

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Дураковой Оксаны Сергеевны на тему «Совершенствование методических подходов для оценки специфической активности антигенов холерной химической вакцины» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология

### **Актуальность темы исследования**

Сложная эпидемиологическая обстановка по холере сохраняется во многих странах мира. Современный этап пандемии холеры характеризуется постоянными проявлениями эпидемий на различных континентах, возникновением измененных вариантов штаммов холерного вибриона, вызывающих тяжелое клиническое течение. Исходя из понятия глобализации, можно заключить, что имеет место глобальное распространение холеры при наличии рисков к возникновению эпидемий. При этом возросшая миграционная активность, развитие международного туризма, торговли и международно-экономических отношений, также способствуют увеличению риска завоза инфекционных болезней в неэндемичные по холере страны.

Значительные успехи в борьбе с холерой в России связаны с проведением своевременных противоэпидемических мероприятий. В России профилактика холеры проводится по эпидемическим показаниям вакциной холерной химической бивалентной, таблетки, представляющие собой смесь холерогена-анатоксина и О-антигена из инактивированных штаммов *Vibrio cholerae* O1 569В серовара Инаба и *Vibrio cholerae* O1 М-41 серовара Огава. В соответствии с рекомендациями ВОЗ, на современном этапе развития производства иммунобиологических препаратов, особое место для контроля компонентов вакцин отводится разработке стандартных, высокочувствительных методов контроля специфической активности *in vitro*, сопоставимых по чувствительности с методами *in vivo*. В связи с этим, работа Дураковой Оксаны Сергеевны, посвященная совершенствованию методических подходов для оценки специфической активности антигенов вакцины холерной химической, является актуальной.

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

Диссертационная работа О.С. Дураковой представляет собой завершенное исследование, выполненное на высоком методическом уровне. Обоснованность научных положений, выносимых на защиту, выводов и рекомендаций подтверждаются отчетливо проанализированными объективными экспериментальными данными.

Значительный объем исследований, проведенных при использовании комплекса адекватных современных методов, позволил последовательно решить стоявшие перед автором задачи, достичь поставленной цели, обосновать положения, выводы и рекомендации. Новизна достигнутых результатов и выводов не противоречит основным сведениям, полученным ранее другими авторами.

Степень достоверности полученных данных основана на использовании большого фактического материала, с использованием современных методов. Достоверность результатов, подтвержденная приведенными таблицами, рисунками и статистической обработкой, не вызывает сомнения.

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

Диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой, результатами которой явилось совершенствование технологического процесса производства и осуществления контроля специфической активности вакцины холерной химической методами *in vitro*.

В ходе проведенного ретроспективного анализа показано, что глубинное культивирование производственных штаммов *V. cholerae* O1569В и *V. cholerae* O1 М-41 на питательной среде на основе сухого ферментативного гидролизата казеина обеспечивает стабильное получение увеличенного количества биомассы и выхода протективных антигенов (холероген-анатоксин и О-антигены), используемых в производстве вакцины холерной химической, соответствующих установленным критериям.

Впервые, с применением современных методов атомно-силовой, трансмиссионной электронной микроскопии и полногеномного секвенирования, доказана стабильность культурально-морфологических свойств и нуклеотидных последовательностей полного генома производственных штаммов *V. cholerae* O1569В и *V. cholerae* O1 М-41.

Научной новизне отвечают совершенствование методических подходов контроля холерного токсина и О-антигена путем замены общепринятых методов с использованием лабораторных животных на современные иммунохимические методы *in vitro* (иммуноферментный анализ, дот-иммуноанализ, радиальный пассивный иммунный гемолиз). Научной новизне отвечает установленная автором корреляция между результатами определения активности холерного токсина и О-антигена *in vitro* и *in vivo* (коэффициент корреляции от 0,8 до 0,96).

В ходе проведенных исследований доказана возможность использования перевиваемой клеточной линии СНО-К1 для определения специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина на этапе технологического процесса производства холерной химической вакцины, коррелирующей с результатами определения активности холерного токсина и холерогена-анатоксина (коэффициент корреляции от 0,82 до 0,93).

Научная новизна подтверждена патентом на изобретение RU2799574С1 «Способ получения холерного токсина для контроля производства холерной химической вакцины» (опубликован 06.07.2023 г., бюл. № 19).

