

## **«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации,  
член-корреспондент РАН,  
доктор биологических наук, профессор



А.Д.Забережный

«01» ноября 2024

## **ОТЗЫВ**

ведущей организации Федерального Государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации о научно-практической ценности диссертационной работы Колесниковой Оксаны Николаевны на тему: «Оптимизация количественной оценки фенола и тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 - Биотехнология (биологические науки).

### **Актуальность темы выполненной работы**

Иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) - особая группа лекарственных препаратов, предназначенных для формирования активного или пассивного иммунитета, а также диагностики иммунологического ответа на аллергизирующие вещества. К иммунобиологическим лекарственным препаратам относят вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки, иммуноглобулины и аллергены.

При производстве иммунобиологических лекарственных препаратов часто используют консерванты, что обусловлено особенностями действующих компонентов препаратов, технологии производства и формы выпуска. К таким особенностям можно отнести: использование многодозовой упаковки; невозможность термической стерилизации продукции из-за опасности инактивации или разрушения действующего вещества; необходимость использования дополнительного инактивирующего агента при тепловой инактивации; необходимость обеспечения микробиологической чистоты антигена на промежуточных стадиях производства; мутность препарата, обусловленная природой действующего вещества или наличием адьюванта; применение консерванта в качестве стабилизатора основного компонента. Возможность использования консервантов подтверждена международными и отечественными нормативными документами (Европейская фармакопея раздел «Вакцины для медицинского применения», ВОЗ «Глобальная безопасность вакцин», FDA «Thimerosal and Vaccines», ГФ РФ ОФС 1.7.1.0001.15 «Аллергены», ОФС 1.7.1.0004.15 «Вакцины и анатоксины» и т.д.). Поскольку в качестве консервантов, как правило, используют вещества, обладающие токсичным действием, диапазон концентраций, обеспечивающий эффективность и безопасность их применения, регламентируется фармакопейными требованиями. Согласно № 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств" соответствие установленным требованиям нормативной документации является необходимым критерием оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов.

В состав иммунобиологических лекарственных препаратов зарегистрированных в Российской Федерации, в качестве консервантов входят тиомерсал, фенол и 2-феноксиэтанол. Тиомерсал (мертиолят) - ртутьорганическое соединение - входит в состав некоторых вакцин против гепатита В, гриппозных вакцин, АКДС-вакцин, анатоксинов, и некоторых комбинированных вакцин. Требования к содержанию тиомерсала в указанных препаратах колеблются в

диапазоне 30,0 - 120,0 мкг/мл. В состав полисахаридных вакцин (моно- и поливалентных), пептидогликановых вакцин, аллергенов (инфекционных и неинфекционных), содержится фенол, в диапазоне 1,5 - 4,0 мг/мл. Зарубежные производители в качестве консерванта используют аналог фенола, его производное 2-феноксиэтанол, который содержится ряде комбинированных вирусных вакцин, вакцин против гепатита А и полиомиелита, в диапазоне от 4,25-6,6 мг/мл.

Методическая база оценки содержания консервантов, формировалась одновременно с разработкой и внедрением в практику здравоохранения соответствующих иммунобиологических лекарственных препаратов. Фармакопейными методиками являются колориметрическая методика в реакции с дитизоном для определения тиомерсала, спектрофотометрическая методика для определения фенола и колориметрическая методика определения фенола. В настоящее время, широкое внедрение в лабораторную практику высокотехнологичного оборудования позволяет разрабатывать качественно новые оригинальные методики, обладающие большей специфичностью, чувствительностью, правильностью и прецизионностью, что отвечает современным требованиям системы менеджмента качества (СМК), основанной на принципах надлежащей лабораторной практики (GLP).

