

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 07.10.2022 г. № 24
о присуждении Кормщицовой Елене Сергеевне, гражданину РФ, ученой
степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка фармакопейного стандартного образца для определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита» по специальности 1.5.6. Биотехнология принята к защите 01.07.2022 г., протокол № 18 диссертационным советом 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Кормщицова Елена Сергеевна, 1988 г. рождения, в 2010 г. окончила Кировский государственный университет по специальности «Биотехнология», работает младшим научным сотрудником в лаборатории препаратов крови Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства».

Диссертация выполнена в лаборатории препаратов крови Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства».

Научный руководитель – доктор медицинских наук (3.1.28 – Гематология и переливание крови), Парамонов Игорь Владимирович,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», директор.

Официальные оппоненты:

Абрамова Елена Геннадьевна, доктор биологических наук (1.5.6 – Биотехнология), Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория профилактических иммуноглобулинов, главный научный сотрудник, г. Саратов,

Игнатъев Георгий Михайлович, доктор медицинских наук, профессор (1.5.10 – Вирусология), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», лаборатория молекулярной биотехнологии, старший научный сотрудник, г. Москва,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь, в своем положительном заключении, подписанном доктором медицинских наук, профессором Тюменцевой Ириной Степановной, главным научным сотрудником научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций, указала, что диссертация Кормщицовой Елены Сергеевны «Разработка фармакопейного стандартного образца для определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита» является законченной научно-квалификационной работой, в которой изложены новые научно-обоснованные технологические решения, связанные с созданием фармакопейного стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита, вопросы экстренной профилактики и специфического лечения которого остаются актуальными в связи с расширением ареала вируса клещевого энцефалита на административных

территориях Российской Федерации и обострением эпидемиологической обстановки в последние годы. По актуальности выбранной темы, объему и методическому уровню проведенных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов данная диссертация и автореферат соответствуют требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Елена Сергеевна Кормщикова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Соискатель имеет **28** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **13** работ, из них **3** статьи в рецензируемых изданиях, **1** патент на изобретение и **9** работ в других изданиях. Общий объем работ – 8,7 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Кормщикова, Е.С.** Разработка математической модели оценки результатов определения антител человека к вирусу клещевого энцефалита / **Е.С. Кормщикова, Е.В. Хлыбова, А.В. Дробкова** // **Биофарм. Журн.** – 2016. - № 3 (8). – С. 35-43. Scopus, ИФ РИНЦ 0,243.

2. **Кормщикова, Е.С.** Проблема оценки специфической активности препаратов иммуноглобулинов человека против клещевого энцефалита / **Е.С. Кормщикова, Е.В. Росина, И.В. Парамонов, А.В. Рылов, Э.Ю. Кудашева** // **Рос. Иммунол. Журн.** – 2016. - № 1-2. – С.475-477. ВАК, ИФ РИНЦ 0,253.

3. **Кормщикова, Е.С.** Биотехнологические подходы к получению стабильной формы стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита / **Е.С. Кормщикова, Е.В. Росина, К.А. Воробьев, И.В. Парамонов, Э.Ю. Кудашева** // **Биотехнология.** – 2021. – Т.37. – № 3. С. 42-52. Scopus, ИФ РИНЦ 0,706.

4. **Пат. РФ № 2735782.** Способ получения стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита / **Е.С. Кормщикова, Е.В. Росина, К.А. Воробьев, И.В. Парамонов, Э.Ю. Кудашева.** Заявитель и патентообладатель ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. Опубл. 09.11.2020. – Бюл. № 31. – 12 с.