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

Работа, посвященная совершенствованию контроля производственных штаммов *V. cholerae* O1 569В серовара Инаба и *V. cholerae* O1 М-41 серовара Огава, внутрипроизводственного контроля промежуточных продуктов и готового лекарственного препарата вакцины холерной химической, имеет большое теоретическое и практическое значение.

В результате проведенных исследований Оксаной Сергеевной обоснована целесообразность замены общепринятых методов с использованием лабораторных животных (*in vivo*) на современные альтернативные методы *in vitro* для контроля промежуточных продуктов (холерный токсин, холероген-анатоксин, О-антиген) на этапе технологического процесса производства холерной химической вакцины и готового препарата:

- разработан вариант непрямого дот-иммуноанализа с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом для определения специфической активности холерного токсина и О-антигена.

- для оценки специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина доказана возможность использования перевиваемой клеточной линии СНО-К1;

- предложено совместное применение методов полимеразной цепной реакции и радиального пассивного иммунного гемолиза для контроля токсигенности бульонной культуры штамма *Vibrio cholerae* 569В и замена метода *in vivo*;

- разработан алгоритм применения методов ПЦР, радиального пассивного иммунного гемолиза (РПИГ), ИФА (GM-ELISA), дот-иммуноанализа (ДИА ЗНЧ) и тестов на клеточной линии (СНО-К1), позволяющего на этапах внутрипроизводственного контроля определить иммунохимическую и биологическую активность холерного токсина и холерогена-анатоксина, способствующие оптимизации процесса производства вакцины, касающиеся исключения из экспериментов лабораторных животных (правило 3R), снижения временных и материальных затрат.

Стандартизирован этап культивирования производственных штаммов *V. cholerae* О1, продуцентов протективных антигенов, путем перехода на использование сухих питательных сред. Выделен с использованием оригинальной методики холерный токсин и показано его соответствие стандартному образцу предприятия «Тест-токсин холерный».

В Государственную коллекцию патогенных бактерий ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» депонированы два штамма *Vibrio cholerae* О1 КМ2129 (569В) классического биовара серовара Инаба и *Vibrio cholerae* О1 КМ2130 (М-41) классического биовара серовара Огава, как производственные линии природных штаммов, для изготовления вакцины холерной бивалентной химической (05.07.2022 г.) – федеральный уровень внедрения.

Результаты исследований использованы:

- при разработке промышленного регламента № ПР 01898109-65-22/1000 на производство «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой» – федеральный уровень внедрения;

- при разработке 4-х методических рекомендаций учрежденческого уровня внедрения: «Методические рекомендации по определению активности холерного токсина в процессе производства холерной химической вакцины методами иммуноферментного анализа и радиального пассивного иммунного гемолиза» (утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 6 от 22.12.2016 г.); «Методические рекомендации по применению ДОТ-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины» (утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 5 от 19.12.2017 г.); «Методические рекомендации по использованию культуры клеток для анализа активности холерного токсина на этапах производства компонентов холерной химической вакцины» (утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 8 от 7.12.2018 г.); «Методические рекомендации по определению специфической активности компонентов холерной вакцины с использованием культуры клеток» (утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 4 от 8.11.2019 г.) (акт внедрения от 14.06.2023 г.).

### **Структура и содержание диссертации, ее завершенность**

Диссертация изложена на 177 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, состоящего из 235 источников, из которых 99 отечественных и 136 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 26 рисунками и 21 таблицей.

Исследования выполнены в рамках 4-х плановых НИР: 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов» (номер госрегистрации 01201457722); 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы» (номер госрегистрации АААА-А16-116112810063-4), 83-2-20 «Совершенствование этапов производства и методов контроля лечебно-профилактических и диагностических препаратов» (номер госрегистрации АААА-А20-120012090035-1); 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (номер госрегистрации АААА-А21-121012090066-4).

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

Результаты диссертационной работы широко представлены на Межгосударственных, Всероссийских с международным участием конференциях и Всероссийских съездах (2016-2022 гг.).

### **Публикации**

По материалам работы опубликовано 26 научных работ, из которых 9 статей в изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки», 1 патент на изобретение, 16 публикаций в сборниках и материалах конференций и иных изданиях.

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

Во введении диссертации обоснована актуальность исследований; приведены научная новизна; практическая значимость; положения, выносимые на защиту; сведения об апробации и публикациях. Четыре поставленные задачи отражают результаты работы, соответствуют цели и положениям, выносимым на защиту.

