.ru

Подпись д.м.н. Сяпиной Л.В. удостоверяю:

Начальник отдела подготовки кадров  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



Макаров А.В.