

Федеральное бюджетное учреждение науки
Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Г.Н. Габричевского
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

На правах рукописи

Воробьев Алексей Максимович

**РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ
ЭНДОЛИЗИНОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РАНЕВОЙ
ИНФЕКЦИИ**

1.5.6 Биотехнология

1.5.11 Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

Кандидат фармацевтических наук

Анурова Мария Николаевна

Кандидат биологических наук

Гущин Владимир Алексеевич

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность темы исследования	6
Степень разработанности темы исследования	7
Цель исследования	8
Задачи исследования	9
Научная новизна исследования.....	9
Теоретическая и практическая значимость работы	11
Методология и методы исследования	13
Материалы исследования	13
Рекомбинантные эндолизины	13
Штаммы микроорганизмов	13
Вспомогательные вещества	19
Питательные среды	19
Реактивы.....	20
Лабораторные животные	20
Методы исследования.....	21
Микробиологические методы исследования	21
Физико-химические методы исследования	23
Иммунологические методы исследования.....	23
Исследования <i>in vivo</i>	24
Валидация аналитических методик	25
Определение срока годности готовой лекарственной формы	25
Методы статистической обработки результатов.....	26
Личное участие автора в получении результатов	26
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	27
Степень достоверности и апробация результатов.....	27
ГЛАВА 1. Обзор литературы	29
1.1 Предпосылки к применению эндолизинов	29
1.2 Структура эндолизинов и механизм их действия	33

1.3 Эффективность применения эндолизинов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> , а также их спектр противомикробного действия	36
1.3.1 Индивидуальные эндолизины.....	37
1.3.2 Комбинации эндолизинов.....	44
1.3.3 Комбинации эндолизинов с антибиотиками.....	46
1.3.4 Комбинация эндолизинов с полисахарид-деполимеразами	49
1.4 Модификация эндолизинов для изменения их свойств.....	49
1.5 Лекарственные формы эндолизинов	54
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	62
ГЛАВА 2. Изучение субстанций рекомбинантных эндолизинов	62
2.1 Определение чувствительности штаммов микроорганизмов к эндолизинам LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11	64
2.1.1 LysECD7	65
2.1.2 LysAm24.....	70
2.1.3 LysAp22.....	74
2.1.4 LysSi3	78
2.1.5 LysSt11	83
2.2 Сравнение спектра бактерицидной активности рекомбинантных эндолизинов	87
ГЛАВА 3. Разработка состава и технологии изготовления готовой лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов	90
3.1 Выбор оптимальной концентрации АФС в ГЛФ	91
3.2 Выбор вспомогательных веществ, изготовление экспериментальных составов и определение совместимости АФС с компонентами ЛФ	92
3.3 Разработка и валидация аналитических методик контроля качества ГЛФ ...	97
3.3.1 Подлинность.....	97
3.3.1.1 Получение поликлональной антисыворотки к смеси рекомбинантных эндолизинов.....	97
3.3.1.2 Валидация	98
3.3.2 Специфическая активность	100

3.3.2.1	Правильность (сходимость).....	100
3.3.2.2	Внутрилабораторная прецизионность	102
3.4	Разработка спецификации на ГЛФ	103
3.5	Изучение стабильности рекомбинантных эндолизинов в экспериментальных образцах лекарственной формы	104
3.6	Отработка технологии изготовления ГЛФ	112
3.7	Разработка лабораторного регламента	112
ГЛАВА 4. Изучение эффективности, острой и субхронической токсичности, местнораздражающего действия, иммуногенности разработанной ГЛФ <i>in vivo</i> и влияния на нормофлору		
4.1	Изучение влияния рекомбинантных эндолизинов на представителей нормофлоры	117
4.1.1	Отработка методики постановки эксперимента	117
4.1.1.1	Обработка жидкой бульонной культуры эндолизинами.....	117
4.1.1.2	Центрифугирование 30 мл суточной бульонной культуры <i>V. longit V379M</i>	118
4.1.1.3	Выращивание культур на поверхности плотных питательных сред	119
4.1.2	Исследование влияния эндолизинов <i>in vitro</i> на штаммы нормофлоры человека.....	120
4.1.3	Исследование влияния рекомбинантных эндолизинов <i>in vivo</i> на состояние просветной и пристеночной микрофлоры мышей	131
4.2	Острая, субхроническая токсичность и местнораздражающее действие	138
4.2.1	Дизайн эксперимента	138
4.2.2	Результаты	139
4.3	Отработка инфекционной модели	140
4.3.1	Определение чувствительности выбранного возбудителя к рекомбинантным эндолизинам.....	140
4.3.2	Проведение эксперимента <i>in vivo</i>	141

4.4 Дизайн эксперимента по определению эффективности разработанной ГЛФ <i>in vivo</i>	143
4.4.1 Дозы, схема и способ введения испытуемого средства.....	143
4.4.2 Осмотр животных и отбор проб для исследования.....	144
4.5 Выживаемость кроликов опытной и контрольной групп.....	144
4.6 Биохимические показатели крови (АСТ, АЛТ, общий белок) кроликов опытной и контрольной групп	147
4.7 Клинический анализ крови кроликов опытной и контрольной групп	148
4.8 Результаты термометрии кроликов на протяжении всего периода проведения опытов.....	149
4.9 Площади абсцессов у животных на протяжении всего периода проведения опытов.....	149
4.10 Патологоанатомическое вскрытие, отбор секционного материала для диагностики.....	150
4.11 Результаты бактериологического исследования секционного материала полученного от опытных и контрольных кроликов после их гибели	152
4.12 Анализ иммуногенности ГЛФ.....	153
4.12.1 Конструирование иммуноферментной тест-системы	153
4.12.2 Результаты	155
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	159
ВЫВОДЫ	170
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	172
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	173
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	174
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	175
БЛАГОДАРНОСТИ.....	193

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время проблема антибиотикорезистентности приобрела глобальные масштабы [4, 7, 11]. Широкое применение антибиотиков приводит к возникновению штаммов микроорганизмов, которые могут быть устойчивы не только к одному, но и к нескольким антибиотикам (множественная лекарственная устойчивость) [26, 29]. Например, согласно информационному бюллетеню ВОЗ, опубликованному 13 октября 2020 г. [32], доля устойчивых к ципрофлоксацину бактерий вида *Klebsiella pneumoniae* в различных странах составляла в среднем около 41,0%, а для *Escherichia coli* данный показатель находился в районе 45,0%. Кроме того, в 2019 году частота инфицирования пациентов метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA) составила 12,11%, а *E. coli*, устойчивой к цефалоспорином третьего поколения – 36,0%. В ответ на данную проблему в Российской Федерации была разработана «Стратегия контроля антимикробной терапии» (СКАТ) [25] и утверждена Распоряжением Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года», в которой в том числе говорится о необходимости разработки альтернативных средств борьбы с антибиотикорезистентными возбудителями.

В связи с этим, поиск альтернативных способов борьбы с бактериальными инфекциями является актуальным направлением современной науки. Существует ряд перспективных решений данной проблемы, которые включают антибактериальные пептиды [84], средства растительного происхождения [73, 125], препараты антител [45, 54, 133] и т.д. Одним из наиболее активно развивающихся направлений является использование бактериофагов, благодаря их эффективности в отношении полирезистентных возбудителей [12, 31]. Бактериофаги не токсичны для человека и обладают узким спектром активности и активны в отношении устойчивых к антибиотикам возбудителей [1, 3, 24, 28]. Однако, бактериофаги обладают и недостатками, к которым относятся иммуногенность, сложность производства и необходимость использования в

производстве и контроле активности патогенных микроорганизмов к работе с которыми предъявляются строгие требования безопасности [3, 5, 6].

Данных недостатков лишены ферменты бактериофагов – эндолизины [81, 114]. Эндолизины синтезируются в конце литического цикла бактериофага и разрушают клеточную стенку бактерий [114]. Они активны в отношении полирезистентных возбудителей и обладают зачастую более широким спектром активности, нежели бактериофаги [99, 102, 120, 130]. Кроме того, технология получения эндолизинов не предусматривает использования патогенных микроорганизмов, а также позволяет получать активные и стабильные препараты белков [61, 81].

В настоящий момент в Российской Федерации отсутствуют зарегистрированные препараты рекомбинантных эндолизинов, что, с учетом «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года», делает разработку эффективной в отношении раневых инфекций готовой лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов актуальной темой исследований.

Степень разработанности темы исследования

Изучением эндолизинов бактериофагов активно занимаются ученые по всему миру. Изучены механизмы действия эндолизинов, которые заключаются в разрушении различных участков пептидогликана клеточной стенки бактерий [114], что вызывает их осмотический лизис [101].

При изучении строения эндолизинов различных бактериофагов обнаружены отличия в структуре молекул данных белков, которые некоторые авторы связывают с особенностями строения клеточной стенки штаммов-хозяев бактериофагов, синтезирующих данный эндолизин [87, 114]. Эндолизины могут иметь одномерную глобулярную структуру (характерно для эндолизинов бактериофагов, активных в отношении грамотрицательных бактерий) [103, 114, 128] или модульную структуру, состоящую из двух и более доменов, как минимум один из которых обладает ферментативной активностью, а другой отвечает за связывание с клеточной стенкой бактерии [59, 88, 132] (встречается как у эндолизинов

бактериофагов, активных в отношении грамотрицательных бактерий [90, 92, 100, 127], так и у эндолизинов бактериофагов, активных в отношении грамположительных бактерий [59, 67, 83, 88, 95, 96, 109, 132]).

При исследовании спектров противомикробной активности эндолизинов показана меньшая специфичность их действия по сравнению с бактериофагами [58, 99, 102, 120, 130], а также активность в отношении резистентных штаммов, включая штаммы с множественной лекарственной устойчивостью [48, 68, 95, 104], что показывает их перспективность для включения в составы противомикробных препаратов.

Получен опыт применения эндолизинов в комбинациях друг с другом [115, 117] и с антибиотиками [49, 74, 85], который показал синергетический эффект, выражающийся в значительном повышении эффективности применения исследуемых смесей по сравнению с применением отдельных компонентов [49, 74, 85, 117].

Также существует пример использования эндолизина в комбинации с полисахарид-деполимеразой, что обеспечило более эффективное разрушение биопленки *S. aureus* [98].

Предложены способы модификации рекомбинантных эндолизинов для изменения их свойств в целях повышения стабильности и эффективности применения. Модификации заключаются в сшивании ферментативно-активных доменов и доменов связывания с клеточной стенкой различных эндолизинов, что повышает их стабильность и эффективность [78, 82, 111, 122] и сшивании молекул эндолизинов с липополисахарид-дестабилизирующими пептидами, что повышает их активность в отношении грамотрицательных бактерий [42].

На этапе разработки находится несколько лекарственных форм рекомбинантных эндолизинов для инъекционного, местного и ингаляционного применения [53, 70, 72, 107].

Цель исследования - разработка безопасной и эффективной в отношении раневой инфекции лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов.

Задачи исследования:

1. Отобрать по силе, спектру и стабильности бактерицидных свойств в отношении ведущих возбудителей раневой инфекции рекомбинантные эндолизины для разработки лекарственной формы.
2. Основываясь на принципах биосовместимости обосновать и сконструировать состав лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов, представляющей собой гидрофильный гель для нанесения на поврежденные кожные и раневые поверхности.
3. Разработать технологию получения геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами и на основании полученных результатов составить лабораторный регламент.
4. Определить показатели качества, разработать методики их анализа и установить нормы допустимых отклонений для полученной готовой лекарственной формы.
5. Изучить стабильность лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов в процессе хранения для обоснования сроков годности.
6. Оценить токсичность, иммуногенность и эффективность разработанной лекарственной формы на инфекционной модели раневой инфекции у лабораторных животных.

Научная новизна исследования

Впервые определен спектр противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11 в отношении 120 штаммов возбудителей инфекций: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter spp.*, *Campylobacter jejuni* и *Salmonella enterica*. LysECD7 поражал 70,83% исследованных штаммов, LysAm24 – 64,17%, LysAp22 – 55,00%, LysSi3 – 48,33%, LysSt11 – 37,50%.

В результате проведенных исследований впервые разработан стабильный при хранении гель бактерицидный с рекомбинантными эндолизинами, содержащий в качестве действующих веществ LysECD7, LysAm24 и LysAp22, срок годности которого составил 6 месяцев при температуре от +2 до +8°C (патент на

изобретение РФ «Бактерицидная фармацевтическая композиция для местного применения в форме геля бактерицидного с эндолизином» RUS 2781050 от 04.10.2022 г. и патент на изобретение РФ «Антибактериальная композиция на основе эндолизинов и лекарственные средства в форме геля или спрея с ее использованием» RUS 2790481 от 21.02.2023 г.). В качестве вспомогательных веществ использованы гидроксипропилцеллюлоза, полиэтиленгликоль 1500 и Трис-гидрохлорид. В качестве упаковки обоснован выбор алюминиевых туб с мембраной и пластиковых дозирующих шприцев.

Разработана технология изготовления готовой лекарственной формы, состоящая из стадий приготовления гелевой основы, ее стерилизации, приготовления концентрированных растворов рекомбинантных эндолизинов и их введения в стерильную гелевую основу с последующей фасовкой в шприцы или тубы алюминиевые и маркировкой.

Впервые разработана методика контроля подлинности готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов методом иммуноэлектрофореза с использованием поликлональной антисыворотки к коктейлю рекомбинантных эндолизинов, входящих в состав готовой лекарственной формы. В ходе валидации доказана специфичность метода по отношению к готовой лекарственной форме.

Модифицирована в части используемых микроорганизмов, контролей и питательных сред и валидирована методика определения специфической противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов в разработанной готовой лекарственной форме. Помимо *A. baumannii* TS 50-16 предложено использование *E. coli* ATCC 25922 в качестве тест-штамма, а также использование плацебо в качестве отрицательного контроля для исключения влияния вспомогательных веществ на результат анализа. В ходе валидации показано обеспечение методикой получения правильных и достоверных результатов в условиях повторяемости и проведения анализа разными сотрудниками.

В ходе проведенных исследований *in vivo* впервые показана эффективность геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами на инфекционной модели

некробактериоза у кроликов, которая выражалась в достоверном увеличении 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), достоверном снижении температуры тела у животных опытной группы по сравнению с контрольной ($39,7^\circ\text{C}$ и $40,7^\circ\text{C}$ соответственно на 9 день после заражения) и значительном 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 проведена оценка иммуногенности, острой, субхронической токсичности и местнораздражающего действия лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22. Показано отсутствие токсичности и местнораздражающего действия разработанной готовой лекарственной формы (ГЛФ) как при однократном, так и при курсовом применении. Кроме того, доказано отсутствие гуморального иммунного ответа на применение препарата.

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Установлено, что изучаемые рекомбинантные эндолизины обладают более широким спектром противомикробной активности по сравнению с бактериофагами, которые их синтезируют, и активны в отношении антибиотикорезистентных микроорганизмов. Полученные данные дополняют теоретические знания о противомикробной активности эндолизинотоксинов и обосновывают перспективность использования рекомбинантных эндолизинотоксинов в качестве действующих веществ при разработке противомикробных препаратов.

Получены новые знания о совместимости рекомбинантных эндолизинотоксинов с различными вспомогательными веществами, применяемыми при разработке биотехнологических препаратов, их влиянии на представителей нормальной микрофлоры и эффективности применения *in vivo*, что расширяет теоретические

основы в области создания эффективных лекарственных и профилактических средств на основе рекомбинантных эндолизинов.

Разработанная методика определения подлинности готовой лекарственной формы методом иммуноэлектрофореза может быть использована фармацевтическими предприятиями для проведения контроля качества препаратов на основе рекомбинантных эндолизинов.

Разработанная в ходе выполнения работы иммуноферментная тест-система позволит определять наличие антител к рекомбинантным эндолизинам LysECD7, LysAm24 и LysAp22 в крови животных в ходе доклинических испытаний новых лекарственных форм данных эндолизинов. Алгоритм разработки такой тест-системы, показанный в диссертационном исследовании, позволит создать аналогичные тест-системы для определения наличия антител к другим эндолизинам.

Данные о влиянии рекомбинантных эндолизинов на нормофлору, полученные в ходе выполнения работы, могут быть использованы при разработке пероральных препаратов на основе эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22 для адекватного выбора лекарственной формы и схемы лечения.

Разработанный лабораторный регламент и проект нормативной документации на гель бактерицидный с рекомбинантными эндолизинами позволяют унифицировать и стандартизовать подходы к производству и контролю качества препаратов на основе рекомбинантных эндолизинов и обеспечивают возможность последующего масштабирования и организации промышленного производства таких препаратов.

Применение разработанной готовой лекарственной формы расширит спектр препаратов, применяемых для борьбы с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи.

Разработанная технология производства готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов внедрена в работу предприятия АО «Биннофарм» (акт внедрения от 27 июня 2022 г.). 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 (акт внедрения от 12 июля 2022 г.).

Методология и методы исследования

Методология работы спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. Предметом исследования является разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов для профилактики и лечения раневой инфекции. В работе применены общепризнанные, апробированные и современные микробиологические, биотехнологические, иммунологические, физико-химические и статистические методы исследований.

Все исследования были одобрены локальным Этическим комитетом ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол №541 от 09.07.2019) и локальным Этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол №38 от 23.12.2019).

Материалы исследования

Рекомбинантные эндолизины

Исследование проводилось на 5 рекомбинантных эндолизинах: LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSt11 и LysSi3, выделенных из одноименных бактериофагов. Рекомбинантные эндолизины были произведены лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России и передавались в виде лиофилизатов.

Штаммы микроорганизмов

При изучении спектра противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов использовано 120 штаммов микроорганизмов различных родов и видов, полученных из национальных и рабочих коллекций различных медицинских и научных организаций согласно таблице 1.

Таблица 1 – Перечень штаммов микроорганизмов для определения спектра противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов

№	Название штамма	Учреждение
1	<i>S. enterica</i> Enteritidis «Калуга»	

Продолжение таблицы 1

№	Название штамма	Учреждение
2	<i>S. enterica</i> Infantis 4632	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр – всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)
3	<i>S. enterica</i> Tiphymurium «ЛЮ»	
4	<i>S. enterica</i> Enteritidis 3Б	
5	<i>S. enterica</i> Infantis 2511	
6	<i>S. enterica</i> Tiphymurium 415	
7	<i>S. enterica</i> Tiphymurium 1281	
8	<i>S. enterica</i> Tiphymurium Уфа	
9	<i>S. enterica</i> Tiphymurium №3	
10	<i>S. enterica</i> Tiphymurium №24	
11	<i>S. enterica</i> Enteritidis 25	
12	<i>S. enterica</i> Infantis 4631	
13	<i>S. enterica</i> Infantis 4522	
14	<i>S. enterica</i> Dublin immobilin 2	
15	<i>S. enterica</i> Enteritidis «4Б»	
16	<i>S. enterica</i> Infantis «Кузн»	
17	<i>S. enterica</i> London N2	
18	<i>S. enterica</i> Tiphymurium Г1	
19	<i>S. enterica</i> Enteritidis SEM4	ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, номер штамма в коллекции «ГКПМ-Оболенск»: В-7156
20	<i>S. enterica</i> Infantis 1271	ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, номер штамма в коллекции «ГКПМ-Оболенск»: В-7713
21	<i>E. coli</i> 96	Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации
22	<i>E. coli</i> 532	
23	<i>E. coli</i> 502	
24	<i>E. coli</i> 125	
25	<i>E. coli</i> 636	
26	<i>E. coli</i> 16	
27	<i>E. coli</i> 110	
28	<i>E. coli</i> 158	
29	<i>E. coli</i> 452	
30	<i>E. coli</i> 510	
31	<i>E. coli</i> 663	
32	<i>E. coli</i> 185	
33	<i>E. coli</i> 515	
34	<i>E. coli</i> 682	
35	<i>E. coli</i> 108	
36	<i>E. coli</i> 503	
37	<i>E. coli</i> 632	
38	<i>E. coli</i> 179	
39	<i>E. coli</i> 201	
40	<i>E. coli</i> 533	
41	<i>P. aeruginosa</i> 1	Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
42	<i>P. aeruginosa</i> 2	
43	<i>P. aeruginosa</i> 3	
44	<i>P. aeruginosa</i> 4	
45	<i>P. aeruginosa</i> 5	

Продолжение таблицы 1

№	Название штамма	Учреждение
46	<i>P. aeruginosa</i> 6	
47	<i>P. aeruginosa</i> 7	
48	<i>P. aeruginosa</i> 8	
49	<i>P. aeruginosa</i> 9	
50	<i>P. aeruginosa</i> 10	
51	<i>P. aeruginosa</i> 11	
52	<i>P. aeruginosa</i> 12	
53	<i>P. aeruginosa</i> 13	
54	<i>P. aeruginosa</i> 14	
55	<i>P. aeruginosa</i> 15	
56	<i>P. aeruginosa</i> 16	
57	<i>P. aeruginosa</i> 3086	Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора)
58	<i>P. aeruginosa</i> 1805	
59	<i>P. aeruginosa</i> PA01	
60	<i>P. aeruginosa</i> В-1304	ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, номер штамма в коллекции «ГКПМ-Оболенск»: В-7708
61	<i>K. pneumoniae</i> 1	Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н. Н. Бурденко» (ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко»)
62	<i>K. pneumoniae</i> 2	
63	<i>K. pneumoniae</i> 3	
64	<i>K. pneumoniae</i> 4	
65	<i>K. pneumoniae</i> 5	
66	<i>K. pneumoniae</i> 6	
67	<i>K. pneumoniae</i> 7	
68	<i>K. pneumoniae</i> 8	
69	<i>K. pneumoniae</i> 9	
70	<i>K. pneumoniae</i> 10	
71	<i>K. pneumoniae</i> 11	
72	<i>K. pneumoniae</i> 12	
73	<i>K. pneumoniae</i> 13	
74	<i>K. pneumoniae</i> 14	
75	<i>K. pneumoniae</i> 15	
76	<i>K. pneumoniae</i> 16	
77	<i>K. pneumoniae</i> 17	
78	<i>K. pneumoniae</i> 18	
79	<i>K. pneumoniae</i> 19	
80	<i>K. pneumoniae</i> 20	
81	<i>A. baumannii</i> 145	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница №67 им. Л.А. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы
82	<i>A. baumannii</i> 402	
83	<i>A. baumannii</i> МА 65	
84	<i>A. baumannii</i> 474	
85	<i>A. baumannii</i> 869	
86	<i>A. baumannii</i> Бор	
87	<i>A. baumannii</i> РА	
88	<i>A. baumannii</i> 67ГКБ	
89	<i>A. baumannii</i> Гар	ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко»
90	<i>A. baumannii</i> В-05	ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, номер штамма в коллекции «ГКПМ-Оболенск»: В-7705

Продолжение таблицы 1

№	Название штамма	Учреждение
91	<i>Enterobacter spp.</i> 1	ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора
92	<i>Enterobacter spp.</i> 2	
93	<i>Enterobacter spp.</i> 3	
94	<i>Enterobacter spp.</i> 4	
95	<i>Enterobacter spp.</i> 5	
96	<i>Enterobacter spp.</i> 6	
97	<i>Enterobacter spp.</i> 7	
98	<i>Enterobacter spp.</i> 8	
99	<i>Enterobacter spp.</i> 9	
100	<i>Enterobacter spp.</i> 10	
101	<i>C. jejuni</i> 3	ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора
102	<i>C. jejuni</i> 4	
103	<i>C. jejuni</i> 6	
104	<i>C. jejuni</i> 7	
105	<i>C. jejuni</i> 9	
106	<i>C. jejuni</i> 12	
107	<i>C. jejuni</i> 15	
108	<i>C. jejuni</i> 17	
109	<i>C. jejuni</i> 18	
110	<i>C. jejuni</i> 23	
111	<i>C. jejuni</i> 24	
112	<i>C. jejuni</i> 28	
113	<i>C. jejuni</i> 30	
114	<i>C. jejuni</i> 31	
115	<i>C. jejuni</i> 33	
116	<i>C. jejuni</i> 34	
117	<i>C. jejuni</i> 36	
118	<i>C. jejuni</i> 37	
119	<i>C. jejuni</i> 41	
120	<i>C. jejuni</i> 42	

Для оценки специфической активности действующих веществ и ГЛФ рекомбинантных эндолизинов были использованы штаммы микроорганизмов, представленные в таблице 1 под номерами 32, 33, 41, 42, 82 и 89, а также штаммы микроорганизмов, полученные из рабочей коллекции Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России) и Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра

«Курчатовский институт» (ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика) согласно таблице 2.

Таблица 2 – Перечень штаммов бактерий, использованных для оценки специфической активности действующих веществ и ГЛФ

№	Название штамма	Учреждение
1	<i>A. baumannii</i> TS 50-16	ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России
2	<i>E. coli</i> ATCC 25922	ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика

С целью воспроизведения раневой инфекционной модели на лабораторных животных был использован контрольно-производственный штамм *Fusobacterium necrophorum* №89-5. Штамм предоставлен Всероссийской коллекцией патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Штамм *F. necrophorum* №89-5, в соответствии с классификацией микроорганизмов-возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности, не относится ни к одной из четырёх групп.

Штамм *F. necrophorum* №89-5 по своим органолептическим, физико-химическим, морфологическим, культуральным и биологическим свойствам должен соответствовать требованиям и нормам, представленным в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели качества штамма *F. necrophorum* №89-5

Наименование показателей	Характеристика и нормы
Внешний вид, цвет	Лиофилизат в виде однородной сухой пористой таблетки белого или светло-жёлтого цвета с сероватым оттенком, отделяющаяся при встряхивании от стенки ампулы/флакона
Наличие посторонней примеси, следов оттаивания, трещин флаконов/ампул	Не допускается
Наличие вакуума во флаконах/ампулах	Во флаконах/ампулах должен быть вакуум
Растворимость, мин, в пределах	Содержимое флакона/ампулы должно полностью раствориться в физиологическом растворе в течение 3 мин с образованием гомогенной взвеси без хлопьев, комочков и осадка
Массовая доля влаги, %, в пределах	1,0-4,0
Контаминация посторонней микрофлорой	В посевах культур штаммов на/в питательных средах не должно быть роста посторонней бактериальной и грибной микрофлоры
Культуральные свойства и типичность роста	<i>F. necrophorum</i> является строгим анаэробом. Штаммы растут в течение 18-36 часов. Вначале происходит помутнение в нижних слоях, а затем всей питательной среды. Через 7- 10 суток среда полностью просветляется, и на дно пробирки выпадает рыхлый осадок. Обладают свойством газообразования. На кровяном агаре

Продолжение таблицы 3

Наименование показателей	Характеристика и нормы
	культуры штаммов должны образовывать гладкие колонии с выпуклым центром в виде перламутровой пуговицей с чёткими краями или в форме виноградного листа, окружённые яркой зоной гемолиза. Рост в МПБ и на МПА должен отсутствовать.
Морфология	Грамотрицательные полиморфные короткие и средней длины палочки или нити, иногда с колбовидными утолщениями и зернистыми включениями, грамотрицательные, неподвижные, неспорообразующие, не имеющие капсул.
Ферментативные свойства	Культура штамма ферментирует глюкозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу, галактозу, слабо ферментирует адонит, дульцит, глицерин, инулин, сорбит, эритрит, не ферментирует рамнозу. Продуцирует индол и пропионовую кислоту, образует сероводород.
Концентрация живых бактерий в 1,0 см ³ сухой культуры штамма, млн.	Не менее 150
Вирулентность	Суточная культура штамма <i>F. necrophorum</i> должна вызывать гибель кроликов в течение 10-14 суток после заражения.

Для оценки действия рекомбинантных эндолизинов на представителей нормофлоры человека *in vitro* были использованы штаммы микроорганизмов из Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры человека и животных ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора согласно таблице 4.

Таблица 4 – Перечень штаммов бактерий нормальной микрофлоры, использованных для оценки действия эндолизинов

№ п/п	Название штамма	№ в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора
1	<i>Bifidobacterium bifidum</i> OV-19	216
2	<i>Bifidobacterium bifidum</i> 791	80
3	<i>Bifidobacterium longum</i> OV-20	214
4	<i>Bifidobacterium longum</i> Я-3	103
5	<i>Bifidobacterium longum</i> В379М	79
6	<i>Bifidobacterium breve</i> OV-12	217
7	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ГО-13	48
8	<i>Bifidobacterium infantis</i> 73-15	115
9	<i>Lactobacillus helveticus</i> НК-1	54
10	<i>Lactobacillus casei</i> КНМ-12	186
11	<i>Lactobacillus helveticus/casei</i> К3Ш24	42

Штаммы *B. bifidum* OV-19, *B. bifidum* 791, *B. longum* В379М, *B. breve* OV-12, *B. infantis* 73-15, *L. helveticus* К3Ш24, *L. helveticus* НК-1, *L. casei* КНМ-12 входят в состав консорциума для приготовления бактериальных препаратов,

предназначенных для коррекции микрофлоры детей в возрасте до 3-х лет (патент RU 2491331).

Штаммы *B. bifidum* 791, *B. longum* B379M, *B. longum* OV-20, *B. breve* OV-12, *L. helveticus* КЗШ24, *L. helveticus* НК-1, *L. casei* КНМ-12 входят в состав консорциума для приготовления бактериальных препаратов, предназначенных для коррекции микрофлоры детей в возрасте от 3-х до 14 лет (патент RU 2491335).

Штаммы *B. bifidum* OV-19, *B. bifidum* 791, *B. longum* OV-20, *B. longum* Я-3, *B. adolescentis* ГО-13, *L. helveticus* КЗШ24, *L. helveticus* НК-1, *L. casei* КНМ-12 входят в состав консорциума для приготовления бактериальных препаратов, предназначенных для коррекции микрофлоры людей старше 14 лет (патент RU 2491336).

Вспомогательные вещества

В качестве гелеобразователей при разработке готовой лекарственной формы использовали гидроксипропилметилцеллюлозу марки Natrosol 250 ННХ (Ashland, США) и гидроксипропилметилцеллюлозу Venecel К100М (Ashland, США).

Для варьирования показателей стабильности, реологических и биоадгезивных свойств экспериментальных составов гелей использовали полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами: 400, 1500, 3000 и 6000 (Химмед, Россия).

В качестве растворителя вспомогательных и действующих веществ использовали буферный раствор Трис-НСl (20 ммоль/л, рН = 7,5), приготовленный согласно требованиям ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы» Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV) [9].

Питательные среды

Для культивирования штаммов *S. jejuni* использовали колумбийский агар (Conda, Испания), для культивирования *F. necrophorum* – кровяной агар (Conda, Испания), для культивирования бифидобактерий – Бифидум-Среду (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Россия), для культивирования лактобацилл – МРС-2 (ООО «НИЦФ», Россия), для культивирования остальных микроорганизмов – агар Мюллера-Хинтона (Himedia, Индия).

Для получения бактериальных суспензий в экспоненциальной фазе роста использовали мясо-пептонный бульон (МПБ), приготовленный согласно ГОСТ 20730-75 «Питательные среды. Бульон мясо-пептонный (для ветеринарных целей). Технические условия».

Реактивы

При определении чувствительности микроорганизмов к рекомбинантным эндолизинам и при определении специфической активности ГЛФ для ресуспендирования бактериальных клеток использовали фосфатный буферный раствор (PBS) с pH = 7,5 (Merk, США).

Для иммунизации животных коктейлем рекомбинантных эндолизинов для усиления иммунного ответа использовался адъювант Фрейнда (Sigma Aldrich, США). При конструировании иммуноферментной тест-системы для определения антиэндолизиновых IgG-антител использовались следующие реагенты:

- Конъюгат Белок А-пероксидаза (Protein A-Peroxidase, Sigma, США);
- Конъюгат аффинно-очищенных поликлональных козьих антител к иммуноглобулинам кролика с пероксидазой хрена («Poly goat anti-rabbit HR», Биалекса, Россия);
- Раствор тетраметилбензидина (ТМБ, Имтек, Россия);
- Забуференный фосфатами физиологический раствор с твином (PBS-T, Диаэм, Россия);
- Субстрат (пероксид водорода, PanReac AppliChem, США);
- Стоп-реагент (Sigma, США);
- Глицерин (PanReac AppliChem, США, Ph. Eur.).

Лабораторные животные

Изучение эффективности разработанной ГЛФ проводили на 15 кроликах породы «Советская шиншилла», массой 2 кг. В опытах использованы самки.

Изучение острой, субхронической токсичности и местнораздражающего действия проводили на аутбредных мышах линии CD-1 (48 самцов и 48 самок), массой 16-18 г.

Животных получали из питомника «Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» и после карантинизации использовали в экспериментах. Содержание и работа с животными соответствовали актуальным нормативным актам и рекомендациям [10, 14, 27].

Методы исследования

Микробиологические методы исследования

Определение чувствительности штаммов микроорганизмов к рекомбинантным эндолизинам

Изучение спектра противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов проводилось по опубликованным ранее методикам [38, 39].

Подготовка суспензий бактериальных клеток проводилась из ночных бульонных культур, полученных в МПБ в объеме 4,5-5 мл. Ночные культуры разбавлялись свежим МПБ с дальнейшей инкубацией при $+37\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ в термостате ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) до достижения мутности по МакФарланду равной 0,5 единиц. Измерение мутности осуществлялось при помощи денситометра Densi-La-Meter II (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Полученные культуры центрифугировались в объеме 1 мл при $6000\times g$ в течение 10 минут, надосадочная жидкость удалялась. Осадок ресуспендировался в PBS до достижения мутности по МакФарланду равной 0,5 единиц. Суспензия бактериальных клеток разбавлялась в 100 раз при помощи 20 мМ Трис-HCl буфера при $\text{pH}=7,5$. Полученная рабочая суспензия использовалась для определения чувствительности к рекомбинантным эндолизинам в течение не более 30 минут.

В стерильном плоскодонном 96-луночном полистироловом планшете (Eppendorf, Германия) смешивалось 100 мкл рабочей суспензии бактериальных клеток и 100 мкл рабочего раствора рекомбинантного эндолизина или их смеси. Планшеты с исследуемыми образцами суспензий бактерий и рекомбинантных эндолизинов инкубировались при $+37\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут с непрерывным шутеллированием при 200 rpm на шейкере Shaker S-3 (ELMI, Латвия). После

инкубирования проводилась подготовка 10-кратных разведений в PBS. Разведения 10^{-1} и 10^{-2} в объеме 100 мкл наносились на поверхность агара Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия) в чашках Петри и равномерно распределялись по его поверхности стеклянным шпателем Дригальского до полного высыхания на поверхности питательной среды. Инкубация чашек проводилась при $+37 \pm 0,4^\circ\text{C}$ в течение ночи, после чего производился подсчет колоний. Оценка чувствительности штаммов бактерий проводилась в сравнении с контрольными образцами, содержащими 20 мМ Трис-HCl буфера при pH=7,5 вместо рабочего раствора рекомбинантного эндолизина. Исследование опытных и контрольных образцов проводилось в двух независимых повторностях.

Специфическая активность рекомбинантного эндолизина рассчитывается по формуле:

$$X = \left(1 - \frac{A}{B}\right) * 100, \text{ где:}$$

X – специфическая бактерицидная активность, %;

A – среднее количество бактериальных клеток в опыте, КОЕ/мл;

B – среднее количество бактериальных клеток в контроле, КОЕ/мл.

Определение чувствительности представителей нормофлоры к рекомбинантным эндолизинам

Культивирование бифидобактерий и лактобацилл, определение титруемой кислотности и подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили в соответствии с существующими методическими рекомендациями и методиками [8, 19, 20, 22].

Ампулы с лиофильно высушенными штаммами вскрывались в асептических условиях и регидратировались средой культивирования, после чего из полученной суспензии готовилось 10 десятикратных разведений в питательной среде. Полученные разведения инкубировались в течение 24 часов при температуре $+37,5 \pm 1^\circ\text{C}$ в термостате ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия). Содержимое пробирки с хорошо сформированными 100–150 колониями перемешивалось пипетированием, и вносилось в свежую питательную среду в

количестве 10% от объема среды (10 мл на 100 мл среды). Инкубация проводилась в течение 24 часов при температуре $+37,5 \pm 1^\circ\text{C}$. Таким образом получали вторую и третью генерации микроорганизмов.

Четвертая генерация выращивалась на поверхности агаризованных сред в анаэроостате АЭ-01 (НИКИ МЛТ, Россия) с созданием атмосферы при помощи газогенерирующих пакетов Анаэрогаз (НИКИ МЛТ, Россия). Культуры при помощи микробиологической петли переносились в стерильный физраствор для подготовки суспензии по стандарту мутности 5 MakFarland. 2 мл полученной суспензии переносилось в 110 мл стерильного 20 мМ Трис-НСl буфера с $\text{pH}=7,5$.

Полученный материал разливался по пробиркам по 9 мл и объединялся с 1 мл исследуемого рекомбинантного эндолизина в концентрации 1 мг/мл для достижения итоговой концентрации 100 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля в пробирки добавляли 1 мл 20 мМ Трис-НСl буфера с $\text{pH}=7,5$. Полученные смеси инкубировали в течение 30 минут при $+37,5 \pm 1^\circ\text{C}$, далее отбиралось по 1 мл для приготовления десятикратных рядов предельных разведений для определения числа КОЕ и по 5 мл для определения титруемой кислотности.

Определение стерильности готовой лекарственной формы

Стерильность определяли методом мембранной фильтрации согласно ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» ГФ РФ XIV [9].

Физико-химические методы исследования

Вязкость экспериментальных образцов определяли методом ротационной вискозиметрии в соответствии с ОФС.1.2.1.0015.15 «Вязкость» ГФ РФ XIV [9] при помощи вискозиметра Rotavisc lo-vi Complete (ИКА, Германия).

Определение pH экспериментальных составов лекарственных форм (ЛФ) производилось потенциометрическим методом в соответствии с ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия» ГФ РФ XIV [9] при помощи прибора SevenCompact S220 (Mettler Toledo, Швейцария).

Иммунологические методы исследования

Подлинность геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами

определяли методом иммуноэлектрофореза в соответствии с ОФС.1.8.2.0002.15 «Имуноэлектрофорез в агаровом геле» ГФ XIV [9].

Оценка иммуногенности рекомбинантных эндолизинов в составе ГЛФ проводилась методом косвенного (непрямого) иммуноферментного анализа в соответствии с ОФС.1.7.2.0033.15 «Метод иммуноферментного анализа» ГФ РФ XIV [9].

Исследования *in vivo*

Методы клинического исследования животных

В ходе проведения испытаний *in vivo* были использованы общие методы клинического исследования: осмотр, пальпация и термометрия. Проводили общее клиническое исследование: определение габитуса, исследование видимых слизистых оболочек, кожи, лимфатических узлов, измерение температуры тела, а также посистемные исследования органов дыхательного аппарата, сердечно-сосудистой системы, пищеварительного тракта, мочеполового аппарата и нервной системы.

Биохимические показатели крови животных

Биохимические показатели крови определяли на биохимическом анализаторе «ChemWell+» (Awareness, США). Оценивали следующие показатели: Аминотрансферазы (АлАТ и АсАТ) и общий белок с использованием наборов реагентов АЛТ-ВИТАЛ (fluid stable), АСТ-ВИТАЛ (fluid stable) и Общий белок-ВИТАЛ фирмы «Витал» (Россия) согласно инструкции к наборам реагентов.