В первой главе диссертационной работы (Обзор литературы) проанализированы литературные источники, посвященные современным средствам специфической профилактики холеры как отечественных, так и за рубежом. Представлена информация о международных и отечественных стандартах, использующихся при оценке качества холерных вакцин. Особое внимание автор уделила основным антигенам и методам оценки их специфической активности. Не осталась без внимания и информация о международных требованиях, предъявляемых к оценке качества и стабильности производственных штаммов.

В целом, обзор основан на использовании большого объема научных данных, что позволило Оксане Сергеевне обосновать необходимость научного подхода для решения поставленных задач.

В разделе «Материалы и методы» изложены методические приемы, с помощью которых были решены поставленные задачи. Автор в своей работе использовала широкий спектр исследований с применением микробиологических, иммунохимических, биологических, биотехнологических, молекулярно-генетических и статистических методов. В экспериментальных работах были задействованы штаммы *V. cholerae*, полученные из ГКПБ ФКУН Российский противочумный институт «Микроб»: 2 производственных, 9 природных, в том числе и вирулентные, и 4 рекомбинантных, а также клеточные линии Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки).

В результате проведенной работы Оксана Сергеевна, решая поставленные задачи, получила интересные и оригинальные материалы, отвечающие требованиям научной новизны и практической значимости.

Результаты собственных исследований изложены с третьей по пятую главам.

**Глава 3** «Экспериментальное обоснование применения комплекса методов *in vitro* для контроля специфической активности антигенов на этапах производства холерной химической вакцины» состоит из трех подглав, в которых представлены материалы и данные, касающиеся разработки критериев и алгоритма применения методов *in vitro* для контроля активности антигенов (холерный токсин и холерный анатоксин) на этапах производства и в готовой лекарственной форме препарата.

На основании полученных результатов предложены методы определения качества промежуточных продуктов холерного токсина, холерогена-анатоксина и О-антигена установлены к ним нормативные требования. В сравнительных испытаниях *in vitro* и *in vivo* внутрипроизводственного контроля промежуточных продуктов (ХТ и ХА) автор убедительно показала, что применение комплекса методов ПЦР, РПИГ, ДИА ЗНЧ, ИФА и клеточной линии СНО-К1 *in vitro* коррелирует с результатами, полученными методами *in vivo* с использованием лабораторных животных (крольчата-сосунки и кролики).

Предложенный Оксаной Сергеевной алгоритм применения комплекса методов *in vitro* ПЦР, РПИГ, ДИА ЗНЧ, GM1-ELISA и клеточной линии СНО-К1 позволяет одновременно определять иммунохимическую и биологическую активность антигенов в компонентах промежуточных продуктов и готовой лекарственной форме вакцины.

**В главе 4** «Совершенствование методического подхода к контролю стабильности свойств штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов активных компонентов вакцины» отражены этапы исследований комплексного анализа определения стабильности производственных штаммов *V. cholerae* O1 569В и *V. cholerae* O1 М-41 в процессе производства и экспериментальное обоснование применения питательной среды на основе сухого ферментативного гидролизата казеина для глубинного культивирования производственных штаммов.

С использованием комплекса методов *in vitro* морфологические (АСМ, ТЭМ, световая микроскопия); молекулярно-генетические (ПЦР, полногеномное секвенирование; иммунохимические (ДИА ЗНЧ) предложен комплексный подход для контроля стабильности производственной линии природных штаммов

*V. cholerae* O1 KM2129 (569B) классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* O1 KM2130 (M-41) классического биовара серовара Огава, которые депонированы в ГКПБ ФКУН Российский противочумный институт «Микроб».

С применением комплекса методов (атомно-силовая микроскопия, трансмиссионная электронная микроскопия, полногеномное секвенирование, дот-иммуноанализ, радиальный пассивный иммунный гемолиз) получены информативные характеристики культурально-морфологических свойств и показана стабильность нуклеотидных последовательностей полного генома штаммов *V. cholerae* O1 569B и *V. cholerae* O1 M-41 на всех стадиях производственного цикла, позволившие рекомендовать альтернативный подход к оценке стабильности штаммов-продуцентов методами *in vitro*.

По результатам проведенных исследований питательная среда на основе ФГК была внедрена в производство и с 2017 г. используется для культивирования производственных штаммов. Проведенный ретроспективный анализ эффективности питательных сред на основе жидкого и сухого гидролизатов казеина для культивирования производственных штаммов *V. cholerae* O1 позволил установить, что по показателю роста биомассы основы питательных сред были сопоставимы; по показателю «выход специфических антигенов» сухая основа была в 1,5 раза эффективнее, чем жидкая.