На диссертацию и автореферат поступило **5** положительных отзывов от: (1) д-ра биол. наук, доцента **Давыдкина Валерия Юрьевича**, главного научного сотрудника лаборатории иммунобиологических препаратов Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, г. Москва – без замечаний; (2) д-ра биол. наук, проф. **Волковой Раузы Асхатовны**, начальника лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Научного центра экспертизы средств медицинского применения Минздрава РФ, г. Москва, содержит следующие замечания: «1) опечатки на рис.1 при указании единиц по оси X; 2) не в полной мере отражены результаты оценки параллелизма зависимости сигнала от концентрации антител при использовании различных наборов реагентов»; (3) канд. техн. наук **Мартинсон Екатерины Александровны**, директора Института биологии и биотехнологии, заведующей кафедрой биотехнологии Вятского государственного университета, г. Киров – без замечаний; (4) канд. биол. наук **Фоменковой Татьяны Николаевны**, ведущего специалиста испытательной лаборатории Российского медицинского научно-производственного центра «Росплазма» Федерального медико-биологического агентства, г. Киров – без замечаний; (5) д-ра биол. наук, доцента **Шуплецово́й Ольги Наумовны**, ведущего научного сотрудника лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов Федерального аграрного научного центра Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, г. Киров – без замечаний.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук **Абрамова Елена Геннадьевна** является признанным специалистом в сфере производства лекарственных препаратов профилактических иммуноглобулинов и их стандартизации, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующих кандидатской диссертации **Кормщицковой Е.С. (БИОпреп. Профил. Диагн. Леч. – 2022. – Т. 22, № 1. – С. 38-48; 2021. – Т. 21, № 4. – С. 76-84; 2021. – Т. 21, № 4. – С. 244-245; 2021. – Т. 20, № 2. – С. 89-96; Avicenna J. Med. Biotechnol. – 2021. – V. 13, N 3. – С. 136-142; Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. им. Ю.А. Овчинникова. – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 26–49; 2018. – Т. 14, № 1. – С. 15-20; Разраб. Регистр. Лек. Средств. – 2021. – № 3 (10). – С. 115-130; 2019. – Т. 15,**

№ 4. – С. 32-40; **Mol. Genet. Microbiol. Virol.** – 2020. – V. 35, N 4. – P. 237-242; Пат. RU 2688334 С1, 21.05.2019; **Инф. и иммун.** – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 107-114; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2019. – № 5. – С. 83-94; **Биотехнология.** – 2018. – Т.34, № 4. С. 83-88; **Биофармацевт. Журн.** – 2018. – № 3. – С. 18-25; **Biotechnol. Rus.** – 2018. – № 4. – С. 83-88);

доктор медицинских наук, профессор Игнатъев Георгий Михайлович является признанным специалистом в сфере вирусологии, диагностики и профилактики вирусных инфекционных заболеваний, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Кормщицовой Е.С. (**Инф. бол.: нов., мнен. и обуч.** – 2022. – Т. 11, № 40. – С. 21-7; **Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2021. – Т. 98, № 6. – С. 648–656; 2020. – № 2. – С. 182-9; 2019. – № 3. – С. 37-45; **Emerg. Microb. Inf.** – 2021. – V. 10, N 1. – С. 1790–1806; **Vaccines.** – 2021. – V. 9, N 6. – С. 565; **Int. J. Inf. Dis.** – 2020. – V. 99. – P. 40-6; **Вопр. Вирусол.** - 2018. – Т. 63, № 2. – С. 90-96; **Эпидемиол. Вакцинопрофил.** – 2018. – Т. 17, № 1 (98). - С. 20-24; **Биопреп. Профилакт. Диагн. Леч.** - 2017. – Т. 17, № 2 (62). – С. 95-102).

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области изучения природно-очаговых инфекций, разработки специфических средств для их профилактики, диагностики и лечения, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Кормщицовой Е.С. (**Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.** – 2021. – Т. 98, № 1. – С. 84-90; **Инф. Иммун.** – 2021. – Т. 11, № 1. – С. 9-16; 2021. – Т. 11, № 5. – С. 820-836; **Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. Овчинникова.** – 2020. – Т. 16, № 3. – С. 36-42, 2020. – Т. 16, № 4. – С. 12-16, 2019. – Т. 15, № 4. – С. 27- 31; **Эпидемиол. Инф. Бол. Акт. Вопр.** – 2020. – Т. 10, № 1. – С. 14-20; **Биофарм. Журн.** – 2019. – Т. 11, № 1. – С. 20-23; **Пробл. Особо Опасн. Инф.** – 2018. – № 4. – С. 54-57; 2018. – № 4. – С. 54-57; **Здор. Насел. Среда Обит.** – 2017. – № 6 (291). – С. 41-43; 2017. – Т. 14, № 2. – С. 52-58; 2017. – Т. 14, № 3. – С. 58-62), а также наличием ученых, являющихся авторитетными специалистами по теме диссертации Кормщицовой Е.С.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан фармакопейный стандартный образец с аттестуемыми характеристиками содержания IgG к вирусу клещевого энцефалита (не ниже титра 1:80) и неопределенностью, не превышающей шаг титрования, в реакции

торможения гемагглютинации и концентрацией IgG (не менее 200 ЕД/мл) с неопределенностью, не превышающей 21 %, в иммуноферментном анализе;

