

ОТЗЫВ

официального оппонента заместителя директора по производству ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», доктора медицинских наук, профессора Игнатъева Георгия Михайловича по диссертации Беляковой Ольги Валерьевны на тему: «Разработка и использование лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, в составе комбинированных вакцин», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.01 – технология получения лекарств

1. Актуальность темы диссертации

Иммунопрофилактика в современном мире является основой борьбы с инфекционной патологией и одним из самых успешных и эффективных медико-санитарных мероприятий. Благодаря иммунопрофилактике удалось ликвидировать оспу, значительно ограничить полиомиелит, в некоторых странах мира и, в том числе, в России, практически элиминировать корь и паротит.

За последние 20 лет в Российской Федерации были достигнуты существенные успехи в области контроля над целым рядом инфекций. Однако до настоящего времени Россия остается в числе немногих стран, которые не ввели массовую вакцинацию детей первого года жизни против *Hib* (*Haemophilus influenzae* тип *b*). На данный момент проводится только вакцинация детей группы риска. С *Hib* связаны тяжелые инвазивные инфекции, прежде всего менингиты, эпиглоттиты, а также тяжелые пневмонии, осложненные плевритом. Единственным способом профилактики *Hib*-инфицирования является вакцинация.

Создание конъюгированной вакцины позволило предупреждать инвазивную *Hib*-инфекцию начиная с самого раннего возраста, в котором она наносит максимальный урон. Многолетний опыт применения данных вакцин в различных странах подтвердил их эффективность и безопасность. Внедрение плановой вакцинации против *Haemophilus influenzae* тип *b* позволило элиминировать гемофильную инфекцию.

Вместе с тем увеличение количества прививок ведет к росту инъекционной нагрузки. Так, до 18-месячного возраста ребенок должен получить 16 инъекций, а включение новых вакцин, вводимых на первом году жизни (*Hib*-инфекции пневмококковой, против ветряной оспы), сделает это число чрезмерным (до 25-26 инъекций). Поэтому особое значение приобретает разработка и внедрение в

практику здравоохранения комбинированных вакцин, содержащих в своем составе 5-6 антигенов. Разработка комбинированных вакцин привлекла активное внимание и стала одним из приоритетных вопросов здравоохранения. Тем не менее, важно быть уверенным, что безопасность, иммуногенность и эффективность комбинированного введения нескольких вакцинных антигенов выгодно отличается от их введения по отдельности.

В рамках Национального календаря профилактических прививок широко используются отечественные комбинированные вакцины АКДС, Бубо-Кок и АКДС-ГепВ и импортные препараты Инфанрикс-Гекса и Пентаксим, содержащие бесклеточный коклюшный компонент. Комбинированные вакцины отечественного производства, по сравнению с зарубежными, не содержат вакцину для профилактики Нів-инфекции. В связи с этим актуальность работы Беляковой Ольги Валерьевны, посвященной разработке лиофилизированной формы вакцины для профилактики Нів-инфекции, и исследованию возможности ее использования в составе отечественных комбинированных вакцин, не вызывает сомнений.

2. Новизна исследования, полученных результатов и выводов, и их достоверность

Автором впервые проведена оценка качества активной фармацевтической субстанции синтетического полирибозилрибитола фосфата, конъюгированного со столбнячным анатоксином производства Центра геной инженерии и биотехнологии Республики Куба в соответствии с отечественными и международными требованиями, отработаны условия проведения анализов, проведена валидация предложенных методик оценки качества.

Автором впервые разработан и запатентован способ определения примесей этилендиаминтетрауксусной кислоты, диметилсульфоксида и N-этилмалеимида методом ОФ-ВЭЖХ в фармацевтических субстанциях.

В результате проведенных исследований разработан состав и технология лиофилизированной лекарственной формы Нів-вакцины. Для изготовленной лиофилизированной Нів-вакцины определены условия хранения и срок годности. Исследованы физико-химические и биологические свойства препарата, установлены показатели и нормы качества. В опытах на животных показана безопасность и высокая иммунологическая активность лиофилизированной Нів-вакцины.

Впервые продемонстрирована полная иммунологическая совместимость дифтерийного, столбнячного, коклюшного, гепатитного и гемофильного

компонентов в составе комбинированных вакцин АКДС-ГепВ+Ніb, аАКДС-ГепВ+Ніb.

Достоверность результатов проведенной научной работы заключается в использовании современных методик контроля качества, описанных в ГФ XIII и Европейской Фармакопее, проведенной статистической проработкой полученных результатов экспериментов.

3. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Беляковой Ольги Валерьевны выполнена на высоком методическом уровне с применением современных методов физико-химического, иммунохимического и иммунобиологического анализа. Исследования проведены на сертифицированном оборудовании, предложенные методики контроля валидированы по основным параметрам, полученные результаты подвергнуты статистической обработке.