Следствием данного подхода является наличие в нормативной базе нескольких принципиально отличающихся способов оценки одного консерванта, что приводит к необходимости стандартизации и оценке сопоставимости методик. Внутрилабораторный контроль качества (ВКК) – одна из составляющих системы менеджмента качества, его осуществление является одним из условий компетенции испытательных лабораторий. Инструментом для осуществления внутрилабораторного контроля качества могут служить стандартные образцы (СО) содержания исследуемого вещества для контроля стабильности воспроизведения методик количественного химического анализа. Наличие стандартных образцов, дает существенное преимущество для внутрилабораторного контроля качества и

возможность использования новых методик в работе аккредитованных лабораторий. Международные стандарты надлежащей лабораторной практики представляют собой систему высоких требований к методикам лабораторного контроля качества, а именно, селективности, точности и воспроизводимости результатов. Наиболее доступными и востребованными, являются методики, основанные на методах газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГЖХ и ВЭЖХ), и атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС).

Таким образом, оптимизация количественной оценки консервантов в иммунобиологических лекарственных препаратах, включающая разработку методик на основе высокотехнологичных методов идентификации веществ и количественного химического анализа, валидацию методик и оценку сопоставимости результатов в сравнении с фармакопейными методиками, а также разработку и аттестацию стандартных образцов для контроля стабильности проведения испытаний, является актуальным направлением научно-исследовательской работы.

### **Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Научная новизна диссертационного исследования очевидна: автором впервые разработана методика, позволяющая применить метод газожидкостной хроматографии для контроля иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Фенол». Подобрана хроматографическая колонка, с неподвижной фазой полиэтиленгликоль, размерами 30 метров × 0,320 мкм, толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 микрон. Разработаны оригинальные условия хроматографирования, позволяющие исследовать все группы иммунобиологических лекарственных препаратов, без предварительной пробоподготовки и разведения образцов. Определена аналитическая область методики в диапазоне концентраций фенола от 1,0 до 5,0 мг/мл. Выбран

внутренний стандарт - 2-феноксиэтанол (патент на изобретение Российской Федерации №2693518).

Автором впервые разработана методика для количественного определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах на основе метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Выбрана колонка с фазой C18 с размерами 150 мм × 4,6 мкм, зернением 5 мкм, условия хроматографирования: способ детектирования - спектрофотометрический при 270 нм, состав подвижной фазы - ацетонитрил: 0,5% раствор уксусной кислоты (1:4), скорость потока 1,0 мл/мин, степень разведения образца 1:25, объем инжекции 20 мкл. Определена аналитическая область методики в диапазоне концентраций фенола от 0,05 до 0,15 мг/мл, калибровочная характеристика строится путем изменения объема инжекции стандартного раствора фенола.

Автором впервые разработана методика, позволяющая применить метод атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара ртути, для контроля иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Тиомерсал». Определена аналитическая область методики в диапазоне концентрации ионов ртути от 10 мкг/л до 40 мкг/л. Разработаны условия пробоподготовки испытуемых образцов, позволяющие проводить контроль качества всех групп препаратов. Разработанные методики валидированы автором и показано их соответствие требованиям Государственной Фармакопеи Российской Федерации и International Council for Harmonisation к аналитическим методикам. Автором изучено возможное влияние систематической ошибки на полученные результаты, показано отсутствие статистической значимости систематической ошибки для каждой из разработанных методик.

Автором сделана оценка сопоставимости результатов, полученных с использованием разработанных методик в сравнении с фармакопейными. В результате сравнения спектрофотометрической методики и разработанной методики на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии: значение

критерия Фишера при анализе полученных результатов составило 0,93, при критическом табличном значении 3,96. Автором установлено наличие статистически значимых различий результатов, полученных фармакопейной спектрофотометрической методикой и разработанной методикой на основе газожидкостной хроматографии, обусловленных более высокой прецизионностью методики на основе газожидкостной хроматографии, при сопоставимых средних арифметических значениях двух выборок: значение критерия Фишера при анализе полученных результатов составило 23,01, при критическом табличном значении 3,96.

Автором впервые на основе экспериментальных данных и статистического анализа сопоставимости результатов разработаны и аттестованы фармакопейные стандартные образцы: ФСО 3.1.00449 содержания фенола (для спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии) и ФСО 3.1.00451 содержания фенола (для газожидкостной хроматографии), позволяющие контролировать стабильность определения фенола при проведении испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов с применением методик, основанных на спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и газожидкостной хроматографии.

