

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Пиняевой Анастасии Николаевны «Разработка процессов очистки инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. – «Вирусология»

### Актуальность темы диссертации

Полиомиелит является неизлечимым и острым инфекционным заболеванием, вызываемым вирусом полиомиелита (род *Enterovirus*, семейство *Picornaviridae*). Ввиду формирования типоспецифического иммунитета необходимым требованием к вакцинам против полиомиелита является формирование устойчивого иммунитета ко всем трем серотипам полиовируса. Долгие годы профилактика успешно достигается с помощью двух доступных вакцин: инактивированной формалином полиовирусной вакциной Солка, приготовленной из диких штаммов вируса (ИПВ), и пероральной (живой) полиовирусной вакциной (ППВ), приготовленной из аттенуированных штаммов Сэбина

Высокая потребность в инактивированной вакцине против полиомиелита связана с выполнением рекомендаций ВОЗ об обязательном первичном применении одной (2019), двух или более доз (2022) ИПВ при плановой вакцинации всеми странами с низким доходом. Дефициту будет способствовать также полный переход плановой иммунизации на использование ИПВ в странах с полным охватом населения вакцинацией и высокой иммунной прослойкой.

В 2022 году потребности России в ИПВ возросли вдвое, так как с 2022 года в рамках Национального календаря профилактических прививок Российской Федерации вакцинация детей против полиомиелита состоит из четырех иммунизаций ИПВ и двух приемов ППВ. Ранее только первые две вакцинации проводились ИПВ.

В соответствии с Национальным календарём профилактических прививок России, ИПВ используют для плановой иммунизации только, начиная с 2008 года. В нашей стране исторически производили и применяли живую вакцину. Таким образом, разработка, исследование и масштабирование производства ИПВ является важнейшей национальной стратегической экономической задачей, многие вопросы реализации которой решает диссертационная работа Анастасии Николаевны Пиняевой «Разработка процессов очистки инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина», чья актуальность не вызывает

сомнений. Научная работа А.Н. Пиняевой посвящена изучению процессов очистки концентратов полиовируса при разработке технологии производства вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина, разработке критериев оценки эффективности проводимого комплекса очисток, проведению клинических исследований для доказательства хорошей переносимости, надлежащей безопасности и иммуногенности вакцины для профилактики полиомиелита.

### **Краткая характеристика основного содержания диссертации**

Диссертационная работа построена по классической схеме, изложена на 124 страницах и состоит из введения и 6-ти глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, гель-фильтрацию концентратов полиовируса, ионообменную хроматографию концентратов полиовируса, разработку технологии получения и контроля качества инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина, клинические исследования вакцины ПолиовакСин, а также заключение, перспективы дальнейшей разработки темы, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 27 рисунками. Список литературы включает 113 источников.

В главе «Введение» автором подробно обоснована актуальность работы, цель и задачи проводимого исследования, научная новизна и значимость полученных результатов. Все запланированные задачи соответствовали цели исследования и были выполнены в полной мере.

Обзор литературы состоит из 7 разделов. В обзоре литературы грамотно освещены характеристика полиовируса, история создания вакцин для профилактики полиомиелита, описано состояние Глобальной инициативы по ликвидации полиомиелита и современная стратегия ВОЗ по иммунопрофилактике, описано производство инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина в мире, представлена информация о вакцинопрофилактике полиомиелита в России.

Глава «Материалы и методы» состоит из 5 разделов. В главе охарактеризована перевиваемая культура клеток почек зеленой мартышки Vero, использованная в качестве субстрата для культивирования вируса, охарактеризованы используемые в работе вирусы, описаны стадии технологического процесса производства инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина. Расписан контроль качества полупродуктов на различных этапах производства инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов

Сэбина. Также в данной главе есть разделы, посвященные клиническим исследованиям и статистическому анализу полученных результатов.

В третьей главе «Гель-фильтрация концентратов полиовируса» представлены результаты подбора сорбентов на стадии гель-фильтрации для очистки концентратов полиовируса от балластных белков. Были рассмотрены такие характеристики концентрата как содержание D-антигена и общего белка, титр вируса во фракциях, содержание структурного белка VP2, также показано содержание вирусной РНК. Разработанные критерии оценки эффективности проведения хроматографических очисток вирусных концентратов позволили проанализировать полученные результаты. Подобраны оптимальные условия для проведения гель-фильтрации.

В четвертой главе «Ионообменная хроматография концентратов полиовируса» представлены результаты подбора сорбентов на стадии ионообменной хроматографии концентратов полиовируса. В работе были использованы слабые и сильные анионообменные сорбенты с разной ионной емкостью. Хроматография проводилась в градиентном режиме для подбора оптимального состава буферного раствора для проведения ионообменной хроматографии. Показано, что максимальная степень извлечения целевого антигена при очистке вакцинных штаммов полиовирусов с помощью ионообменной хроматографии с сохранением показателей очистки от технологических примесей, соответствует рН элюирующего буферного раствора близком к изоэлектрической точке соответствующего штамма. Подобраны оптимальные условия для проведения ионообменной хроматографии вирусных суспензий.

В пятой главе описаны стадии технологического процесса получения инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина. Кроме того, даны рекомендации по проведению контроля качества на стадиях хроматографических очисток (гель-фильтрация и ионообменная хроматография), описан контроль качества фармацевтической субстанции и готовой лекарственной формы.