Для исследования использовали венозную кровь, которую отбирали из вены в чистую пластмассовую пробирку. Для получения сыворотки кровь центрифугировали 6 мин при 4000 об/мин. Полученная сыворотка переносилась во вторичные пробирки, которые затем загружали в анализатор.

Гематологические показатели крови животных

Гематологические исследования цельной крови выполнялись на гематологическом анализаторе ВС-3200 (Myndrey, Китай).

Патологоанатомическое вскрытие животных

Макроскопическое исследование органов и тканей проводилось согласно «Методическим указаниям по патоморфологической диагностике болезней животных, птиц и рыб в ветеринарных лабораториях» [21]. Вскрытие трупов павших и вынужденно убитых животных осуществляли методом полной эвисцерации.

Оценку полученных результатов проводили в соответствии с методологией, описанной Жаровым А.В. [23].

Диагностика некробактериоза

Диагностика некробактериоза проводилась согласно методическим рекомендациям «Лабораторные методы диагностики некробактериоза сельскохозяйственных животных» [17], а также «Методическим рекомендациям по диагностике, лечению и профилактике некробактериоза, пальцевого дерматита и болезней копыт крупного рогатого скота незаразной этиологии» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации [18].

Валидация аналитических методик

Валидация аналитических методик контроля качества разработанной ЛФ по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность» проводилась согласно требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV [9] по параметрам «Специфичность», «Правильность (Сходимость)» и «Внутрилабораторная прецизионность».

Определение срока годности готовой лекарственной формы

Для подтверждения стабильности ГЛФ в процессе хранения были проведены долгосрочные испытания стабильности в соответствии с ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» ГФ РФ XIV [9].

Определение стабильности проводилось в течение 6 месяцев при температурном режиме от +2°C до +8°C. Анализ образцов производился перед закладкой на хранение, через 1, 3 и 6 месяцев хранения. Показатели качества определялись в соответствии с составленной спецификацией.

Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel 2021. Количественные признаки представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения. Оценка достоверности различий выборок проводилась путем расчета показателя p , различия считали достоверными при $p < 0,05$. При валидации аналитических методик рассчитывали относительное стандартное отклонение (relative standard deviation, RSD).

Личное участие автора в получении результатов

Автором разработан дизайн научного исследования, проведен сбор и аналитический обзор данных литературы, разработан план валидации аналитических методик контроля качества, проведена статистическая обработка полученных в ходе исследования результатов. Автором принято непосредственное участие в выполнении всех этапов исследования, написании научных статей и докладах о полученных в ходе работы результатах на научных конференциях.

Изучение влияния рекомбинантных эндолизиннов на представителей нормофлоры проводилось совместно с сотрудниками лаборатории биологии бифидобактерий ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (рук. лаборатории, к.б.н. Жиленкова О.Г.).

Иммунологические исследования (контроль подлинности готовой лекарственной формы, изучение ее иммуногенности) проводились совместно с сотрудниками лаборатории иммунобиологических препаратов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (рук. лаборатории, к.м.н. Новикова Л.И.).

Изучение острой, субхронической токсичности и местнораздражающего действия, а также эффективности разработанной готовой лекарственной формы на инфекционной модели некробактериоза у кроликов проводилось на базе Лаборатории диагностики и контроля антибиотикорезистентности возбудителей наиболее клинически значимых инфекционных болезней животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (зав. лабораторией, к.б.н. Лаишевцев А.И.).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Рекомбинантные эндолизины LysECD7, LysAm24 и LysAp22 обладают более широким спектром противомикробной активности по сравнению с бактериофагами, являющимися их источниками и являются перспективными кандидатами для включения в состав готовой лекарственной формы.

2. Разработанный гель с рекомбинантными эндолизинами с использованием в качестве вспомогательных веществ гидроксиэтилцеллюлозы, полиэтиленгликоля 1500 и Трис-гидрохлорида является безопасным и эффективным и не вызывает гуморального иммунного ответа в опыте на инфекционной модели некробактериоза у кроликов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается благодаря объему проведенных исследований (изучено действие 5 рекомбинантных эндолизинов на 120 штаммов микроорганизмов, проведены исследования *in vivo* на 96 мышах и 13 кроликах), использованию валидированных и апробированных методов исследований (микробиологических, иммунологических, биотехнологических) и применением адекватной статистической обработки первичных данных.

Диссертация апробирована на заседании секции ученого совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол №2 от 28.06.2022 г.).

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на: Всероссийской научно-практической интернет-конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения» (Пермь, 2020 г.); XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Ростов-на-Дону, 2020 г.); VII Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, молекулярных биологов и биофизиков (Наукоград Кольцово, 2020 г.); Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2020 г.);

Международной конференции «Эпидемиологическое благополучие» (Москва, 2021 г.); Всероссийской научно-практической конференции «ИммунБиоТех-2021. Разработка, производство и применение биологических лекарственных препаратов» (Томск, 2021 г.); XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Екатеринбург, 2021 г.).

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1 Предпосылки к применению эндолизинов

Согласно данным PubMed, в период с 2015 по 2019 год число публикаций, посвященных антибиотикорезистентности, возросло более, чем на 30% (9900 и 13002 публикаций в год соответственно), что говорит о повышении частоты возникновения антибиотикорезистентных инфекций и об ухудшении эпидемиологической обстановки в целом. По мнению некоторых авторов [7], распространение антибиотикорезистентных возбудителей уже приняло характер эпидемии и, следовательно, требует оперативных действий для борьбы с резистентными штаммами и профилактики вызываемых ими инфекций.

Наибольшее распространение и, соответственно, наибольшую значимость среди антибиотикорезистентных возбудителей имеют, так называемые, ESKAPE-патогены, которые состоят из представителей *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*

Указанные микроорганизмы зачастую являются госпитальными штаммами и вызывают вспышки внутрибольничных (нозокомиальных) инфекций, борьба с которыми осложняется множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), приобретенной ими вследствие длительной селекции в условиях лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ). Жертвами таких инфекций часто становятся пациенты с ослабленной иммунной системой (например, после операции) [7], контактирующие с возбудителем, который может находиться на оборудовании, прикроватных тумбах, столах и т.д. [79]

Высокая резистентность ESKAPE-патогенов обусловлена взаимосвязью множества механизмов, из которых можно выделить:

- Изменение проницаемости внешней мембраны бактерии для антибиотика;
- Активный транспорт антибиотика из клетки при помощи систем эффлюкса;

- Расщепление антибиотиков за счет периплазматических и цитоплазматических ферментов;
- Горизонтальный обмен генами устойчивости;
- Формирование биопленок [91, 94].

Помимо экологической толерантности, высоких адаптационных свойств, тропности к тканям инфицируемого организма и устойчивости к антибиотикам, опасность данных возбудителей также обусловлена устойчивостью к дезинфектантам и ультрафиолетовому облучению [77].

Согласно данным Российского многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон», наибольшее распространение среди возбудителей нозокомиальных инфекций в 2015–2016 гг. получили *K. pneumoniae* (22,8%), *P. aeruginosa* (17,4%) и *A. baumannii* (16,8%) [4, 29].

ESKAPE-патогены устойчивы к большинству применяемых в настоящее время антибиотиков, что говорит о необходимости эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью [26, 29, 33, 34]. По мнению некоторых авторов [7, 11, 43, 60, 124], снизить уровень обсемененности госпитальной среды антибиотикорезистентными бактериями и, следовательно, риск заражения ими пациентов, можно путем введения эпидемиологического мониторинга во всех подразделениях ЛПУ. Своевременная информация о составе микрофлоры и ее устойчивости позволит подобрать рациональную схему лечения пациента в случае инфицирования, а также позволит выбрать эффективные средства дезинфекции. Так, согласно опубликованным данным, наличие в ЛПУ лабораторного подразделения, которое занимается микробиологической диагностикой, сильно увеличивает диагностические возможности и облегчает проведение профилактического скрининга, являющегося важным условием успешного инфекционного контроля в ЛПУ [7, 43, 60].

Тем не менее, помимо профилактических мероприятий, необходимо уделять внимание разработке новых препаратов, не подверженных влиянию механизмов резистентности бактерий.

Согласно данным ВОЗ, по состоянию на 1 сентября 2019 года, на стадии клинических испытаний (фазы I-III) находилось 50 новых антибиотиков и их комбинаций, активных в отношении как минимум одного из патогенов, выделенных ВОЗ, как критически важного [35]. Также, на стадии доклинических испытаний находилось 252 антибиотика, но, учитывая ранние стадии их разработки, допущены к применению они будут минимум через 10 лет [80].

Несмотря на большое количество разрабатываемых антибиотиков, большинство из них слабо отличаются от применяемых в настоящее время и только 2 антибиотика из 50, находящихся на стадии клинических испытаний, активны в отношении мультирезистентных Гр- бактерий [80].

Основываясь на приведенных выше данных, можно сделать вывод о том, что помимо разработки новых антибиотиков необходимо искать альтернативные способы борьбы с бактериальными инфекциями, которые будут отвечать современным требованиям к безопасности и будут эффективны при терапии и профилактике инфекций, вызванных мультирезистентными бактериями. Среди множества альтернатив, исследуемых на данный момент (антимикробные пептиды, пробиотики, пребиотики, антитела, органические кислоты, вещества растительного происхождения и т.д.), можно выделить бактериофаги, как одно из наиболее активно развивающихся направлений.

Бактериофаги – вирусы, способные поражать бактерии и не оказывающие влияния на животные клетки [12]. К преимуществам бактериофагов перед антибиотиками можно отнести:

- Активность в отношении устойчивых к антибиотикам бактерий;
- Способность проникать в ткани организма, не нарушая баланс нормофлоры (благодаря высокой специфичности и предварительной оценке чувствительности нормофлоры пациента);
- Совместимость с многими лекарственными препаратами;
- Отсутствие иммуносупрессивного действия и наличие иммуномодулирующего эффекта [13, 31].

Тем не менее, бактериофаги обладают рядом недостатков, среди которых можно выделить узкий спектр литической активности (одним из наиболее эффективных способов применения бактериофагов является персонализированная фаготерапия, что является достаточно дорогостоящей и трудоемкой процедурой), а также иммуногенность [5, 6]. Кроме того, для регистрации препарата, содержащего бактериофаг, необходимо соблюсти целый ряд условий, которые обусловлены особенностями получения бактериофагов:

- Каждый бактериофаг, используемый в препарате, должен быть изучен молекулярно-генетическими методами (полногеномное секвенирование) для предотвращения попадания в препарат умеренных бактериофагов, способных переносить гены резистентности;
- В досье на препарат необходимо включать данные о штамм-продуценте, на котором проводится культивирование бактериофага на производстве, в связи с тем, что часто такое культивирование производится на штаммах, близких к патогену, в отношении которого бактериофаг активен;
- При производстве необходимо применять дополнительные методы очистки (аффинная хроматография, ультрафильтрация и т.д.) для предотвращения попадания в препарат продуктов жизнедеятельности штамма-продуцента (эндо- и экзотоксины) [1].

Все вышеуказанные нюансы делают процесс получения бактериофагов и препаратов на их основе довольно трудоемким и дорогостоящим, что может препятствовать их широкому применению.

На фоне этих данных, перспективным выглядит применение ферментов, синтезируемых бактериофагами – эндолизинов. Эндолизины активны в отношении полирезистентных штаммов микроорганизмов и не оказывают специфического бактерицидного действия на негомолгичные бактерии нормальной флоры. Препараты рекомбинантных эндолизинов работают на поверхности клетки патогена и не подвержены действию внутриклеточных механизмов защиты.

Эндолизины способны разрушать мукополисахаридный матрикс биоплёнок [98], с которым не справляется большинство антибиотиков [30]. Мультидоменная природа эндолизинов позволяет конструировать белки с двумя или более бактерицидными активностями, увеличивая терапевтический потенциал препаратов [57, 78].

Также, технология получения эндолизинов (культивирование штамма-продуцента, несущего плазмиду, кодирующую фермент) менее трудоемка и не требует особого подхода к организации производства и регистрации препарата, что делает эндолизины актуальными и перспективными объектами для исследований.

1.2 Структура эндолизинов и механизм их действия

Эндолизины являются ферментами, которые синтезируются в конце литического цикла бактериофага и способствуют высвобождению фагового потомства путем разрушения клеточной стенки бактерии изнутри, что вызывает ее осмотический лизис [101]. Все эндолизины относятся к классу гидролаз пептидогликана (пептидогликангидролазы, ПГГ) и подразделяются в зависимости от участка пептидогликана, в отношении которого они активны:

- Мурамидазы:
 - Лизоцим-подобные ферменты;
 - Литические трансгликозилазы
- N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы;
- N-ацетилмурамоил-L-аланин-амидазы;
- Пептидазы [114]

На рисунке 1 представлено графическое изображение участков пептидогликана, разрушаемых эндолизинами различных групп.

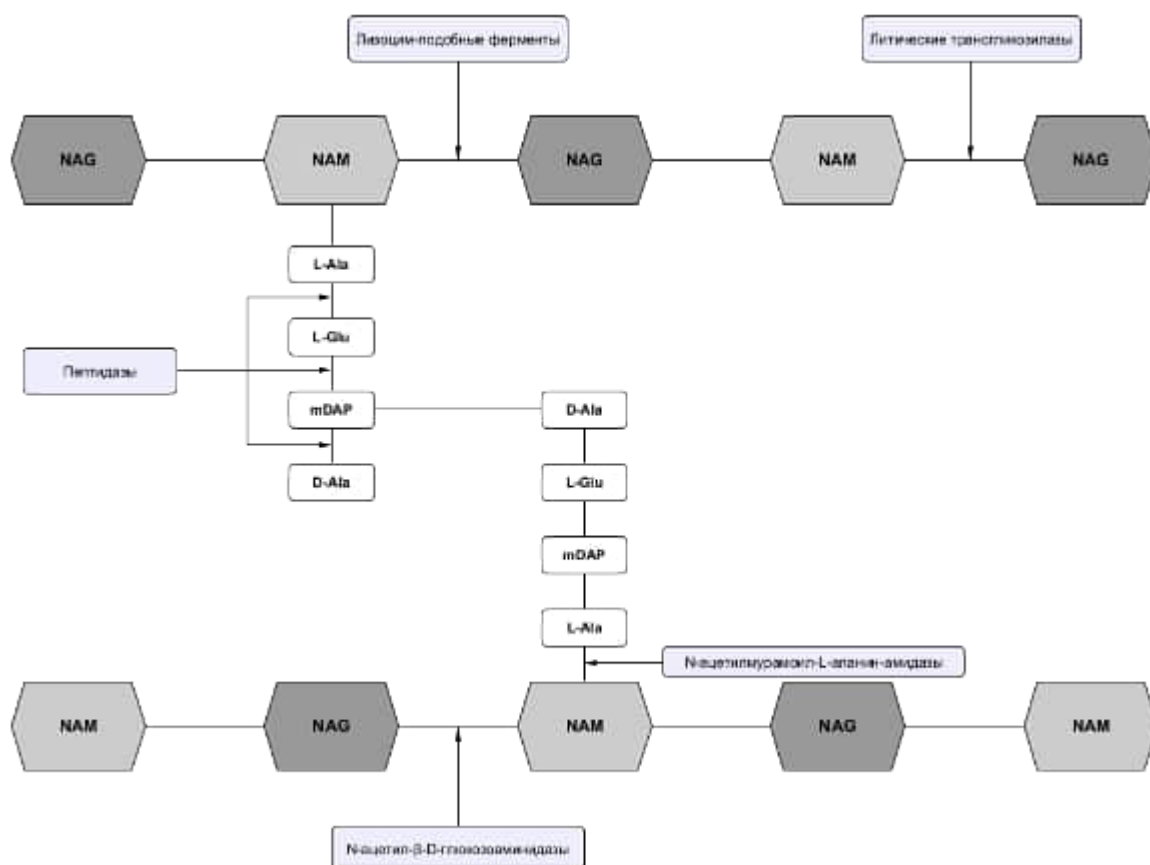


Рисунок 1 – Мишени эндолизинов. NAM – N-ацетилмурамовая кислота; NAG – N-ацетилглюкозамин [114]

Различия в структуре эндолизинов обусловлены строением клеточной стенки бактерии, которую они должны разрушать. Так, эндолизины, синтезируемые бактериофагами, активными в отношении Гр⁺ бактерий (Гр⁺ эндолизины), имеют модульную структуру и состоят, зачастую, из двух доменов, имеющих различные функции. На N-конце находится ферментативно-активный домен (enzymatically active domain, EAD), а на C-конце – домен связывания с клеточной стенкой (cell wall binding domain, CBD) [59, 88, 132]. Некоторые эндолизины могут обладать и несколькими EAD с различной ферментативной активностью или несколькими CBD с различной аффинностью (Таблица 5) [67, 83, 95, 96, 109, 123].

Таблица 5 – Различия в строении некоторых Гр⁺ эндолизинов

Эндолизин	Строение эндолизина (N-конец → C-конец)	Фаг активен в отношении	Источник
PlyPSA	Амидаза – CBD	<i>Listeria monocytogenes</i>	[132]
Ply500	Пептидаза – CBD	<i>Listeria monocytogenes</i>	[88]

Продолжение таблицы 5

Эндолизин	Строение эндолизина (N-конец → С-конец)	Фаг активен в отношении	Источник
Cpl-1	Мурамидаза – CBD	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	[59]
LysIME-EF1	Пептидаза – CBD – CBD – CBD	<i>Enterococcus faecalis</i>	[131]
LysBC17	Пептидаза – CBD – CBD	<i>Bacillus cereus</i>	[123]
LysPBC5	Трансгликозилаза – CBD – CBD	<i>Bacillus cereus</i>	[83]
LysK	Пептидаза – Амидаза – CBD	<i>Staphylococcus aureus</i>	[95]
B30	Пептидаза – Мурамидаза – CBD	<i>Streptococcus agalactiae</i>	[109]
λSA2	Пептидаза – CBD – CBD – Глюкозаминидаза	<i>Streptococcus agalactiae</i>	[108]

CBD отвечает за распознавание субстрата и соединяется со специфичными лигандами на клеточной стенке, обеспечивая специфичность действия фермента. CBD некоторых эндолизинов остается связанным с субстратом даже после лизиса клетки, что, вероятно, предотвращает действие эндолизина на не инфицированные фагом бактерии [87].

На данный момент существует множество данных об аффинности CBD различных эндолизинов. Так, домен LysM (Lysin Motif) [114, 126] является наиболее типичным доменом для пептидогликангидролаз и связывается с остатками N-ацетилглюкозамина [97, 114], известны также несколько доменов эндолизина Cpl-1 и других пневмококковых эндолизинов, связывающихся с холинсодержащими тейхоевыми кислотами в клеточной стенке [69, 89] и домен эндолизина Cpl-7, связывающийся с клеточной стенкой пневмококков в холиннезависимой манере [114].

Аффинность CBD зачастую распространяется на весь род бактерий, что подтверждается исследованиями с CBD, помеченными GFP (Green fluorescent protein – зеленый флуоресцирующий протеин) [65], данная особенность обуславливает более широкий спектр активности эндолизинов по сравнению с синтезирующими их бактериофагами [114].

В свою очередь, строение оболочки Гр- бактерий предотвращает воздействие на клеточную стенку снаружи клетки за счет наличия внешней мембраны. В связи

с этим, эндолизины, которые синтезируются бактериофагами, активными в отношении грамотрицательных бактерий (Гр- эндолизины), зачастую имеют одномерную глобулярную структуру и содержат только домен EAD [114, 128]. Тем не менее, некоторые Гр- эндолизины могут иметь модульную структуру [90, 92, 100, 127], которая отличается от таковой у Гр+ эндолизинов (Таблица 6). Так, EAD у Гр- эндолизинов находится на С- конце молекулы, а на N- конце находится пептидогликансвязывающий домен (peptidoglycan binding domain, PBD), который выполняет функции, аналогичные CBD [81].

Таблица 6 – Различия в строении некоторых Гр- эндолизинов

Эндолизин	Строение эндолизина (N-конец → С-конец)	Фаг активен в отношении	Источник
TSPphg	Пептидаза	<i>Thermus scotoductus</i>	[128]
Ts2631	Амидаза	<i>Thermus scotoductus</i>	[103]
OBPgp279	PBD ₁ – PBD ₂ – Лизоцим-подобный фермент*	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	[127]
PVP- SE1gp146	PBD – Лизоцим-подобный фермент	<i>Salmonella enterica</i>	[127]
201φ2-1gp229	PBD – Лизоцим-подобный фермент	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	[127]
SPN1S	PBD – Лизоцим-подобный фермент	<i>Salmonella typhimurium</i>	[100]
Gp110	PBD – N-ацетилмурамидаза	<i>Salmonella enterica</i>	[90]

Примечание: * – цифровой индекс означает различие в структуре PBD, что может говорить о различной аффинности данных доменов.

Таким образом, ввиду большого разнообразия в строении эндолизинов, данный класс ферментов обладает различными механизмами и спектрами бактерицидного действия, что обуславливает большой интерес научного сообщества.

1.3 Эффективность применения эндолизинов *in vitro* и *in vivo*, а также их спектр противомикробного действия

Теория о более широком спектре противомикробного действия и более высокой эффективности эндолизинов по сравнению с бактериофагами подтверждается многочисленными исследованиями, которые можно разделить на

исследования индивидуальных белков, их комбинаций друг с другом и антибиотиками.

1.3.1 Индивидуальные эндолизины

В 2019 году Fraga A.G. и соавторами опубликованы результаты исследования бактерицидной активности эндолизина LysB бактериофага D29, штаммом-хозяином которого является *Mycobacterium tuberculosis*, *in vitro* и *in vivo*. Исследование проводили на *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG, *M. ulcerans* и *M. tuberculosis* [58].

Наиболее эффективной оказалась концентрация эндолизина 100 мкг/мл. Помимо высокой активности в отношении *M. tuberculosis* (минимальная ингибирующая концентрация (МИК) составила 0,20 мкг/мл), эндолизин показал высокую активность в отношении двух других исследуемых бактерий (МИК 1,5 мкг/мл для *M. smegmatis*, 0,079 мкг/мл для *M. ulcerans* и 0,19 мкг/мл для *M. bovis* BCG) [58].

Для исследований *in vivo* авторами была выбрана модель язвы Бурули у мышей, возбудителем которой является *M. ulcerans*, продуцирующая миколактон. Лабораторным мышам в подушечку задней лапы подкожно вводили 0,03 мл суспензии, содержащей 3×10^5 КОЕ *M. ulcerans*. Лечение проводили путем подкожной инъекции в подушечку лапы 50 мкг эндолизина на 10-й и 13-й дни от начала инфекции [58].

Проведенный эксперимент показал, что терапия с применением эндолизина позволила предотвратить рост количества бактерий в очаге инфекции. Концентрация бактерий в контрольной группе, получавшей плацебо, превышало таковую в опытной группе более, чем в 10 раз на 16 день после заражения. Кроме того, терапия эндолизином привела к росту содержания γ -интерферона и фактора некроза опухоли (ФНО) в клетках лимфатических узлов на 16 день после заражения по сравнению с контрольной группой, что, по мнению авторов, способствовало снижению уровня миколактона и развитию защитного иммунитета у лабораторных животных, чего обычно не происходит при традиционной терапии [58].

Основываясь на полученных данных, авторы предполагают, что LysB может стать эффективным дополнением к традиционной терапии язвы Бурули после некоторой оптимизации схемы лечения (путь введения, дозировка, режим применения и т.д.) [58].

Аналогичная картина наблюдается у эндолизинов бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Bacillus*. Так, эндолизины AP50-31 и LysB4 показали высокую активность внутри рода *Bacillus*, в то время как бактериофаги, являющиеся их источниками, были активны только в отношении *B. anthracis* и *B. cereus* соответственно [99, 120, 121].

Исследование проводилось на 8 видах бактерий: *B. cereus*, *B. circulans*, *B. laevolacticus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* и на 4-х штаммах *B. thuringiensis*. Активность эндолизинов оценивали турбидиметрией путем определения времени, необходимого белку для снижения OD₆₀₀ (оптическая плотность при длине волны 600 нм) бактериальной культуры в 2 раза (TOD₅₀). Исследуемые эндолизины показали различную активность. Так, у LysB4 TOD₅₀ варьировалось от 0,5 минут для *B. subtilis* до 4,2 минут для *B. thuringiensis*, в то время как AP50-31 показывал TOD₅₀ от 2,2 минут для *B. thuringiensis* до 19,4 минут для *B. licheniformis*. Оба эндолизина были активны в отношении *B. anthracis* (максимальное TOD₅₀ 16,3 мин у эндолизина AP50-31 и 10,2 – у LysB4) [99].

Помимо определения бактерицидной активности *in vitro*, была проведена оценка эффективности применения LysB4 при инфекции, вызванной спорами *B. anthracis* у лабораторных мышей. Эндолизин вводили интраназально через 6, 24 и 48 часов после инфицирования [99].

Применение LysB4 в концентрации 10 мкг/животное позволило замедлить гибель животных и существенно повысить выживаемость (50% при выживаемости в контрольной группе, получавшей плацебо, 0% на 5 день после инфицирования). Применение же LysB4 в концентрации 100 мкг/животное позволило достичь уровня выживаемости 100%. Также, в обеих группах, получавших эндолизин, наблюдалось улучшение состояния животных и снижение клинических

проявлений инфекции, наряду с концентрацией *B. anthracis* во внутренних органах [99].

Несмотря на позитивные данные о спектре бактерицидной активности эндолизинов и их эффективности при применении у животных, описанные выше, в приведенных работах нет прямого сравнения эндолизинов с бактериофагами, являющимися их источниками, что не позволяет сделать объективные выводы об их преимуществах. В 2019 году Jun-Нyeok Yu и соавторами опубликованы результаты исследования, наиболее наглядно показывающего различия в спектрах активности эндолизинов и бактериофагов. В ходе исследования было проведено определение спектра бактерицидной активности эндолизина LysSAP8 и его сравнение с бактериофагом SAP8, из которого он был получен [130].

Исследование проводили на 116 бактериальных штаммах, 75 из которых относились виду *S. aureus*, включая MRSA. Остальные штаммы (41) относились к видам *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. warneri* и *S. xylosus*, а также к представителям родов *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella* и *Vibrio* [130].

Бактериофаг SAP8 был активен только в отношении 15 штаммов *S. aureus*, и не заражал метицилин-резистентные штаммы (MRSA). При этом, к эндолизину данного бактериофага (LysSAP8) оказались чувствительны 73 из 75 штаммов *S. aureus*, включая MRSA, а также другие исследуемые представители рода *Staphylococcus*, указанные выше, за исключением четырех штаммов (1 штамм *S. condiment*, 1 штамм *S. warneri* и 2 штамма *S. epidermidis*). Однако, эндолизин не показывал активности в отношении представителей других родов бактерий [130].

По мнению авторов, полученные результаты говорят о возможности применения эндолизина LysSAP8 для биоконтроля в пищевой промышленности благодаря его способности убивать специфические патогены и не оказывать влияния на комменсальную микрофлору [130].

Также известно исследование способности эндолизина LysCSA13 (источник – бактериофаг CSA13 [46]) к удалению биопленок *S. aureus* с различных

поверхностей (полистирол, стекло, нержавеющая сталь и т.д.), частью которого было определение спектра бактерицидной активности эндолизина [47].

Была исследована чувствительность 16 штаммов *S. aureus*, 3 из которых были метициллин-резистентными, *S. haemolyticus*, *S. hominis* и *S. warneri*, а также нескольких представителей других родов (*Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia* и *Cronobacter*). Все исследуемые представители рода *Staphylococcus* были чувствительны к эндолицину, а бактерии других родов оказались устойчивы к его действию [47]. Стоит отметить, что бактериофаг, являющийся источником данного эндолизина, обладал практически аналогичным спектром литической активности [46], что несколько отличается от общих представлений об эндолизинах и является достаточно редким случаем.

LysCSA13 оказался способен разрушать биопленки *S. aureus* на полистироловом планшете, снижая концентрацию бактерий более чем на 80% за 2 часа [47], в то время как бактериофаг CSA13 достигал такого эффекта только через 24 часа [46], что говорит о более высокой скорости действия эндолизина по сравнению с бактериофагом и, следовательно, о более высокой эффективности его применения для уничтожения биопленок.

Аналогичный эффект эндолизин оказывал на биопленки на стекле и нержавеющей стали, что делает данный фермент перспективным кандидатом для обработки рабочих поверхностей в пищевой промышленности, в медицине и т.д. [47]

Другим примером, показывающим перспективность применения эндолицинов в пищевой промышленности для уничтожения биопленок, является работа Vincenzo Pennone и соавторов, в которой была исследована способность эндолизина бактериофага vB_LmoS_293 подавлять формирование биопленок *L. monocytogenes*, являющейся серьезной угрозой в пищевой промышленности ввиду высокой патогенности и способности к формированию биопленок [102, 112].

Для исследования было отобрано 9 представителей рода *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*), которые были

получены с молочных производств, а также *B. cereus*, *S. aureus* и 2 штамма *E. coli* [102].

Проведенное исследование показало, что рекомбинантный эндолизин обладает более широким спектром действия в пределах рода *Listeria*, по сравнению с бактериофагом, не оказывая влияния на представителей других родов. Кроме того, предварительная обработка полистироловых и стальных пластин рекомбинантным эндолизином снижала образование на них биопленок на 78%, по сравнению с контрольными. Также, обработка эндолизином полистироловых пластин с четырехдневной биопленкой позволила удалить 25% биомассы, по сравнению с контрольными образцами, на стальных пластинах такого эффекта не наблюдалось [102].

По мнению авторов, необходимо проведения большего количества исследований для более подробного изучения влияния данного эндолизина на биопленки *L. monocytogenes*, тем не менее полученные данные уже позволяют говорить о возможности эффективного применения рекомбинантных эндолизинов для повышения безопасности пищевых продуктов [102].

Помимо внутриродовой бактерицидной активности, описанной выше, эндолизины способны поражать бактерии и других родов. Так, LysSS – эндолизин бактериофага SS3e, штаммом-хозяином которого является *S. enterica*, в исследованиях *in vitro* показал активность в отношении *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp.*, а также *S. aureus* (MRSA). Стоит отметить, что сам бактериофаг также обладает широким спектром литической активности, но, в отличие от рекомбинантного эндолизина, не способен лизировать *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* [76]. Все бактериальные штаммы, используемые в исследовании, обладали МЛЮ. МИК варьировались от 0,063-0,25 мг/мл для 16 штаммов *A. baumannii* до 0,75 мг/мл для *E. coli*, *Salmonella spp.* и *S. aureus*. Наименее чувствительными к исследуемому эндолизины были штаммы *Enterococcus faecalis* (МИК > 2 мг/мл) [75].

Также исследователями был проведен эксперимент по оценке эффективности эндолизина *in vivo*. Для этого лабораторных мышей заражали путем

внутрибрюшинного введения суспензии *A. baumannii* ATCC 17978 и последующим (через 30 минут после инфицирования) введением раствора LysSS в концентрациях 125 и 500 мкг/животное [75].

Группа животных, получавших лечение эндолизином в концентрации 125 мкг/животное, показала наивысшую выживаемость (40% на 4-й день от начала инфекции) по сравнению с контрольной группой и группой, получавшей лечение эндолизином в концентрации 500 мкг/животное, в которой смертность достигла 100% уже через 1 день после начала лечения. Исследование также показало отсутствие токсичности при применении эндолизина в концентрациях до 500 мкг/животное [75].

По мнению авторов, проводивших исследование, высокая смертность животных в группе, получавшей лечение эндолизином в концентрации 500 мкг/животное, была вызвана острым септическим или эндотоксическим шоком, причиной которого стал быстрый лизис *A. baumannii*, что говорит о необходимости тщательного подбора дозировки эндолизинов при терапии системных инфекций [75].

Аналогичные тенденции наблюдаются и в исследованиях других авторов. Например, в 2019 году Magdalena Plotka и соавторы опубликовали результаты определения бактерицидной активности эндолизина Ts2631 против грамтрицательных мультирезистентных бактерий [104].

В исследовании использовали различные штаммы *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *S. braakii*, *K. pneumoniae* и *E. cloacae*, обладающие резистентностью сразу к нескольким антибиотикам, например, в случае с *K. pneumoniae* KPD 298, к ампициллину, амоксициллину в комбинации с клавулановой кислотой, пиперациллину в комбинации с тазобактамом, цефалотину, цефуроксиму натрия и т.д. [104]

Рекомбинантный эндолизин показал высокую бактерицидную активность в отношении всех исследуемых бактерий в то время, как бактериофаг vB_Tsc2631, из которого был выделен эндолизин, активен только в отношении *Thermus*

scotoductus, что говорит о более широком спектре активности эндолизина по сравнению с бактериофагом-хозяином, также, как и в предыдущем примере [104].

Схожие результаты получены для эндолизина TSPp_hg, выделенного из бактериофага TSP4, активного в отношении бактерий рода *Thermus* [86, 128]. В отличие от предыдущего исследования, в данной работе определяли бактерицидную активность эндолизина в отношении не только грамотрицательных, но и в отношении мультирезистентных грамположительных бактерий, включая *S. aureus*, *S. epidermidis* и *Micrococcus luteus* [128].

Эндолизин показал высокую бактерицидную активность в отношении всех исследуемых микроорганизмов, что говорит о способности некоторых эндолизинов уничтожать бактерии с различной структурой клеточной стенки [128].

Помимо высокой активности в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, эндолизин показал способность улучшать заживление ран, инфицированных *S. aureus* на инфекционной модели раневой инфекции у лабораторных мышей. Для проведения исследования на раневую поверхность наносили 20 мкл бактериальной суспензии с содержанием клеток 1×10^5 КОЕ и через 24 часа после инфицирования начинали лечение. Лечение заключалось в ежедневном нанесении на раневую поверхность 100 мкл эндолизина в концентрации 50 мкг/мл. В качестве групп сравнения использовали группу, получавшую 100 мкл PBS (контрольная группа), группу, получавшую 100 мкл канамицина в концентрации 50 мкг/мл и интактную группу без инфицирования. Оценку эффективности проводили путем определения степени заживления, выраженной в процентах, а также путем определения титра бактерий на раневой поверхности [128].

Применение эндолизина и канамицина значительно ускорило заживление раны. Так, на 7 день после инфицирования степень заживления ран составила 89% для группы, получавшей лечение эндолизином, и 90% – для группы, получавшей лечение канамицином, при этом в интактной и контрольной группах степень заживления составляла 66% и 60% соответственно. Также, титр бактерий на раневой поверхности в группах, получавших лечение, упал со стартового значения

до приблизительно 55 КОЕ/мл, что говорит об эффективном уничтожении бактерий эндолизином и канамицином [128].

По мнению авторов, полученные результаты говорят об эффективности рекомбинантного эндолизина TSPphg в уничтожении *S. aureus* на раневых поверхностях и его способности ускорять заживление ран. Кроме того, авторы считают необходимой дальнейшую оптимизацию схемы лечения и считают возможным применение данного фермента в терапии раневых инфекций [128].

1.3.2 Комбинации эндолизинов

Учитывая различия в строении, организации, механизмах и спектрах действия различных эндолизинов, логично выглядит их применение в комбинации друг с другом для обеспечения разнонаправленного действия на бактериальные клетки и расширения спектра бактерицидной активности. Примеров такого применения на данный момент довольно мало, что можно объяснить относительной новизной данной темы и, как следствие, малым количеством проведенных исследований.

Тем не менее, исследования в данном направлении ведутся. Например, в 2019 году Raymond Schuch и соавторы опубликовали результаты работы, в ходе которой они определили спектр противомикробной активности эндолизина PlyB, выделенного из бактериофага ν B_BanS_Vcr1 [117], а также определили тип его взаимодействия с эндолизином PlyG, выделенным из γ -бактериофага *B. cereus* [116]. Предположение о возможной синергии двух ферментов возникло ввиду различного механизма действия [117].

Для оценки взаимодействия двух эндолизинов, определяли индекс фракционной ингибирующей концентрации, определение проводили на двух штаммах *B. anthracis* и двух штаммах *B. cereus*. Значение данного индекса колебалось от 0,185 до 0,250, что соответствует сильной синергии. Для подтверждения результатов опыта *in vitro* были проведены эксперименты *in vivo* на модели летальной инфекции *B. anthracis* Δ Sterne у лабораторных мышей. Через 1 час после заражения летальной дозой бактерий животным однократно

внутрибрюшинно вводили PlyB, PlyG или их смесь, выживаемость в опытных группах сравнивали с контрольной, получавшей физиологический раствор [117].

Оба эндолизина при индивидуальном применении обеспечили 100% выживаемость на 7 день в концентрации 5 мг/кг животного в то время, как выживаемость в контрольной группе в этой временной точке составляла 0-14%. При этом применение комбинации эндолизинов позволило достичь такого же результата уже при концентрации каждого белка 1,25 мг/кг животного (суммарная концентрация – 2,5 мг/кг), таким образом суммарная концентрация белка была в 2 раза ниже, чем в других группах. Также, применение комбинации эндолизинов в концентрации 0,312 мг/кг (суммарная концентрация – 0,625 мг/кг) позволило достичь выживаемости 71%, когда индивидуальные белки в концентрации 0,625 мг/кг обеспечили 28% выживаемости [117].

Основываясь на полученных данных, авторы говорят о возможности применения в терапии бактериальных инфекций комбинаций рекомбинантных эндолизинов для значительного усиления бактерицидной активности [117].

Синергия между эндолизинами не всегда сохраняется при различных условиях внешней среды. Так, при определении типа взаимодействия эндолизинов стрептококковых бактериофагов λ SA2 [108] и B30 [109], разрушающих различные участки пептидогликана, на *S. dysgalactiae*, индекс фракционной ингибирующей концентрации составлял 0,42, что говорит о сильной синергии [115].

Эндолизины не показали аналогичный эффект *in vivo* на инфекционной модели стрептококкового мастита у лабораторных мышей. Для проведения опыта лабораторных мышей заражали *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* или *S. uberis* путем внутримаммарной инъекции суспензии бактерий с содержанием клеток 10^2 КОЕ/мл. Через 45 минут после инфицирования животным через молочный проток вводили один из исследуемых эндолизинов или их смесь. Через 24 часа после начала инфекции животные подвергались эвтаназии и их молочные железы исследовались на содержание бактерий [115].

Как индивидуальные эндолизины, так и их смесь показали активность, отличную от таковой *in vitro*. У всех животных, получавших лечение, концентрация

бактерий в молочных железах была существенно ниже, по сравнению с контролем, однако было обнаружено, что оба эндолизина при индивидуальном применении проявили высокую активность относительно *S. agalactiae*, хотя при опыте *in vitro* данный вид был практически нечувствителен к их действию. Результаты, полученные при применении смеси эндолизинов были аналогичны или ниже результатов, полученных при применении индивидуальных белков (снижение титра бактерий на $10^{1,5}$ – $10^{4,5}$ КОЕ), что говорит об отсутствии синергии [115].

Таким образом, несмотря на малое количество данных, можно судить о возможности применения комбинаций эндолизинов для повышения эффективности и расширения спектра бактерицидной активности. Эффект, получаемый при комбинации рекомбинантных эндолизинов, не всегда является синергетическим, более того, в отдельных случаях проявление такого эффекта зависит от условий среды, в которой действуют белки, что говорит о необходимости комплексного подхода к разработке составов с несколькими белками и тщательного изучения их эффекта как *in vitro*, так и *in vivo*.

