

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора РАН, заведующего кафедрой иммунологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» Пименова Николая Васильевича на диссертационную работу Воробьева Алексея Максимовича «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов для профилактики и лечения раневой инфекции», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.6. – биотехнология, 1.5.11. – микробиология

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

Распространение инфекций, вызванных резистентными возбудителями, с каждым годом становится все более серьезной проблемой для здравоохранения ввиду увеличения частоты встречаемости таких возбудителей и низких темпов разработки новых противомикробных препаратов. Нерациональное и неконтролируемое применение антибиотиков приводит к формированию штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), и вспышкам инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), профилактика и борьба с которыми требуют больших денежных и трудовых затрат ввиду отсутствия эффективной альтернативы применяемым в настоящее время противомикробным средствам. Работой по поиску таких альтернатив занимается множество ученых по всему миру: уже известны препараты антител, средства растительного происхождения, которые могут быть эффективны в отношении резистентных возбудителей, а также противомикробные пептиды.

Довольно популярным направлением в поиске альтернативных противомикробных препаратов является изучение бактериофагов, противомикробные свойства которых были открыты в начале XX века. Бактериофаги обладают литической активностью в отношении резистентных возбудителей, в том числе и обладающих МЛУ, и менее токсичны по сравнению с антибиотиками, что делает их перспективными кандидатами для разработки противомикробных препаратов. Результатом исследований бактериофагов стал вывод на российский фармацевтический рынок ряда лекарственных препаратов и косметических средств на их основе, которые находят применение в различных сферах здравоохранения. Закономерным продолжением изучения бактериофагов является исследование свойств эндолизинов – ферментов, синтезирующихся в конце литического цикла бактериофагов и разрушающих клеточную стенку бактерии-хозяина, способствуя высвобождению фагового потомства. Эндолизины обладают противомикробной активностью в отношении возбудителей с МЛУ, а также

лишены некоторых недостатков бактериофагов в виде узкого спектра литической активности, трудозатратной технологии получения и, в некоторых случаях, иммунного ответа при повторном применении, что делает их перспективными кандидатами для разработки противомикробных препаратов, применяемых для борьбы с резистентными возбудителями. В связи с этим диссертационная работа Воробьева А.М., направленная на разработку лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов для терапии и профилактики раневых инфекций, является актуальным направлением исследований.

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

В результате проведенного исследования Воробьевым А.М. впервые определен спектр активности рекомбинантных эндолизинов бактериофагов ECD7, AM24, AP22, SI3 и ST11 в отношении ведущих возбудителей инфекций: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* и *Campylobacter jejuni*. Доказан широкий спектр активности эндолизинов в отношении данных возбудителей и обоснована их перспективность в качестве действующих веществ при разработке противомикробных препаратов. На основе полученных данных определены кандидаты с наиболее широким спектром действия для включения в состав лекарственной формы.

Впервые разработан гель бактерицидный с рекомбинантными эндолизинами, содержащий в качестве действующих веществ LysECD7, LysAm24 и LysAp22, а в качестве вспомогательных веществ – гидроксипропилцеллюлозу, полиэтиленгликоль 1500 и Трис-гидрохлорид. Подтвержден срок хранения геля в течение 6 месяцев при температуре от +2 до +8°C.

Впервые разработана методика контроля подлинности готовой лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов методом иммуноэлектрофореза с использованием поликлональной антисыворотки к коктейлю рекомбинантных эндолизинов, входящих в состав готовой лекарственной формы. Проведена валидация данной методики, которая показала ее специфичность и пригодность для проведения контроля.

Автором предложена модификация методики определения специфической противомикробной активности готовой лекарственной формы в части используемых микроорганизмов, контролей и питательных сред. Помимо *A. baumannii* TS 50-16 в качестве тест-штамма предложено использование *E. coli* ATCC 25922, а также введен отрицательный контроль в виде плацебо для исключения влияния вспомогательных веществ на результат анализа. Проведена валидация модифицированной методики, в ходе которой показано обеспечение методикой получения правильных и достоверных результатов в условиях повторяемости и проведения анализа разными сотрудниками.

Получены новые данные об эффективности разработанной готовой лекарственной формы на инфекционной модели некробактериоза у кроликов. Применение лекарственной формы привело к достоверному увеличению продолжительности жизни животных опытной группы более, чем на 50 % по сравнению с контрольной ( $22 \pm 2,18$  дня и  $13,33 \pm 0,58$  дней соответственно), достоверному снижению температуры тела ( $39,7$  °C и  $40,7$  °C на 9 день после заражения у опытной и контрольной группы соответственно) и замедлении развития абсцесса (замедление на 49,1 % на 9 день после заражения и на 68,36 % – на 12 день по сравнению с контрольной группой).

Впервые определена иммуногенность, острая, субхроническая токсичность и местнораздражающее действие лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22. Показано отсутствие токсичности и местнораздражающего действия как при однократном, так и при курсовом применении, доказано отсутствие гуморального иммунного ответа при курсовом применении препарата.