**Глава 5** посвящена оптимизации способа получения холерного токсина для контроля вакцины холерной химической бивалентной. В результате экспериментальных работ определены условия максимальной продукции холерного токсина при культивировании в условиях биореактора штамма-продуцента *V. cholerae* KM68 на основе сухого ферментативного гидролизата фибрина. В ходе проводимых исследований авторами разработан новый способ выделения холерного токсина, включающий ультрафильтрацию, ЛПС-адсорбцию, гель-хроматографию на TSK-геле HW-60, использование которого позволяет исключить стадии ионообменной хроматографии и диализа, снизить временные затраты с  $(47 \pm 5)$  до  $(26 \pm 6)$  ч и получить холерный токсин, соответствующий нормированным требованиям (специфическая активность в каждой пробе не менее 1:16000 и содержание белка по Лоури  $(200 \pm 20)$  мкг/мл). Показана возможность его использования для изготовления стандартного образца предприятия «Тест-токсин холерный».

#### **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, молекулярно-генетических, биохимических, биологических и статистических исследованиях, анализе результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях.

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

В автореферате диссертационной работы 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.

Диссертационная работа производит положительное впечатление. Принципиальных замечаний по работе нет. Имеющиеся погрешности, касающиеся неточности некоторых выражений, вольного обращения в некоторых обозначениях, не оказывают влияние на высокую положительную оценку работы.

### **К Оксане Сергеевне имеются вопросы:**

1. Вами предложен комплексный подход для контроля стабильности производственной линии природных штаммов *V. cholerae* O1 KM2129 (569B) серовара Инаба и *V. cholerae* O1 KM2130 (M-41) серовара Огава.

В свое время д.б.н., профессор Смирнова Н.И. разработала штамм *V. cholerae* O1 (KM) на основе *V. cholerae* O1 569B, который проходил комиссионные испытания и был включен в промышленный регламент, как альтернативный, для использования в производстве холерной вакцины.

Кто разработал исследуемые Вами штаммы *V. cholerae* и в чем их отличие от ранее предложенного штамма? Насколько реально существует возможность использования новых штаммов для производства коммерческой вакцины?

2. Исследования по применению сухой питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина проводились и ранее другими сотрудниками ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Используется в настоящее время глубинное культивирование на сухой основе питательной среды регламентированных штаммов для производства коммерческой вакцины?

3. Скажите, пожалуйста, применяются разработанные Вами альтернативные методы *in vitro* для внутрипроизводственного контроля промежуточных продуктов при производстве коммерческой вакцины и, если используется, то какие из них? Применение новых методов осуществляется самостоятельно от методов *in vivo* или параллельно с ними?

4. Планируется внесение разработанных Вами методов *in vitro* включить в нормативную документацию на вакцину холерную бивалентную химическую таблетки?

### **Заключение**

Диссертационная работа Дураковой О.С. на тему «Совершенствование методических подходов для оценки специфической активности антигенов холерной химической вакцины» является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором решена задача получения новых сведений о путях совершенствования технологического процесса производства, контроля производственных штаммов *V. cholerae* O1 569B серовара Инаба и *V. cholerae* O1 M-41 серовара Огава, внутрипроизводственного контроля промежуточных продуктов и готового лекарственного препарата вакцины холерной химической методами *in vitro*, имеющая большое практического значение для здравоохранения.

По актуальности, объему, новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Дураковой О.С. на тему «Совершенствование

методических подходов для оценки специфической активности антигенов холерной химической вакцины» 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 30 июля 2014 г. № 723, 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, 20 марта 2021 г. № 426, 11 сентября 2021 г. № 1539, 26 сентября 2022 г. № 1690, 26 января 2023 г. № 101, 18 марта 2023 г. № 415), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Дуракова Оксана Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент  
 Главный эксперт  
 Федерального государственного  
 бюджетного учреждения «Научный центр  
 экспертизы средств медицинского  
 применения»  
 Минздрава России  
 доктор медицинских наук

*Саяпина*

Саяпина Лидия Васильевна

Адрес организации:

127051, г. Москва,  
 Петровский бульвар, д.8, строение 2  
 Тел: 499-241-91-47,  
 E-mail: Sаяпина@expmed.ru

Подпись Саяпиной Лидии Васильевны удостоверяю:  
 Главный специалист по кадрам  
 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



*Курышева*

Курышева М.А.

«16» августа 2023 г.