1.3.3 Комбинации эндолизинов с антибиотиками

Помимо комбинаций рекомбинантных эндолизинов друг с другом, учеными рассматривается возможность их применения совместно с антибиотиками для снижения концентрации последних и повышения эффективности терапии.

Например, в 2018 году Patricia Letrado и соавторы изучили синергетический эффект при совместном применении химерного стрептококкового эндолизина Ср1-711 [51], полученного путем сочетания структурных компонентов эндолизинов Ср1-1 [55] и Ср1-7S [52], и различных антибиотиков (амоксициллин, цефотаксим, левофлоксацин и ванкомицин) [85].

Исследование проводили на четырех полирезистентных штаммах *Streptococcus pneumoniae* (D39, 48, 450 и 3498). В случае со штаммами 450 и 3498 большинство комбинаций обладало аддитивным эффектом, за исключением комбинации с амоксициллином в первом случае и с ванкомицином – во втором, эти комбинации обладали синергетическим эффектом. С остальными штаммами все варианты комбинаций обладали синергетическим эффектом [85].

Для подтверждения полученных *in vitro* данных были проведены исследования *in vivo* на модели стрептококковой инфекции у мышей и рыбок данио. В случае с мышами комбинация Cpl-711 с цефотаксимом обеспечила 100% выживаемости в то время, как эндолизин или цефотаксим по отдельности обеспечивали выживаемость на уровне 58% и 67% соответственно. В контрольной группе, не получавшей лечение выживаемость составила 53% [85].

При определении эффективности комбинации эндолизина и цефотаксима на модели стрептококковой инфекции у рыбок данио, эндолизин и антибиотик отдельно обеспечили 23% и 48% выживаемости соответственно в то время, как их комбинация позволила достичь уровня выживаемости 100% на фоне тотальной гибели рыбок из контрольной группы [85].

Опираясь на полученные данные, авторы говорят о возможности применения комбинации цефотаксима и Cpl-711 для терапии заболеваний, вызванных полирезистентными штаммами *S. pneumoniae* [85].

Схожие результаты получены при исследовании эффекта, возникающего при комбинированном применении эндолизина SAL200 [70] и нафциллина или ванкомицина. Исследование проводилось на 5 метициллин-устойчивых штаммах *S. aureus*. Помимо исследований *in vitro* было проведено исследование *in vivo* на модели инфекции, вызванной *S. aureus* у мышей [74].

Комбинированной применение эндолизина с антибиотиками позволило значительно снизить МИК последних. Так, МИК нафциллина в отношении *S. aureus* ATCC B1707 при индивидуальном применении составляла 16 мкг/мл, а при добавлении эндолизина в концентрации 0,195 мкг/мл снижалась до 2 мкг/мл, что говорит о синергетическом эффекте, возникающем при комбинации данных веществ. Аналогичная картина наблюдалась и с другими штаммами для обоих вариантов комбинаций (SAL200 + нафциллин и SAL200 + ванкомицин) [74].

При проведении исследования *in vivo* комбинации эндолизина с антибиотиком показали наибольшую эффективность в снижении количества бактерий в крови лабораторных животных. Так, содержание бактерий в крови животных, инфицированных *S. aureus* Newman и получавших лечение

эндолизином, составило $2,284 \log_{10}$ КОЕ/мл, а при лечении комбинацией SAL200 с нафциллином – $1,635 \log_{10}$ КОЕ/мл. При этом в контрольной группе, не получавшей лечение, содержание бактерий составило $3,437 \log_{10}$ КОЕ/мл [74].

Исходя из полученных данных, авторы предполагают, что применение такой комбинации позволит повысить эффективность терапии инфекций, вызванных метициллин-устойчивым *S. aureus* [74].

Эффективность комбинированной терапии инфекций, вызванных метициллин-устойчивым *S. aureus*, также была показана Shivani Chopra и соавторами на инфекционной модели ожога у мышей. Исследовались антибиотик миноциклин и эндолизин MR-10 [49].

Исследование проводилось с использованием метициллин-устойчивого штамма *S. aureus*. Животные были разделены на 5 групп: контрольную (Группа 1), получавшую лечение миноциклином в концентрации 50 мг/кг животного (Группа 2), получавшую лечение эндолизином в количестве 50 мкг/животное (Группа 3), получавшую лечение миноциклином в концентрации 100 мг/кг животного (Группа 4) и получавшую лечение смесью эндолизина в количестве 50 мкг/животное и миноциклина в концентрации 50 мг/кг животного (Группа 5) [49].

У животных из Группы 5 уже на пятый день после инфицирования не обнаруживались бактерии в крови, а на шестой день они не обнаруживались в печени и селезенке. Выживаемость в данной группе составила 100%. Схожие результаты были получены для Группы 4, однако в этой группе из кровотока возбудитель исчезал на седьмой день после инфицирования. В Группе 2 и 3 наблюдалось значительное снижение содержания бактерий на пятый день после инфицирования, однако в обеих группах смертность составила 100% на седьмой день. В контрольной группе (Группа 1) смертность составила 100% уже на пятый день после инфицирования [49].

Таким образом, применение эндолизина MR-10 позволило снизить терапевтическую дозу миноциклина (обычно прописываемая доза составляет 100 мг/кг животного), что говорит о возможности применения такой комбинации в терапии инфекций, вызванных метициллин-устойчивым *S. aureus* [49].

1.3.4 Комбинация эндолизинов с полисахарид-деполимеразами

Новым направлением в применении эндолизинов является их комбинация с полисахарид-деполимеразами – ферментами, разрушающими полисахариды во внеклеточном матриксе биопленок и в капсулах бактерий (такими ферментами обладают некоторые стафилококковые бактериофаги [66]). В 2018 году Olsen и соавторы опубликовали результаты исследования эффективности комбинированного применения эндолизина LysK и деполимеразы DA7, полученной из *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [98].

Было изучено влияние на статичные и динамичные биопленки *S. aureus* эндолизина и деполимеразы по отдельности и в комбинации. Оба фермента показали способность разрушать биопленки как при индивидуальном применении, так и в комбинации, при этом комбинация, содержащая 25% DA7 и 75% LysK показала наилучшую эффективность. Так, после обработки статичной биопленки на стеклянной поверхности, остаточное количество клеток составляло (\log_{10} (КОЕ/мл)):

- при обработке буферным раствором (отрицательный контроль) – 7,5;
- при обработке DA7 в концентрации 0,625 нМ – 6,6;
- при обработке LysK в концентрации 1,25 мкМ – 5,7;
- при обработке DA7 и LysK в концентрации 0,156 нМ и 0,938 мкМ соответственно – 5,0 [98].

Таким образом, комбинация эндолизина и деполимеразы более эффективно уничтожала биопленку и позволила снизить концентрации компонентов, необходимые для достижения данного эффекта, что говорит о синергетическом взаимодействии этих ферментов и перспективности изучения данного направления [98].

1.4 Модификация эндолизинов для изменения их свойств

Помимо комбинирования эндолизинов с другими веществами, изменить их спектр активности, силу действия или устойчивость к воздействию факторов внешней среды можно путем модификации молекул (замена, добавление CBD, добавление линкеров или EAD, связывание с антимикробными пептидами и т. д.).

Например, сшивание EAD эндолизина термофильного бактериофага φGVE2 [129] с CBD эндолизина бактериофага φCP26F [118], активного в отношении *Clostridium perfringens*, позволило получить химерный эндолизин, проявляющий высокую активность в отношении данного возбудителя и стабильный при воздействии температур до 50°C, в то время, как эндолизин бактериофага φCP26F сохранял активность при температурах до 22°C [122].

Основываясь на полученных данных и на важности указанного возбудителя (*C. perfringens* является третьим по значимости возбудителем бактериальных инфекций человека, передающихся через пищу, а также является этиологическим агентом некротического энтерита у кур) авторы считают полученный химерный эндолизин PlyGVE2CpCWB перспективным кандидатом для использования в птицеводстве для предотвращения указанного заболевания и заражения человека [122].

Другим примером получения химерного эндолизина является работа Натальи Ковальской и соавторов, опубликованная в 2019 году. В ходе данной работы был получен химерный эндолизин, обладающий тремя ферментативными активностями, что было достигнуто путем соединения EAD эндолизина стрептококкового профага λSA2 [108] (D-глутамин-L-лизин эндопептидаза), EAD эндолизина стафилококкового бактериофага 2638A [36] (N-ацетилмурамоил-L-аланин амидаза) и лизостафина – бактериолизина, продуцируемого *Staphylococcus simulans* [41] (глицил-глицин эндопептидаза). Полученный таким образом эндолизин, штаммом-продуцентом которого являлась *E. coli*, проявлял высокую активность в отношении метициллин-устойчивых штаммов *S. aureus* (подавление роста на 60% и более) [78].

Основной целью данного исследования было получение растения, продуцирующего химерный эндолизин, для последующего использования такого растения в профилактике и терапии инфекций, вызванных MRSA у животных. Было получено растение-продуцент, которым являлся табак Бентхама, однако активность синтезируемого им химерного эндолизина была значительно ниже таковой у эндолизина, продуцируемого *E. coli* (подавление роста в среднем

составляло 14%). Авторы говорят о необходимости дальнейшего подбора и оптимизации растения-продуцента для получения активного химерного эндолизина и перспективности данного фермента для профилактики и терапии инфекций в животноводстве [78].

Помимо указанных, существуют примеры значительного усиления действия химерных эндолизинов по сравнению с предшественниками. Так, известна работа по получению химерного эндолизина EC300, активного в отношении *Enterococcus faecalis*, путем сшивания EAD вирион-ассоциированного лизина Orf73 (эндопептидаза) и CBD эндолизина Lys170 [110], оба предшественника были получены из бактериофага F170/08, активного в отношении *E. faecalis* [111].

Модификация позволила значительно повысить активность фермента и ускорить его действие. Так, химерный эндолизин снижал OD₆₀₀ бактериальной суспензии на 85% за 20 минут в то время, как Lys170 за это же время снижал OD₆₀₀ на 50%. Авторы считают, что полученные данные позволяют судить о разработке нового направления в применении эндолизинов, позволяющего получать ферменты с повышенной активностью [111].

Помимо направленной модификации эндолизинов для придания ферменту конкретных свойств известен подход, при котором домены различных эндолизинов «перемешивают» друг между другом в случайном порядке и в последствии отбирают химерные белки с необходимыми свойствами. Например, в 2021 году Christine Landlinger и соавторами опубликованы результаты работы, в ходе которой был сконструирован химерный эндолизин, обладающий повышенной активностью в отношении бактерий рода *Garnerella* и не влияющий на представителей нормальной микрофлоры [82].

Для получения эндолизина с улучшенными свойствами из участков генома нескольких видов *Garnerella*, похожих на профаги, было выделено 14 участков, предположительно кодирующих эндолизины, и после проверки их активности на четырех видах *Garnerella*, были отобраны 10 ферментов, обладающих характерными для эндолизинов свойствами. Затем EAD одних полученных эндолизинов последовательно сшивали с CBD других, в результате чего был

получен 81 химерный эндолизин для последующей проверки бактерицидной активности на четырех видах *Garnerella* [82].

Один из исследуемых ферментов показал высокую активность в отношении всех четырех видов бактерий, снижая их концентрацию в среднем на $4,3 \log_{10}$ КОЕ/мл, этому химерному эндолизину было присвоено название РМ-477 и он был отобран для последующих исследований [82].

В последующих экспериментах было проведено сравнение полученного фермента со стандартными антибиотиками, используемыми в терапии инфекций, вызванных представителями рода *Garnerella* (клиндамицин, метронидазол, тедизолид). Исследование проводили на 20 штаммах *G. vaginalis*, *G. leopoldii*, *G. piovii*, *G. swidsinskii*, *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii*. Химерный эндолизин показал высокую активность в отношении всех представителей рода *Garnerella* со значениями МИК от 0,13 мкг/мл до 8 мкг/мл, не оказывая влияния на представителей рода *Lactobacillus* (МИК > 128 мкг/мл). При этом, из 20 исследованных штаммов *Garnerella*, 12 были устойчивы к действию метронидазола и 15 – к действию тедизолида, клиндамицин был активен в отношении всех исследованных штаммов *Garnerella*, но также проявлял активность в отношении рода *Lactobacillus* [82].

Полученный химерный эндолизин показал способность уничтожать биопленки *Garnerella* на вагинальных эпителиальных клетках пациентов с бактериальным вагинозом [82].

Таким образом, разработанный в ходе данного исследования химерный эндолизин является перспективным кандидатом для терапии бактериального вагиноза у пациентов и доказывает возможность получения эндолизинов с повышенной активностью путем их модификации [82].

Помимо объединения доменов различных эндолизинов, улучшить их свойства можно путем присоединения доменов, не относящихся к эндолизинам. Данное направление позволило создать отдельный класс белков под названием «Артилизины», которые представляют собой эндолизины, соединенные с липополисахарид-дестабилизирующими пептидами (LPS-destabilizing peptides),

что повышает их активность в отношении грамотрицательных бактерий ввиду повышения способности к проникновению через липополисахаридную мембрану. В 2014 году Yves Briere и соавторы опубликовали результаты работы по конструированию таких эндолизинов и изучению их свойств [42].

Суммарно в ходе исследования было сконструировано 49 артилизинов, состоящих из эндолизинов OVPgp279 (получен из синегнойного бактериофага OVP) или PVP-SE1gp146 (получен из сальмонеллезного бактериофага PVP-SE1) [127] и ЛПС-дестабилизирующих пептидов:

- поликатионный нонапептид (polycationic nonapeptide, PCNP),
- гидрофобный пентапептид (hydrophobic pentapeptide, HPP),
- Паразин I,
- Ликотоксин I [42].

Активность полученных артилизинов проверяли на нескольких штаммах *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica* и *A. baumannii*. Наибольшую активность показали эндолизин OVPgp279 и PVP-SE1gp146 с PCNP N-конце молекулы. Также, PCNP-PVP-SE1gp146 показал эффективность в уничтожении *P. aeruginosa* на инфекционной модели кожной инфекции на кератиноцитах человека. Применение артилизина позволило снизить число бактерий на 71% в то время, как немодифицированный эндолизин снижал их число на 31% [42].

Авторами было проведено определение эффективности полученного артилизина *in vivo* на инфекционной модели *P. aeruginosa* у нематод. Применение артилизина позволило достичь уровня выживаемости 63% в то время, как немодифицированный эндолизин обеспечил выживаемость на уровне 40%, а ципрофлоксацин (антибиотик, используемый для терапии такого рода инфекций) – 45% [42].

Проведенное исследование показывает, что артилизин могут иметь потенциально широкую область применения, ввиду повышенной активности в отношении грамотрицательных бактерий, начиная от местного применения, лечения слизистых оболочек и заканчивая дезинфекцией, применением в пищевой промышленности и сельском хозяйстве [42].

1.5 Лекарственные формы эндолизинов

Учитывая позитивные данные об эффективности и безопасности эндолизинов, закономерным продолжением описанных выше работ является разработка препаратов на их основе. Такая разработка осложняется высокой лабильностью данных ферментов, а именно их чувствительностью к рН, температуре, содержанию различных солей, а также их способности к агрегации в растворах [44, 70, 97].

Наиболее распространенным на данный момент направлением является разработка лекарственных форм эндолизинов для парентерального применения в связи с относительной простотой изготовления и малой нагрузкой вспомогательными веществами, что положительно сказывается на стабильности ферментов [50].

В 2012 году Soo Youn Jun и соавторы опубликовали результаты разработки лекарственной формы для внутривенного введения, содержащей в качестве действующего вещества эндолизин SAL-1, активный в отношении *S. aureus* [71], лекарственная форма получила название SAL200 [70].

Согласно данным, полученным авторами ранее [71], SAL-1 проявлял наибольшую активность в присутствии ионов кальция, однако при этом его стабильность была наихудшей (через 5 минут небольшого перемешивания раствора происходила агрегация молекул фермента [71, 70]). В связи с этим основной целью авторов было создание лекарственной формы, содержащей ионы кальция и одновременно обеспечивающей стабильность эндолизина.

Поставленной цели удалось достичь, введя в состав лекарственной формы 0,1% (м/о) Поллоксамера 188, предотвращающего агрегацию молекул эндолизина. Также, для обеспечения стабильности и высокой активности в состав лекарственной формы были введены 5% (м/о) сорбитола и 10 мМ CaCl₂, в качестве растворителя использовался 0,01 М раствор L-гистидина с рН = 6,0 (оптимальное значение для данного эндолизина) [70].

Полученный препарат сохранял стабильность в течение 8 недель хранения при 4°C и в течение 4-х часов при активном перемешивании. Эффективность

препарата была определена на инфекционной модели мышей, зараженных MRSA. Применение разработанного препарата, содержащего эндолизин в концентрации 25 мг/мл позволило достичь уровня выживаемости 100% в то время, как в контрольной группе животных, получавших плацебо выживаемость составила 20% [70].

Другим распространенным направлением в разработке препаратов эндолизинов является создание лекарственных форм для местного применения [50]. Так, в 2018 году Mengjun Cheng и соавторы опубликовали результаты разработки мази, содержащей в качестве действующих веществ эндолизин LysGH15, активный в отношении *S. aureus* [64], включая метициллин-резистентные штаммы, и апигенин, обладающий противовоспалительным эффектом и предотвращающий гемолиз, вызываемый *S. aureus* [48].

Оба действующих вещества вводились в состав коммерческой мази «Aquarhog», в состав которой входят петролатум, минеральное масло, церезин, ланолиновый спирт, пантенол, глицерин и бисаболол [48].

В проведенном исследовании *in vivo* на модели кожной инфекции у мышей, вызванной MRSA, разработанный препарат показал высокую эффективность, снижая содержание бактерий до 0 КОЕ/мг ткани через 96 часов от начала терапии в то время, как в контрольной группе, получавшей плацебо, в данной временной точке число бактерий составляло 10^5 КОЕ/мг ткани. Кроме того, разработанный препарат снижал уровень провоспалительных цитокинов, ингибировал гемолиз и ускорял заживление ран [48].

Другим примером лекарственной формы эндолизинов для местного применения является трансдермальная форма, содержащая наночастицы поли(N-изопропилакриламида) (PNIPAM, [40]), включающие в себя эндолизин SHAP_K, активный в отношении *S. aureus* [56] и лизостафин, описанный ранее [41, 68].

Использование PNIPAM позволяет получить термически контролируемое высвобождение действующих веществ, которое происходит при 37°C, что было подтверждено путем помещения испытуемых и контрольных образцов (плацебо) в суспензию MRSA в титре $1,2 \times 10^8$ КОЕ/мл при температурах 32 и 37°C с

последующим посевом полученного раствора на твердую питательную среду. Подавление бактериального роста наблюдалось только при растворении испытуемого образца при 37°C, что свидетельствует о высвобождении действующих веществ только при заданной температуре [68].

Известен пример терапии пневмококковой пневмонии с использованием эндолизина Cp1-1 в форме аэрозоля [53]. Для получения лекарственной формы эндолизин растворяли в физиологическом растворе в количестве 1000 Ед / мл (16 мг/мл).

Изучение эффективности изготовленного препарата проводили на инфекционной модели пневмококковой пневмонии у лабораторных мышей с использованием возбудителя *S. pneumoniae* серотип 3 (NCTC 7978). Через 24 часа после интраназального заражения животных (время, необходимое для развития инфекции) им проводили трансоральную интубацию трахеи и вводили 25 мкл препарата (опытная группа) или физиологического раствора (контрольная группа). Введение производили однократно ввиду высокой концентрации эндолизина [53].

Применение эндолизина позволило достичь выживаемости 80% животных в опытной группе к концу периода наблюдения (10 суток) в то время, как в контрольной группе выживаемость через 84 часа после инфицирования составила 0%. В процессе исследования также измеряли вес и температуру тела лабораторных животных каждые 12 часов. Вес животных через 24 часа после заражения резко снижался во всех группах, но в опытной группе возвращался к норме через 108 часов после инфицирования. Температура тела животных в контрольной группе резко снижалась (с 37°C через 24 часа после инфицирования до 32,5°C через 72 часа после инфицирования), температура животных в опытной группе оставалась в пределах нормы на протяжении всего эксперимента [53].

Терапия аэрозолем эндолизина также привела к резкому повышению уровня цитокинов и уменьшению количества инфильтрата в легких [53].

Таким образом, однократная ингаляция эндолизина Cp1-1 через 24 часа после инфицирования позволила уменьшить бактериальную нагрузку в легких и предотвратить бактериемию, что привело к быстрому восстановлению

лабораторных животных. Полученные данные говорят о возможности использования эндолизина Cpl-1 для терапии пневмококковой пневмонии [53].

В 2019 году Singh V. Gondil и соавторы опубликовали результаты разработки системы доставки эндолизина Cpl-1 для терапии пневмококковой пневмонии, которая позволит повысить биодоступность [63].

Система доставки представляет собой наночастицы хитозана, в которые инкапсулирован эндолизин. Изготовление данной системы проводилось с использованием метода ионного гелеобразования, для оптимизации состава и технологии авторы варьировали различные физико-химические параметры (рН, время перемешивания, концентрация эндолизина и т.д.). Были проведены исследования цитотоксичности и иммуногенности разработанного препарата [63].

Проведенные исследования показали мукоадгезивные свойства разработанного препарата и доказали биосовместимость, гемосовместимость, а также отсутствие цитотоксического действия. В последующих исследованиях авторы планируют провести исследования эффективности разработанного препарата на инфекционной модели пневмококковой пневмонии у лабораторных мышей [63].

Схожий подход использовали Kaug J. и соавторы, опубликовавшие в 2020 году результаты исследования, в ходе которого они инкапсулировали эндолизин LysMR5, активного в отношении *S. aureus*, в альгинат-хитозановые наночастицы [72].

Способ получения наночастиц был аналогичен описанному выше. Были проведены исследования бактерицидного действия, биосовместимости, гемосовместимости и высвобождения эндолизина в фосфатном буфере с рН = 7,2. Согласно результатам исследований разработанная лекарственная форма была био- и гемосовместима и обладала двухэтапным высвобождением, которое быстро достигало 40% в течение 4 часов и продолжало медленно расти, достигая максимума (81%) через 36 часов [72].

При изучении бактерицидного действия разработанной системы доставки методом диффузии в агар сравнивали «пустые» наночастицы, наночастицы с

эндолизином, инкапсулированный эндолизин и фосфатный буфер. Хорошую бактерицидную активность показали как «пустые» наночастицы, так и инкапсулированный и неинкапсулированный эндолизин, диаметр зоны подавления роста составлял $14 \pm 1,5$ мм, $22,5 \pm 1,5$ мм и $18 \pm 2,0$ мм соответственно, что говорит о наличии аддитивного эффекта при инкапсулировании эндолизина [72].

Авторы говорят о возможности применения разработанной системы доставки для терапии инфекций, вызванных *S. aureus* и необходимости дальнейших исследований на инфекционной модели [72].

Известен пример инкапсулирования эндолизина LysRODI в pH-чувствительные липосомы для терапии инфекций, вызванных MRSA. Инкапсулирование в липосомы позволяет осуществлять таргетную доставку действующего вещества в условиях низкого значения pH ($\sim 5,0$) [107].

Активность инкапсулированного эндолизина была изучена в сравнении с неинкапсулированным белком, пустыми липосомами и буферным раствором. В то время, как пустые липосомы и буферный раствор не оказывали влияния на рост бактериальных клеток, инкапсулированный эндолизин вызывал снижение числа бактерий на $0,77 \pm 0,04$ и $2,06 \pm 0,03 \log_{10}(\text{КОЕ/мл})$ через 15 и 60 минут соответственно. Неинкапсулированный эндолизин показал значительно более высокую активность через 15 минут, однако после данной временной точки его активность была близка к инкапсулированному эндолизиону [107].

Инкапсулированный эндолизин также показал активность в отношении биопленок, снижая титр бактерий на $1,03 \pm 0,00$, $0,139 \pm 0,06$ и $1,90 \pm 0,03 \log_{10}(\text{КОЕ/мл})$ для трех различных штаммов MRSA [107].

В последствии инкапсулирование эндолизинов в липосомы позволит получать препараты, обладающие контролируемым высвобождением и осуществляющие таргетную доставку эндолизина [107].

Помимо терапевтического, эндолизины также могут найти применение в профилактике инфекций. Например, в 2019 году Linnea Nilebäck и соавторы представили вариант шелкового покрытия для ортопедических и дентальных имплантов, при использовании которых часто возникают имплант-

ассоциированные инфекции, вызванные *S. aureus*, что приводит к плохой остеоинтеграции и возможности отторжения имплантата [93].

Покрытие было изготовлено из рекомбинантного шелка паука с иммобилизованными на нем Дисперсином Б (DspB, фермент, разрушающий биопленки [113]), PlySs2 (эндолизин показывающий высокую активность против *Streptococcus suis* на слизистых оболочках [62]) или SAL-1 (эндолизин, активный в отношении *S. aureus* и описанный ранее [71]). Испытания, проведенные с данными покрытиями, показали их способность предотвращать адгезию бактерий и образование биопленок. Так, через 1 час выдерживания в суспензии *S. aureus* с концентрацией бактерий 3×10^8 КОЕ/мл, число бактерий на покрытии с DspB в среднем составляло $1,5 \times 10^6$ КОЕ/см², на покрытии с PlySs2 – $2,5 \times 10^6$ КОЕ/см², а на покрытии с SAL-1 – 3×10^6 КОЕ/см² в то время, как на контрольных образцах (шелк без иммобилизованных ферментов) оно составляло в среднем $9,5 \times 10^6$ КОЕ/см², что говорит о снижении адгезии бактерий на импланте [93].

Также, бактериальные клетки, оставшиеся на покрытии с иммобилизованными ферментами, показали более высокую мобильность, по сравнению с контрольным образцом, что было показано путем отмывания тестовых образцов при 120 rpm (rounds per minute, обороты в минуту). После данной процедуры число бактерий на испытуемых образцах снизилось на 83%, 71% и 53% для образцов с иммобилизованными DspB, PlySs2 и SAL-1 соответственно. На контрольных образцах содержание бактерий снизилось лишь на 13%, что говорит о повышенной мобильности клеток на испытуемых образцах. Помимо всего, указанного выше, все образцы показывали хорошую адгезию и рост на них остеобластов [93].

Основываясь на полученных данных, авторы говорят о возможности широкого применения такого рода покрытий для предотвращения развития инфекций после имплантации и улучшения приживаемости имплантов [93].

Существует пример иммобилизации эндолизина Ply500 на кремниевых наночастицах с последующим нанесением на пленку из поли(гидроксиэтилметакрилата) (hydroxyethyl methacrylate, НЕМА) или аффинное

связывание данного фермента с наночастицами крахмала, пригодными для применения внутрь. Эндолизин Ply500 активен в отношении *L. monocytogenes* и ее безопасного суррогата – *L. innocua* [119].

После изготовления описанных выше образцов была определена их активность в отношении суспензионной культуры *L. innocua* в PBS (в титре 10^5 КОЕ/мл). Фермент, иммобилизованный на НЕМА пленке, вызывал снижение титра бактерий на $1,6 \pm 0,12 \log_{10}(\text{КОЕ/мл})$, а фермент, иммобилизованный на наночастицах крахмала – на $2,9 \pm 0,18 \log_{10}(\text{КОЕ/мл})$. Образцы также показали стабильность специфической активности при хранении в течение 30 дней при 4°C [119].

По мнению авторов разработанные составы могут применяться для деконтаминации пищевых продуктов. Так, эндолизин, иммобилизованный на наночастицах крахмала, пригоден для обработки пищи перед упаковкой, а фермент, иммобилизованный на пленке – непосредственно для упаковки продуктов питания [119].

Альтернативным способом доставки эндолизинов может стать штамм-продуцент, синтезирующий эндолизин непосредственно в организме пациента или животного, которому необходима терапия. Такой подход использовали Teresa Gervasi и соавторы, создав штамм *Lactobacillus johnsonii* FI9785, синтезирующий эндолизин CP25L, активный в отношении *Clostridium perfringens* [61].

Для подтверждения синтеза эндолизина штаммом-продуцентом была определена бактерицидная активность экстрактов из штамма-продуцента, выращиваемого с и без добавления низина, а также экстракт из интактных клеток. Эксперимент показал, что в первых двух случаях экстракты обладали схожей бактерицидной активностью, что говорит об отсутствии необходимости в индукции синтеза эндолизина при помощи низина. В случае с интактными клетками бактерицидной активности не наблюдалось [61].

Авторы предлагают использовать разработанный подход для профилактики и терапии инфекций, вызванных *C. perfringens* у домашней птицы. В последующих исследованиях авторы планируют определить эффективность разработанного

штамма *in vivo* как при индивидуальном применении, так и в комбинации с другими противомикробными препаратами [61].

Таким образом, активное изучение эндолизинов бактериофагов позволило получить множество данных об их структуре, механизмах действия, стабильности и эффективности как *in vitro*, так и *in vivo* при индивидуальном применении и в комбинации с другими эндолизинами, антибиотиками и ферментами. Понимание данных аспектов позволило получить модифицированные рекомбинантные эндолизины, обладающие более широким спектром активности, лучшей стабильностью и повышенной эффективностью. В настоящее время разрабатываются лекарственные формы рекомбинантных эндолизинов с различными подходами к дизайну (способы доставки, пути введения, стабилизация молекул действующих веществ и т.д.).

Данные, полученные учеными в ходе работ в этом направлении, говорят о перспективности применения рекомбинантных эндолизинов для терапии и профилактики инфекций, вызванных резистентными микроорганизмами. Работы, проведенные в части фармацевтической разработки, говорят о возможности создания препаратов рекомбинантных эндолизинов, которые могут стать эффективной и безопасной альтернативой применению антибиотиков.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Изучение субстанций рекомбинантных эндолизинов

В ходе диссертационной работы необходимо было решить ряд задач, связанных с обеспечением широкого спектра антибактериального действия ГЛФ, ее безопасности, эффективности, надлежащего качества, стабильности в пределах заданного срока хранения и постоянства условий технологического процесса.

Для последовательного решения данных проблем работа была разделена на несколько этапов:

- Выбор кандидатных АФС рекомбинантных эндолизинов (обеспечение широкого спектра действия);
- Разработка состава лекарственной формы (Обеспечение эффективности и стабильности ГЛФ);
- Разработка проекта нормативной документации (обеспечение надлежащего качества ГЛФ и определение сроков хранения);
- Разработка лабораторного регламента получения ГЛФ (обеспечение постоянства условий технологического процесса);
- Проведение исследований *in vivo* (подтверждение эффективности и безопасности ГЛФ).

Каждый из этапов содержал одну или несколько задач, поставленных исходя из проблем, которые необходимо было решить в ходе разработки ГЛФ. Так, для обеспечения широкого спектра действия необходимо было провести скрининг спектра противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов и выбрать ферменты, влияющие на наибольшее число исследуемых бактерий.

В случае попадания ГЛФ в кровь необходимо было обеспечить отсутствие иммуногенности и отсутствие влияния препарата на нормофлору, что требовало изучения действия отдельных рекомбинантных эндолизинов на ее представителей, изучение иммуногенности препарата и т.д.

На рисунке 2 представлено схематичное описание разработанного дизайна исследования, отражающее все этапы, проблемы и задачи, связанные с разработкой готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов.

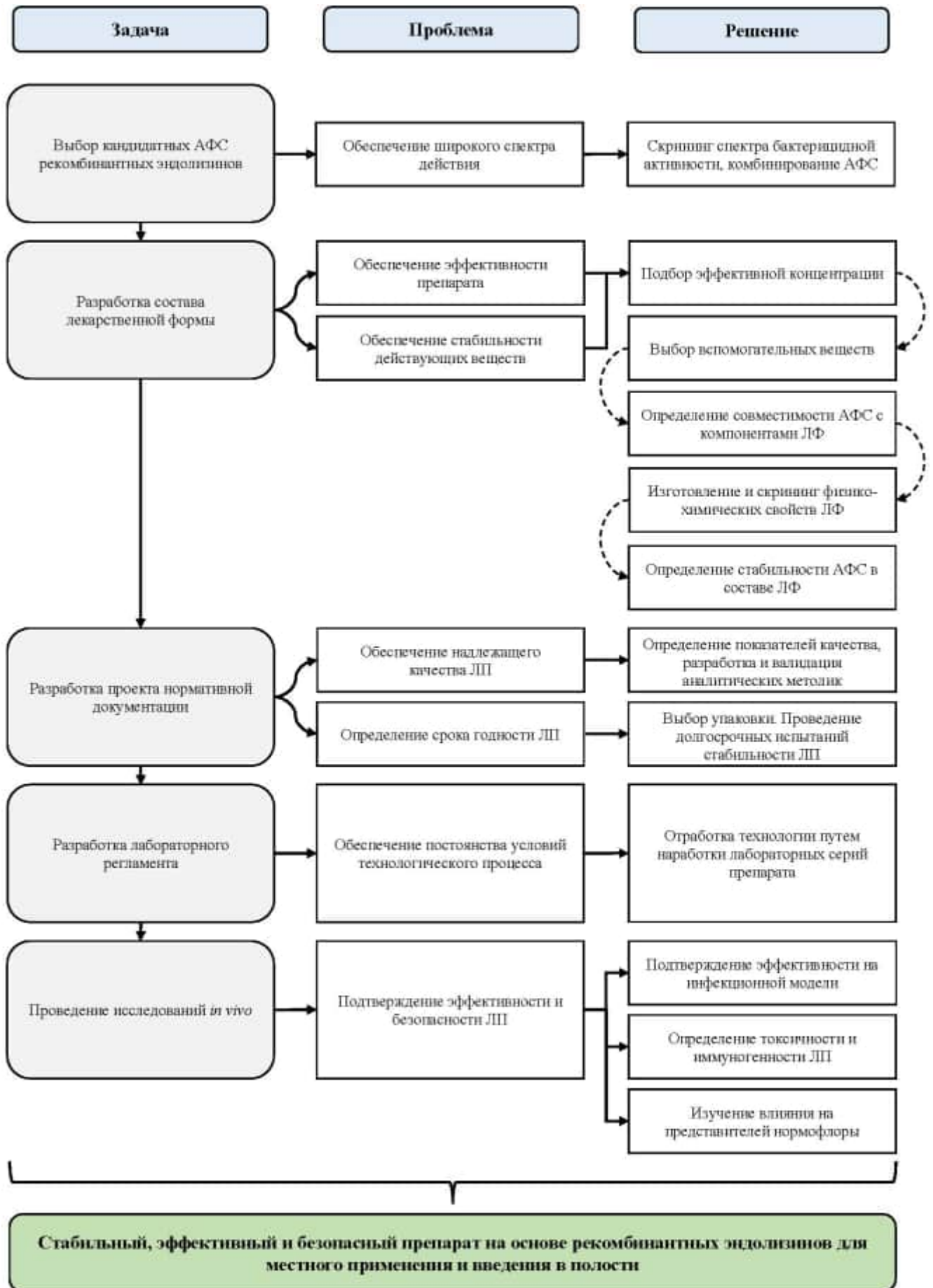


Рисунок 2 – Дизайн исследований

На первом этапе исследований необходимо было провести определение спектра бактерицидной активности рекомбинантных эндолизин в отношении грамотрицательных бактерий.

Для проведения исследований были выбраны рекомбинантные эндолизин бактериофагов ECD7 (бактериофаг активен в отношении *E. coli*, *Shigella sonne* и *S. flexneri* [37]), AM24 (бактериофаг активен в отношении *A. baumannii* [105]), AP22 (бактериофаг активен в отношении *A. baumannii* [106]), SI3 (бактериофаг активен в отношении *S. enterica* Infantis [2]) и ST11 (бактериофаг активен в отношении *S. enterica* Typhimurium [2]). Предположительно, рекомбинантные эндолизин данных бактериофагов должны обладать более широким спектром действия, ввиду меньшей специфичности. Учитывая данное предположение, один или несколько из выбранных рекомбинантных эндолизин должны обеспечить широту спектра действия разрабатываемой ГЛФ.

Также, с учетом возможности попадания ГЛФ в кровь при местном применении за счет всасывания или повреждений кожного покрова на раневых поверхностях с последующим возможным выведением через желчные протоки в кишечник, во избежание действия рекомбинантных эндолизин на нормофлору необходимо было отобрать эндолизин, не влияющие на представителей нормальной микрофлоры. Кроме того, учитывая возможность системного действия при местном применении за счет описанного выше механизма, необходима проверка иммуногенности.

2.1 Определение чувствительности штаммов микроорганизмов к эндолизинам LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11

Определение чувствительности штаммов микроорганизмов к рекомбинантным эндолизинам проводили по опубликованным методикам [38, 39] с модификациями в части питательных сред и способов культивирования и подготовки бактериальных суспензий в зависимости от особенностей микроорганизмов.

Культивирование *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica*, *A. baumannii* и *Enterobacter spp.* проводили на агаре Мюллера-Хинтона и МПБ бульоне.

Культивирование и подготовку бактериальных суспензий штаммов *C. jejuni* проводили по следующему алгоритму: подготовка суспензий бактериальных клеток штаммов *C. jejuni* проводилась из суточных культур, полученных на поверхности колумбийского агара (Conda, Испания) с добавлением 10% стерильной дефибрированной крови в чашках Петри при инкубировании в CO₂-инкубаторе NB-203 (N-BIOTEK, Корея) при +37±0,4°C и содержании в атмосфере углекислого газа 5%. Культуры с плотной питательной среды суспендировались в 20 мМ Трис-HCl буфер при pH=7,5 до достижения мутности по МакФарланду равной 0,5 единиц.

После смешивания суспензии бактерий с рекомбинантными эндолизинами, как описано в методиках [38, 39] и инкубирования при +37±0,4°C и содержании в атмосфере углекислого газа 5% в течение 30 минут с непрерывным шутеллированием при 200 rpm проводилась подготовка 10-кратных разведений в PBS. Разведения 10⁻¹ и 10⁻² в объеме 100 мкл наносились на поверхность кровяного агара (КА) (основа ГРМ-агар, ГНЦ ПМБ, Россия) с добавлением 5% стерильной дефибрированной крови в чашках Петри и равномерно распределялись по его поверхности стеклянным шпателем Дригальского до полного высыхания на поверхности питательной среды. Чашки инкубировались при +37±0,4°C и содержании в атмосфере углекислого газа 5% в течение двух суток, после чего производился подсчет колоний.

2.1.1 *LysECD7*

Согласно опубликованным данным, бактериофаг ECD7, являющийся источником изучаемого эндолизина, обладает литической активностью только в отношении *E. coli*, *S. sonne* и *S. flexneri* [37]. Для определения спектра бактерицидной активности рекомбинантного эндолизина LysECD7 изучали чувствительность к нему штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica*, *A. baumannii*, *Enterobacter spp.* и *C. jejuni* (Рисунки 3-9). Оранжевым цветом на

рисунках обозначены недостоверные результаты ($p > 0,05$). Если статистическая обработка не доказывала достоверность полученных результатов, то их не учитывали при интерпретации.

На рисунке 3 представлены результаты определения чувствительности *K. pneumoniae* к рекомбинантному эндолизину LysECD7.