Автором впервые на основе экспериментальных данных оценена сопоставимость результатов определения тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах, полученных вновь разработанной методикой в сравнении с фармакопейной: значение критерия Фишера при анализе полученных результатов составило 1,29 (при критическом табличном значении 3,96). Автором впервые на основе экспериментальных данных и статистического анализа сопоставимости результатов показана возможность использования стандартного образца ФСО 3.1.00427 содержания тиомерсала в сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратах, аттестованного фармакопейной колориметрической методикой для контроля стабильности определения

тиомерсала при проведении испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов с применением методики на основе атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара.

### **Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки**

Результаты диссертационной работы получены при выполнении государственных заданий ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в рамках следующих научно-исследовательских работ: Научное обоснование методов оценки качества, эффективности и безопасности иммунобиологических лекарственных препаратов и их стандартизация, регистрационный № 01201275293 (акт внедрения результатов НИР от 28.12.2017); Совершенствование системы разработки и применения стандартных образцов, предназначенных для оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств, регистрационный № 115111740007 (акт внедрения результатов НИР от 28.12.2017); Научное обоснование перспективных направлений совершенствования иммунобиологических лекарственных препаратов, предназначенных для иммунопрофилактики инфекционных болезней, регистрационный № АААА-А18-118021590046-9 (акт внедрения результатов НИР от 13.12.2019); Разработка перспективных направлений совершенствования экспертизы качества, эффективности и безопасности биологических лекарственных препаратов и стандартизация методов их оценки № госрегистрации НИОКТР 121022000147-4 (ГЗ НИР 2021-2023).

### **Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации**

Автором экспериментально обоснована возможность применения методов газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Фенол». Разработанные методики позволяют проводить испытания без

предварительной пробоподготовки, в присутствии высокомолекулярных примесей (белков и полисахаридов) и других компонентов препаратов.

Экспериментально доказана возможность применения методики на основе метода атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара ртути, для контроля качества несорбированных и сорбированных иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «Тиомерсал».

Разработанная методика определения фенола в ИЛП методом ВЭЖХ внесена в ОФС 1.7.2.0028.18 «Количественное определение фенола в биологических лекарственных препаратах» ГФ РФ (XIV, том 2).

Разработанная методика определения тиомерсала в ИЛП методом ААС ХII внесена в ОФС 1.7.2.0025.15 «Количественное определение тиомерсала в биологических лекарственных препаратах» ГФ РФ (XIV, том 2).

Внедрение данных методик в практику лабораторного контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов позволяет повысить специфичность и точность определения содержания консервантов за счет применения высокотехнологичных методов и частичной автоматизации процесса.

Разработанные фармакопейные стандартные образцы рекомендованы фармацевтическим предприятиям для контроля стабильности проведения испытаний количественного определения фенола и тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах.

Методики определения фенола на основе газожидкостной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также тиомерсала на основе атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара рекомендованы предприятиям-производителям иммунобиологических лекарственных препаратов, а также организациям и специалистам, проводящим экспертизу и оценку соответствия качества.

Разработанная методика количественного определения фенола в иммунобиологических лекарственных препаратах на основе метода

газожидкостной хроматографии внедрена в практическую деятельность фармацевтической компании ООО «Гритвак» (акт внедрения от 01.11.2021). Разработанная методика количественного определения тиомерсала на основе метода атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара внедрена в практическую деятельность ФГУП Санкт-Петербургского научно-исследовательского института ФМБА России (акт внедрения от 13.03.2017).

**Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе  
публикации в рецензируемых изданиях**

Достоверность полученных Колесниковой О.Н. результатов обеспечивается большим объемом полученных экспериментальных данных, статистической обработкой данных с применением общепринятых методов математического анализа, наличием материалов по валидации и сравнительных исследований.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на: третьей научно-практической конференции молодых ученых «Приоритетные направления развития экспертной деятельности в области обращения лекарственных средств» (Москва 2014); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием: «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва 2019).