В ходе исследования разработана тест-система для определения наличия IgG-антител к рекомбинантным эндолизинам LysECD7, LysAm24 и LysAp22 в крови животных методом косвенного (непрямого) иммуноферментного анализа.

Научные положения, выводы и практические рекомендации рецензируемой работы, сформулированные соискателем, научно обоснованы и логически вытекают из результатов, полученных и обработанных с использованием современных методов исследований.

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

Достоверность результатов диссертационной работы Воробьева А.М. обоснована большим объемом выборки и количеством изученных штаммов микроорганизмов и образцов лекарственных форм, а также использованием современных апробированных методов исследований: микробиологических, биотехнологических, иммунологических, физико-химических и статистических. Дизайн диссертационной работы основан на анализе актуальных литературных источников, в том числе зарубежных. Выводы, представленные автором, логически вытекают из полученных результатов и соответствуют положениям, выносимым на защиту.

#### **Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы**

Новые данные о противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, обосновывают возможность использования эндолизинов при разработке новых противомикробных препаратов.

Расширение знаний о совместимости рекомбинантных эндолизинов с различными вспомогательными веществами необходимо для дальнейшей разработки стабильных, эффективных и безопасных противомикробных средств на их основе.

Разработанная методика контроля подлинности готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов методом иммуноэлектрофореза создает задел для стандартизации подходов к контролю качества препаратов на их основе в условиях промышленного производства.

Разработанная в процессе исследования иммуноферментная тест-система для определения антител к эндолизинам LysECD7, LysAm24 и LysAp22 в сыворотке крови животных, а также алгоритм ее разработки, облегчают дальнейшее создание аналогичных тест-систем, которые могут быть использованы в процессе доклинических испытаний препаратов как на основе эндолизинов, представленных в диссертационном исследовании, так и новых ферментных препаратов.

Данные, полученные при изучении влияния эндолизинов на представителей нормальной микрофлоры, создают предпосылки для разработки пероральных лекарственных средств на основе эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22.

Лабораторный регламент и проект нормативной документации, разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования, обеспечивают унификацию и стандартизацию технологических этапов и подходов к производству и контролю качества препаратов рекомбинантных эндолизинов в целом, что облегчает масштабирование технологии и организацию промышленного производства.

Разработанная готовая лекарственная форма рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22 позволит дополнить пул препаратов, применяемых для профилактики и терапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

#### **Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях**

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на международных и всероссийских научно-практических конференциях. Разработанная технология производства готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов внедрена в работу предприятия АО «Биннофарм».

Модифицированная аналитическая методика контроля качества разработанного геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами по показателю «Специфическая активность» внедрена в работу Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

По теме диссертации Воробьева А.М. опубликовано 11 печатных работ, из них 4 статьи в соавторстве – в рецензируемых изданиях, 7 – в материалах конференций (тезисы).

#### **Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации**

Диссертационная работа Воробьева Алексея Максимовича является законченной научно-квалификационной работой. Изложена на 193 страницах

машинописного текста, иллюстрирована 58 рисунками и 46 таблицами. Состоит из введения, основной части, четырех глав собственных исследований, заключения о выполненных исследованиях, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, изложен список сокращений и условных обозначений, список литературы (133 источника, из которых 34 работы отечественных и 99 иностранных авторов). Задачи для решения поставленной автором цели полностью выполнены. По полученным результатам исследований Воробьев А.М. логично, научно-обоснованно, с учетом данных российской и зарубежной литературы сформулировал 6 выводов. Структура и содержание диссертации в необходимом объеме представлены в автореферате, соответствуют ГОСТ 7.0.11-2011.

В разделе «**Введение**» представлена актуальность проблемы, выбранной для проведения исследований, степень разработанности темы, определены цель и задачи работы, изложены научная новизна и научно-практическая значимость. В ходе подготовки диссертации использованы рациональные, современные, эффективные и апробированные методы испытаний. Сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обоснована достоверность, проведена апробация полученных результатов. Диссертант лично принимал активное участие в изучении рекомбинантных эндолизинов, вспомогательных веществ, образцов лекарственных форм, систематизации, анализе и оценке результатов исследования.

**В первой главе** раскрыты современные представления о строении и свойствах эндолизинов бактериофагов, механизме их действия, приведены примеры существующих в настоящий момент разработок в области разработки и применения препаратов на их основе.

**Вторая глава** посвящена изучению противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов. Автором изучена чувствительность 120 штаммов микроорганизмов к 5 рекомбинантным эндолизинам. Проведено сравнение их спектра противомикробной активности, на основании чего отобрано 3 рекомбинантных эндолизина для включения в состав готовой лекарственной формы.