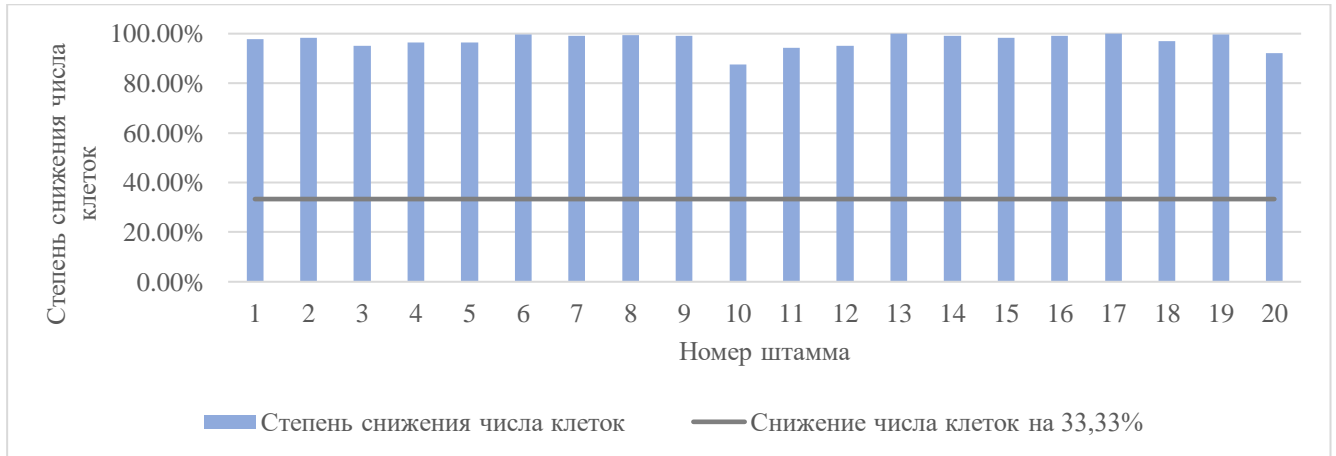


Рисунок 3 – Чувствительность *K. pneumoniae* к LysECD7

Так, все исследуемые штаммы были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 92,16 до 100,00%), что говорит о высокой активности LysECD7 в отношении штаммов *K. pneumoniae*.

На рисунке 4 представлены результаты определения чувствительности *P. aeruginosa* к рекомбинантному эндолизину LysECD7.

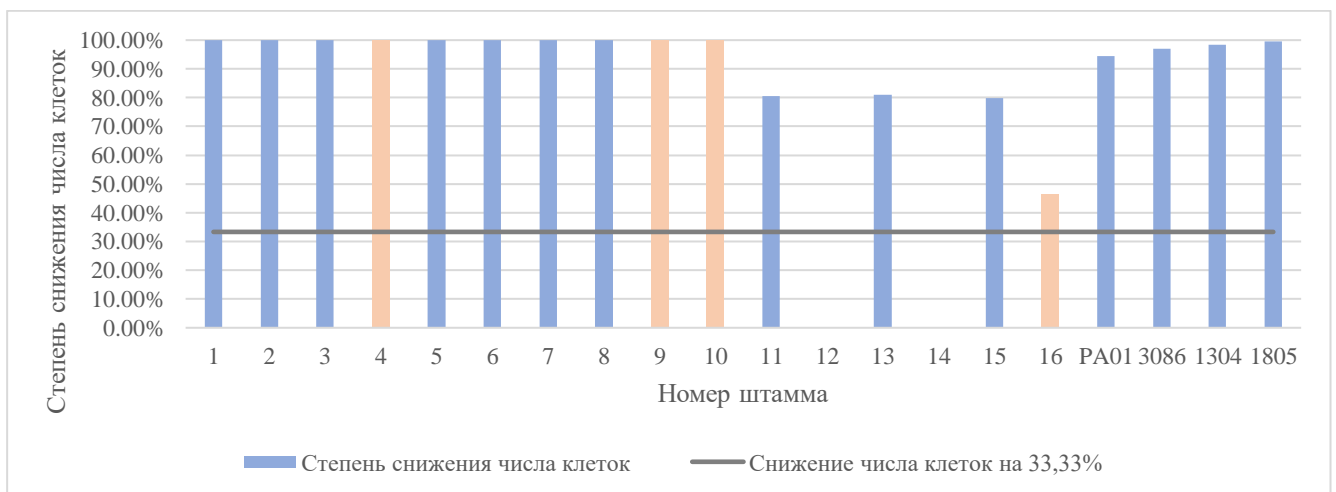


Рисунок 4 – Чувствительность *P. aeruginosa* к LysECD7

Из 20 исследованных штаммов 14 были чувствительны к рекомбинантному эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов

составило от 80,98 до 100,00%), по чему можно судить о высокой активности LysECD7 в отношении штаммов *P. aeruginosa*.

На рисунке 5 представлены результаты определения чувствительности *E. coli* к рекомбинантному эндолизину LysECD7.

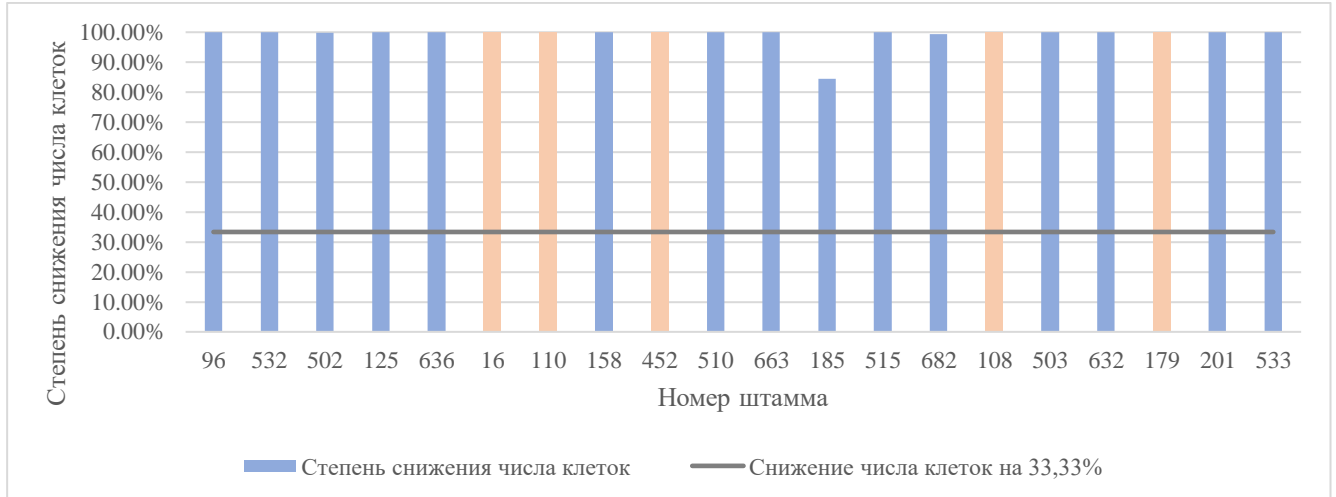


Рисунок 5 – Чувствительность *E. coli* к LysECD7

Из 20 изучаемых штаммов *E. coli* 15 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 84,74 до 100,00%). Полученные результаты показывают высокую чувствительность данных штаммов к LysECD7.

На рисунке 6 представлены результаты определения чувствительности *S. enterica* к рекомбинантному эндолизину LysECD7.

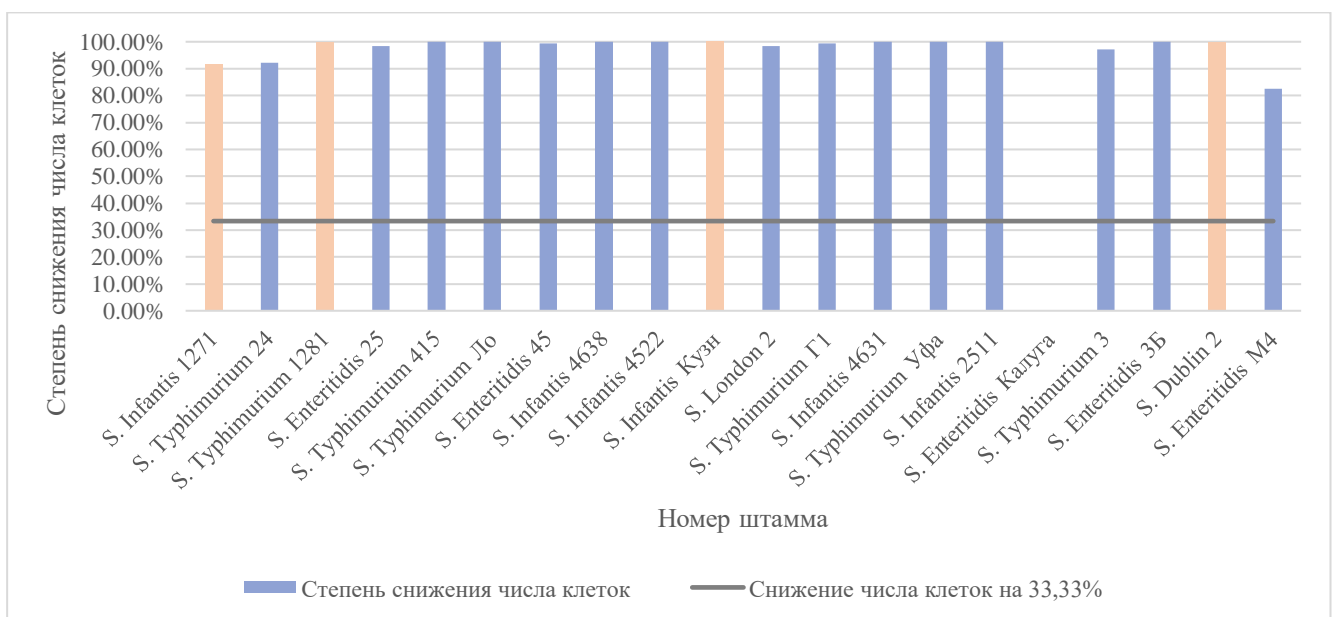


Рисунок 6 – Чувствительность *S. enterica* к LysECD7

Из 20 изучаемых штаммов 15 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 82,62 до 100,00%), что демонстрирует высокую активность LysECD7 в отношении штаммов *S. enterica*.

На рисунке 7 представлены результаты определения чувствительности *A. baumannii* к рекомбинантному эндолизину LysECD7.

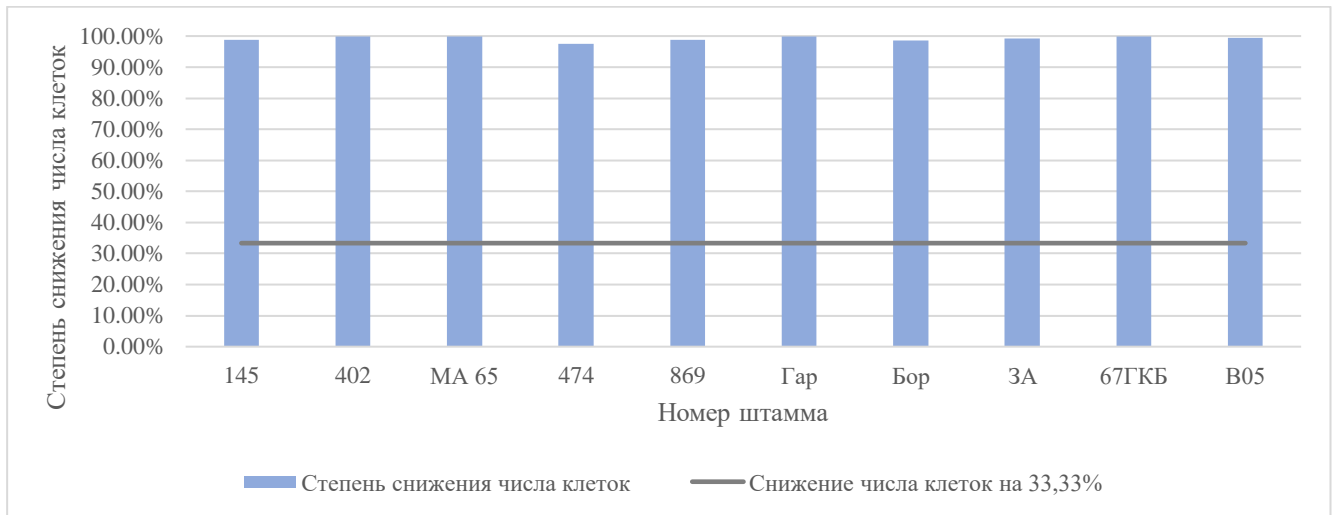


Рисунок 7 – Чувствительность *A. baumannii* к LysECD7

Так, все исследуемые штаммы были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 97,49 до 99,88%), на основании чего был сделан вывод о высоком уровне противомикробной активности LysECD7 в отношении *A. baumannii*.

На рисунке 8 представлены результаты определения чувствительности *Enterobacter spp.* к рекомбинантному эндолизину LysECD7.

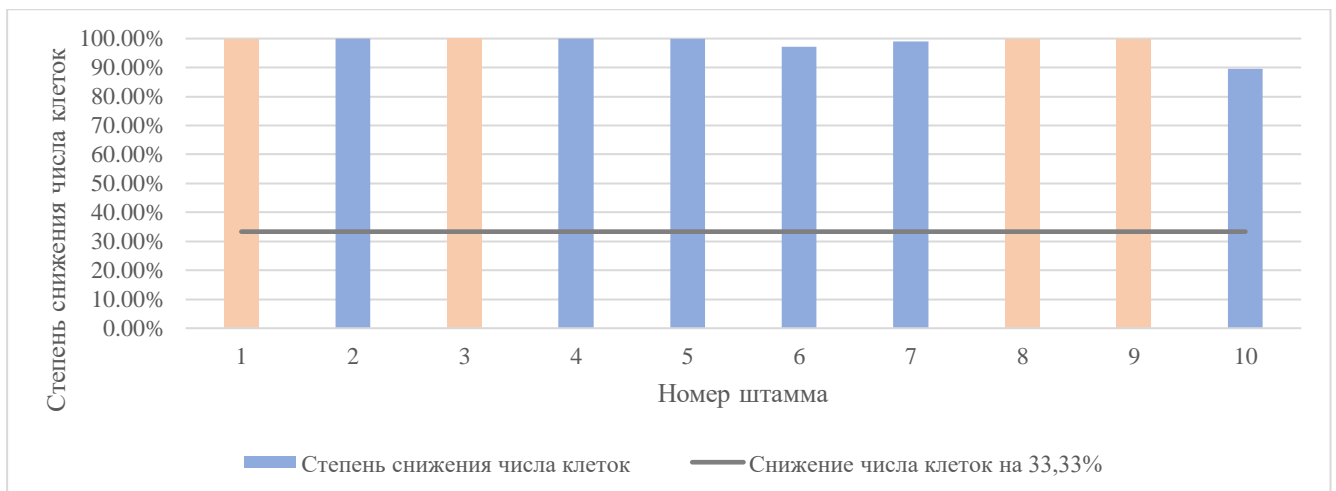


Рисунок 8 – Чувствительность *Enterobacter spp.* к LysECD7

Из 10 изученных штаммов 6 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 89,48 до 100,00%), по чему можно судить о высокой активности LysECD7 в отношении штаммов *Enterobacter spp.*

На рисунке 9 представлены результаты определения чувствительности *S. jejuni* к рекомбинантному эндолизину LysECD7.

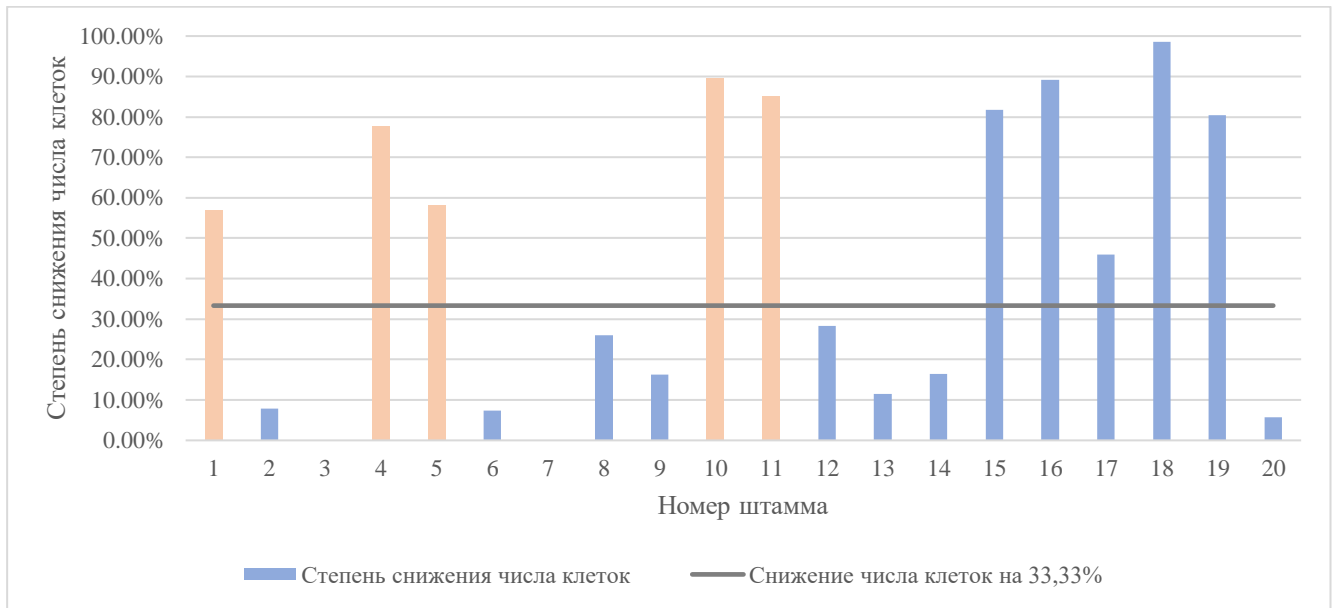


Рисунок 9 – Чувствительность *S. jejuni* к LysECD7

Из 20 исследованных штаммов 5 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 80,41 до 98,51%). Полученные данные показывают узкий спектр противомикробной активности рекомбинантного эндолизина LysECD7 в отношении штаммов *S. jejuni*, тем не менее эндолизин показал высокую активность в отношении 5 штаммов *S. jejuni* при том, что бактериофаг ECD7 не проявляет литической активности в отношении данного вида бактерий [37].

Таким образом, применение рекомбинантного эндолизина LysECD7 привело к достоверному снижению числа клеток не менее, чем на 33,33% у 85 из 120 исследованных штаммов микроорганизмов, на основании чего можно судить о более широком спектре противомикробной активности данного эндолизина по сравнению с бактериофагом ECD7, который проявляет активность только в отношении *E. coli*, *S. sonne* и *S. flexneri* [37].

2.1.2 LysAm24

Согласно опубликованным данным, бактериофаг AM24, являющийся источником изучаемого эндолизина, обладает литической активностью только в отношении *A. baumannii* [105]. Для определения спектра бактерицидной активности рекомбинантного эндолизина LysAm24 изучали чувствительность к нему штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica*, *A. baumannii*, *Enterobacter spp.* и *C. jejuni* (Рисунки 10-16). Оранжевым цветом обозначены недостоверные результаты ($p > 0,05$), которые не учитывались при интерпретации.

На рисунке 10 представлены результаты, полученные в ходе определения чувствительности *K. pneumoniae* к рекомбинантному эндолизины LysAm24.

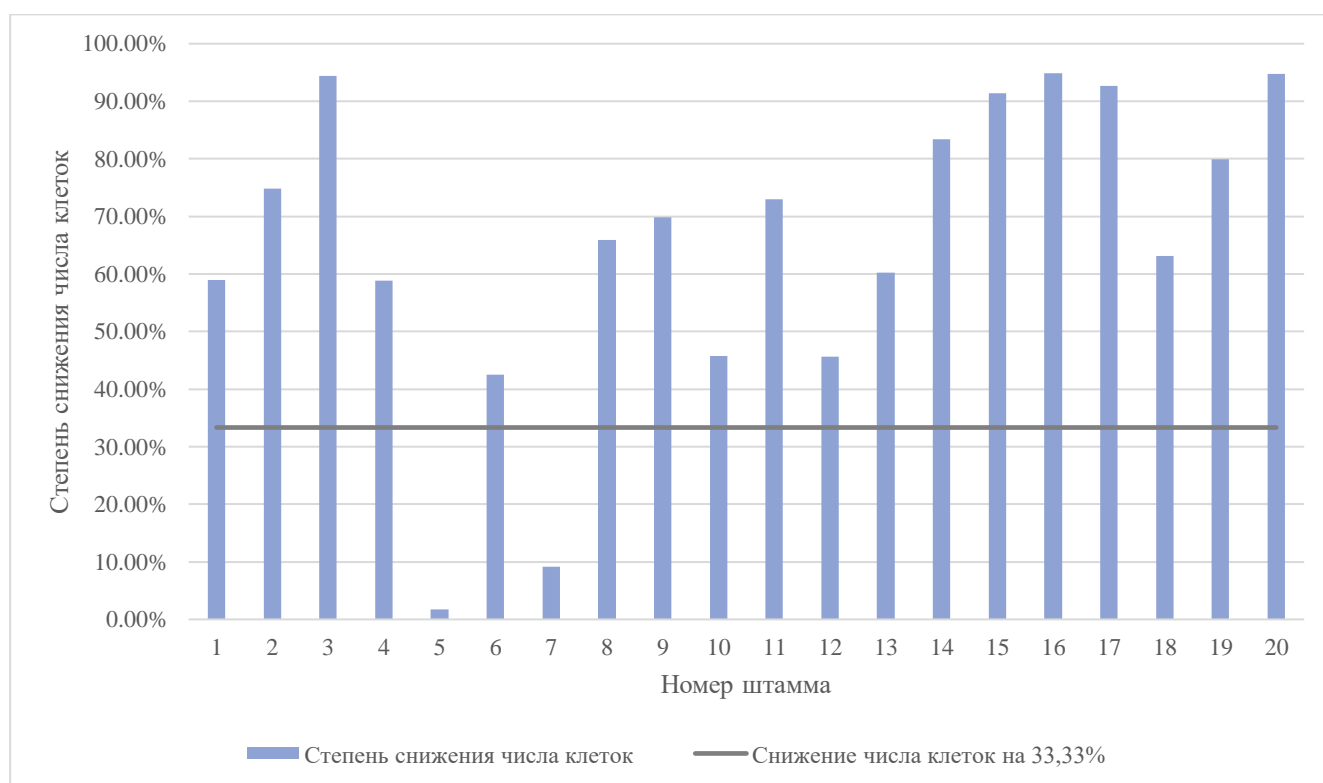


Рисунок 10 – Чувствительность *K. pneumoniae* к LysAm24

Из 20 исследованных штаммов 18 были чувствительны к эндолизины (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 42,51 до 94,84%), что позволяет сделать вывод о высокой активности LysAm24 в отношении штаммов *K. pneumoniae*.

На рисунке 11 представлены результаты определения чувствительности *P. aeruginosa* к рекомбинантному эндолизины LysAm24.

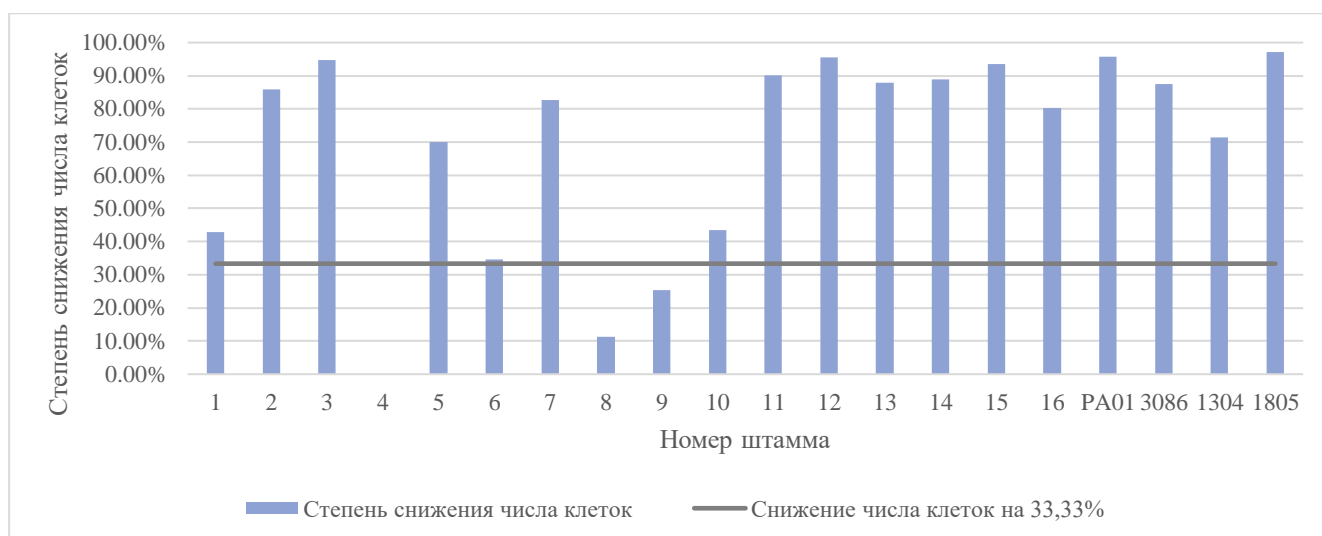


Рисунок 11 – Чувствительность *P. aeruginosa* к LysAm24

Эндолизин показал противомикробную активность в отношении 16 из 20 исследованных штаммов (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 34,55 до 97,19%), что позволяет судить о высокой чувствительности данного вида бактерий к изучаемому эндолизину.

На рисунке 12 представлены результаты определения чувствительности *E. coli* к рекомбинантному эндолизину LysAm24.

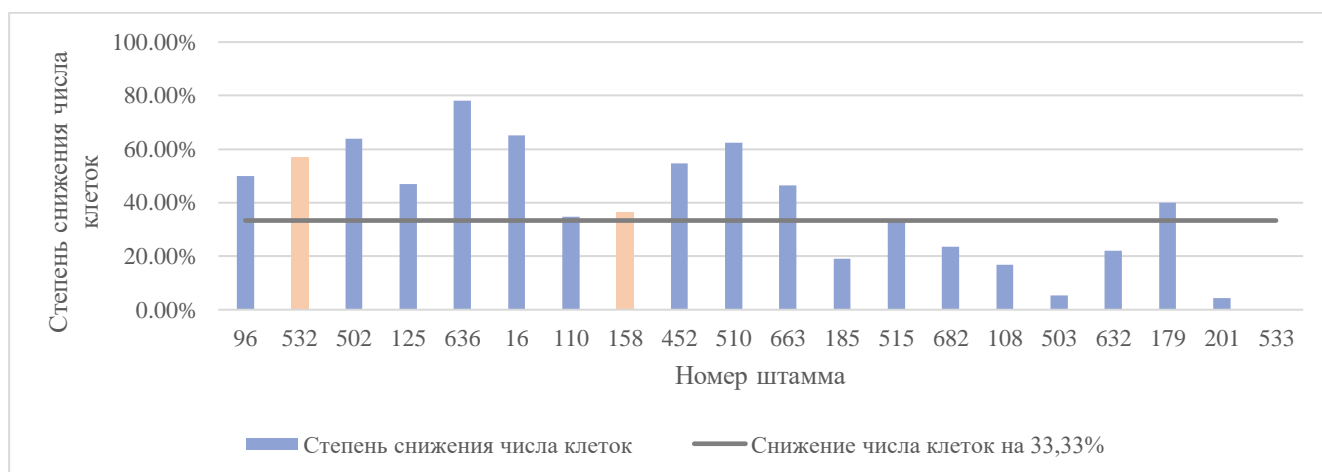


Рисунок 12 – Чувствительность *E. coli* к LysAm24

Из 20 изученных штаммов микроорганизмов 10 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 34,76 до 78,14%), что говорит об активности LysAm24 в отношении штаммов *E. coli*.

На рисунке 13 представлены результаты, полученные в ходе определения чувствительности *S. enterica* к рекомбинантному эндолизину LysAm24.

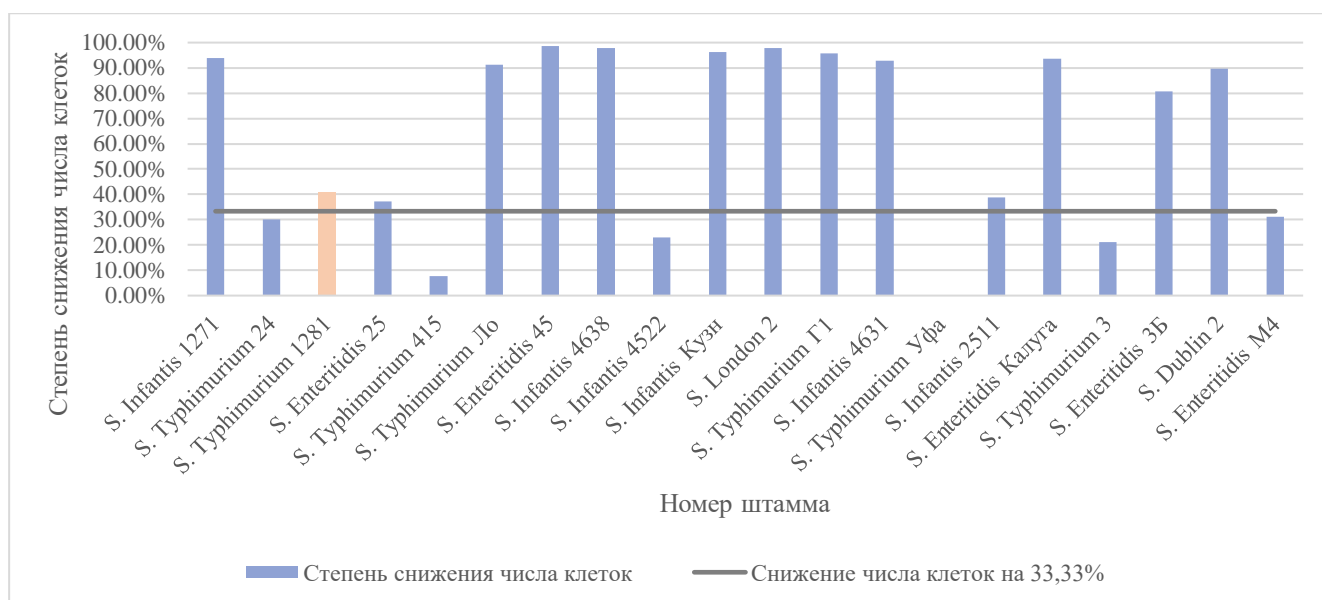


Рисунок 13 – Чувствительность *S. enterica* к LysAm24

Эндолизин показал активность в отношении 13 из 20 исследованных штаммов микроорганизмов (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 37,55 до 97,75%), поэтому считали, что LysAm24 проявляет высокую активность отношении штаммов *S. enterica*.

На рисунке 14 представлены результаты определения чувствительности *A. baumannii* к рекомбинантному эндолизину LysAm24.

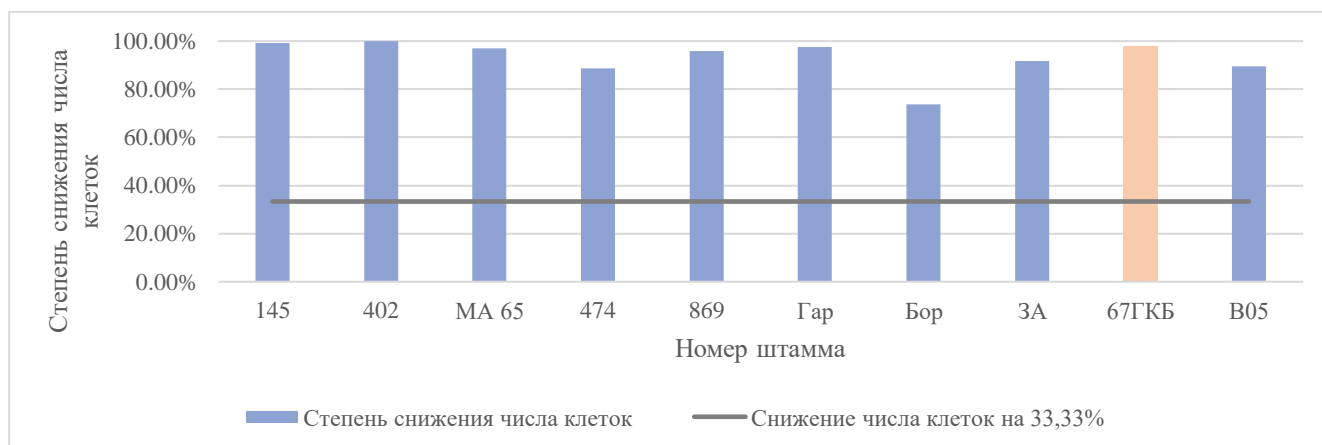


Рисунок 14 – Чувствительность *A. baumannii* к LysAm24

Из 10 исследованных штаммов 9 были чувствительны к эндолизину. При этом достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 73,66 до 100%, что показывает высокую противомикробную активность рекомбинантного эндолизина LysAm24 в отношении *A. baumannii*.

На рисунке 15 представлены результаты, полученные в ходе определения чувствительности *Enterobacter spp.* к рекомбинантному эндолизину LysAm24.

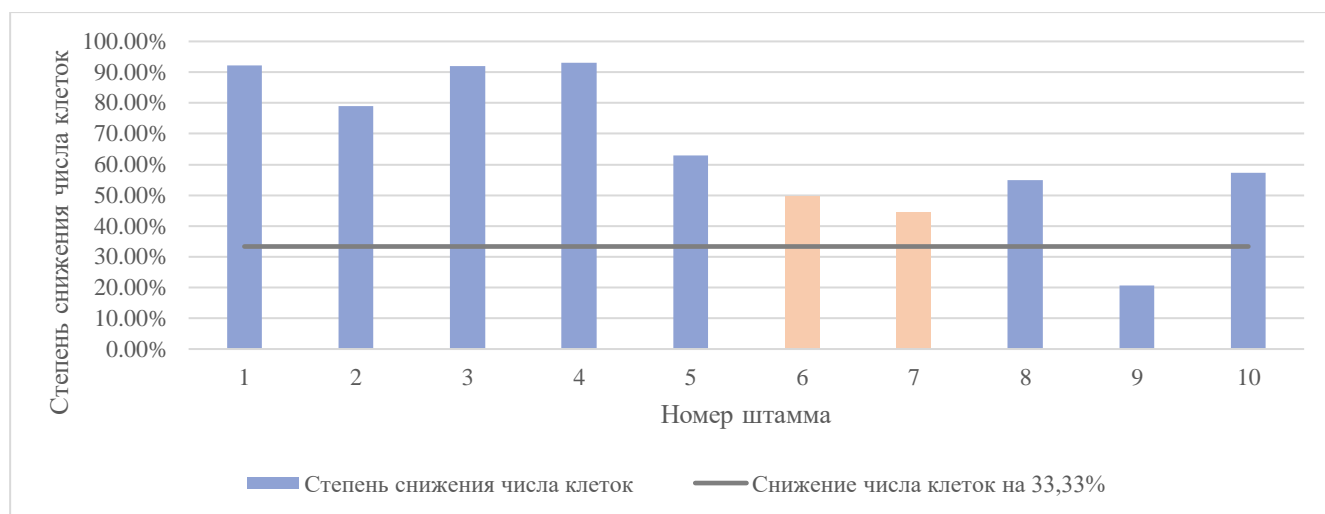


Рисунок 15 – Чувствительность *Enterobacter spp.* к LysAm24

К эндолизину были чувствительны 7 из 10 исследованных штаммов микроорганизмов. Кроме того, применение рекомбинантного эндолизина приводило к достоверному снижению числа клеток чувствительных штаммов на 54,81–93,01%, что свидетельствует о высокой активности LysAm24 в отношении штаммов *Enterobacter spp.*

На рисунке 16 представлены результаты определения чувствительности *S. jejuni* к рекомбинантному эндолизину LysAm24, полученные в ходе эксперимента.

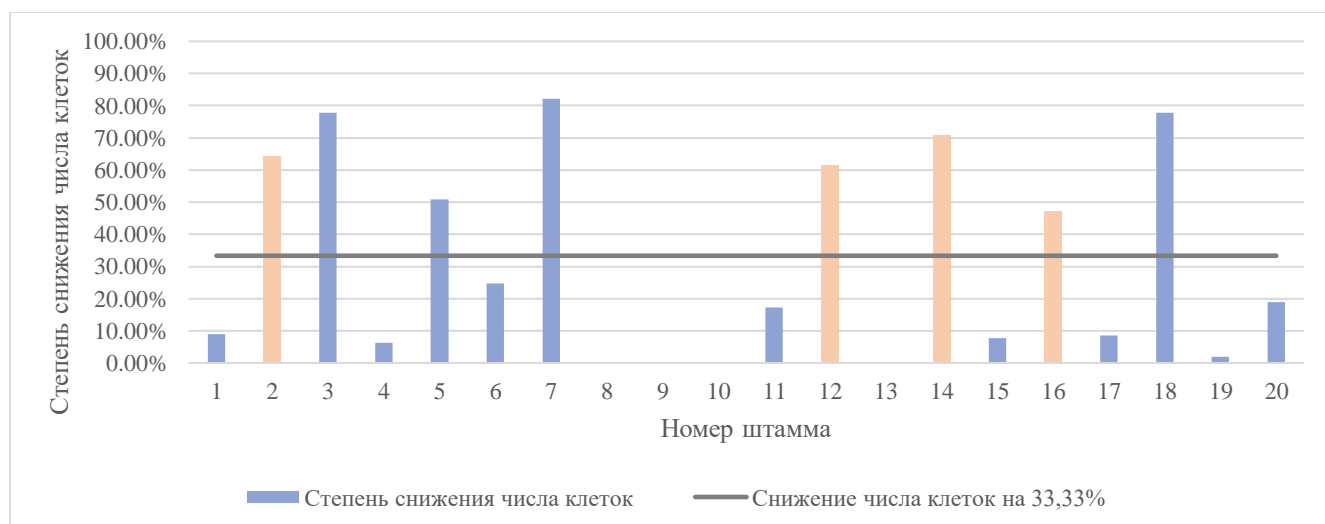


Рисунок 16 – Чувствительность *S. jejuni* к LysAm24

Из 20 исследованных штаммов 4 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 47,17

до 82,14%). Полученные данные показывают узкий спектр противомикробной активности рекомбинантного эндолизина LysAm24 в отношении *C. jejuni*, тем не менее эндолизин показал высокую активность в отношении 4 штаммов данного вида бактерий.

Таким образом применение рекомбинантного эндолизина LysAm24 привело к достоверному снижению числа клеток не менее, чем на 33,33% у 77 из 120 исследованных штаммов микроорганизмов, что показывает более широкий спектр противомикробной активности данного эндолизина по сравнению с бактериофагом AM24, который проявляет активность только в отношении *A. baumannii* [105].

2.1.3 LysAp22

Согласно опубликованным данным, бактериофаг AP22, являющийся источником изучаемого эндолизина, обладает литической активностью только в отношении *A. baumannii* [106]. Нами изучен спектр бактерицидной активности рекомбинантного эндолизина LysAp22 в отношении штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica*, *A. baumannii*, *Enterobacter spp.* и *C. jejuni* (Рисунки 17-23). Оранжевым цветом обозначены недостоверные результаты ($p > 0,05$), которые не учитывались при интерпретации.

На рисунке 17 представлены результаты определения чувствительности *K. pneumoniae* к рекомбинантному эндолизину LysAp22.