По теме диссертации Колесниковой О.Н. опубликовано 8 научных работ, из них 3 - в рецензируемых научных изданиях, 2 - в других изданиях, 2 - в материалах конференций, 1 - патент на изобретение Российской Федерации.

Апробация работы состоялась на заседании Ученого совета Федерального государственного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №7 от 28.11.2023).

## **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Разработанные в процессе выполнения диссертационной работы Колесниковой О.Н. методики контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов на содержание консервантов могут применяться на фармацевтических предприятиях, выпускающих иммунобиологические препараты, содержащие в своем составе в качестве консервантов фенол или тиомерсал.

Разработанные фармакопейные стандартные образцы содержания фенола рекомендуются к использованию в аккредитованных лабораториях для подтверждения правильности результатов испытаний при оценке качества иммунобиологических лекарственных препаратов по показателю «фенол».

### **Соответствие специальностям**

Тема диссертации, цели, задачи, основные положения и выводы, сформулированные автором, соответствуют специальности 1.5.6. – Биотехнология.

### **Оценка содержания и оформления диссертации**

Диссертация изложена на 185 страницах машинописного текста, иллюстрирована 56 таблицами и 30 рисунками. Работа включает следующие структурные элементы: введение, основную часть, состоящую из трех глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, раздел о перспективах дальнейшей разработки темы, в рукописи имеется список сокращений с условными обозначениями и список литературы (236 источников из которых 50 работы отечественных и 186 зарубежных авторов).

Содержание работы соответствует поставленной цели, выводы соответствуют задачам исследования.

Автореферат соответствует структуре и содержанию диссертации и оформлен, согласно требованиям ВАК.

По теме диссертации имеется вопрос дискуссионного характера:

**С начала двадцать первого века наметилась тенденция ухода от применения консервантов в вакцинах, по причине получившего широкое распространение мнения о связи роста случаев аутизма с использованием тиомерсала в вакцинах календаря прививок. Хотя данное утверждение не имеет доказательной базы, тем не менее, все больше производителей отказываются от использования тиомерсала. Следует ли ожидать полный отказ от использования тиомерсала в препаратах в будущем и какова ситуация в отношении использования фенола?**

Работа не содержит ошибок. Принципиальных замечаний к работе нет.

Результаты исследований Колесниковой Оксаны Николаевны обсуждены, и отзыв одобрен на заседании информационно-аналитического и координационного центра по биотехнологиям (Протокол № 05 от 28.10.2024 года).

### **Заключение**

Диссертационная работа Колесниковой Оксаны Николаевны на тему: «Оптимизация количественной оценки фенола и тиомерсала в иммунобиологических лекарственных препаратах», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 - Биотехнология (биологические науки), выполненной под руководством Устинниковой Ольги Борисовны, является завершенной научно-квалификационной работой и содержит новое решение актуальной научной задачи – совершенствование методической базы оценки качества иммунобиологических препаратов на содержание консервантов. По актуальности, новизне и практической значимости диссертационная работа Колесниковой Оксаны Николаевны отвечает требованиям п. 9 - 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748,

от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786, от 25.01.2024 № 62 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Колесникова Оксана Николаевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 - Биотехнология (биологические науки).

Ведущий научный сотрудник информационно-аналитического и координационного центра по биотехнологиям Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 141142, Московская область, г.о. Лосино-Петровский, поселок Биокомбината, строение 17, корпус 1, 8-903-574-80-40, nem\_la53@mail.ru  
доктор биологический наук,  
доцент

Неминущая Лариса Анатольевна

Подпись Неминущей Ларисы Анатольевны заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 141142, Московская область, г.о. Лосино-Петровский, поселок Биокомбината, строение 17, корпус 1, 8-916-329-36-51, biologm2020@mail.ru  
кандидат сельскохозяйственных  
наук

Маркова Евгения Владимировна