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, основываются на большом объеме экспериментального материала, являются достоверными и логически вытекают из результатов проведенных исследований.

4. Значимость для науки и практики результатов диссертации, возможные конкретные пути их использования

Полученные автором результаты внедрены в производство филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед». По разработанной технологии получено шесть экспериментально-производственных серий препарата «Вакцина для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип *b*, конъюгированная синтетическая лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения», которые были включены в состав комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша, гепатита В и Ніb-инфекции (вакцины АКДС-ГепВ+Ніb и аАКДС-ГепВ+Ніb)

Материалы диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России при подготовке студентов очного и заочного факультетов по специальности «Фармация» и «Биотехнология». Акты внедрения прилагаются к диссертации.

5. Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом

научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (№ 01.9.50007417).

6. Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 - технология получения лекарств: пункту 3 - Разработка технологий получения субстанций и готовых лекарственных форм и пункту 7 - Совершенствование системы организации производства, изготовления и контроля качества лекарственных средств.

7. Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 56 отечественных и 135 зарубежных источника, и приложений (А, Б, В). Работа иллюстрирована 66 таблицами и 21 рисунком.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, определены научная новизна и практическая значимость, выделены основные положения, выносимые на защиту, представлены сведения по апробации результатов, указан личный вклад автора.

В первой главе (обзор литературы) отражен проведенный автором анализ зарубежной и отечественной литературы по теме диссертации. Приводятся сведения о природе Hib-инфекции, вакцинах, используемых для ее профилактики. Представлена концепция контроля качества Hib-компонента комбинированных вакцинных препаратов на этапах их производства.

Вторая глава традиционно посвящена описанию объектов, материалов и методов исследования, использованных в работе. Описанные соискателем методы свидетельствуют о его разноплановой подготовке.

В третьей главе представлены результаты исследований по оценке качества активной фармацевтической субстанции синтетического полирибозилрибитола фосфата, конъюгированного со столбнячным анатоксином. С помощью разработанной, защищенной патентом методики, показано отсутствие примесей этилендиаминтетрауксусной кислоты, диметилсульфоксида и N-этилмалеимида, в субстанции Hib. Проведен всесторонний контроль субстанции в соответствии с требованиями российских и европейских нормативных документов. Методики контроля валидированы по основным показателям. В заключение главы представлена разработанная спецификация и установлено соответствие

исследуемых серий субстанции нормативным показателям.

Четвертая глава посвящена разработке технологии лиофилизированной лекарственной формы Нib-вакцины. Для решения поставленной задачи автором был проведен ряд экспериментов по выбору оптимального состава защитной среды для основного антигена в процессе лиофилизации, отработаны режимы замораживания и высушивания. Проведен всесторонний контроль вакцины в соответствии с требованиями российских и европейских нормативных документов. Проведено исследование стабильности Нib-вакцины в условиях долгосрочных, ускоренных и стресс-испытаний. В результате установлен срок годности Нib-вакцины составляющий 3 года хранения при температуре от 2 до 8 °С. Исследования иммуногенности в тесте «in vivo» на кроликах свидетельствуют о том, уровень антител, индуцируемый Нib-вакциной, сопоставим с препаратами сравнения - коммерческими моновакцинами Акт-ХИБ® и Хиберикс® зарегистрированных в Российской Федерации.

В заключение главы представлена технологическая схема лиофилизированной Нib-вакцины и разработанная спецификация .

В пятой главе представлены данные по оценке острой и хронической токсичности лиофилизированной Нib-вакцины. Показано, что введение вакцины не оказывало токсического действия на организм подопытных животных. Леофилизированная Нib-вакцина при введении в глаз кролику не вызывала местно-раздражающего действия. Все данные статистически обработаны.

В шестой главе представлены данные по получению готовых к применению комбинированных вакцин для профилактики дифтерии, столбняка, коклюша и гепатита В с включением гемофильного компонента и исследованию их специфической активности.

Автором приводятся результаты исследования иммунологической совместимости лиофилизованного Нib-компонента с антигенами комбинированных вакцин АКДС-Геп В и аАКДС-Геп В содержащих цельноклеточный и бесклеточный коклюшный компонент соответственно. В проведенных экспериментах на кроликах было продемонстрировано формирование напряженного иммунитета в отношении всех компонентов, входящих в состав вакцин, и таким образом обоснованы конструкции комбинированных вакцин АКДС-Геп В+Нib и аАКДС-Геп В+Нib. Установлено соответствие исследуемых серий комбинированных вакцин отечественным и международным требованиям, предъявляемым к данным комбинированным

вакцинным препаратам.