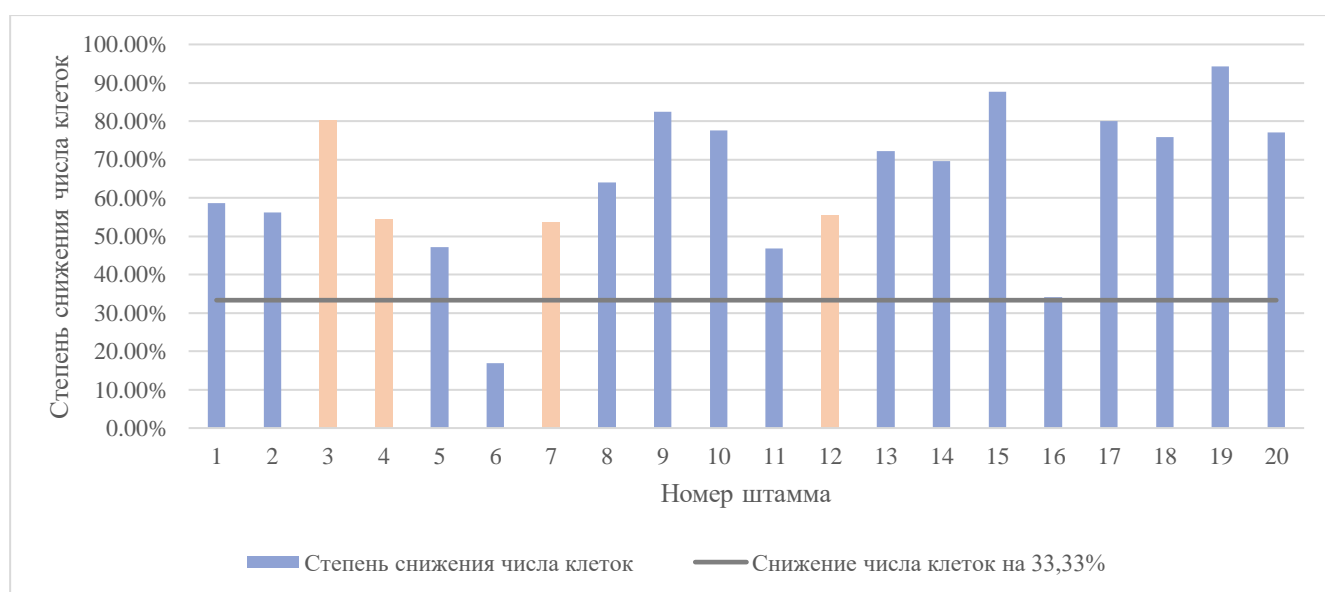


Рисунок 17 – Чувствительность *K. pneumoniae* к LysAp22

Из 20 исследованных штаммов 15 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 34,11 до 94,23%), что показывает высокую противомикробную активность LysAp22 в отношении штаммов *K. pneumoniae*.

На рисунке 18 представлены полученные в ходе исследования результаты определения чувствительности *P. aeruginosa* к рекомбинантному эндолизину LysAp22.

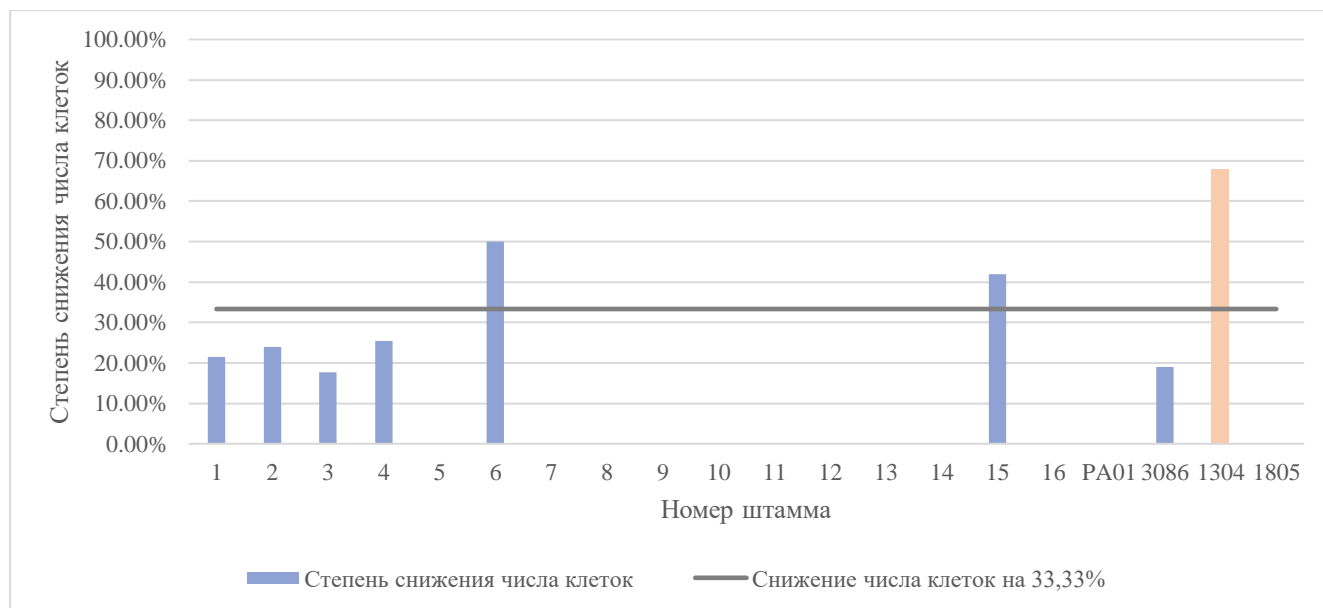


Рисунок 18 – Чувствительность *P. aeruginosa* к LysAp22

Рекомбинантный эндолизин показал противомикробную активность только в отношении двух штаммов из 20 исследованных (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило 42,01% для штамма 15 и 50,00% для штамма 6). Полученные данные показывают низкую активность LysAp22 в отношении штаммов *P. aeruginosa*. Стоит отметить различия в спектре противомикробной активности LysAp22 и LysAm24, полученных из бактериофагов, активных в отношении *A. baumannii*. В то время как LysAm24 проявляет противомикробную активность в отношении 80% штаммов *P. aeruginosa*, LysAp22 вызывает снижение числа клеток только у 10%, что может говорить о разном механизме действия или различной специфичности данных ферментов.

Результаты определения чувствительности представителей *E. coli* к рекомбинантному эндолизину LysAp22 представлены на рисунке 19.

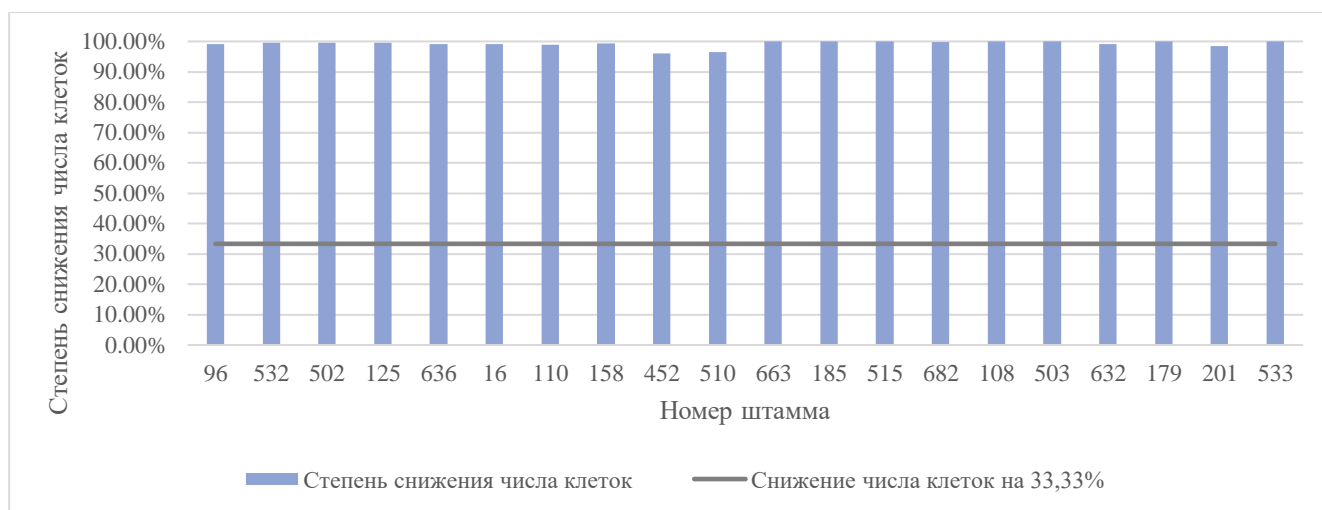


Рисунок 19 – Чувствительность *E. coli* к LysAp22

Все исследуемые штаммы были чувствительны к эндолизину. При этом достоверное снижение числа клеток исследуемых штаммов микроорганизмов составило от 96,00 до 100,00%, что позволяет судить о высокой активности LysAp22 в отношении штаммов *E. coli*.

На рисунке 20 представлены результаты определения чувствительности *S. enterica* к рекомбинантному эндолизину LysAp22.

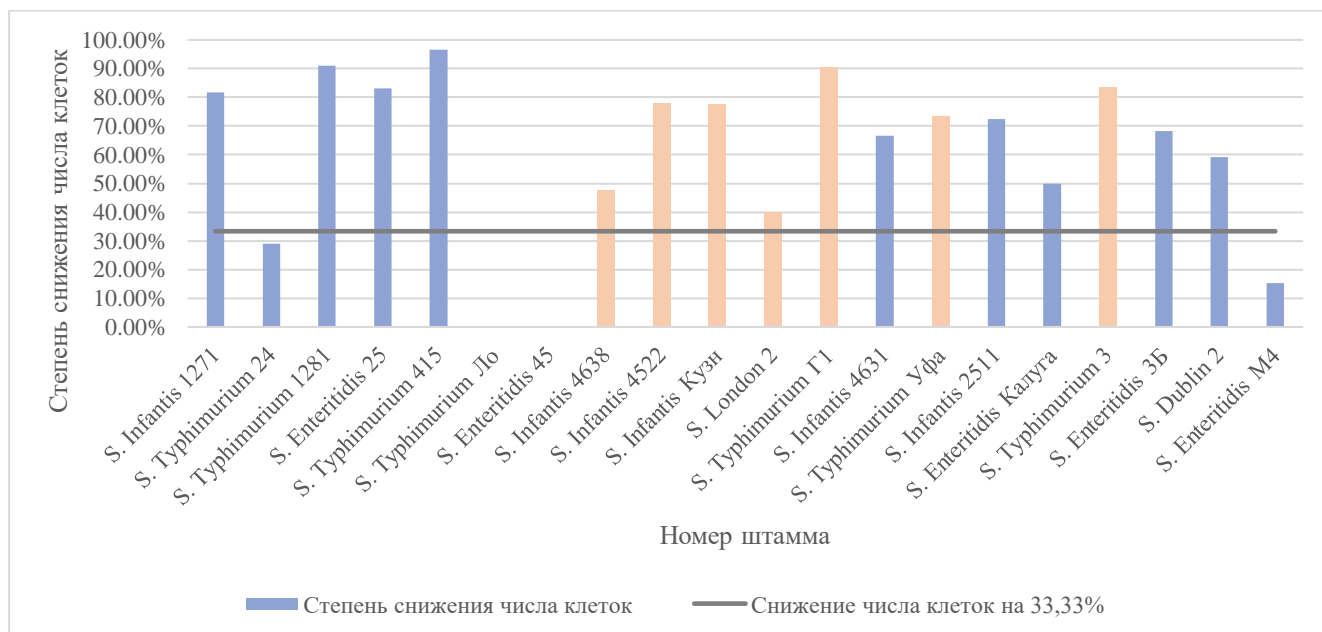


Рисунок 20 – Чувствительность *S. enterica* к LysAp22

Из 20 исследованных штаммов 9 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 66,67

до 96,53%), что свидетельствует об активности LysAp22 в отношении штаммов *S. enterica*.

На рисунке 21 представлены результаты, полученные в ходе определения чувствительности *A. baumannii* к рекомбинантному эндолизину LysAp22.

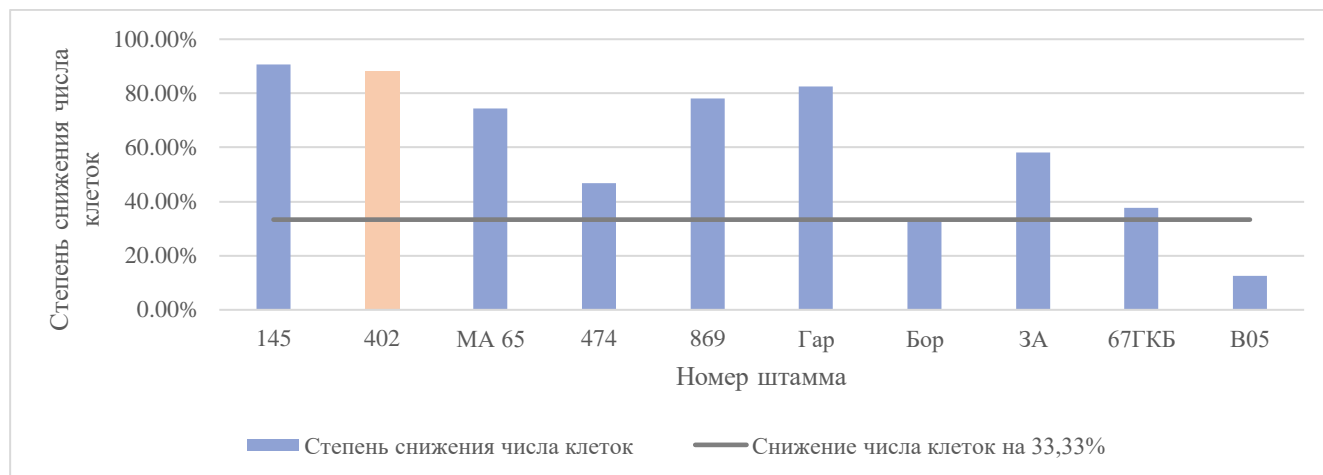


Рисунок 21 – Чувствительность *A. baumannii* к LysAp22

Рекомбинантный эндолизин показал противомикробную активность в отношении 7 из 10 исследованных штаммов (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 37,59 до 90,65%). Полученные результаты показывают высокую чувствительность *A. baumannii* к LysAp22.

На рисунке 22 представлена чувствительность *Enterobacter spp.* к рекомбинантному эндолизину LysAp22.

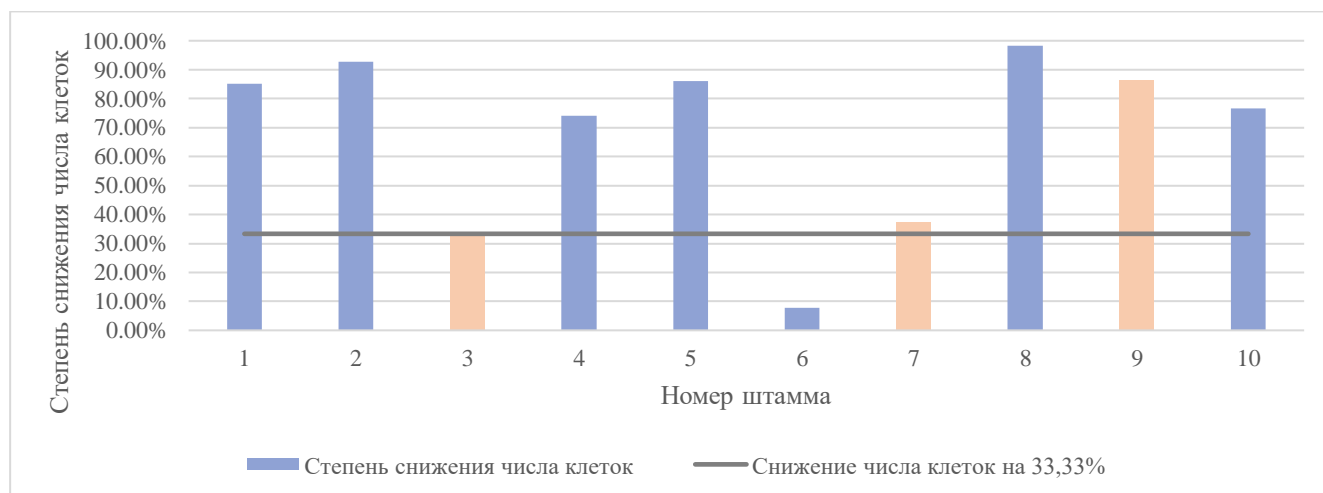


Рисунок 22 – Чувствительность *Enterobacter spp.* к LysAp22

К рекомбинантному эндолизину были чувствительны 6 из 10 исследованных штаммов (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило

от 74,16 до 98,28%), что свидетельствует об активности LysAp22 в отношении штаммов *Enterobacter spp.*

На рисунке 23 представлены результаты изучения чувствительности *C. jejuni* к рекомбинантному эндолизину LysAp22.

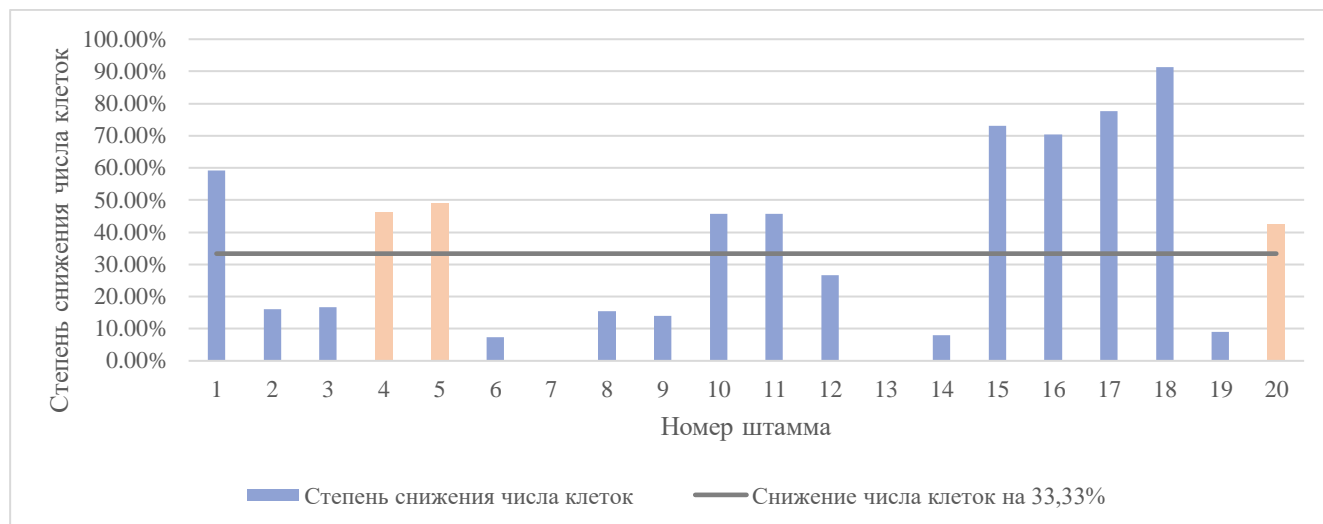


Рисунок 23 – Чувствительность *C. jejuni* к LysAp22

Из 20 исследованных штаммов 7 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 45,71 до 91,25%), что говорит об активности LysAp22 в отношении штаммов *C. jejuni*.

Таким образом применение рекомбинантного эндолизина LysAp22 привело к достоверному снижению числа клеток не менее, чем на 33,33% у 66 из 120 исследованных штаммов микроорганизмов. На основании полученных данных можно судить о более широком спектре противомикробной активности данного эндолизина по сравнению с бактериофагом Ap22, который проявляет активность только в отношении *A. baumannii* [106].

2.1.4 LysSi3

Согласно опубликованным данным, бактериофаг SI3, являющийся источником изучаемого эндолизина, обладает литической активностью только в отношении *S. enterica* Infantis [2]. Для определения спектра бактерицидной активности рекомбинантного эндолизина LysSi3 изучали чувствительность к нему штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica*, *A. baumannii*, *Enterobacter spp.* и *C. jejuni* (Рисунки 24-30). Оранжевым цветом обозначены недостоверные

результаты ($p > 0,05$). Если статистическая обработка не подтверждала достоверность полученных результатов, они не учитывались при интерпретации.

На рисунке 24 представлены полученные в ходе исследования данные о чувствительности *K. pneumoniae* к рекомбинантному эндолизину LysSi3.

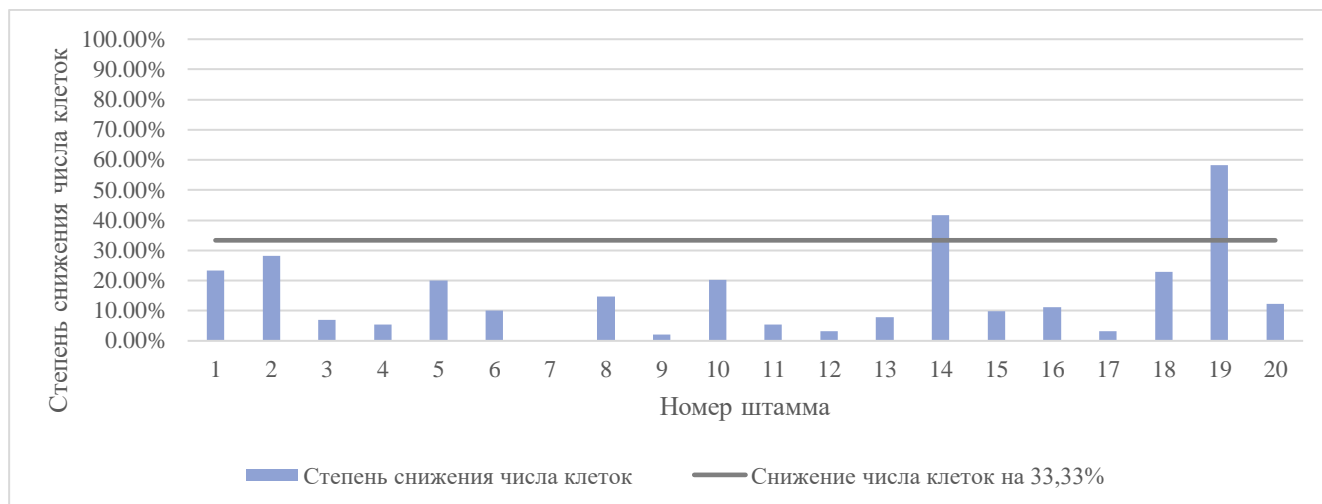


Рисунок 24 – Чувствительность *K. pneumoniae* к LysSi3

Из 20 исследованных штаммов 2 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило 41,65 и 58,33%), что демонстрирует низкую чувствительность *K. pneumoniae* к LysSi3.

На рисунке 25 представлены результаты определения чувствительности *P. aeruginosa* к рекомбинантному эндолизину LysSi3.

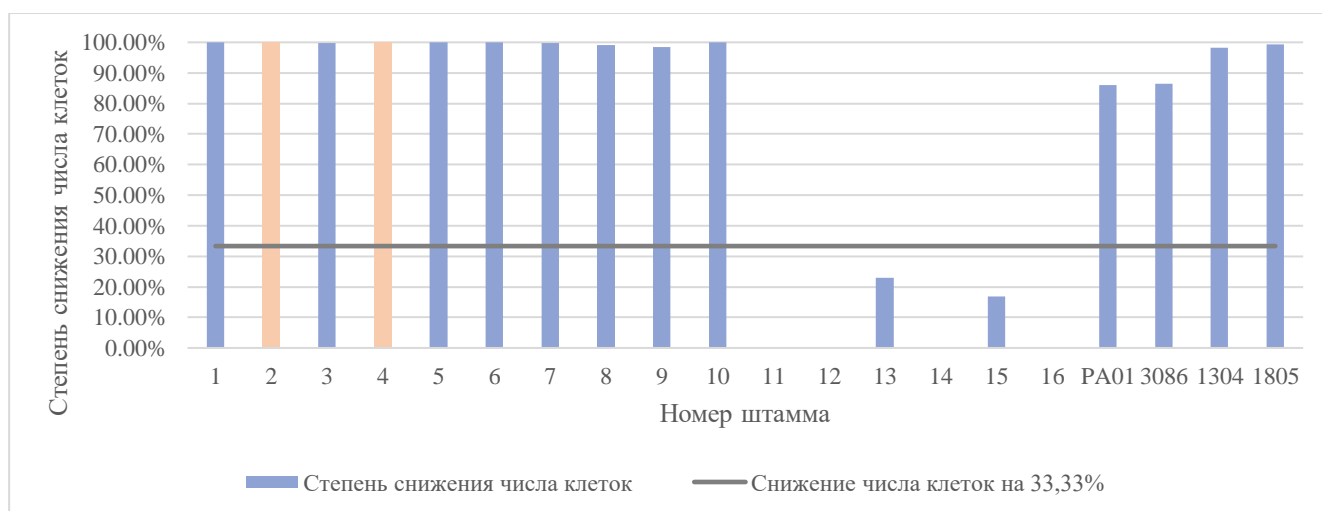


Рисунок 25 – Чувствительность *P. aeruginosa* к LysSi3

Рекомбинантный эндолизин показал активность в отношении 12 из 20 исследованных штаммов (достоверное снижение числа клеток чувствительных

штаммов составило от 85,92 до 100,00%), что говорит о высокой активности LysSi3 в отношении штаммов *P. aeruginosa*.

На рисунке 26 представлены данные о чувствительности *E. coli* к рекомбинантному эндолизину LysSi3.

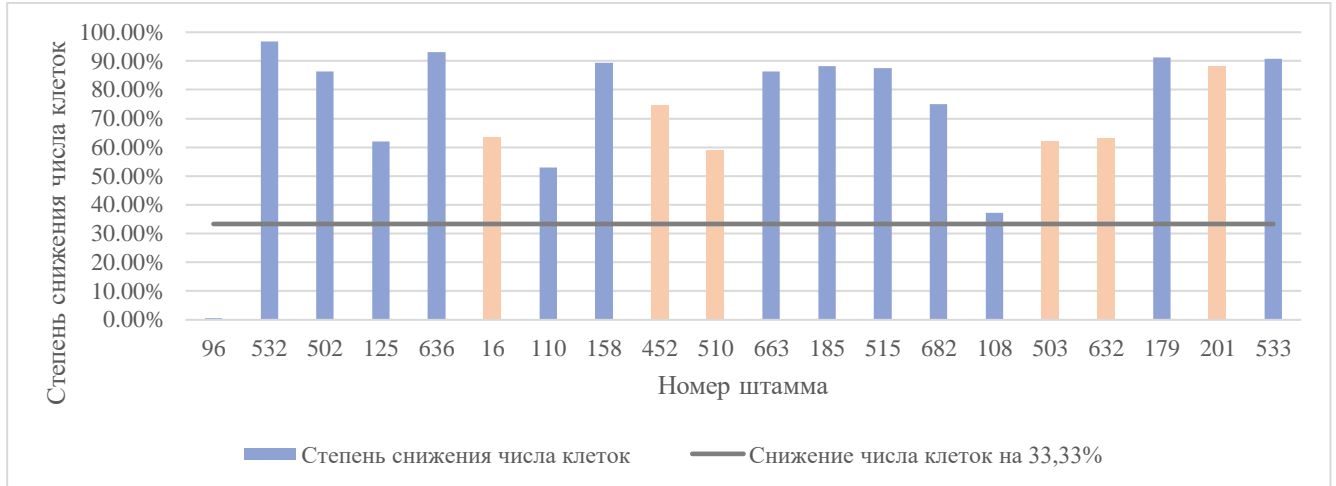


Рисунок 26 – Чувствительность *E. coli* к LysSi3

К рекомбинантному эндолизину были чувствительны 13 из 20 исследованных штаммов. Достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 37,14 до 96,69%, что позволяет судить о высокой противомикробной активности LysSi3 в отношении штаммов *E. coli*.

На рисунке 27 показаны результаты определения чувствительности *S. enterica* к рекомбинантному эндолизину LysSi3.

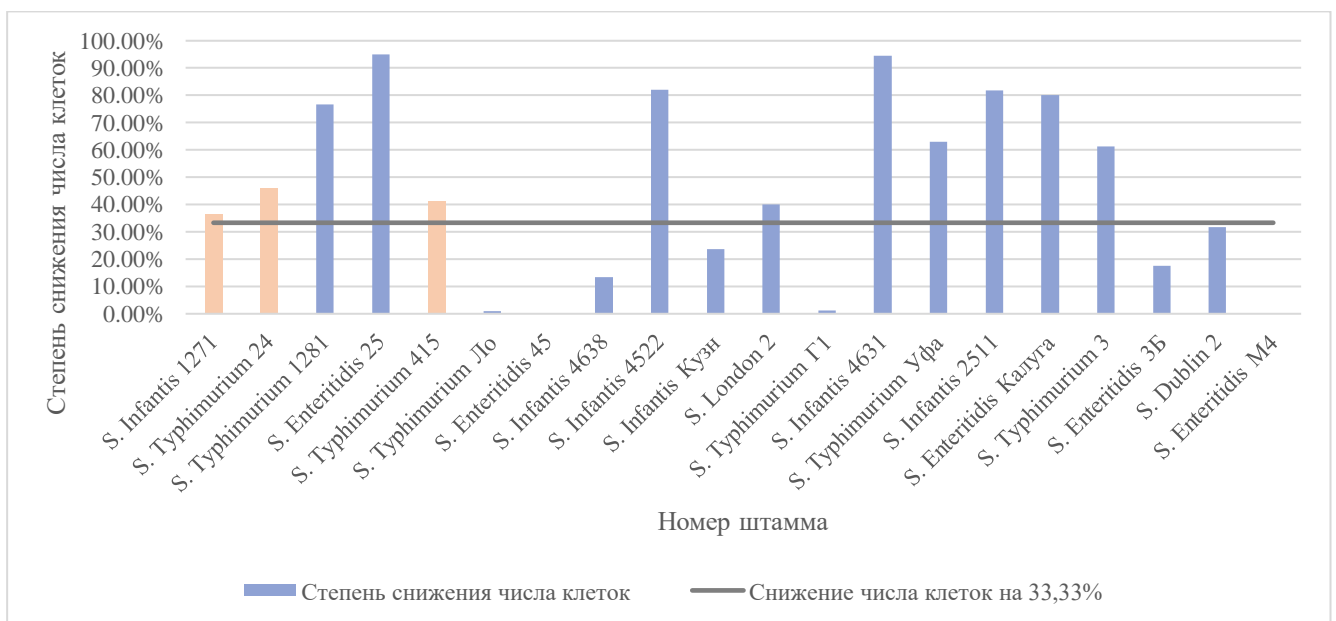


Рисунок 27 – Чувствительность *S. enterica* к LysSi3

Из 20 исследованных штаммов 9 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 40,13 до 95,10%), что указывает на средний уровень чувствительности *S. enterica* к LysSi3.

На рисунке 28 показаны полученные данные о чувствительности *A. baumannii* к рекомбинантному эндолизину LysSi3.

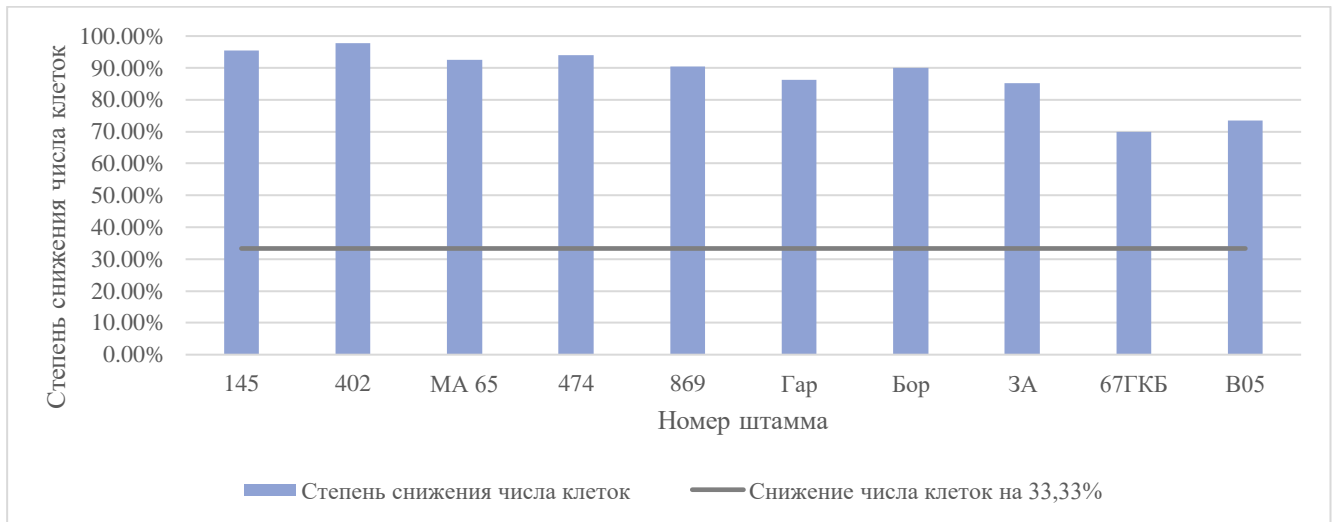


Рисунок 28 – Чувствительность *A. baumannii* к LysSi3

Все 10 исследованных штаммов были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 70,00 до 97,74%), на основании чего можно судить о высокой активности LysSi3 в отношении штаммов *A. baumannii*.

На рисунке 29 представлены результаты определения чувствительности *Enterobacter spp.* к рекомбинантному эндолизину LysSi3.

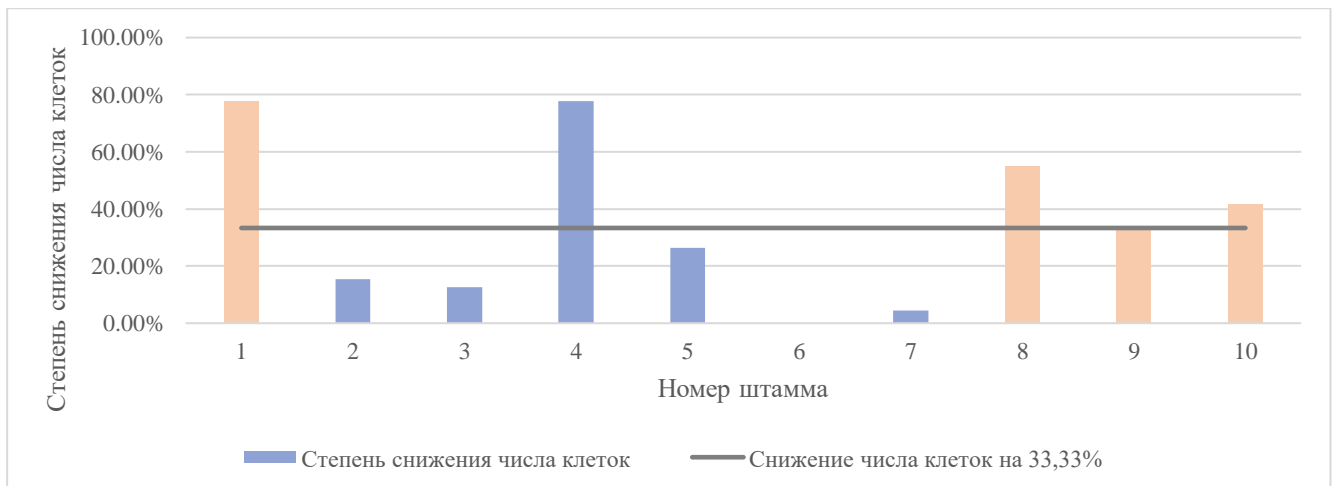


Рисунок 29 – Чувствительность *Enterobacter spp.* к LysSi3

Из 10 исследованных штаммов к рекомбинантному эндолизину был чувствителен всего 1 (достоверное снижение числа клеток чувствительного штамма составило 77,69%), что говорит об отсутствии чувствительности *Enterobacter spp.* к данному белку.

На рисунке 30 представлены результаты определения чувствительности *S. jejuni* к рекомбинантному эндолизину LysSi3.

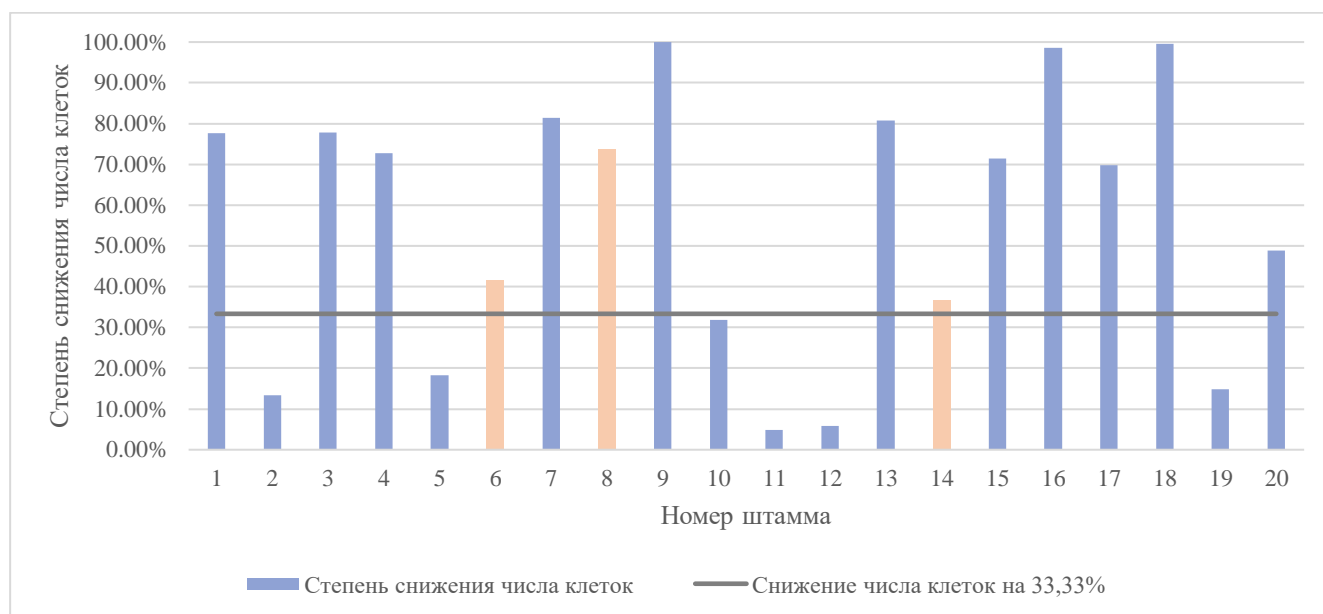


Рисунок 30 – Чувствительность *S. jejuni* к LysSi3

Исследуемый эндолизин показал противомикробную активность в отношении 11 из 20 исследованных штаммов. При этом достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 48,83 до 100,00%, что показывает высокую противомикробную активность LysSi3 в отношении штаммов *S. jejuni*.

Таким образом применение рекомбинантного эндолизина LysSi3 привело к достоверному снижению числа клеток не менее, чем на 33,33% у 58 из 120 исследованных штаммов микроорганизмов. Полученные данные показывают более широкий спектр противомикробной активности LysSi3 по сравнению с бактериофагом SI3, который проявляет активность только в отношении *S. enterica* Infantis [2].