предложен новый подход к получению концентрата IgG к вирусу клещевого энцефалита, отличающийся от традиционной технологии производства иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита составом вносимого наполнителя (*l*-пролин и глицин в количестве по 12,5 г/л), показателем рН стабилизированного раствора ($5,0 \pm 0,5$), введением непрерывного перемешивания на стадии стерильного розлива и лиофилизацией до остаточной влажности не выше 1 %, что в комплексе позволило получить фармакопейный стандартный образец, характеризующийся внутрисерийной однородностью (погрешность от неоднородности не превышает 3 %) и постоянством аттестованного значения в течение 3 лет;

доказано, что метрологическое обеспечение методик определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита фармакопейным стандартным образцом позволяет снизить вариабельность результатов реакции торможения гемагглютинации на шаг титрования и унифицировать данные иммуноферментного анализа, полученные с использованием разных наборов реагентов;

введены единицы измерения концентрации IgG к вирусу клещевого энцефалита – ЕД/мл, которые позволяют обеспечить прослеживаемость результатов определения специфической активности в иммуноферментном анализе к аттестованному значению фармакопейного стандартного образца.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что изложенные технологические приемы получения фармакопейного стандартного образца обеспечивают стабильность содержания антител к вирусу клещевого энцефалита в процессе хранения, близость состава и свойств исследуемым иммуноглобулинам человека против клещевого энцефалита по фракционному составу, содержанию γ -глобулинов, молекулярным параметрам, прозрачности, цветности, стерильности, вирусной безопасности и специфической активности, а также внутрисерийную однородность по содержанию антител к вирусу клещевого энцефалита; алгоритм межлабораторной аттестации, заключающийся в построении

калибровочных кривых по значениям коэффициентов разведения фармакопейного стандартного образца и соответствующим величинам оптической плотности, проверке их линейности и адекватности, расчете коэффициентов активности и их стандартного отклонения, позволяет установить неопределенность аттестованного значения первичных фармакопейных стандартных образцов; разработанный способ расчета концентрации IgG к вирусу клещевого энцефалита, заключающийся в обработке линий регрессии фармакопейного стандартного образца и испытуемого препарата в точке со значением оптической плотности 0,5, дает возможность получать результаты, сопоставимые с данными метода параллельных линий, оптимизировать процедуру подбора разведений и способ обработки данных иммуноферментного анализа;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: биотехнологических (этанольно-холодовое фракционирование по методу Кона, ультрафильтрация, высушивание методом сублимации); иммунологических (реакция торможения гемагглютинации и иммуноферментный анализ); физико-химических и биохимических (определение остаточной влажности и точности розлива гравиметрическим методом, цветности и прозрачности растворов спектрофотометрическим методом, показателя рН потенциометрическим методом, содержания белка колориметрическим методом, электрофоретической однородности методом электрофореза на плёнках из ацетата целлюлозы, фракционного состава методом иммуноэлектрофореза в агаровом геле, молекулярных параметров методом гель-фильтрационной высокоэффективной жидкостной хроматографии), микробиологического (определение стерильности методом прямого посева) и статистических (описательный, корреляционный, линейный регрессионный и дисперсионный анализ), а также метода ускоренных испытаний стабильности, основанного на уравнении Аррениуса;

изложены стадии получения концентрата IgG к вирусу клещевого энцефалита, соответствующего требованиям к фармакопейным стандартным образцам (стабилизация раствора иммуноглобулина, произведенного из иммунной плазмы крови доноров, *l*-пролином и глицином в концентрации по

12,5 г/л, корректировке рН до $5,0 \pm 0,5$, стерильном розливе при непрерывном перемешивании и лиофилизации), а также результаты валидации методик, обеспеченных разработанным фармакопейным стандартным образцом, подтверждающие их пригодность для определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита;

раскрыты противоречия, заключающиеся в применении для стабилизации фармакопейного стандартного образца защитной среды на основе *l*-пролина и глицина, отличной от традиционного наполнителя иммуноглобулиновых лекарственных препаратов – глицина, что обосновано результатами ускоренных испытаний стабильности, по данным которых показано повышение сохранности антител к вирусу клещевого энцефалита в среднем в 1,7 раза при применении двухкомпонентного наполнителя;

изучены эффективность защитных сред на основе аминокислот *l*-пролина и глицина для обеспечения стабильности фармакопейного стандартного образца методом ускоренных испытаний, стабильность аттестованного значения фармакопейного стандартного образца в долгосрочных испытаниях при температуре от 2 до 8 °С, аналитическая область методики определения IgG к вирусу клещевого энцефалита в иммуноферментном анализе при использовании различных отечественных и зарубежных тест-систем; корреляция результатов определения специфической активности методами реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментного анализа;