Общие выводы диссертационной работы полностью отражают полученные результаты исследования и соответствуют поставленной цели и задачам.

В **приложениях** к диссертационной работе представлены: патент на способ одновременного определения примесей, данные исследования стабильности лиофилизированной лекарственной формы H1b-вакцины, а также акты внедрения результатов диссертационного исследования в производственный процесс филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» и учебную деятельность ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано в 11 печатных работах, в том числе 4 из них в изданиях перечня ВАК РФ. Получен патент «Способ определения примесей этилендиаминтетрауксусной кислоты, диметилсульфоксида и N-этилмалеимида методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармацевтических субстанциях».

Работа построена логично, читается и воспринимается легко, нет сленга, выводы полностью соответствуют проведенным исследованиям. Результаты исследований статистически достоверны и убедительны. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

При рассмотрении диссертационной работы возникли следующие **вопросы, предложения и замечания:**

1. В Главе 2 «Материалы и методы» в разделе 2.3 нет указаний на условия содержания животных, в автореферате указано, что исследования проводили в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Желательно было указать и российские документы, например, «Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений» (РД-АПК 3.10.07.02-09) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».
2. Там же, стр.53 – Полнота сорбции HBsAg – желательно указать, с использованием какой именно тест-системы проводили анализ. В Главе 6 приводятся результаты оценки полноты сорбции в готовых сериях вакцины АКДС-ГепВ+H1b (таблица 65). Название набора реагентов следовало указать в разделе 2.1.2.
3. Во введении желательно было упомянуть (выразить благодарность)

сотрудников, кто оказывал помощь в проведении работы. В частности, при разработке метода одновременного определения примесей, при оценке влияния внутри-лабораторных вариаций (Глава 3, стр. 81).

4. Разработанный ВЭЖХ-ОФ метод определения посторонних примесей (НЭМ, ЭДТА, ДМСО) очень важен и своевременен. Было бы уместно указать, каким методом оценивался этот показатель ранее, был ли он воспроизводим, чувствителен и специфичен. Внесены ли в НД на субстанцию Нib кубинского производства изменения, полученные соискателем в ходе выполненной работы? Напрасно соискатель стесняется подчеркнуть важность полученного результата.

5. В Главе 4 автор пишет (стр.111), что содержание конъюгированного и свободного РРР находилось в пределах норм, установленных Европейской Фармакопеей для конъюгированных Нib-вакцин. Есть ли такие нормы в отечественной регуляторике? Если есть – соответствует ли им данный показатель?

6. При оценке хронической токсичности Нib-вакцины (Глава 5) соискатель не упоминает о гистологических исследованиях органов вакцинированных животных. Эти результаты не представлены соискателем в связи с большим объемом материалов?

7. В той же Главе 5 для изучения местного раздражающего действия Нib-вакцины выбрана конъюнктивальная проба. Почему именно она, если вакцина вводится внутримышечно? Почему в качестве модели выбраны кролики? Почему не проводился учет ГНТ?

8. В названии таблицы 64 уместно было указать – средняя геометрическая титра антител.

Сделанные замечания и предложения никак не умаляют огромный объем результативной работы, проведенной соискателем, не носят принципиального характера и не влияют на общую оценку диссертационной работы.

Заключение

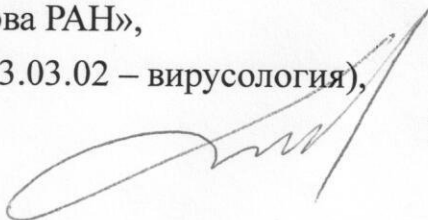
Таким образом, диссертационная работа Беляковой Ольги Валерьевны «Разработка и использование лиофилизированной формы вакцины для профилактики инфекции, вызываемой *Haemophilus influenzae* тип b, в составе комбинированных вакцин», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.01 – технология получения лекарств, является самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержатся решения актуальных задач современной фармации.

Диссертационная работа по своей актуальности, научной новизне,

теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов соответствует требованиям п. 9 - 14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а ее автор, Белякова Ольга Валерьевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.01 – технология получения лекарств.

Официальный оппонент:

заместитель директора по производству
федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Федеральный научный центр
исследований и разработки иммунобиологических
препаратов им. М.П. Чумакова РАН»,
доктор медицинских наук (03.03.02 – вирусология),
профессор



Игнатьев Георгий Михайлович

Подпись Игнатьева Г.М. заверяю:

Ученый секретарь
ФГБНУ ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН
к.б.н.



Белякова Алла Владимировна

Почтовый адрес: 108819, поселение Московский, посёлок Института
полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, город Москва
тел: +7 495 841-90-02

e-mail: marburgman@mail.ru ; ignatjev_gm@chumakovs.su