2.1.5 LysSt11

Согласно опубликованным данным, бактериофаг ST11, являющийся источником изучаемого эндолизина, обладает литической активностью только в отношении *S. enterica* Typhimurium [2]. Для определения спектра бактерицидной активности рекомбинантного эндолизина LysSt11 изучали чувствительность к нему штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica*, *A. baumannii*, *Enterobacter spp.* и *C. jejuni* (Рисунки 31-37). Оранжевым цветом обозначены недостоверные результаты ($p > 0,05$), которые не учитывались при интерпретации.

На рисунке 31 представлены результаты определения чувствительности *K. pneumoniae* к рекомбинантному эндолизу LysSt11.

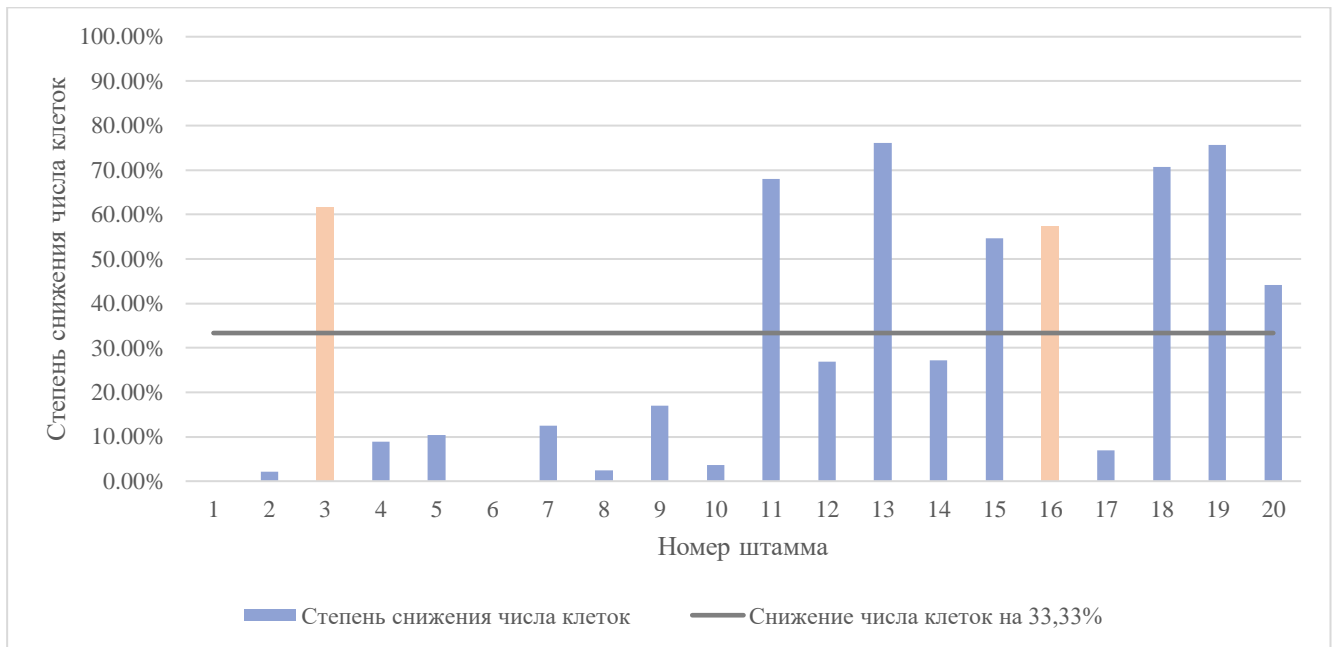


Рисунок 31 – Чувствительность *K. pneumoniae* к LysSt11

Из 20 исследованных штаммов 6 были чувствительны к эндолизу (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 44,09 до 75,67%), на основании полученных данных был сделан вывод о средней активности LysSt11 в отношении штаммов *K. pneumoniae*.

На рисунке 32 представлены результаты определения чувствительности *P. aeruginosa* к рекомбинантному эндолизу LysSt11, полученные в ходе исследования.

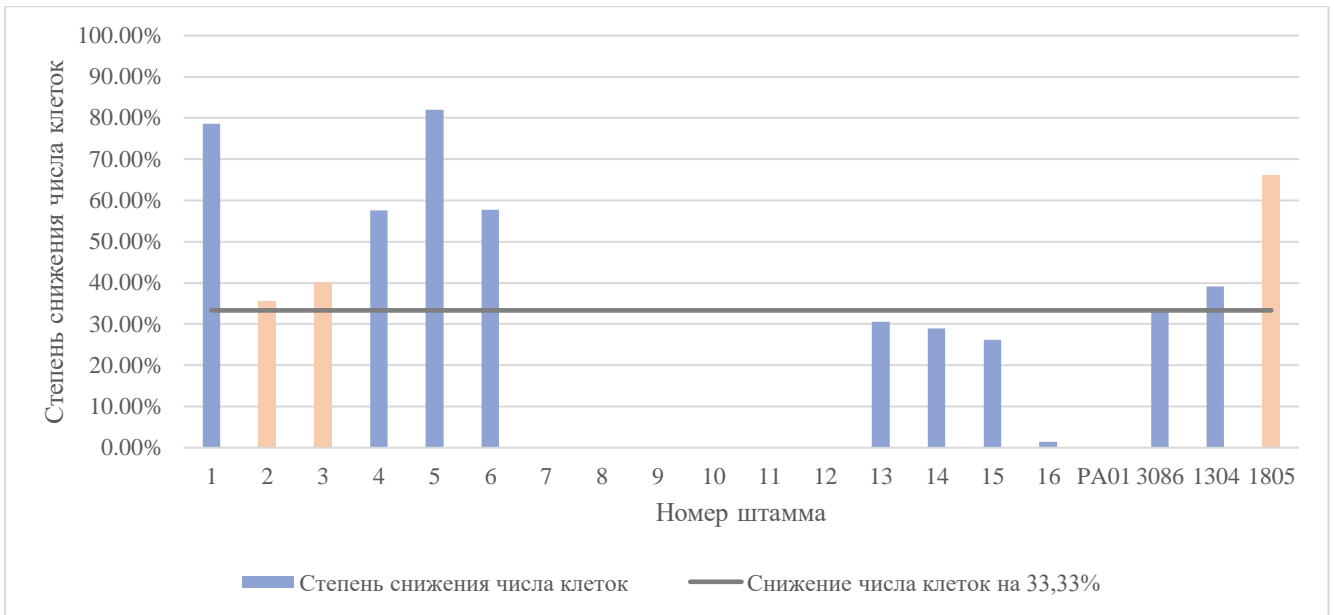


Рисунок 32 – Чувствительность *P. aeruginosa* к LysSt11

Рекомбинантный эндолизин проявлял противомикробную активность в отношении 6 из 20 исследованных штаммов микроорганизмов (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 33,45 до 81,94%), что позволяет судить о средней чувствительности *P. aeruginosa* к изучаемому ферменту.

На рисунке 33 показаны данные о чувствительности *E. coli* к рекомбинантному эндолизину LysSt11.

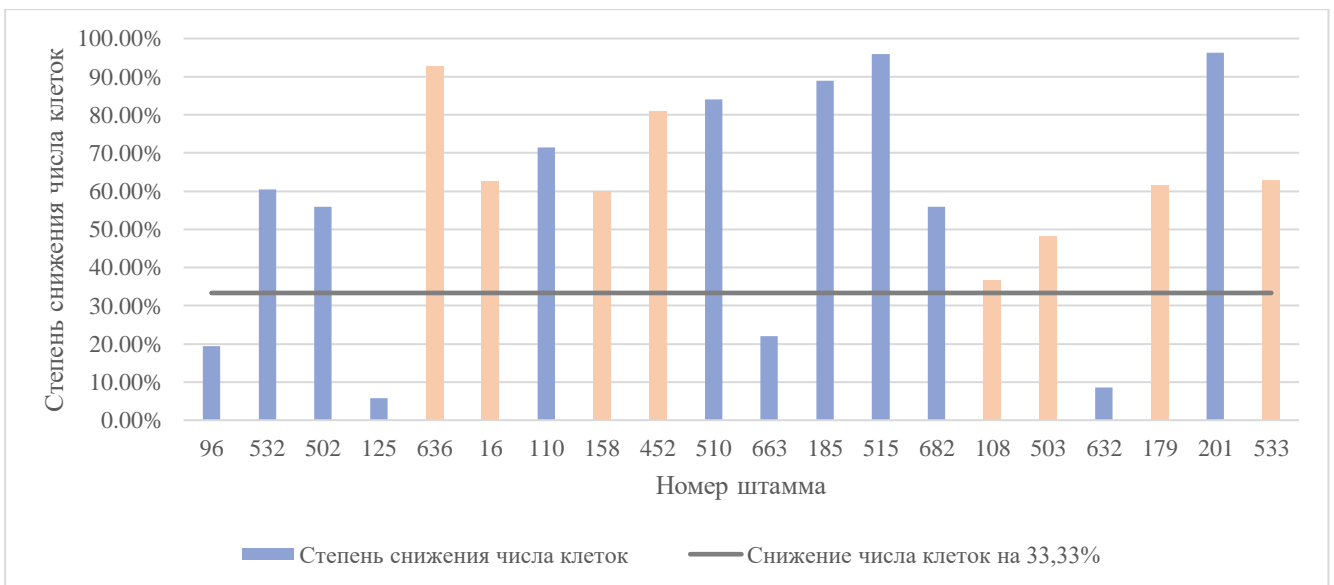


Рисунок 33 – Чувствительность *E. coli* к LysSt11

Противомикробная активность изучаемого эндолизина была зафиксирована в отношении 8 из 20 исследованных штаммов (достоверное снижение числа клеток

чувствительных штаммов составило от 55,86 до 96,30%), что говорит о чувствительности *E. coli* к LysSt11.

Полученные данные о чувствительности *S. enterica* к рекомбинантному эндолизину LysSt11 представлены на рисунке 34.

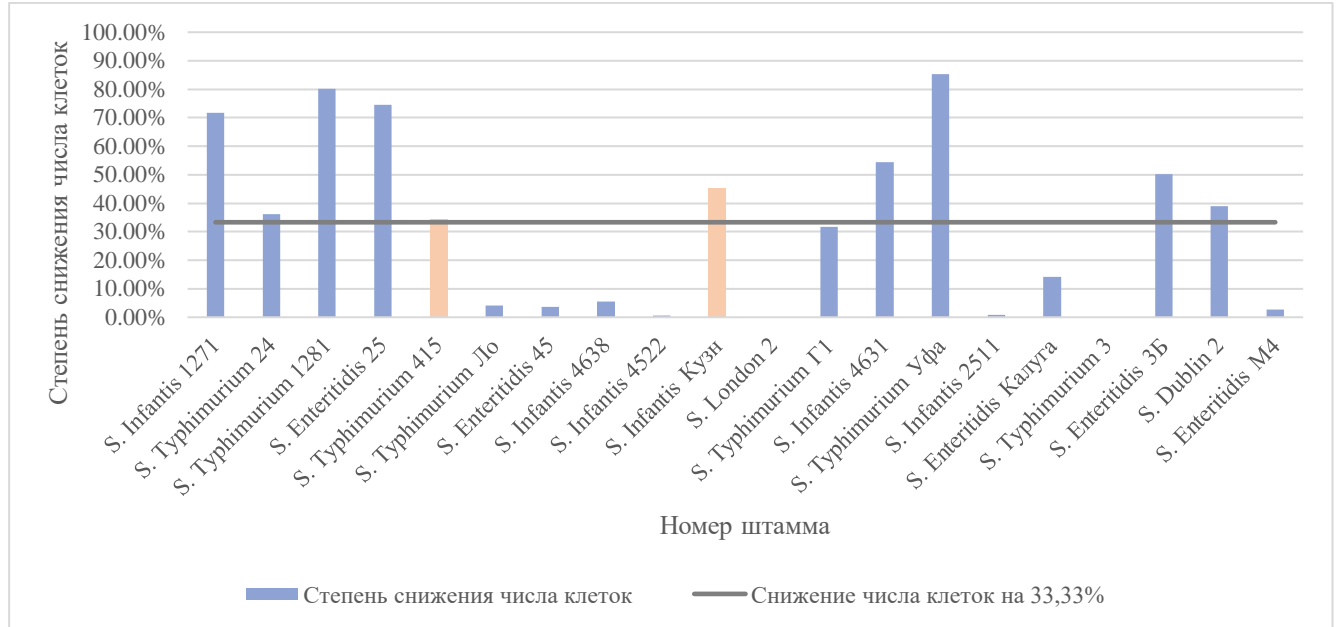


Рисунок 34 – Чувствительность *S. enterica* к LysSt11

Из 20 исследованных штаммов 8 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 36,22 до 85,36%), что указывает на средний уровень чувствительности *S. enterica* к LysSi3.

На рисунке 35 представлены результаты определения чувствительности *A. baumannii* к рекомбинантному эндолизину LysSt11.

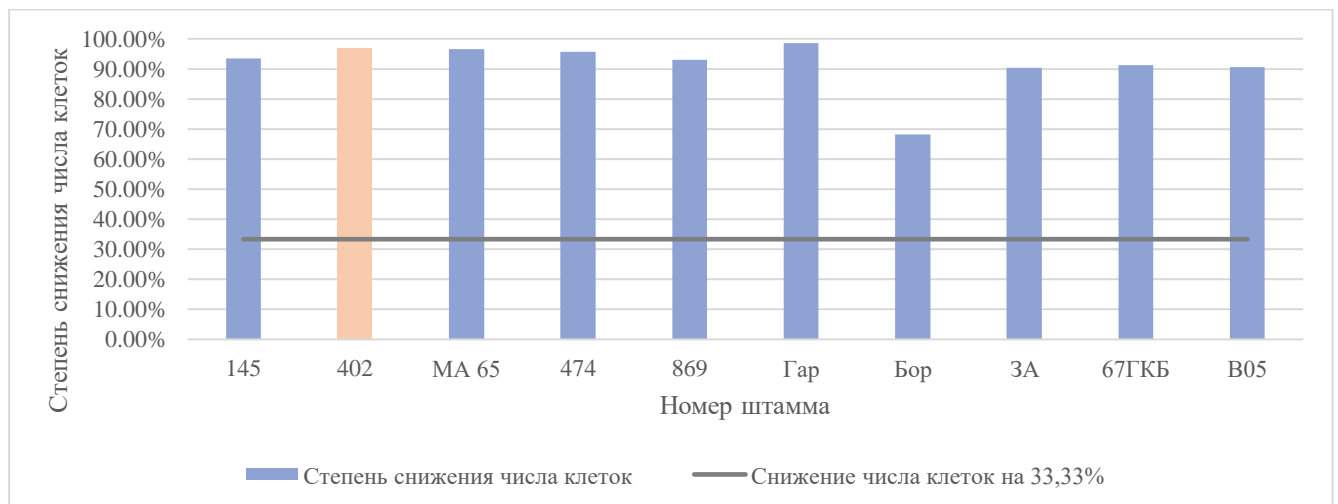


Рисунок 35 – Чувствительность *A. baumannii* к LysSt11

Чувствительность к LysSt11 показали 9 из 10 исследованных штаммов микроорганизмов. При этом достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 68,19 до 98,67%, что позволяет говорить о высокой активности LysSt11 в отношении штаммов *A. baumannii*.

На рисунке 36 показана чувствительность *Enterobacter spp.* к рекомбинантному эндолизину LysSt11.

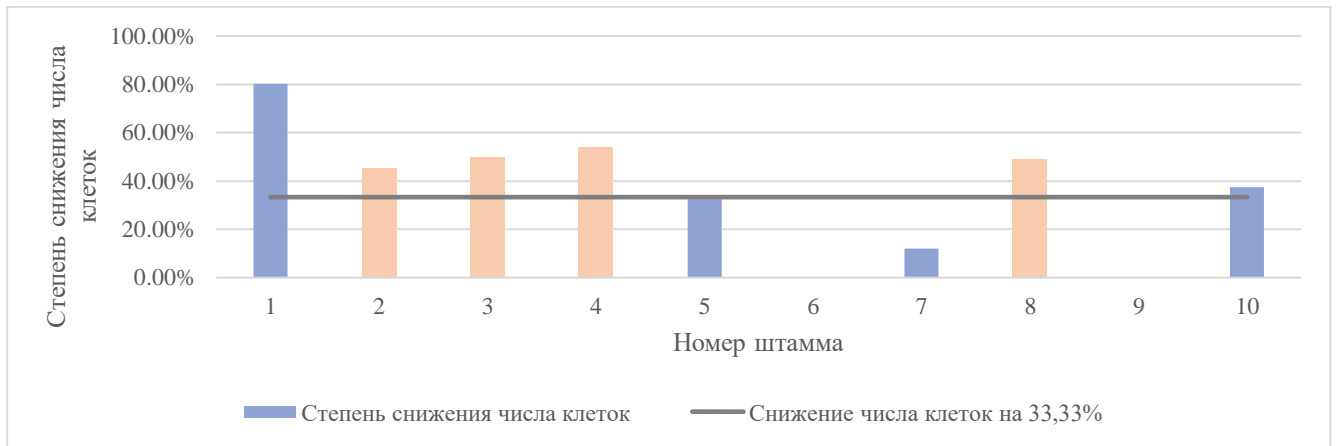


Рисунок 36 – Чувствительность *Enterobacter spp.* к LysSt11

Из 10 исследованных штаммов рекомбинантный эндолизин показал активность в отношении 2 (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 37,43 до 80,17%). На основании полученных данных был сделан вывод о низкой чувствительности изученных штаммов *Enterobacter spp.* к LysSt11.

На рисунке 37 представлены результаты определения чувствительности *S. jejuni* к рекомбинантному эндолизину LysSt11.

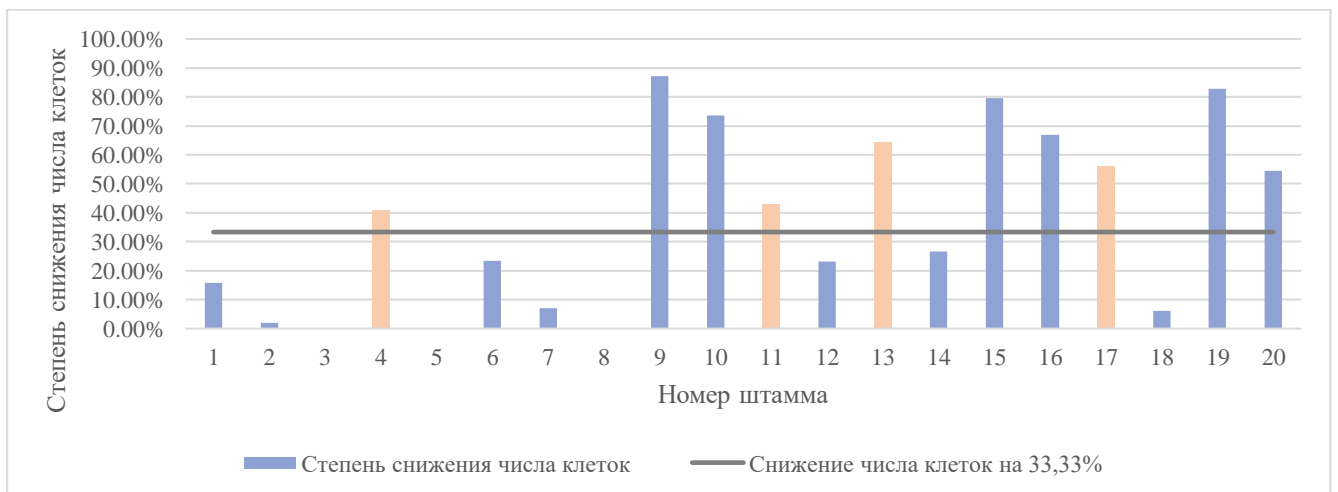


Рисунок 37 – Чувствительность *S. jejuni* к LysSt11

Из 20 исследованных штаммов 6 были чувствительны к эндолизину (достоверное снижение числа клеток чувствительных штаммов составило от 54,55 до 87,14%), что показывает среднюю чувствительность штаммов *C. jejuni* к LysSt11.

Согласно полученным данным, применение рекомбинантного эндолизина LysSt11 привело к достоверному снижению числа клеток не менее, чем на 33,33% у 45 из 120 исследованных штаммов микроорганизмов, что показывает более широкий спектр противомикробной активности LysSt11 по сравнению с бактериофагом ST11, который проявляет активность только в отношении *S. enterica* Typhimurium [2].

2.2 Сравнение спектра бактерицидной активности рекомбинантных эндолизинов

В таблице 7 представлена доля чувствительных микроорганизмов к каждому рекомбинантному эндолизину.

Таблица 7 – Доля чувствительных к эндолизинам микроорганизмов

Микроорганизмы	Рекомбинантные эндолизины				
	LysECD7	LysAm24	LysAp22	LysSi3	LysSt11
<i>K. pneumoniae</i>	100%	90%	75%	10%	30%
<i>P. aeruginosa</i>	70%	80%	10%	60%	30%
<i>E. coli</i>	75%	50%	100%	65%	40%
<i>S. enterica</i>	75%	65%	45%	45%	40%
<i>A. baumannii</i>	100%	90%	70%	100%	90%
<i>Enterobacter spp.</i>	60%	70%	60%	10%	20%
<i>C. jejuni</i>	25%	20%	35%	55%	30%
Итого	70,83%	64,17%	55,00%	48,33%	37,50%

Как видно из данных таблицы 7 рекомбинантные эндолизины показали высокую противомикробную активность в отношении представителей *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.* и *C. jejuni*.

Наиболее широким спектром противомикробной активности обладал LysECD7, чувствительным к которому являлись 85 из 120 исследуемых штаммов микроорганизмов (70,83%). К LysAm24 были чувствительны 77 из 120 исследуемых штаммов (64,17%), к LysAp22 – 66 из 120 штаммов (55,00%), к LysSi3 – 58 из 120 штаммов (48,33%), наименее широким спектром противомикробной активности обладал LysSt11, проявившим активность в отношении 45 из 120 исследуемых штаммов микроорганизмов (37,50%).

Полученные данные показывают различия в спектре бактерицидной активности рекомбинантных эндолизинов и бактериофагов, являвшихся их источником. Так, бактериофаг ECD7 является специфичным в отношении *E. coli*, *S. sonne* и *S. flexneri* [37], в то время как к рекомбинантному эндолизину данного бактериофага были чувствительны представители родов *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* и *Campylobacter*.

Аналогично, бактериофаги Am24 и Ap22 специфичны в отношении *A. baumannii* [105, 106], бактериофаг Si3 – в отношении *S. infantis* [2], бактериофаг St11 – в отношении *S. typhimurium* [2]. При этом рекомбинантные эндолизины данных бактериофагов показали более широкий спектр противомикробной активности, достоверно снижая число клеток микроорганизмов всех исследуемых родов, что, вероятно, обусловлено различиями в сродстве бактериофагов, специфичность действия которых обусловлена распознаванием определенных фагоспецифических рецепторов на поверхности бактериальной клетки, набор которых может отличаться у различных видов (иногда и в пределах одного вида), и эндолизинов, которые обладают сродством к различным участкам пептидогликана, структура которого схожа у большинства видов бактерий.

На основе полученных данных можно также предположить, что при применении комбинации рекомбинантных эндолизинов может быть достигнут более эффективный лизис бактериальных клеток по сравнению с отдельными ферментами, обусловленный различиями в субстратной специфичности и каталитической активности эндолизинов, нацеленных на разные пептидогликановые связи в углеводном каркасе, полипептидных цепях и

межпептидном мостике. Таким образом, мультимодальный механизм действия позволит добиться глубокого расщепления пептидогликана и снижения шансов бактериальной клетки на выживание.

ГЛАВА 3. Разработка состава и технологии изготовления готовой лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов

Разработка состава и технологии ГЛФ на основе рекомбинантных эндолизинов проводилась в соответствии с Гармонизированным трехсторонним руководством ICH «Фармацевтическая разработка Q8» (ICH Q8).

Одной из основных задач фармацевтической разработки является выбор ЛФ. Разрабатываемая нами ГЛФ должна применяться местно, в том числе на раневой поверхности и в полостях (например, полость абсцесса). Исходя из этого к ЛФ применяются следующие требования:

- ЛФ должна обеспечивать хорошее распределение по раневой поверхности и прикрепление к ней;
- ЛФ должна способствовать отхождению экссудата;
- ЛФ не должна нарушать газообмен;
- ЛФ должна быть стерильна.

Из ЛФ, применяемых для нанесения на раневые поверхности, можно выделить мягкие лекарственные формы: мази, гели, крема, а также растворы и спреи.

Недостатком растворов является необходимость их нанесения на какой-либо подложке (например, на марле, ватном тампоне и т.д.) ввиду их плохого закрепления на месте нанесения. Применение подложки может привести к сорбции на ней действующих веществ и снижению эффективности ГЛФ [15].

Мази нарушают газообмен и плохо высвобождают гидрофильные действующие вещества, к которым относятся рекомбинантные эндолизины, и плохо распределяются на раневой поверхности [16].

Крема ввиду содержания в их составе ПАВ не рекомендуются к применению на открытых ранах, кроме того, при стерилизации из основы могут выделяться дополнительные примеси [16].

В свою очередь гели лишены перечисленных недостатков: хорошо распределяются и закрепляются на раневой поверхности, не нарушают газообмен, в их состав можно ввести вещества, способствующие оттоку экссудата, гели

хорошо высвобождают гидрофильные действующие вещества, менее подвержены бактериальной контаминации, проще в нанесении и при необходимости легко удаляются с места нанесения, в отличие от мазей. Возможно получение стерильных ЛФ [16].

Учитывая приведенные выше данные, было принято решение разрабатывать биотехнологический препарат на основе рекомбинантных эндолизинов в форме геля.

3.1 Выбор оптимальной концентрации АФС в ГЛФ

Для определения оптимальной концентрации кандидатных АФС рекомбинантных эндолизинов для дальнейшего введения их в состав ГЛФ была определена специфическая бактерицидная активность трех индивидуальных белков и их комбинации в диапазоне концентраций от 10 мкг/мл до 10 мг/мл.

Исследование проводилось на тест-культуре *A. baumannii* TS 50-16, полученные результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Специфическая активность индивидуальных рекомбинантных эндолизинов и их смеси в различных концентрациях

Эндолизин	Концентрация, %						
	10 мг/мл	1 мг/мл	300 мкг/мл	150 мкг/мл	100 мкг/мл	50 мкг/мл	10 мкг/мл
LysECD7	98,20	97,57	94,48	99,66	38,84	-	-
LysAm24	100,00	100,00	100,00	99,74	71,50	-	-
LysAp22	100,00	85,30	50,56	63,68	25,80	-	-
LysECD7 + LysAm24 + LysAp22	-	48,55	-	100,00	91,96	98,17	98,55

Примечание: «-» – исследование не проводилось

Из таблицы 8 видно, что использование смеси рекомбинантных эндолизинов с концентрацией каждого белка 1 мг/мл приводило к резкому снижению противомикробной активности в то время, как при применении индивидуальных белков бактерицидная активность сохранялась на высоком уровне вплоть до концентрации 10 мг/мл, что может указывать на ингибирование свойств эндолизинов в смесях с высокими концентрациями белков. На основе полученных

результатов был сделан вывод о нецелесообразности использования смеси рекомбинантных эндолизинов в данной концентрации.

Для последующих испытаний изготавливались образцы с концентрациями эндолизинов 150 и 50 мкг/мл ввиду наиболее высокого уровня специфической активности.

3.2 Выбор вспомогательных веществ, изготовление экспериментальных составов и определение совместимости АФС с компонентами ЛФ

В качестве гелеобразователей для изготовления ЛФ изучали возможность использовать гидроксипропилметилцеллюлозу марки Venecel K100M и гидроксиэтилцеллюлозу марки Natrosol 250 ННХ, являющиеся производными целлюлозы. Производные целлюлозы являются наиболее индифферентными гелеобразователями, используемыми в ЛФ для всех видов применения, включая парентеральное. Гидроксипропилметилцеллюлозу и гидроксиэтилцеллюлозу различных коммерческих марок отличает простота технологии, отсутствие необходимости нагревания, устойчивость к стерилизации, широкий диапазон вязкостей, нейтральное значение рН, устойчивость в присутствии электролитов (компонентов буферных растворов).

Для варьирования показателей стабильности, мукоадгезии и реологических свойств ЛФ использовались ПЭГ с молекулярными массами 400, 1500, 3000 и 6000. Являясь осмотически активными эксципиентами, полиэтиленгликоли рекомендуются для введения в состав ЛФ, предназначенных для нанесения на раневую поверхность – так как будут способствовать оттоку гнойного содержимого и очистке раны.

Все образцы изготавливались с использованием в качестве растворителя буферного раствора с рН=7,5 (20 мМ Трис-НСl). Объем растворителя определялся исходя из необходимого количества образца. В случае, если планировалось внесение в образец действующих веществ, из рассчитанного объема растворителя вычитался объем раствора действующих веществ.

Natrosol 250 ННХ. В необходимый объем растворителя, нагретый до $50 \pm 5^\circ\text{C}$, при постоянном перемешивании постепенно добавляли рассчитанное количество

гелеобразователя. После полного растворения вещества передавали раствор на стерилизацию.

Benecel K100M. В необходимый объем растворителя при комнатной температуре при постоянном перемешивании постепенно добавляли рассчитанное количество гелеобразователя. Перемешивали до полного растворения вещества и образования геля. Передавали полученный гель на стерилизацию.

ПЭГ 400. К необходимому объему растворителя при комнатной температуре добавляли рассчитанный объем ПЭГ 400 и тщательно перемешивали. Передавали полученный раствор на стерилизацию.

ПЭГ 1500-6000. В необходимый объем растворителя, нагретый до $50 \pm 5^\circ\text{C}$, при постоянном перемешивании постепенно добавляли рассчитанное количество ПЭГ. После полного растворения вещества передавали раствор на стерилизацию.

Стерилизация образцов гелевой основы осуществлялась автоклавированием при 121°C в течение 12 мин.

В таблице 9 представлены экспериментальные составы гелевых основ. После изготовления составы подвергались стерилизации автоклавированием при 121°C в течение 12 мин. В качестве растворителя использовался буферный раствор Трис-НСI с $\text{pH}=7,5$.

Таблица 9 – Экспериментальные составы гелевых основ

№ состава	Концентрация эксципиентов, м/о %					
	Natrosol 250 ННХ	Benecel K100M	ПЭГ 400	ПЭГ 1500	ПЭГ 3000	ПЭГ 6000
1	1	-	-	-	-	-
2	1,5	-	-	-	-	-
3	1	-	1	-	-	-
4	1	-	2	-	-	-
5	1	-	3	-	-	-
6	1	-	-	1	-	-
7	1	-	-	1,5	-	-
8	1	-	-	2	-	-
9	1	-	-	3	-	-
10	1	-	-	-	1	-
11	1	-	-	-	2	-
12	1	-	-	-	3	-
13	1	-	-	-	-	1
14	1	-	-	-	-	2
15	1	-	-	-	-	3

Продолжение таблицы 9

№ состава	Концентрация эксципиентов, м/о %					
	Natrosol 250 ННХ	Benecel K100M	ПЭГ 400	ПЭГ 1500	ПЭГ 3000	ПЭГ 6000
16	-	1	-	-	-	-
17	-	1,5	-	-	-	-
18	-	1	1	-	-	-
19	-	1	2	-	-	-
20	-	1	3	-	-	-
21	-	1	-	1	-	-

Как видно из таблицы 9, суммарно был изготовлен 21 экспериментальный состав с различными комбинациями вспомогательных веществ в различных концентрациях, которые должны были обеспечить технологические и физико-химические свойства разрабатываемой ГЛФ. До и после стерилизации у экспериментальных составов контролировалось значение рН и реологические свойства (вязкость).

Стерилизация экспериментальных составов 16-21 (Таблица 9) приводила к расслоению геля и потере технологических свойств, что говорит о невозможности их использования для дальнейшей разработки, так как одним из главных параметров ГЛФ на основе рекомбинантных эндолизинов является стерильность, которую невозможно обеспечить с использованием указанных составов ввиду невозможности их стерилизации путем автоклавирования. В связи с этим дальнейшее исследование данных составов не проводилось.

Для оставшихся составов 1-15 были изучены значение рН и вязкость до и после стерилизации для выявления возможных изменений данных параметров в процессе автоклавирования (Таблица 10).

Таблица 10 – Значения рН и вязкости экспериментальных гелевых основ до и после стерилизации

№ состава	рН		Вязкость, Па·с	
	До стерилизации	После стерилизации	До стерилизации	После стерилизации
1	7,40	8,26	0,198 ±0,100	0,167 ±0,008
2	7,50	8,34	0,205 ±0,102	0,226 ±0,011
3	7,17	8,00	0,125 ±0,06	0,114 ±0,05

Продолжение таблицы 10

№ состава	рН		Вязкость, Па·с	
	До стерилизации	После стерилизации	До стерилизации	После стерилизации
4	6,92	6,12	0,133 ±0,006	0,036 ±0,002
5	6,47	5,34	0,153 ±0,007	0,127 ±0,006
6	7,86	7,92	0,151 ±0,007	0,144 ±0,007
7	7,42	7,47	0,150 ±0,009	0,154 ±0,007
8	7,30	7,34	0,157 ±0,008	0,170 ±0,008
9	7,31	7,70	0,166 ±0,008	0,193 ±0,009
10	7,49	8,06	0,104 ±0,05	0,124 ±0,006
11	7,46	7,43	0,102 ±0,005	0,165 ±0,008
12	7,64	7,91	0,112 ±0,005	0,064 ±0,003
13	4,75	4,59	0,172 ±0,008	0,0041 ±0,0002
14	4,44	4,28	0,092 ±0,0046	0,0019 ±0,0001
15	4,33	4,23	0,244 ±0,0122	0,0021 ±0,0001

Основываясь на данных, представленных в таблице 10, в связи с резким изменением рН после стерилизации были исключены составы 1-3, 5 и 10. Составы 13-15 изначально обладали низким значением рН, которое могло оказывать негативное влияние на АФС, и теряли вязкость после стерилизации в связи с чем они были исключены из эксперимента. В связи с резким изменением вязкости после стерилизации были исключены составы 4, 8, 9 и 12. Из оставшихся составов 6, 7 и 11 для дальнейших испытаний были выбраны составы 7 и 11, как обеспечивающие необходимый уровень рН после стерилизации. В составе 11 концентрация ПЭГ 3000 была снижена до 1,5 % для предотвращения повышения вязкости после стерилизации.

На следующем этапе работ была проведена оценка совместимости АФС рекомбинантных эндолизинов с экспериментальными гелевыми основами. Совместимость оценивали путем определения специфической активности

рекомбинантных эндолизинов после внесения в стерильную гелевую основу в концентрации, планируемой к применению в ГЛФ. Рекомбинантные эндолизины вводили в состав как по отдельности, так и в смеси в выбранных ранее концентрациях 150 мкг/мл и 50 мкг/мл. Специфическая активность оценивалась на тест-культуре *A. baumannii* TS 50-16 по опубликованной методике [38, 39] с использованием в качестве отрицательного контроля раствор исследуемого эксципиента без добавления рекомбинантных эндолизинов для исключения его возможного влияния на тест-культуру. Полученные данные представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Оценка совместимости АФС с гелевыми основами

Эндолизин	Активность в присутствии ВВ, %			
	Трис-НСI (Контроль)	Natrosol 250 ННХ 1,0%	ПЭГ 1500 1,5%	ПЭГ 3000 1,5%
LysAp22 150 мкг/мл	63,68	56,01	48,85	25,39
LysAm24 150 мкг/мл	99,74	100,00	100,00	38,80
LysECD7 150 мкг/мл	99,66	99,76	100,00	99,94
LysAp22 + LysAm24 + LysECD7 По 50 мкг/мл	96,34	82,31	62,63	60,45
LysAp22 + LysAm24 + LysECD7 По 150 мкг/мл	100,00	99,26	99,82	98,90

На основе полученных данных было принято решение использовать в качестве АФС смесь из трех рекомбинантных эндолизинов с индивидуальной концентрацией 150 мкг/мл (общая концентрация белков – 450 мкг/мл). Применение смеси рекомбинантных эндолизинов обеспечит наиболее широкий спектр противомикробной активности ГЛФ, что позволит применять ее при большем числе клинических случаев.

Ввиду того, что смесь рекомбинантных эндолизинов показала наилучшую бактерицидную активность в присутствии Natrosol 250 ННХ и ПЭГ 1500 в концентрации 1,0 и 1,5% соответственно, для дальнейших исследований был выбран состав гелевой основы №7.

3.3 Разработка и валидация аналитических методик контроля качества ГЛФ

Для стандартизации подхода к контролю качества ГЛФ была разработана методика контроля по показателю «Подлинность», модифицирована методика определения показателя «Специфическая активность» и проведена их валидация. Валидация аналитических методик проводилась согласно требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV [9].

3.3.1 Подлинность

3.3.1.1 Получение поликлональной антисыворотки к смеси рекомбинантных эндолизинов

Для получения кроличьей поликлональной антисыворотки к коктейлю рекомбинантных эндолизинов, входящих в состав ГЛФ, был проведен цикл внутримышечных иммунизаций кроликам, состоящий из 4 инъекций соответствующим коктейлем. Для гарантированного иммунного ответа для иммунизации была взята доза антигена, вдвое превышающая концентрацию эндолизинов в лекарственной форме (по 2,0-2,2 мг каждого эндолизина на одну иммунизацию). Содержимое флаконов с эндолизинами растворяли в 20 мМ Трис-НСl буфере (рН=7,5). Исходя из концентрации эндолизинов во флаконах, объем раствора антигена (АГ) составил:

- на первую иммунизацию – 1,2 мл (0,5 мл LysECD7 - 2,2 мг, 0,4 мл LysAp22 - 2 мг, 0,3 мл LysAm24 - 2,1 мг);
- на вторую иммунизацию – 1,22 мл (0,5 мл LysECD7 - 2,2 мг, 0,4 мл LysAp22 - 2 мг, 0,32 мл LysAm24 - 2,1 мг);
- на третью иммунизацию – 0,51 мл (0,2 мл LysECD7 - 2,2 мг, 0,11 мл LysAp22 - 2,1 мг, 0,2 мл LysAm24 - 2,2 мг);
- на четвертую иммунизацию – 0,9 мл (0,5 мл LysECD7 - 2,2 мг, 0,2 мл LysAp22 - 2 мг, 0,2 мл LysAm24 - 2,1 мг).

Иммунизация состояла из цикла внутримышечных инъекций АГ, смешанного с адьювантом Фрейнда, в четыре точки (в равном объеме в четыре лапы кролика) и проводилась по следующей схеме.

- первая иммунизация: 1,2 мл АГ +1,2 мл полного адьюванта Фрейнда;
- вторая иммунизация через 10 дней: 1,22 мл АГ+1,22 мл неполного адьюванта Фрейнда;
- третья иммунизация через 20 дней: 0,51 мл АГ+0,6 мл неполного адьюванта Фрейнда;
- четвертая иммунизация через 30 дней: 0,9 мл АГ+0,9 мл полного адьюванта Фрейнда;
- забор крови через 37 дней.

Полученная кроличья антисыворотка была проанализирована иммунохимическими методами (преципитация по Оухтерлони, иммуноэлектрофорез) для подтверждения образования антител к каждому рекомбинантному эндолизину в смеси, о чем свидетельствовали линии преципитации, образующиеся между лунками с изучаемыми эндолизинами и лункой с кроличьей антисывороткой (Рисунок 38).