проведена модернизация способа обработки результатов определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита в реакции торможения гемагглютинации путем введения коэффициента пересчета, учитывающего смещение фактического титра антител в фармакопейном стандартном образце относительно его аттестованного значения, что позволяет повысить точность результатов, а также способа обработки данных иммуноферментного анализа путем вычисления концентрации IgG к вирусу клещевого энцефалита по точке со значением оптической плотности 0,5, что упрощает подбор разведений образцов и алгоритм расчета в сравнении с общепринятым методом параллельных линий.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены: фармакопейный стандартный образец содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита (номер в реестре фармакопейных стандартных образцов Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации ФСО ГФ РФ 3.1.00453) – отраслевой уровень внедрения;

способ получения фармакопейного стандартного образца (Пат. РФ № 2735782 от 09.11.2020 г., Акт внедрения от 02.12.2021) – учрежденческий уровень внедрения;

способ оценки качества кандидата в фармакопейный стандартный образец (Акт внедрения от 10.02.2022) – учрежденческий уровень внедрения;

инструкция по изготовлению, контролю и аттестации фармакопейного стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита (утверждена директором Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» 12.04.2022 г.) – учрежденческий уровень внедрения;

определены перспективы использования разработанного фармакопейного стандартного образца для определения специфической активности лекарственных препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита;

созданы 3 экспериментальные серии фармакопейного стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита и нормативно-технологическая документация для осуществления его серийного выпуска (инструкция по изготовлению, контролю и аттестации, проекты паспорта и инструкции по применению), утвержденная директором Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» 12.04.2022 г.;

представлены рекомендации по внедрению методик определения специфической активности на основе реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментного анализа с использованием фармакопейного стандартного образца в сферу производства и государственного контроля лекарственных препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита, заключающиеся в их применении при проведении выпускающего контроля качества и государственной экспертизы, а также предложения по разработке методики определения специфической активности донорской плазмы на основе иммуноферментного анализа для отбора иммунного сырья для производства препаратов иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты получены с использованием средств измерений, прошедших метрологическую поверку, проверена адекватность функций калибровки при аттестации фармакопейного стандартного образца, показана воспроизводимость данных в различных условиях;

идея диссертационного исследования о значимости стандартизации методик определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита опирается на анализ имеющихся в научной литературе данных отечественных и зарубежных исследователей о разработке и применении биологических стандартных образцов, технологии производства иммуноглобулинов человека, повышении их стабильности, методах определения содержания антител к вирусу клещевого энцефалита, а также на обзоре нормативной базы в области контроля качества и метрологического обеспечения в сфере обращения лекарственных средств;

установлена статистическая эквивалентность результатов вычисления концентрации IgG к вирусу клещевого энцефалита с использованием предложенной математической модели и референсного метода параллельных линий, а также корреляция значений титров антител по данным реакции торможения гемагглютинации и концентрации IgG к вирусу клещевого энцефалита по данным иммуноферментного анализа;

использованы современные методы обработки информации, в том числе программы Statistica версии 12.0, включающей в себя оценку характера

распределения признака в группах с использованием *W*-критерия Шапиро – Уилка, проверку статистических гипотез о равенстве внутригрупповых дисперсий с использованием теста Левена (*Levene' test*), средних значений с применением параметрического однофакторного дисперсионного анализа *ANOVA* и непараметрических критериев: *U*-критерия Манна – Уитни (для двух групп) и критерия Краскела – Уоллиса (для трех и более групп), корреляционный и линейный регрессионный анализ данных.

Личный вклад соискателя состоит в планировании и выполнении экспериментальных работ, анализе результатов, подготовке материалов для публикаций, патента на изобретение, разработке нормативно-технологической документации, представлении устных докладов на конференциях.

На заседании 07.10.2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Кормщицковой Е.С. ученую степень кандидата биологических наук за комплексное решение актуальной задачи по разработке фармакопейного стандартного образца для определения специфической активности иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита, что имеет существенное значение для сферы производства лекарственных препаратов, предназначенных для экстренной профилактики и лечения клещевого энцефалита.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве **19** человек, из них **9** докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из **23** человек, входящих в состав совета, проголосовали: за **19**, против **0**, недействительных бюллетеней **нет**.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН, д.м.н., профессор



(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н.

(Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 07.10.2022 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.