Шестая глава посвящена клиническим исследованиям вакцины ПолиовакСин, в технологический процесс которой внедрены предложенные хроматографические очистки. Представленные в главе результаты демонстрируют хорошую переносимость, низкую реактогенность, высокий профиль безопасности и выраженные иммуногенные свойства вакцины ПолиовакСин. Представленные данные согласуются с данными клинических исследований по оценке иммуногенности инактивированных вакцин против полиомиелита на основе штаммов Сэбина, полученных зарубежными исследователями. В диссертационной работе показано, что

антитела, индуцируемые вакциной ПолиовакСин, могут нейтрализовать не только штаммы Сэбина, но и дикие штаммы полиовируса.

В главе «Заключение» А.Н. Пиняева обобщает и анализирует результаты исследования, подтверждает важность и актуальность полученных данных, а также указывает возможные области их применения.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.10. – «Вирусология».

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Достоверность представленных в диссертационной работе данных, обоснованность научных положений и практических рекомендаций, сформулированных автором диссертации, определяется большим объемом проведенных исследований с применением современных лабораторных методов (включая вирусологические, иммунологические и молекулярно-генетические), адекватно подобранными методами статистической обработки полученных данных.

Проведена статистическая оценка всех полученных результатов, приведена их статистическая значимость. Все это позволяет отметить, что проведенное исследование является оригинальным, завершенным в рамках поставленной цели и задач научно-квалификационным трудом.

Основные результаты диссертационного исследования полностью отражены в печати. Материалы диссертации были представлены на различных международных научных конференциях.

### **Научная новизна выполненной работы**

По критериям оценки максимального извлечения целевого антигена при минимальном присутствии технологических примесей подобраны оптимальные условия проведения хроматографических очисток концентратов полиовирусов штаммов Сэбина трех типов. Также была установлена, что максимальная степень извлечения целевого антигена при очистке от технологических примесей препаратов вакцинных штаммов полиовирусов с помощью ионообменной хроматографии обеспечивается при рН элюирующего буферного раствора, близком к изоэлектрической точке вирионов соответствующего штамма.

### **Практическая значимость работы**

На основе представленных в диссертационной работе исследований разработана технология получения высокоочищенных концентратов

полиовирусов (штаммы Сэбина), продуцируемых в культуре клеток Vero, с применением биореакторной технологии. Предложенные процессы проведения хроматографических очисток позволяют получать моновалентные концентраты с высокой степенью извлечения антигена при минимальном содержании технологических примесей. Вакцинный препарат ПолиовакСин в клинических исследованиях продемонстрировал хорошую переносимость, низкую реактогенность, высокий профиль безопасности и выраженные иммуногенные свойства. Полученные в клинических исследованиях данные позволили продолжить регистрационные мероприятия, направленные на внедрение в клиническую практику отечественной вакцины и дальнейшее ее использование в рамках Национального календаря профилактических прививок.

### **Замечания по диссертационной работе**

Несмотря на то, что в диссертационной работе Пиняевой Анастасии Николаевны представлены весомые и значимые результаты, следует отметить ряд замечаний и вопросов, возникших у оппонента при прочтении диссертации:

1. Для оценки степени извлечения целевого продукта (вируса полиомиелита различных типов) диссертант использует определение содержания D-антигена в исходных и очищенных препаратах. Однако, в диссертационной работе не приведены данные, подтверждающие корреляцию между содержанием вируса и D-антигена для каждого из трех типов вируса полиомиелита.
2. В разработанной диссертантом схеме производства инактивированной вакцины очистка вирусных моновалентов осуществляется до инаktivации вируса формалином, что, с одной стороны, повышает выход целевых продуктов, с другой- повышает риски инфицирования работающего персонала. Вполне возможно, что замена инактивирующего вещества (формалина) на бета-пропиолактон позволит проводить инаktivацию перед очисткой вируса.
3. Для разбавления объединенного сбора очищенных инактивированных концентрированных моновалентов диссертант использует 199 среду, которая имеет сложный состав. Насколько целесообразна добавка среды в вакцину и связана ли эта добавка со стабилизацией целевого продукта.

4. На стр. 71, таблица 9 диссертантом показана 100% очистка препарата от остаточной ДНК. Обычно указывают менее предела чувствительности метода, которым определяют нужную величину.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют высокой значимости диссертационного исследования и огромного объема научных изысканий, проведенных диссертантом.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Пиняевой Анастасии Николаевны на тему: «Разработка процессов очистки инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук является законченной научно-квалификационной работой по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.; №1024 от 28.08.2017 г.; №1168 от 01.01.2018 г.; № 426 от 20.03.2021 г.; с изменениями в действующей ред. от 18.03.2023 г.), а ее автор Пиняева Анастасия Николаевна несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. – «Вирусология».

### **Официальный оппонент:**

Генеральный директор Акционерного общества  
«Развитие Биотехнологий»  
профессор, доктор биологических наук,  
E-mail: kiv06@mail.ru,  
Тел.: +7 925-776-5821



Красильников Игорь Викторович

Подпись профессора, д.б.н. Красильникова И.В. заверяю.  
Заместитель генерального директора  
АО «Развитие Биотехнологий»



Погодин П.И.

«17» ноября 2023 г.