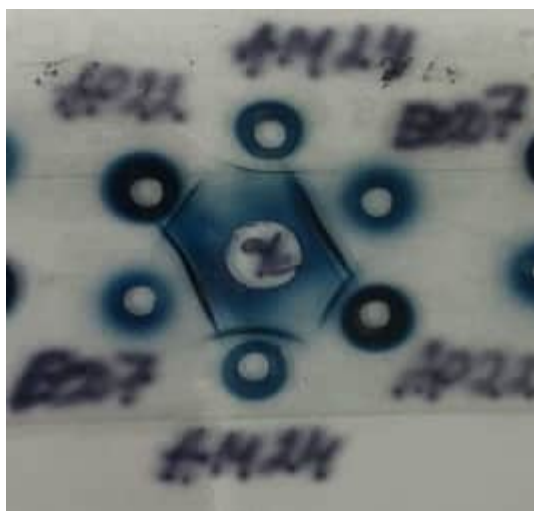


Рисунок 38 – Реакция преципитации по Оухтерлони

Полученная антисыворотка использовалась для контроля подлинности разработанной ГЛФ методом иммуноэлектрофореза согласно требованиям ОФС.1.8.2.002.15 «Имуноэлектрофорез в агаровом геле» ГФ РФ XIV [9].

3.3.1.2 Валидация

Валидация разработанной методики проводилась по параметру «Специфичность». Для валидации по данному показателю были исследованы следующие образцы:

1. смесь рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22 с индивидуальной концентрацией каждого белка 150 мкг/мл без добавления вспомогательных веществ (положительный контроль);
2. 3 лабораторные серии ГЛФ (00108420, 00115420, 00122420);
3. раствор, содержащий рекомбинантный эндолизин LysSi3 в концентрации 150 мкг/мл (отрицательный контроль);
4. плацебо (отрицательный контроль).

При проведении иммуноэлектрофореза использовали сыворотку иммунизированного и интактного кроликов. Для удовлетворения требованиям образцы 1 и 2 должны были дать положительный результат (линии преципитации) с сывороткой иммунизированного кролика и отрицательный результат с сывороткой интактного кролика, а остальные образцы – отрицательный результат (отсутствие линии преципитации) с обеими сыворотками.

Полученные результаты представлены на рисунке 39, линии преципитации отмечены красными стрелками, сыворотка иммунизированного кролика отмечена как «Антисыворотка +», сыворотка интактного кролика отмечена как «Антисыворотка –».

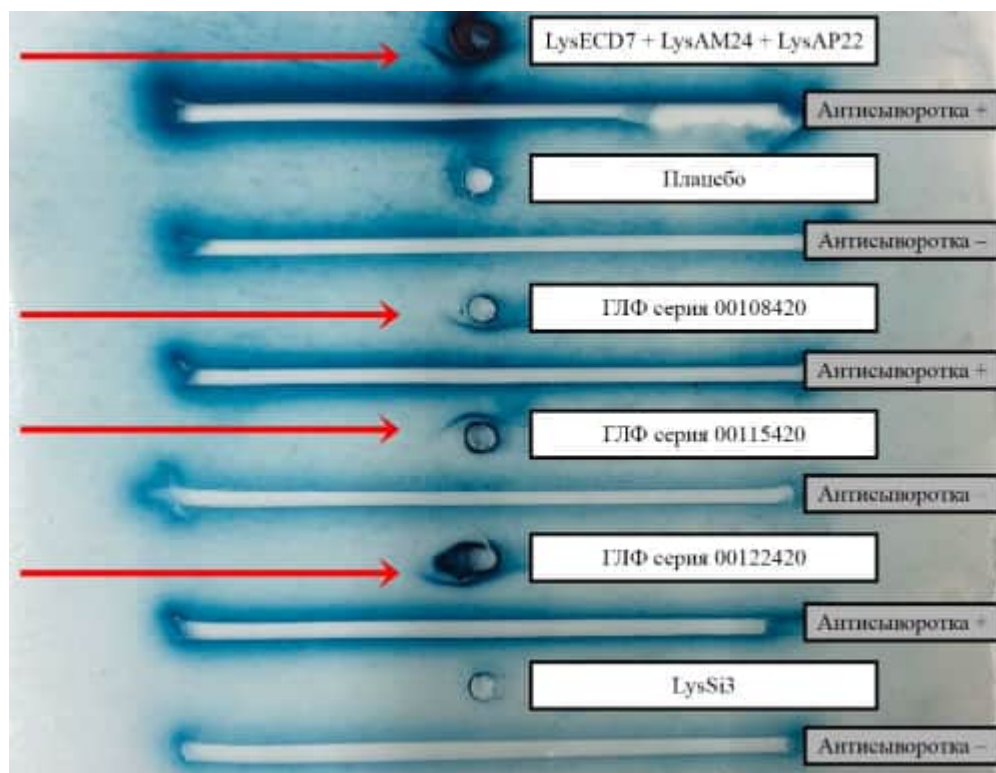


Рисунок 39 – Результаты анализа образцов методом иммуноэлектрофореза

Из рисунка 39 видно, что при проведении иммуноэлектрофореза с указанными образцами образуются линии преципитации между сывороткой иммунизированного кролика, смесью эндолизинов, входящих в состав ГЛФ и тремя сериями ГЛФ, в остальных случаях линии преципитации не образуются. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости, вследствие чего методика признана специфичной и пригодной для контроля разработанной ГЛФ по показателю «Подлинность».

3.3.2 Специфическая активность

Контроль специфической активности ГЛФ проводился по опубликованной методике [38, 39] с модификациями, обусловленными исследуемыми образцами и используемыми микроорганизмами. Так, питательные среды, изначально описанные в методике, были заменены на агар Мюллера-Хинтона и МПБ для ускорения достижения микроорганизмами экспоненциальной фазы роста, которая необходима для проведения анализа. Кроме того, для расчета специфической активности разработанной ГЛФ в качестве отрицательного контроля использовали плацебо для исключения влияния компонентов лекарственной формы на результат анализа.

Валидация методики проводилась по показателям «Правильность (сходимость)» и «Внутрилабораторная прецизионность». В качестве тест-микроорганизмов были выбраны *A. baumannii* TS 50-16, *E. coli* ATCC 25922 ввиду простоты культивирования и быстрого достижения экспоненциальной фазы роста, что критично при проведении поточного посерийного анализа ЛП в условиях производства.

Валидация проводилась путем анализа трех лабораторных серий ГЛФ (00108420, 00115420, 00122420) и смеси рекомбинантных эндолизинов, входящих в его состав, без добавления вспомогательных веществ.

3.3.2.1 Правильность (сходимость)

Для расчета правильности (сходимости) была определена теоретическая специфическая активность смеси рекомбинантных эндолизинов без добавления вспомогательных веществ в отношении выбранных бактериальных штаммов.

Определение проводилось путем анализа смесей рекомбинантных эндолизинов, которые использовались для изготовления лабораторных серий ГЛФ. Теоретическую специфическую активность рассчитывали, как среднее арифметическое результатов пяти независимых повторностей.

Далее был проведен анализ трех лабораторных серий ГЛФ (00108420, 00115420, 00122420) в трех независимых повторностях и рассчитано отношение Z_i по следующей формуле:

$$Z_i = \frac{X_{\text{теор}}}{X_{\text{пр}}} * 100\%, \text{ где:}$$

$X_{\text{теор}}$ – теоретическая противомикробная активность, полученная путем анализа смеси рекомбинантных эндолизинов без добавления вспомогательных веществ, %;

$X_{\text{пр}}$ – практическая противомикробная активность, определенная путем анализа лабораторных серий ГЛФ.

Полученное значение Z_i должно находиться в пределах 90-110%.

В таблице 12 представлены полученные результаты, все значения соответствуют заданным критериям.

Таблица 12 – Валидация методики контроля специфической активности по показателю «Правильность (сходимость)»

Серия	$X_{\text{теор}}$	$X_{\text{пр}}$	Z_i	Z_i среднее
<i>E. coli</i> ATCC 25922				
00108420	96,72%	95,99%	99,25%	99,28%
	96,72%	99,50%	102,87%	
	96,72%	93,53%	96,70%	
00115420	100,00%	99,70%	99,70%	
	100,00%	98,61%	98,61%	
	100,00%	98,66%	98,66%	
00122420	99,92%	99,26%	99,34%	
	99,92%	98,77%	98,85%	
	99,92%	99,43%	99,51%	
<i>A. baumannii</i> TS 50-16				
00108420	97,39%	99,77%	102,44%	100,81%
	97,39%	100,00%	102,68%	
	97,39%	99,38%	102,04%	
00115420	99,73%	100,00%	100,27%	
	99,73%	100,00%	100,27%	
	99,73%	99,76%	100,03%	
00122420	100,00%	99,89%	99,89%	
	100,00%	99,89%	99,89%	
	100,00%	99,78%	99,78%	

Из таблицы 12 видно, что соотношение Z_i соответствовало установленным критериям приемлемости и находилось в пределах от 90 до 110%. Таким образом, модифицированная методика обеспечивает получение достоверных и правильных результатов в условиях повторяемости.

3.3.2.2 Внутрилабораторная прецизионность

Для валидации методики по показателю «Внутрилабораторная прецизионность» проводился независимый анализ трех лабораторных серий ГЛФ (00108420, 00115420, 00122420) двумя аналитиками в двух повторностях, после чего результаты аналитика №1 сравнивались с результатами аналитика №2 путем расчета относительного стандартного отклонения (RSD, %) по формуле:

$$RSD = \frac{\sqrt{\frac{\sum(X_i - X_{cp})^2}{n - 1}}}{X_{cp}} * 100\%, \text{ где:}$$

X_i – специфическая бактерицидная активность, %;

X_{cp} – среднее значение специфической активности, %;

n – число значений в выборке.

Значение RSD для всех результатов не должно превышать 10%, а для каждой пары результатов «аналитик №1 : аналитик №2» – 5%.

Рассчитанные значения RSD представлены в таблице 13 и соответствуют заданным критериям.

Таблица 13 – Валидация методики контроля специфической активности по показателю «Внутрилабораторная прецизионность»

Серия	X_i		RSD	RSD общее
	Аналитик №1	Аналитик №2		
<i>E. coli</i> ATCC 25922				
00108420	95,99%	98,30%	1,68%	1,66%
	99,50%	98,08%	1,02%	
00115420	99,70%	99,65%	0,04%	
	98,61%	99,30%	0,49%	
00122420	99,26%	94,28%	3,64%	
	98,77%	98,97%	0,14%	
<i>A. baumannii</i> TS 50-16				
00108420	99,77%	100,00%	0,16%	0,09%
	100,00%	100,00%	0,00%	
00115420	100,00%	100,00%	0,00%	
	100,00%	99,84%	0,11%	
00122420	99,89%	100,00%	0,08%	
	99,78%	100,00%	0,16%	

Согласно данным, представленным в таблице 13, значение RSD для каждой пары результатов «аналитик №1 : аналитик №2» и значение RSD для всех результатов соответствовали установленным критериям приемлемости. Таким образом, модифицированная методика обеспечивает получение достоверных и правильных результатов при анализе разными людьми в условиях одной лаборатории.

На основе полученных данных был сделан вывод о пригодности разработанных методик для проведения контроля качества ГЛФ по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность». Результаты валидации были оформлены в виде протоколов и отчетов валидации.

3.4 Разработка спецификации на ГЛФ

После разработки и валидации методик контроля качества ГЛФ была разработана спецификация в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV [9]. Показатели качества определялись исходя из способа применения разработанной ГЛФ и упаковки. Показатели качества, включенные в спецификацию представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Показатели качества, включенные в спецификацию на гель бактерицидный с рекомбинантными эндолизинами LysECD7, LysAm24 и LysAp22

№ п/п	Наименование показателя	Требование		Методика контроля
1	Описание	Прозрачный бесцветный гель без запаха		Визуальный
2	Подлинность	Образует линию преципитации с антисывороткой к LysECD7, LysAm24 и LysAp22		Метод иммуноэлектрофореза, ГФ РФ ОФС.1.8.2.002.15
3	pH	7,0-8,0		Потенциометрический, ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004.15
4	Аномальная токсичность	Препарат должен быть нетоксичным		Биологический, ГФ РФ
5	Стерильность	Препарат должен быть стерилен		Метод мембранной фильтрации, ГФ РФ ОФС.1.2.4.0003.15
6	Специфическая активность	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Не менее 80%	Микробиологический метод, определение бактерицидной активности на тест-микроорганизмах
		<i>A. baumannii</i> TS 50-16	Не менее 80%	
7	Бактериальные эндотоксины	Не более 100 ЕЭ/г		ЛАЛ-тест, ГФ РФ ОФС.1.2.4.0006.15

Продолжение таблицы 14

№ п/п	Наименование показателя	Требование	Методика контроля
8	Герметичность упаковки	Упаковка должна быть герметична	ГФ РФ ОФС.1.4.1.0008.15
9	Масса содержимого упаковки	5 г ±5%	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007.15
10	Упаковка	По 5 г в шприце стерильном одноразовом с заглушкой с градуировкой или без градуировки. На шприц наклеивают этикетку. По 5 г в тубу алюминиевую с мембраной. На тубу наклеивают этикетку.	Визуальный
11	Маркировка	На этикетке на русском языке указывают: торговое наименование препарата, лекарственную форму, дозировку в мкг/г, количество в г, наименование производителя, номер серии, дату выпуска, срок годности	Визуальный
12	Условия хранения	Хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С	-

3.5 Изучение стабильности рекомбинантных эндолизинов в экспериментальных образцах лекарственной формы

В рамках эксперимента по изучению стабильности рекомбинантных эндолизинов в выбранном составе были изготовлены 2 лабораторные серии ГЛФ. Контроль в процессе хранения проводился по показателю «Специфическая активность». В предварительном эксперименте для изучения бактерицидной активности были выбраны 6 штаммов микроорганизмов для контроля бактерицидной активности каждого отдельного белка (по 2 штамма для каждого рекомбинантного эндолизина). Хранение проводилось в течение 7 суток при температуре от +2 до +8°С. Результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Изучение стабильности рекомбинантных эндолизинов в составе ГЛФ

Штамм	Активность в составе ЛФ, %	
	Серия 01	Серия 02
После изготовления		
<i>LysAp22</i>		
<i>E. coli</i> 185	86,70	85,11
<i>E. coli</i> 515	100,00	100,00
<i>LysAm24</i>		
<i>A. baumannii</i> 402	90,85	100,00

Продолжение таблицы 15

Штамм	Активность в составе ЛФ, %	
	Серия 01	Серия 02
<i>A. baumannii</i> Гар	96,90	100,00
<i>LysECD7</i>		
<i>P. aeruginosa</i> 1	100,00	100,00
<i>P. aeruginosa</i> 2	100,00	100,00
После 7 суток хранения		
<i>LysAp22</i>		
<i>E. coli</i> 185	84,62	92,86
<i>E. coli</i> 515	87,93	100,00
<i>LysAm24</i>		
<i>A. baumannii</i> 402	86,84	83,09
<i>A. baumannii</i> Гар	65,60	41,67
<i>LysECD7</i>		
<i>P. aeruginosa</i> 1	100,00	100,00
<i>P. aeruginosa</i> 2	100,00	100,00

Из таблицы 15 видно, что обе серии ГЛФ через 7 суток хранения при температуре от +2 до +8°C сохраняли противомикробную активность, что говорит об их стабильности при хранении в течение заданного срока при данной температуре. Далее были проведены долгосрочные испытания в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» ГФ РФ XIV для подтверждения стабильности изготовленной ГЛФ в течение 6 месяцев хранения при температуре от +2 до +8°C. Для проведения испытаний были изготовлены 3 лабораторные серии ГЛФ.

Установление срока годности геля рекомбинантных эндолизиннов проводили в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи методом долгосрочных испытаний по показателям качества, указанным в спецификации на ЛП, во всех временных точках:

- Описание
- Подлинность
- рН
- Аномальная токсичность
- Стерильность
- Специфическая активность
- Бактериальные эндотоксины

- Герметичность упаковки
- Масса содержимого упаковки

Перед закладкой ГЛФ на стабильность был проведен выбор упаковки, которая должна обеспечивать герметичность и сохранность готовой лекарственной формы. В качестве упаковки разработанной ГЛФ были выбраны шприцы производства Nordson, США номинального объема 6 мл, (арт. 7660279) с заглушками (арт. 7660198) и с плунжером Dial-a-Dose (арт. 7661311), позволяющим извлекать строго заданный объем, что обеспечивает однородность дозирования при нанесении ГЛФ на раневую поверхность. Внешний вид упаковки представлен на рисунке 40.

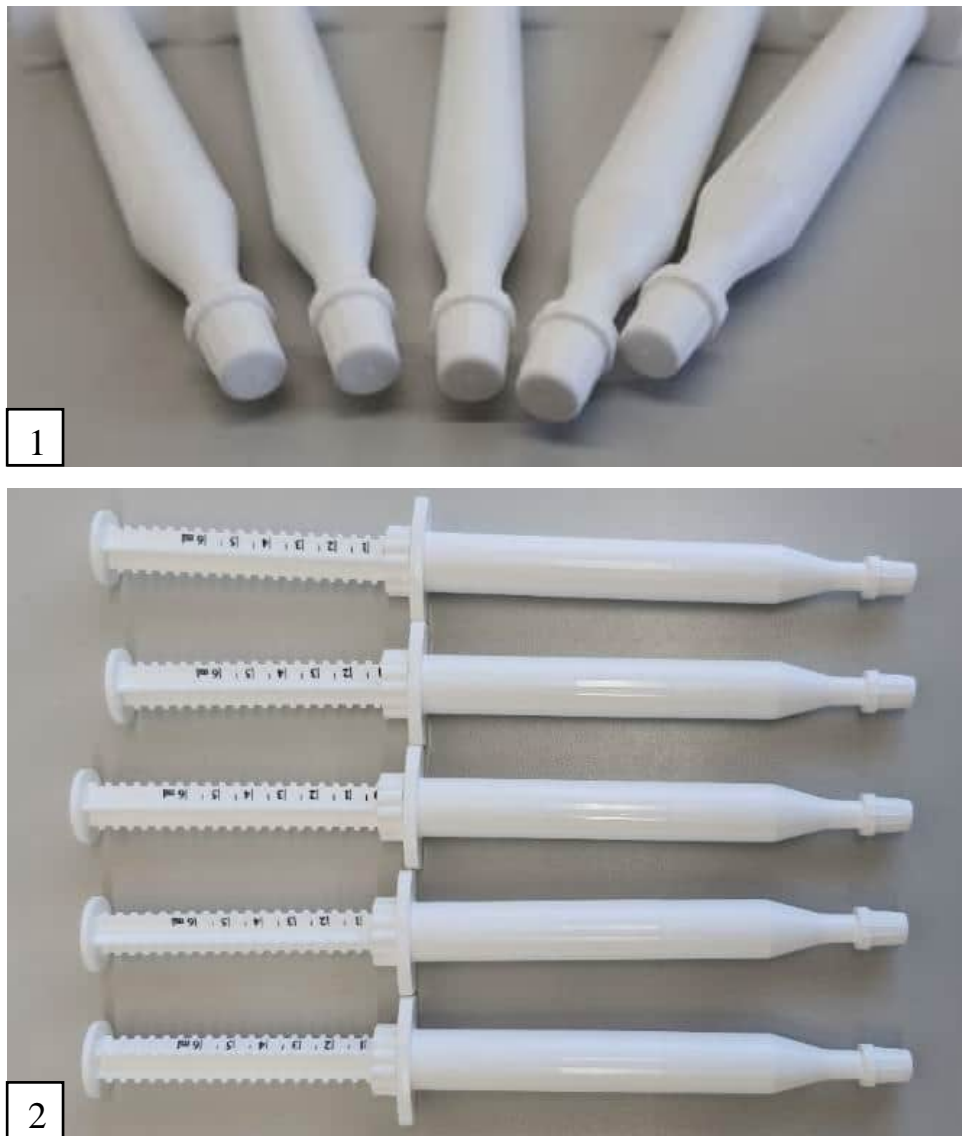


Рисунок 40 – Упаковка ГЛФ в шприцы

Примечание: 1 – вид канюли шприца с заглушкой; 2 – общий вид преднаполненных шприцев

Также в качестве упаковки для ГЛФ использовались алюминиевые тубы с мембраной (Рисунок 41).



Рисунок 41 – Упаковка ГЛФ в тубы алюминиевые

Выбор двух упаковок обусловлен вариативностью условий применения разрабатываемой ГЛФ. Так, шприц обеспечивает удобное введение в полости (например, полость абсцесса), в то время как тубы позволяют наносить ГЛФ на раневые и ожоговые поверхности.

Материал упаковок подбирался по совместимости с иммунобиологическими субстанциями для предотвращения возможной сорбции действующих веществ на материале и их инактивации за счет различных химических взаимодействий.

Ввиду выбора двух упаковок ГЛФ определение срока годности проводилось в шприцах и в тубах при $+2^{\circ}\text{C}$ и при $+8^{\circ}\text{C}$ для оценки стабильности ГЛФ при крайних значениях температуры хранения.

Полученные результаты представлены в таблицах 16-19.

Таблица 16 – Результаты определения срока хранения ГЛФ при температуре +2°С. Упаковка – шприцы.

Номер серии	Дата анализа	Описание	Подлинность	рН	Специфическая активность		Стерильность	Аномальная токсичность	Бактериальные эндотоксины	Герметичность упаковки	Масса содержимого упаковки	Срок хранения	Выводы по хранению
		Прозрачный бесцветный гель без запаха			Иммуноэлектрофорез. Образует линию преципитации с антисывороткой к LysECD7, LysAm24, LysAp22	7,0-8,0							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
00128420	28.04.20	Соотв.	Соответствует	7,4	89,70%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,07	-	Годен
	28.05.20	Соотв.	Соответствует	7,5	90,98%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,18	1 мес.	Годен
	27.07.20	Соотв.	Соответствует	7,7	82,97%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,12	3 мес.	Годен
	23.10.20	Соотв.	Соответствует	8,0	84,58%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,25	6 мес.	Годен
00130420	30.04.20	Соотв.	Соответствует	7,6	93,07%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,10	-	Годен
	29.05.20	Соотв.	Соответствует	7,7	100,00%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,83	1 мес.	Годен
	29.07.20	Соотв.	Соответствует	7,7	97,82%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,07	3 мес.	Годен
	27.10.20	Соотв.	Соответствует	8,0	80,97%	98,46%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,92	6 мес.	Годен
00405520	05.05.20	Соотв.	Соответствует	7,4	99,90%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,93	-	Годен
	03.06.20	Соотв.	Соответствует	7,4	84,30%	84,64%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,92	1 мес.	Годен
	31.07.20	Соотв.	Соответствует	7,6	99,00%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,04	3 мес.	Годен
	30.10.20	Соотв.	Соответствует	7,9	95,05%	99,78%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,75	6 мес.	Годен

Таблица 17 – Результаты определения срока хранения ГЛФ при температуре +8°C. Упаковка – шприцы.

Номер серии	Дата анализа	Описание	Подлинность	рН	Специфическая активность		Стерильность	Аномальная токсичность	Бактериальные эндотоксины	Герметичность упаковки	Масса содержимого упаковки	Срок хранения	Выводы по хранению
					<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> TS 50-16							
		Прозрачный бесцветный гель без запаха	Иммуноэлектрофорез. Образует линию преципитации с антисывороткой к LysECD7, LysAm24, LysAp22	7,0-8,0	Не менее 80%		Должен быть стерилизован	Должен быть нетоксичным	Не более 100 ЕЭ/г	Должна быть герметична	5 г±5%		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
00128420	28.04.20	Соотв.	Соответствует	7,4	89,70%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,02	-	Годен
	28.05.20	Соотв.	Соответствует	7,4	91,97%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,17	1 мес.	Годен
	27.07.20	Соотв.	Соответствует	7,6	83,12%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,08	3 мес.	Годен
	23.10.20	Соотв.	Соответствует	7,9	84,18%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,09	6 мес.	Годен
00130420	30.04.20	Соотв.	Соответствует	7,6	93,07%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,12	-	Годен
	29.05.20	Соотв.	Соответствует	7,5	100,00%	99,97%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,92	1 мес.	Годен
	29.07.20	Соотв.	Соответствует	7,8	95,51%	99,12%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,83	3 мес.	Годен
	27.10.20	Соотв.	Соответствует	8,0	82,16%	99,12%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,19	6 мес.	Годен
00405520	05.05.20	Соотв.	Соответствует	7,4	99,90%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,02	-	Годен
	03.06.20	Соотв.	Соответствует	7,5	85,59%	85,11%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,20	1 мес.	Годен
	31.07.20	Соотв.	Соответствует	7,7	98,03%	97,03%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,96	3 мес.	Годен
	30.10.20	Соотв.	Соответствует	8,0	96,18%	99,50%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,04	6 мес.	Годен

Таблица 18 – Результаты определения срока хранения ГЛФ при температуре +2°С. Упаковка – тубы.

Номер серии	Дата анализа	Описание	Подлинность	рН	Специфическая активность		Стерильность	Аномальная токсичность	Бактериальные эндотоксины	Герметичность упаковки	Масса содержимого упаковки	Срок хранения	Выводы по хранению
					<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. baumannii</i> TS 50-16							
		Прозрачный бесцветный гель без запаха	Иммуноэлектрофорез. Образует линию преципитации с антисывороткой к LysECD7, LysAm24, LysAp22	7,0-8,0	Не менее 80%		Должен быть стерилизован	Должен быть нетоксичным	Не более 100 ЕЭ/г	Должна быть герметична	5 г±5%		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
00228420	28.04.20	Соотв.	Соответствует	7,5	90,53%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,82	-	Годен
	28.05.20	Соотв.	Соответствует	7,5	92,79%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,99	1 мес.	Годен
	27.07.20	Соотв.	Соответствует	7,8	82,72%	97,65%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,87	3 мес.	Годен
	23.10.20	Соотв.	Соответствует	8,0	81,47%	96,81%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,83	6 мес.	Годен
00230420	30.04.20	Соотв.	Соответствует	7,5	97,08%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,01	-	Годен
	29.05.20	Соотв.	Соответствует	7,6	97,06%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,77	1 мес.	Годен
	29.07.20	Соотв.	Соответствует	7,6	96,10%	98,75%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,97	3 мес.	Годен
	27.10.20	Соотв.	Соответствует	7,8	83,54%	99,21%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,07	6 мес.	Годен
00505520	05.05.20	Соотв.	Соответствует	7,6	98,76%	99,69%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,89	-	Годен
	03.06.20	Соотв.	Соответствует	7,7	86,06%	100,39%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,99	1 мес.	Годен
	31.07.20	Соотв.	Соответствует	7,8	88,01%	86,35%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,81	3 мес.	Годен
	30.10.20	Соотв.	Соответствует	7,9	86,25%	87,52%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,86	6 мес.	Годен

Таблица 19 – Результаты определения срока хранения ГЛФ при температуре +8°C. Упаковка – тубы.

Номер серии	Дата анализа	Описание	Подлинность	рН	Специфическая активность		Стерильность	Аномальная токсичность	Бактериальные эндотоксины	Герметичность упаковки	Масса содержимого упаковки	Срок хранения	Выводы по хранению
		Прозрачный бесцветный гель без запаха			Иммуноэлектрофорез. Образует линию преципитации с антисывороткой к LysECD7, LysAm24, LysAp22	7,0-8,0							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
00228420	28.04.20	Соотв.	Соответствует	7,4	90,53%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,93	-	Годен
	28.05.20	Соотв.	Соответствует	7,5	90,72%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,96	1 мес.	Годен
	27.07.20	Соотв.	Соответствует	7,8	83,91%	99,26%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,01	3 мес.	Годен
	23.10.20	Соотв.	Соответствует	7,9	80,94%	95,01%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,95	6 мес.	Годен
00230420	30.04.20	Соотв.	Соответствует	7,6	97,08%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,82	-	Годен
	29.05.20	Соотв.	Соответствует	7,6	94,15%	99,28%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,2	1 мес.	Годен
	29.07.20	Соотв.	Соответствует	7,9	98,96%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,18	3 мес.	Годен
	27.10.20	Соотв.	Соответствует	8,0	85,86%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,8	6 мес.	Годен
00505520	05.05.20	Соотв.	Соответствует	7,4	98,76%	99,69%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,96	-	Годен
	03.06.20	Соотв.	Соответствует	7,5	85,49%	100,00%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,05	1 мес.	Годен
	31.07.20	Соотв.	Соответствует	7,8	90,41%	84,66%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	5,08	3 мес.	Годен
	30.10.20	Соотв.	Соответствует	8,0	84,91%	85,18%	Соотв.	Соотв.	Соотв.	Соотв.	4,88	6 мес.	Годен

Как видно из таблиц 16-19, все исследуемые серии ГЛФ в обоих типах упаковки удовлетворяли требованиям спецификации на протяжении заданного срока хранения. Исходя из полученных в ходе изучения стабильности данных был сделан вывод о стабильности разработанной ГЛФ при упаковке как в шприцы, так и в тубы алюминиевые и хранения в течение 6 месяцев при температуре от +2 до +8 °С.

3.6 Отработка технологии изготовления ГЛФ

При отработке технологии изготовления ГЛФ заданного состава учитывались физико-химические свойства действующих и вспомогательных веществ. Так, рекомбинантные эндолизины чувствительны к высоким температурам, в связи с чем невозможна их стерилизация методом автоклавирования. В связи с этим действующие вещества вводили в состав в виде стерильных концентрированных растворов в простерилизованную методом автоклавирования гелевую основу. Стерильные растворы действующих веществ получали путем стерилизующей фильтрации через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и мембраной, изготовленной из полиэфирсульфона (PES), что предотвращало сорбцию рекомбинантных эндолизинов в ходе фильтрования.

При изготовлении гелевой основы учитывали объем концентрированных растворов действующих веществ, который будет добавлен после стерилизации и вносили соответствующий объем растворителя.

Учитывая растворимость вспомогательных веществ, их вводили в нагретый до 50±5°С буферный раствор при постоянном перемешивании. ПЭГ 1500 вводили в первую очередь и после его полного растворения вводили Natrosol 250 ННХ, после чего перемешивали до набухания и формирования прозрачного геля.

3.7 Разработка лабораторного регламента

После отработки технологии изготовления ГЛФ был разработан лабораторный регламент, в котором были приведены характеристика ГЛФ, технологическая и аппаратурная схемы производства, спецификации используемого оборудования, характеристика сырья и вспомогательных

материалов, перечень промежуточных продуктов, параметры режима и безопасности технологического процесса, материальный баланс и т.д.

Технологическая и аппаратурная схемы производства ГЛФ на основе рекомбинантных эндолизиннов представлены на рисунках 42 и 43.

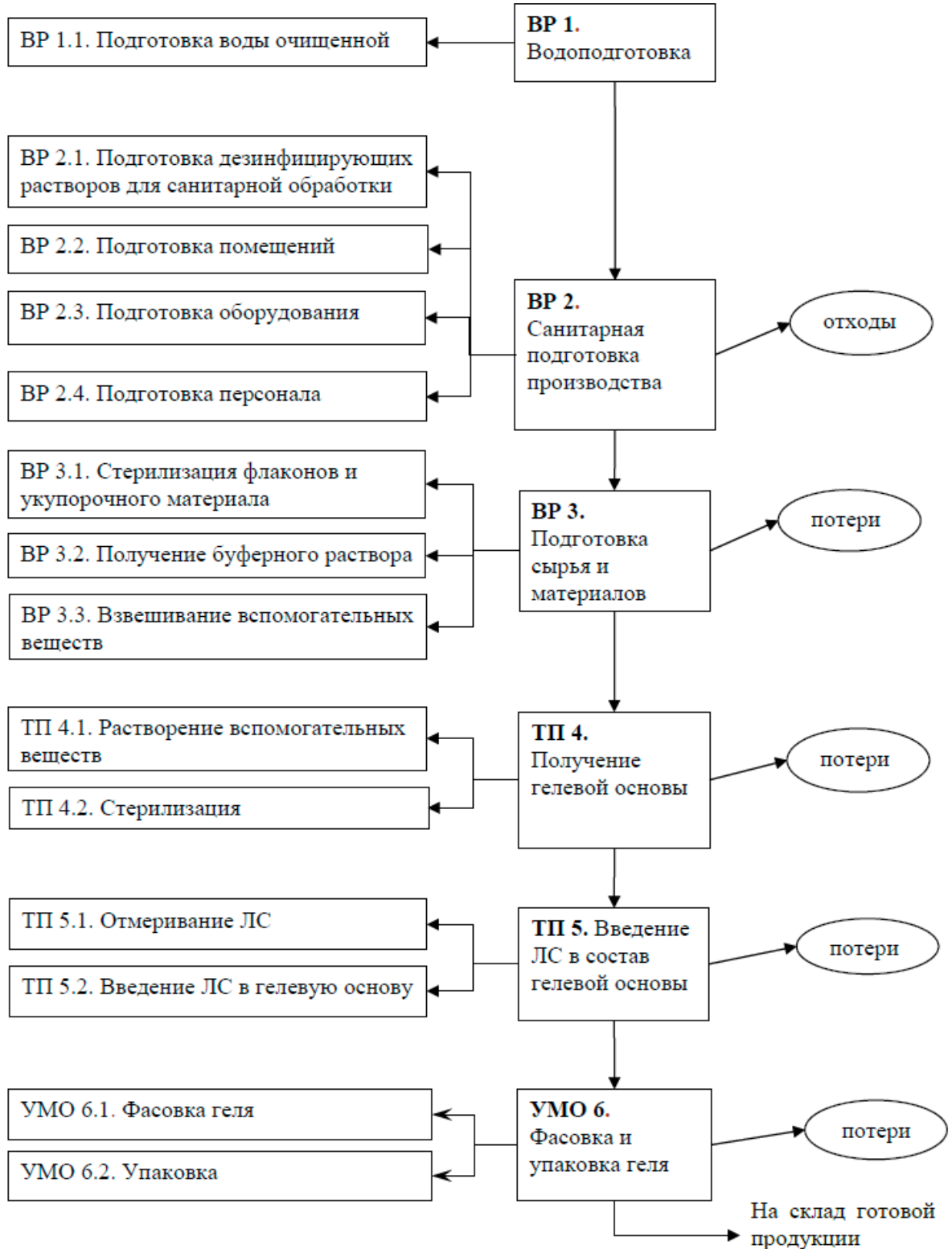


Рисунок 42 – Технологическая схема производства

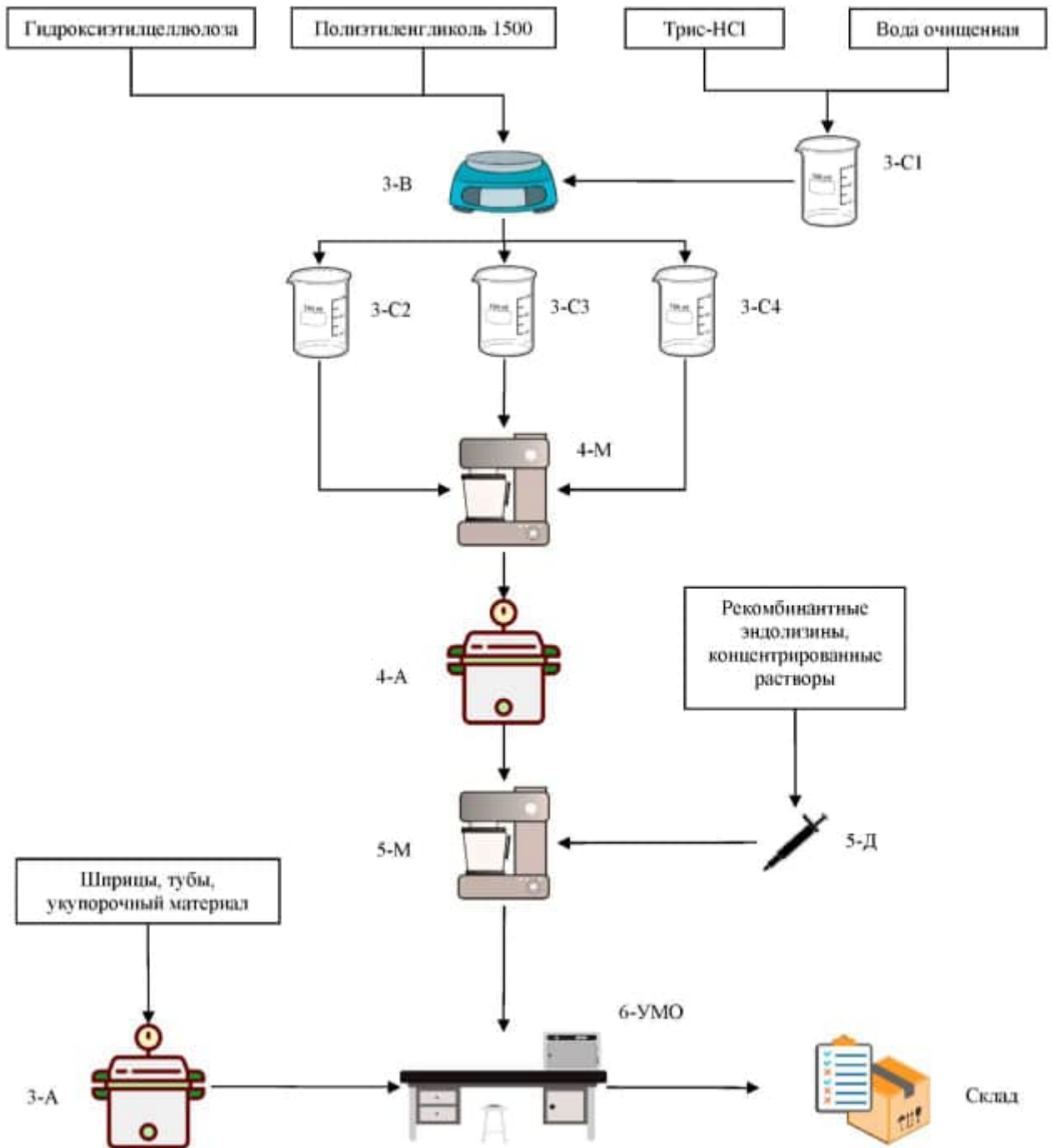


Рисунок 43 – Аппаратурная схема производства

Отработанная технология изготовления ГЛФ с рекомбинантными эндолизинами состояла из нескольких этапов:

ВР 1. Водоподготовка:

ВР 1.1. Подготовка воды очищенной;

ВР 2. Санитарная подготовка производства:

ВР 2.1. Приготовление дезинфицирующих растворов для санитарной обработки (спирт этиловый 70%, раствор Жавельона и т.д.);

- ВР 2.2. Подготовка помещений. Проведение уборки и дезинфекции рабочих поверхностей;
- ВР 2.3. Подготовка оборудования. Обработка оборудования дезинфицирующими средствами;
- ВР 2.4. Подготовка персонала. Переодевание в технологическую одежду, обработка рук дезинфицирующими средствами;
- ВР 3. Подготовка сырья и материалов:
- ВР 3.1. Стерилизация расходных материалов, флаконов, укупорочного материала в паровом стерилизаторе ГП-400-2, ТЗМОИ (3-А);
- ВР 3.2. Приготовление 20 мМ Трис-НСl с рН = 7,5 в мерном стакане (3-С1);
- ВР 3.3. Взвешивание вспомогательных веществ на весах AJ-220CE, ViBRA, Япония (3-В) в отдельных мерных емкостях для ПЭГ 1500 (3-С2), Natrosol 250 ННХ (3-С3) и буферного раствора (3-С4);
- ТП 4. Получение гелевой основы:
- ТП 4.1. Растворение вспомогательных веществ в буферном растворе при помощи верхнеприводной мешалки RW 11 basic, ИКА, Германия (4-М);
- ТП 4.2. Стерилизация гелевой основы путем автоклавирования в паровом стерилизаторе ГП-400-2, ТЗМОИ (4-А);
- ТП 5. Введение действующих веществ в состав ГЛФ:
- ТП 5.1. Отмеривание действующих веществ при помощи механического дозатора ВЮНІТ mLINE (5-Д);
- ТП 5.2. Введение действующих веществ в гелевую основу в асептических условиях и перемешивание полученного геля при помощи верхнеприводной мешалки RW 11 basic, ИКА, Германия (5-М);
- УМО 6. Упаковка и маркировка ГЛФ в асептических условиях (6-УМО).