**В третьей главе** представлена информация о разработке состава и технологии изготовления готовой лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов. Проведены исследования по подбору оптимальной комбинации и концентрации действующих веществ в составе готовой лекарственной формы, сделан выбор в пользу использования смеси из трех рекомбинантных эндолизинов для обеспечения наиболее широкого спектра действия. Подобраны вспомогательные вещества, исходя из планируемой формы препарата (гель для нанесения на раневые поверхности), изготовлены экспериментальные составы лекарственной формы, определены их физико-химические характеристики до и после стерилизации. На основании полученных данных выбраны составы с оптимальными физико-химическими и технологическими характеристиками. Определена

совместимость смеси рекомбинантных эндолизинов с выбранными вспомогательными веществами.

Разработана методика контроля готовой лекарственной формы по показателю «Подлинность» и модифицирована методика контроля по показателю «Специфическая активность». Проведена валидация данных методик для подтверждения их пригодности для проведения контроля качества. Методика контроля специфической активности внедрена в работу Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Разработан проект спецификации на готовую лекарственную форму, выбрано два варианта упаковки, обеспечивающие удобство нанесения и стабильность лекарственного средства. Изучена стабильность готовой лекарственной формы в двух типах упаковки в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания.

Проведена отработка технологии изготовления готовой лекарственной формы. На основе полученных данных составлен лабораторный регламент производства геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами.

В четвертой главе представлены результаты исследований *in vivo*, направленных на изучение безопасности и эффективности разработанной готовой лекарственной формы. В опыте на мышах изучена острая, субхроническая токсичность и местнораздражающее действие как при однократном, так и при курсовом применении готовой лекарственной формы. На инфекционной модели некробактериоза у кроликов изучена эффективность применения препарата в полости абсцесса. Материал опытных животных использован для изучения иммуногенности эндолизинов при данном способе применения, для чего была разработана иммуноферментная тест-система. Показано влияние рекомбинантных эндолизинов на представителей нормофлоры.

В заключении диссертант анализирует полученные данные, сопоставляя с данными литературы, подчеркивая актуальность и важность изучения эндолизинов бактериофагов.

Выводы научно доказаны, убедительны, являются логическим завершением диссертационной работы, соответствуют целям и задачам исследования.

#### **Соответствие специальности**

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальностям 1.5.6. – биотехнология и 1.5.11. – микробиология. Автореферат соответствует ГОСТ 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

В процессе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие вопросы и замечания:

1. В технологии изготовления ГЛФ (готовой лекарственной формы) слабо представлена методология получения эндолизинов. Уточните, пожалуйста, основные особенности и технологические приёмы

получения и накопления биомассы рекомбинантных эндолизинов бактериофагов.

2. Проводили ли Вы изучение совместимости компонентов упаковки готовой лекарственной формы с действующими веществами, включенными в ее состав?
3. Обоснуйте метод и способ определения иммуногенности готовой лекарственной формы на экспериментальных животных, представленный в работе.
4. Почему не проводилась валидация методики определения активности эндолизинов по показателю «Линейность»?
5. Какой статистический критерий использовал автор в анализе достоверности разницы показателей (гематологических, термометрических, временных) в исследовании на инфекционной модели некробактериоза у кроликов? Также уточните, пожалуйста, факторы отсутствия оздоровительного исхода при использовании готового лекарственного средства на основе эндолизинов с установленной антибактериальной активностью *in vitro*. Насколько полученные результаты позволяют констатировать клиническую эффективность разработанного средства при широком целевом использовании?
6. При анализе диссертационной работы были выявлены орфографические, синтаксические ошибки; имеются отдельные замечания к стилистическому оформлению работы. Четвёртый вывод по работе сформулирован как сведения о практическом использовании результатов исследования. Уместнее было бы выделить такую главу.

Отмеченные вопросы и замечания – дискуссионны, не носят принципиального характера и не снижают положительную оценку представленной диссертационной работы.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Воробьева Алексея Максимовича на тему «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов для профилактики и лечения раневой инфекции», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6. – биотехнология и 1.5.11. – микробиология, выполненная под руководством кандидата фармацевтических наук, доцента Ануровой Марии Николаевны и кандидата биологических наук Гущина Владимира Алексеевича, является законченной научной работой, в которой представлено новое решение актуальной задачи – разработка нового противомикробного препарата на основе рекомбинантных эндолизинов бактериофагов.

Диссертационная работа по актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, практической значимости соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842

от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 года, № 748 от 02 августа 2016 года, №650 от 29 мая 2017 года, № 1024 от 28 августа 2017 года, № 1168 от 01 декабря 2018 года, № 751 от 26 мая 2020 года, №426 от 20 марта 2021 года, № 1539 от 11 сентября 2021 года «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Воробьев Алексей Максимович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6. – биотехнология и 1.5.11. – микробиология.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой иммунологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23);  
телефон +7 (909) 944-80-12;  
e-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru),

доктор биологических наук,  
профессор,  
профессор РАН



23.11.2022

Пименов Николай Васильевич

Подпись профессора Н.В. Пименова заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23);  
телефон +7 (495) 709-02-02;  
e-mail: uch-sovet@mgavm.ru),

кандидат сельскохозяйственных наук,  
доцент



Маркин Сергей Сергеевич