Описанная технология изготовления позволяет получать стерильный препарат с заданными технологическими свойствами, не подвергая действующие вещества термической обработке, которая приводит к их деградации.

Резюме. В ходе выполнения работы, описанной в данной главе, был разработан состав геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами для местного применения и введения в полости.

Определена оптимальная концентрация действующих веществ в составе ГЛФ. Путем скрининга выбраны вспомогательные вещества, обеспечивающие заданные технологические свойства и стабильность действующих веществ.

Разработана методика контроля качества ГЛФ по показателю «Подлинность» и модифицированная методика контроля по показателю «Специфическая активность», проведена их валидация. Методики соответствовали заданным в ходе валидации критериям приемлемости и обеспечивают получение достоверных результатов в условиях повторяемости и проведении анализа разными сотрудниками.

Разработана спецификация на гель бактерицидный с рекомбинантными эндолизинами. Спецификация разработана в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации и содержит в себе все необходимые показатели качества с указанием методов их контроля.

Проведено изучение стабильности разработанной ГЛФ в процессе хранения. Доказана ее стабильность при хранении в течение 6 месяцев при температуре от +2 до +8 °С в двух выбранных упаковках (шприцы и алюминиевые тубы).

Отработана технология изготовления разработанной ГЛФ путем изготовления 3 лабораторных серий, разработан лабораторный регламент производства препарата «Гель бактерицидный с рекомбинантными эндолизинами».

На разработанный препарат и технологию изготовления получены патенты RU 2781050 С1 (дата публикации 04.10.2022 г.) и RU 2790481 С1 (дата публикации 21.02.2023 г.).

ГЛАВА 4. Изучение эффективности, острой и субхронической токсичности, местнораздражающего действия, иммуногенности разработанной ГЛФ *in vivo* и влияния на нормофлору

Способ применения разработанной ГЛФ, а также возможность системного эффекта при местном применении эндолизинов вызывает необходимость контроля местнораздражающего действия, острой и субхронической токсичности, а также иммуногенности, так как действующими веществами являются белки, способные вызывать иммунный ответ.

Также, необходимо подтвердить эффективность разработанной ГЛФ *in vivo*.

4.1 Изучение влияния рекомбинантных эндолизинов на представителей нормофлоры

С учетом возможного попадания рекомбинантных эндолизинов из крови через желчные протоки в кишечник необходимо оценить действие эндолизинов на представителей нормофлоры.

4.1.1 Отработка методики постановки эксперимента

На первом этапе была отработана методика постановки эксперимента для выявления возможных проблем при культивировании исследуемых штаммов и проведении других операций.

4.1.1.1 Обработка жидкой бульонной культуры эндолизинами

Для отработки методики проведения исследований выбран штамм *B. longum* В379М, как один из типичных представителей нормальной микрофлоры кишечника, и LysAm24, использована 4 генерация суточных культур, выращенных в полужидкой среде для выделения и культивирования бифидобактерий и на ней же с добавлением агара до 1%. Для определения титра посевного материала из выросшего материала отбирали 1 мл для приготовления десятикратных предельных разведений третьей генерации и 5 мл для определения титруемой кислотности. Результаты, полученные в ходе описанного эксперимента, представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Результат обработки суточной бульонной культуры *B. longum* В379М рекомбинантным эндолизином LysAm24

<i>B. longum</i> В379М	pH	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал	6,8	$1,8 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСI	6,8	$2,0 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
Рабочий материал + Эндолизин обработка 30 минут	6,7	$1,6 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$

Согласно данным, представленным в таблице 20, методика пригодна для проведения эксперимента и позволяет определять титр бактерий после обработки как буферным раствором, так и рекомбинантным эндолизином, тем не менее для исключения возможного влияния метаболитов бифидобактерий на рекомбинантный эндолизин был добавлен этап центрифугирования бульонной культуры при 5000 rpm в течение 20 минут при температуре +4°C.

4.1.1.2 Центрифугирование 30 мл суточной бульонной культуры *B. longum* В379М

После центрифугирования бульонной культуры при 5000 rpm в течение 20 минут при температуре +4°C. Надосадочную жидкость в асептических условиях слили с осадка, получили 3 мл (10%), разбавили стерильным буфером Трис-НСI при pH = 7,5 комнатной температуры до 30 мл. Тщательно перемешали пипетированием, из полученной суспензии готовили 2 мл посевного материала по стандарту мутности 5 MakFarland. Переносили 2 мл в 110 мл буфера Трис-НСI. Из полученной суспензии отбирали 1 мл в первую пробирку ряда десятикратных разведений. В 4 стерильные пробирки отбирали по 9 мл, и вносили в 2 опытные пробирки по 1 мл эндолизина, а в 2 контрольные – по 1 мл буфера Трис-НСI. Выдерживали в течение 30 минут. За это время готовили ряды десятикратных разведений для определения титра рабочей суспензии. Результаты эксперимента представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Влияние рекомбинантного эндолизина LysAm24 на клетки *B. longum* В379М после центрифугирования

<i>B. longum</i> В379М	pH	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал	6,56	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСl обработка 30 минут	6,52	$1,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	6,55	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$

Как видно из представленной таблицы, после добавления этапа центрифугирования происходит снижение количества клеток на порядок как с буфером Трис-НСl, так и с эндолизином, в связи с чем было принято решение исключить данный этап при постановке методики.

4.1.1.3 Выращивание культур на поверхности плотных питательных сред

Для приближения схемы эксперимента к опубликованным методикам [38, 39], было отработано выращивание культуры на поверхности среды, приготовленной из полужидкой среды для культивирования и выделения бифидобактерий с добавлением агара до 1%. Постановку эксперимента провели для всех рекомбинантных эндолизинов, входящих в состав ГЛФ.

Четвертую генерацию *B. longum* В379М вырастили на поверхности агаризованной среды в анаэроостате с созданием атмосферы при помощи газогенерирующих пакетов Анаэро. Контроль создания анаэробноза проводили индикатором. Микробиологической петлей снимали культуру и в стерильном физрастворе приготовили суспензию по стандарту мутности 5 MakFarland (Рисунок 44). 2 мл перенесли в 110 мл стерильного буфера Трис-НСl. Разливали полученный материал по 12 стерильным пробиркам. Из оставшихся 2 мл суспензии приготовили ряды для определения титра рабочего материала.



Рисунок 44 – Рост культуры на поверхности плотной питательной среды

При данном способе постановки эксперимента не удалось добиться роста единичных колоний на поверхности питательной среды, в связи с чем было принято решение проводить работу с полужидкой питательной средой.

4.1.2 Исследование влияния эндолизинов *in vitro* на штаммы нормофлоры человека

Результаты эксперимента по исследованию воздействия эндолизинов на бифидобактерии и лактобациллы представлены в таблицах 22-33. Характерный рост исследованных микроорганизмов представлен на рисунках 45-55.

Таблица 22 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. longum* B379M

<i>B. longum</i> B379M	°Т	pH	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	0,8	6,74	$1,8 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,05 \times 10^6$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСl	0,8	6,78	$4,5 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	0,8	6,81	$4,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	0,7	6,61	$2,2 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	0,8	6,95	$2,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$

На рисунке 45 представлены пробирки ряда десятикратных разведений после воздействия эндолизина LysECD7 в течение 30 минут.

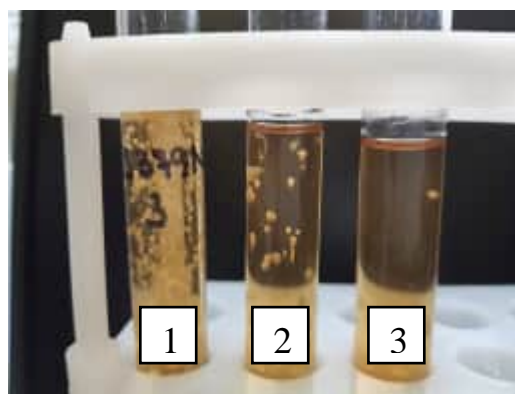


Рисунок 45 – Характерный рост *B. longum* B379M после использования эндолизина LysECD7

Примечание: 1 – разведение 10^{-3} ; 2 – разведение 10^{-4} ; 3- разведение 10^{-5}

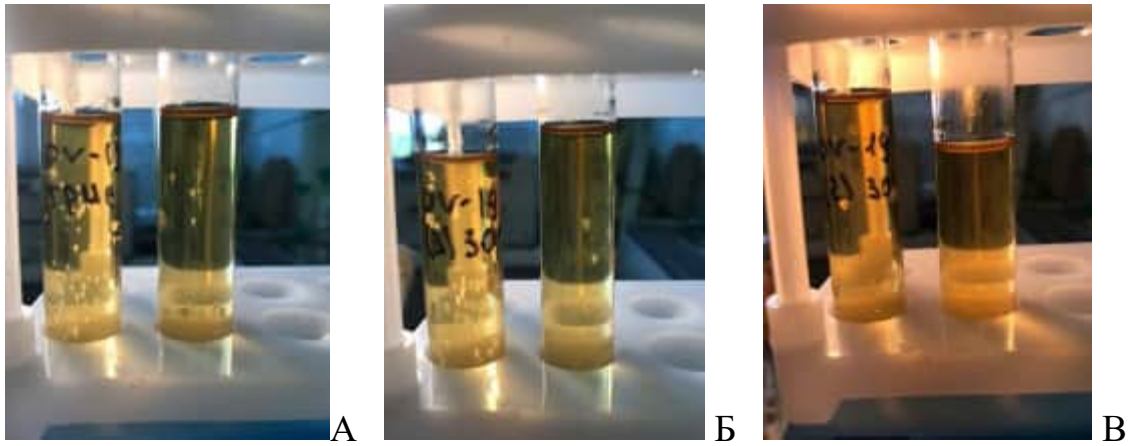
Как видно из представленных данных угнетающее воздействие трех рекомбинантных эндолизинов на популяцию *B. longum* B379M отсутствовало или не превышало такового в контроле.

Далее было определено влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. bifidum* OV-19, полученные данные представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. bifidum* OV-19

<i>B. bifidum</i> OV-19	°Т	рН	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	0,8	6,74	$1,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСI	0,8	6,68	$1,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	0,7	6,85	$3,0 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$3,15 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	0,7	6,65	$3,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$2,75 \times 10^4$
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	0,8	6,91	$4,0 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$

Как видно из представленных в таблице 23 данных, влияния трех эндолизинов на *B. bifidum* OV-19 по сравнению с контролем не отмечено, что продемонстрировано на рисунке 46.

Рисунок 46 – Рост *B. bifidum* OV-19

Примечание: **А** – 30 минут обработки буфером Трис-НСl, разведения 10^{-3} и 10^{-4} ; **Б** – LysAp22, разведения 10^{-3} и 10^{-4} ; **В** – LysECD7, разведения 10^{-3} и 10^{-4}

Далее было определено влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. breve* OV-12, полученные данные представлены в таблице 24, на рисунке 47 представлен характерный рост культуры на полужидкой питательной среде.

Таблица 24 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. breve* OV-12

<i>B. breve</i> OV-12	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	$9,5 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСl	$6,5 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	$6,0 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$	$6,75 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	$6,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	$6,0 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$	$6,25 \times 10^4$

Рисунок 47 – Характерный рост *B. breve* OV-12

Примечание: 1 – разведение 10^{-5} ; 2 – разведение 10^{-6} ; 3 – разведение 10^{-7}

Полученные данные (Таблица 24) указывают на незначительное снижение активности штамма *B. breve* OV-12 после обработки LysAm24 и LysECD7, что не превышает изменений активности культуры в контроле, и может быть связано с неравномерным распределением клеток в суспензии при инокуляции. Рекомбинантный эндолизин LysAp22 не оказывал влияния на *B. breve* OV-12.

При определении чувствительности *B. infantis* 73-15 к рекомбинантным эндолизинам были получены результаты, представленные в таблице 25. На рисунке 48 представлен характерный рост *B. infantis* 73-15 на полужидкой питательной среде.

Таблица 25 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. infantis* 73-15

<i>B. infantis</i> 73-15	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	$0,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСI	$1,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	$1,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	$1,0 \times 10^4$	$0,6 \times 10^4$	$0,8 \times 10^4$
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	$2,8 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$

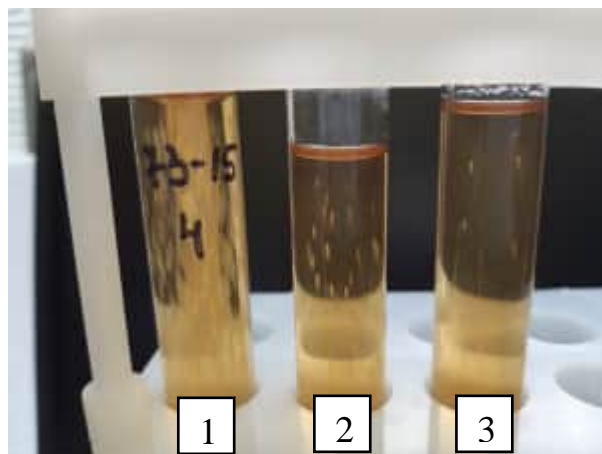


Рисунок 48 – Характерный рост *B. infantis* 73-15

Примечание: 1 – разведение 10^{-4} ; 2 – разведение 10^{-5} ; 3 – разведение 10^{-6}

Данные, представленные в таблице 25, показывают незначительное снижение количества жизнеспособных колониеобразующих единиц *B. infantis* 73-15 после обработки штамма тремя изучаемыми эндолизинами в течение 30 минут, которое может быть связано с неравномерным распределением клеток в суспензии при инокуляции.

Далее было определено влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. adolescentis* ГО-13, полученные данные представлены в таблице 26, на рисунке 49 представлен характерный рост культуры на полужидкой питательной среде.

Таблица 26 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. adolescentis* ГО-13

<i>B. adolescentis</i> ГО-13	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	$2,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСI	$1,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	$1,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	$1,5 \times 10^4$	$0,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	$1,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$

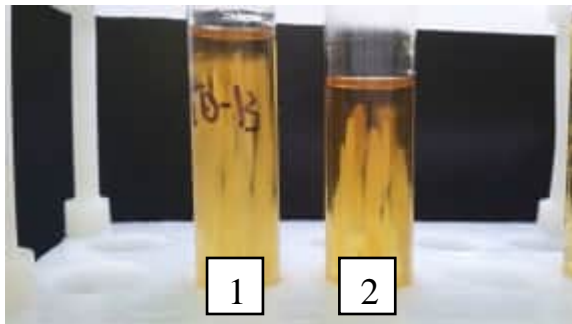


Рисунок 49 – Характерный рост *B. adolescentis* ГО-13

Примечание: 1 – разведение 10^{-5} ; 2 – разведение 10^{-6}

Согласно полученным данным, не отмечено изменения КОЕ/мл после обработки культуры *B. adolescentis* ГО-13 всеми тремя рекомбинантными эндолизинами в течение 30 минут, что говорит о нечувствительности данного штамма к данным белкам.

При определении чувствительности *B. bifidum* 791 к рекомбинантным эндолизинам были получены результаты, представленные в таблице 27. На рисунке 50 представлен характерный рост *B. bifidum* 791 на полужидкой питательной среде.

Таблица 27 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. bifidum* 791

<i>B. bifidum</i> 791	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	$1,55 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСl	$2,5 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	$1,8 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	$1,5 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	$2,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$

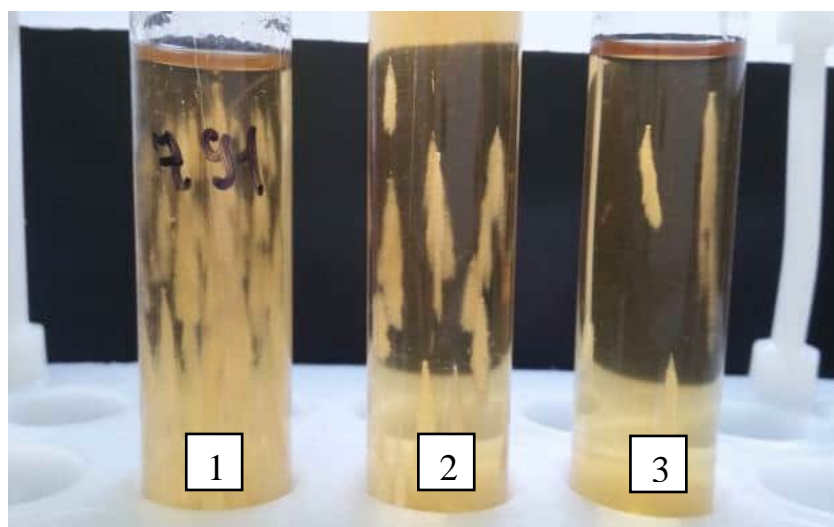


Рисунок 50 – Характерный рост *B. bifidum* 791

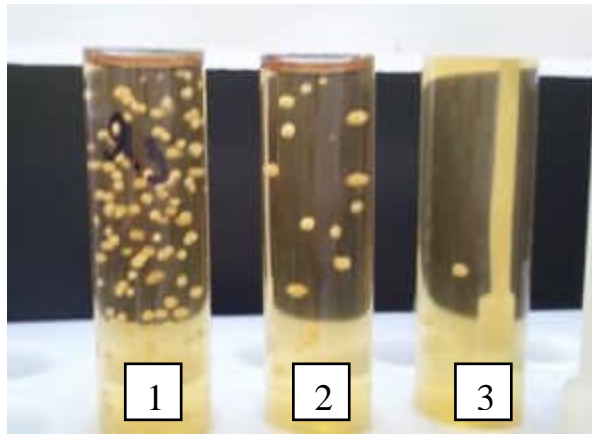
Примечание: 1 – разведение 10^{-4} ; 2 – разведение 10^{-5} ; 3 – разведение 10^{-6}

Представленные в таблице 27 данные демонстрируют отсутствие влияния всех изучаемых рекомбинантных эндолизинов, входящих в состав ГЛФ, на *B. bifidum* 791 при экспозиции 30 минут.

Далее было определено влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. longum* Я-3, полученные данные представлены в таблице 28, на рисунке 51 представлен характерный рост культуры на полужидкой питательной среде.

Таблица 28 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. longum* Я-3

<i>B. longum</i> Я-3	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	$2,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСI	$1,8 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	$1,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	$1,0 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6$
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	$1,8 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$

Рисунок 51 – Характерный рост *B. longum* Я-3

Примечание: 1 – разведение 10^{-4} ; 2 – разведение 10^{-5} ; 3 – разведение 10^{-6}

Согласно полученным данным, наблюдалось незначительное снижение числа КОЕ/мл *B. longum* Я-3 при воздействии рекомбинантного эндолизина LysAp22. При этом, LysECD7 и LysAm24 не оказали влияния на данный штамм.

При определении чувствительности *B. longum* OV-20 к рекомбинантным эндолизинам были получены результаты, представленные в таблице 29.

Таблица 29 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *B. longum* OV-20

<i>B. longum</i> OV-20	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	$0,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСI	$1,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	$1,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$

Продолжение таблицы 29

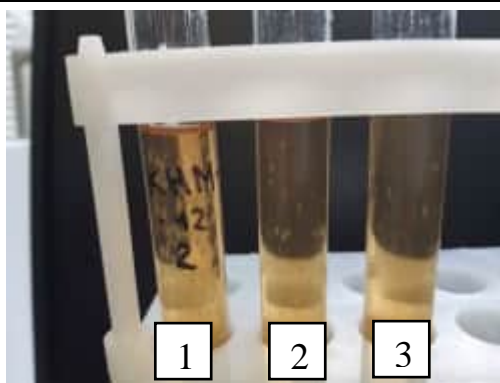
<i>B. longum</i> OV-20	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	$1,0 \times 10^4$	$0,6 \times 10^4$	$0,8 \times 10^4$
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	$2,8 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$

Полученные данные свидетельствуют о незначительном снижении количества КОЕ *B. longum* OV-20 после воздействия LysAp22, что может быть связано с неравномерным распределением клеток в суспензии при инокуляции. Влияния LysECD7 и LysAm24 на *B. longum* OV-20 отмечено не было.

Далее было определено влияние рекомбинантных эндолизинов на представителей рода *Lactobacillus*. В таблице 30 представлены результаты воздействия рекомбинантных эндолизинов на штамм *L. casei* КНМ-12. На рисунке 52 показан рост *L. casei* КНМ-12 после воздействия LysAp22.

Таблица 30 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *L. casei* КНМ-12

<i>L. casei</i> КНМ-12	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	$5,9 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСI	$4,5 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	$3,9 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	$2,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	$3,3 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$

Рисунок 52 – Рост *L. casei* КНМ-12 после воздействия + LysAp22

Примечание: 1 – разведение 10^{-2} ; 2 – разведение 10^{-3} ; 3 – разведение 10^{-4}

Согласно полученным данным, не отмечено влияния всех изучаемых рекомбинантных эндолизинов на штамм *L. casei* КНМ-12, что говорит о его нечувствительности к данным ферментам при экспозиции в течение 30 минут.

При определении чувствительности *L. casei* КЗШ24 к рекомбинантным эндолизинам были получены результаты, представленные в таблице 31. На рисунке 53 представлен характерный рост *L. casei* КЗШ24 на полужидкой питательной среде.

Таблица 31 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *L. casei* КЗШ24

<i>L. casei</i> КЗШ24	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	$1,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСl	$1,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	$1,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	$1,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	$1,8 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$

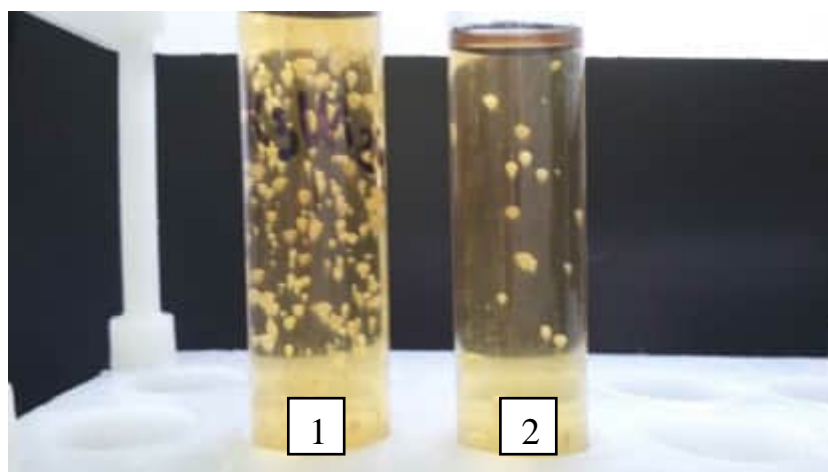


Рисунок 53 – Рост *L. casei* КЗШ24

Примечание: 1 – разведение 10^{-4} ; 2 – разведение 10^{-5}

Данные, представленные в таблице 31 свидетельствуют об отсутствии влияния трех изучаемых рекомбинантных эндолизинов на штамм *L. casei* КЗШ24.

При определении чувствительности *L. helveticus* НК-1 к рекомбинантным эндолизинам были получены результаты, представленные в таблице 32. На рисунке

54 представлен рост *L. helveticus* НК-1 на полужидкой питательной среде после воздействия LysAm24.

Таблица 32 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *L. helveticus* НК-1

<i>L. helveticus</i> НК-1	°Т	рН	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	0,8	6,74	$1,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСI	0,8	6,59	$1,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	0,8	6,81	$0,6 \times 10^3$	$0,2 \times 10^3$	$0,3 \times 10^3$
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	0,8	6,64	$2,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	0,7	6,95	$4,0 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$

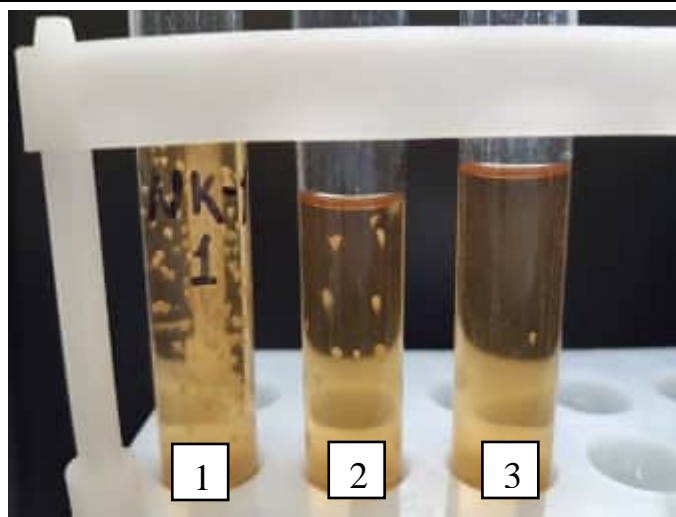


Рисунок 54 – Рост *L. helveticus* НК-1 после воздействия LysAm24

Примечание: 1 – разведение 10^{-1} ; 2 – разведение 10^{-2} ; 3 – разведение 10^{-3}

Согласно полученным данным, обнаружено угнетение роста культуры *L. helveticus* НК-1 после воздействия рекомбинантного эндолизина LysAm24 в течение 30 минут и отсутствие влияния на данный штамм LysECD7 и LysAp22. В связи с полученными результатами было принято решение провести повторную постановку эксперимента для получения достоверного результата. Полученные данные представлены в таблице 33. На рисунке 55 представлен рост *L. helveticus* НК-1 после воздействия рекомбинантного эндолизина LysAm24.

Таблица 33 – Влияние рекомбинантных эндолизинов на *L. helveticus* НК-1 (повторный эксперимент)

<i>L. helveticus</i> НК-1	1 Повторность, КОЕ/мл	2 Повторность, КОЕ/мл	Среднее, КОЕ/мл
Рабочий материал (ПМ)	$1,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
Контроль рабочий материал + буфер Трис-НСI	$1,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
Рабочий материал + LysAm24 обработка 30 минут	$1,0 \times 10^1$	$0,6 \times 10^1$	$0,8 \times 10^1$
Рабочий материал + LysAp22 обработка 30 минут	-	-	-
Рабочий материал + LysECD7 обработка 30 минут	$1,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$



Рисунок 55 – Рост *L. helveticus* НК-1 после обработки LysAm24, разведение 10^{-1}

Полученные результаты свидетельствуют о сильном угнетении популяции *L. helveticus* НК-1 под действием рекомбинантного эндолизина LysAm24 в то время, как LysECD7 и LysAp22 не оказывали влияния на данный штамм.

Таким образом, исследование чувствительности представителей нормофлоры *in vitro* показало, что минимальное угнетающее воздействие на популяцию *B. longum* В379М оказал эндолизин LysECD7, незначительное снижение активности штамма *B. breve* OV-12 выявлено после обработки популяции LysAm24 и LysECD7, что не превышает изменений активности культуры в контроле. Отмечено снижение количества жизнеспособных колониеобразующих единиц *B. infantis* 73-15 под воздействием LysAp22. Отмечено снижение развития

популяции штамма *B. longum* Я-3 под воздействием LysAp22, снижение количества КОЕ *B. longum* OV-20 после воздействия LysAp22. Также не отмечено влияния эндолизинов на *B. bifidum* OV-19, *B. adolescentis* ГО-13, *L. casei* КНМ-12, *L. casei* КЗШ24. Наибольшее угнетение роста выявлено для культуры *L. helveticus* НК-1 после воздействия LysAm24 в течение 30 минут.

4.1.3 Исследование влияния рекомбинантных эндолизинов *in vivo* на состояние просветной и пристеночной микрофлоры мышей

Учитывая существующие данные о различиях в действии эндолизинов *in vitro* и *in vivo* [115], полученные данные *in vitro* необходимо было подтвердить *in vivo*, что было сделано на 28 мышах, которые были разделены на 4 группы: контрольная группа – 11 шт., группа, получавшая LysECD7 – 5 шт., группа, получавшая LysAm24 – 7 шт. и группа, получавшая LysAp22 – 5 шт.

Рекомбинантные эндолизины вводились внутрибрюшинно опытным мышам ежедневно в течение 5 дней по 0,5 мл эндолизина в день однократно, в концентрации 500 мкг (0,5 мг)/животное. Контрольной группе вводился буферный раствор (20 мМ Трис-НСl, рН=7,5). Перед введением эндолизинов, на 5-ый и на 7-й день отбирался кал у каждой мыши и проводился анализ его состава микроорганизмов (оценка просветной микрофлоры). В конечной точке (спустя 2 дня после прекращения введения) животные умерщвлялись и проводился высеив из отмытого кишечника (оценка пристеночной микрофлоры).

В таблице 34 представлена динамика титра *E. coli* в составе просветной и пристеночной микрофлоры.

Таблица 34 – Показатели титра *E. coli* в образцах от животных

Группа животных	Номер животного	Просветная микрофлора, КОЕ/г			Пристеночная микрофлора, КОЕ/г
		До введения лизина	На пятый день после начала введения лизина	На седьмой день после начала введения лизина	
Контроль	1-К-1	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵
	2-К-1	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
	3-К-1	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
	4-К-1	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	-
	5-К-1	10 ⁵	пала	-	-
	6-К-1	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴
	1-К-2	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴

Продолжение таблицы 34

Группа животных	Номер животного	Просветная микрофлора, КОЕ/г			Пристеночная микрофлора, КОЕ/г
		До введения лизина	На пятый день после начала введения лизина	На седьмой день после начала введения лизина	
	2-К-2	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁵	10 ²
	3-К-2	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵
	4-К-2	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵
	5-К-2	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
	Среднее значение	8,28×10 ⁵	8,20×10 ⁵	5,50×10 ⁵	1,59×10 ⁵
	Стандартное отклонение	3,83×10 ⁵	3,79×10 ⁵	4,74×10 ⁵	3,19×10 ⁵
	P (t-тест), до введения	-	0,9613	0,1538	-
LysAm24	1-1	10 ⁶	10 ⁶	-	10 ⁶
	1-2	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶
	1-3	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
	1-4	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶
	1-5	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁴
	1-6	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁴
	1-7	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶
	Среднее значение	2,03×10 ⁶	2,29×10 ⁶	2,35×10 ⁶	7,17×10 ⁵
	Стандартное отклонение	3,54×10 ⁶	3,40×10 ⁶	3,76×10 ⁶	4,83×10 ⁵
	P (t-тест), до введения	-	0,8921	0,8769	-
	P (t-тест), контроль	0,2735	0,1909	0,1489	0,0146
LysAp22	2-1	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ²
	2-2	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ³
	2-3	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	10 ³
	2-4	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
	2-5	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵
	Среднее значение	2,60×10 ⁶	6,04×10 ⁵	4,60×10 ⁵	2,20×10 ⁵
	Стандартное отклонение	4,16×10 ⁶	5,42×10 ⁵	4,93×10 ⁵	4,38×10 ⁵
	P (t-тест), до введения	-	0,3177	0,2346	-
	P (t-тест), контроль	0,1652	0,3823	0,7377	0,7664
LysECD7	3-1	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ²
	3-2	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
	3-3	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	-
	3-4	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	-
	3-5	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	-
	Среднее значение	2,80×10 ⁶	2,80×10 ⁶	2,80×10 ⁶	5,00×10 ⁵
	Стандартное отклонение	4,02×10 ⁶	4,02×10 ⁶	4,02×10 ⁶	7,07×10 ⁵
	P (t-тест), до введения	-	1,0000	0,8729	-
	P (t-тест), контроль	0,1150	0,1329	0,0932	0,2827

Примечание: полужирным шрифтом выделены статистически достоверные различия

Из таблицы 34 видно, что при использовании LysAm24 наблюдалось достоверное (P<0,05) повышение количества *E. coli* в составе пристеночной микрофлоры по сравнению с контрольной группой животных, в то время как в

опытах *in vitro* данный фермент был активен в отношении 50% исследованных штаммов.

Далее была определена динамика титра коагулазо-отрицательных стафилококков в составе просветной и пристеночной микрофлоры, полученные данные представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Показатели титра коагулазо-отрицательных стафилококков в образцах от животных

Группа животных	Номер животного	Просветная микрофлора, КОЕ/г			Пристеночная микрофлора, КОЕ/г
		До введения лизина	На пятый день после начала введения лизина	На седьмой день после начала введения лизина	
Контроль	1-К-1	10 ⁴	10 ⁵	10 ³	10 ³
	2-К-1	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
	3-К-1	10 ³	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴
	4-К-1	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	-
	5-К-1	10 ⁴	-	-	-
	6-К-1	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴
	1-К-2	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ³
	2-К-2	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ²
	3-К-2	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
	4-К-2	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ³
	5-К-2	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ³
	Среднее значение	5,91×10 ³	3,70×10 ⁴	1,54×10 ⁴	4,90×10 ³
	Стандартное отклонение	4,70×10 ³	4,35×10 ⁴	3,01×10 ⁴	4,85×10 ³
	P (t-тест), до введения	-	0,0290	0,3132	-
LysAm24	1-1	10 ⁴	10 ³	-	10 ⁴
	1-2	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ²
	1-3	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
	1-4	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁴
	1-5	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ⁴
	1-6	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	0
	1-7	10 ³	10 ³	10 ⁵	10 ⁴
	Среднее значение	7,30×10 ³	2,29×10 ³	2,50×10 ⁴	7,16×10 ³
	Стандартное отклонение	4,62×10 ³	3,40×10 ³	3,67×10 ⁴	4,86×10 ³
	P (t-тест), до введения	-	0,0393	0,2295	-
	P (t-тест), контроль	0,5465	0,0543	0,5776	0,3714
LysAp22	2-1	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
	2-2	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
	2-3	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
	2-4	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ³
	2-5	10 ²	10 ⁴	10 ⁵	10 ³
	Среднее значение	4,04×10 ⁴	8,20×10 ³	2,80×10 ⁴	6,40×10 ³
	Стандартное отклонение	5,44×10 ⁴	4,02×10 ³	4,02×10 ⁴	4,93×10 ³
	P (t-тест), до введения	-	0,2230	0,5830	-

Продолжение таблицы 35

Группа животных	Номер животного	Просветная микрофлора, КОЕ/г			Пристеночная микрофлора, КОЕ/г
		До введения лизина	На пятый день после начала введения лизина	На седьмой день после начала введения лизина	
	P (t-тест), контроль	0,0468	0,1705	0,5047	0,5913
LysECD7	3-1	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ²
	3-2	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ²
	3-3	10 ⁴	10 ³	10 ⁵	-
	3-4	10 ³	10 ³	10 ⁴	-
	3-5	10 ³	10 ³	10 ⁴	-
	Среднее значение	2,80×10 ³	2,80×10 ³	2,80×10 ⁴	10 ²
	Стандартное отклонение	4,02×10 ³	4,02×10 ³	4,02×10 ⁴	0
	P (t-тест), до введения	-	1,0000	0,2544	-
	P (t-тест), контроль	0,2227	0,1086	0,5047	0,2119

Примечание: полужирным шрифтом выделены статистически достоверные различия

Как видно из таблицы 35, статистически достоверных отличий при применении рекомбинантных эндолизинов не выявлено, что говорит об отсутствии влияния данных ферментов на коагулазо-отрицательные стафилококки. Статистически достоверные различия в количестве стафилококков в просветной микрофлоре, выявленные до начала введения препарата в одной из опытных групп животных, а также в контрольной группе на пятый день после начала введения эндолизинов, не связаны с применением белков, а обусловлены индивидуальными особенностями животных, поэтому не учитывались.

Далее была определена динамика титра представителей *Enterococcus spp.* в составе просветной и пристеночной микрофлоры, полученные результаты представлены в таблице 36.

Таблица 36 – Показатели титра *Enterococcus spp.* в образцах от животных

Группа животных	Номер животного	Просветная микрофлора, КОЕ/г			Пристеночная микрофлора, КОЕ/г
		До введения лизина	На пятый день после начала введения лизина	На седьмой день после начала введения лизина	
Контроль	1-К-1	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
	2-К-1	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
	3-К-1	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
	4-К-1	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	-
	5-К-1	10 ⁶	-	-	-

Продолжение таблицы 36

Группа животных	Номер животного	Просветная микрофлора, КОЕ/г			Пристеночная микрофлора, КОЕ/г
Контроль	6-К-1	10^6	10^6	10^6	10^6
	1-К-2	10^5	10^6	10^4	10^5
	2-К-2	10^5	10^6	10^4	10^5
	3-К-2	10^4	10^5	10^6	10^4
	4-К-2	10^4	10^4	10^4	10^5
	5-К-2	10^6	10^6	10^5	10^5
	Среднее значение	$3,11 \times 10^6$	$8,11 \times 10^5$	$6,13 \times 10^5$	$4,90 \times 10^5$
	Стандартное отклонение	$4,44 \times 10^6$	$3,99 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$4,85 \times 10^5$
	P (t-тест), до введения	-	0,1203	0,0940	-
LysAm24	1-1	10^6	10^6	10^6	10^6
	1-2	10^7	10^6	10^6	10^6
	1-3	10^7	10^6	10^6	10^6
	1-4	10^7	10^6	10^6	10^6
	1-5	10^6	10^6	10^6	10^6
	1-6	10^6	10^6	10^6	10^6
	1-7	10^6	10^6	10^6	10^6
	Среднее значение	$4,86 \times 10^6$	10^6	10^6	10^6
	Стандартное отклонение	$4,81 \times 10^6$	0	0	0
	P (t-тест), до введения	-	0,0554	0,0554	-
	P (t-тест), контроль	0,4424	0,2337	0,0609	0,0153
LysAp22	2-1	10^6	10^6	10^6	10^5
	2-2	10^7	10^6	10^6	10^6
	2-3	10^6	10^6	10^6	10^6
	2-4	10^3	10^6	10^6	10^6
	2-5	10^6	10^6	10^6	10^6
	Среднее значение	$2,60 \times 10^6$	10^6	10^6	$8,20 \times 10^5$
	Стандартное отклонение	$4,16 \times 10^6$	0	0	$4,02 \times 10^5$
	P (t-тест), до введения	-	0,4147	0,3427	-
	P (t-тест), контроль	0,8314	0,3176	0,1134	0,2216
LysECD7	3-1	10^6	10^6	10^6	10^5
	3-2	10^6	10^6	10^6	10^5
	3-3	10^6	10^6	10^6	-
	3-4	10^3	10^6	10^6	-
	3-5	10^6	10^6	10^6	-
	Среднее значение	$8,00 \times 10^5$	10^6	10^6	10^5
	Стандартное отклонение	$4,47 \times 10^5$	0	0	0
	P (t-тест), до введения	-	0,3466	0,8679	-
	P (t-тест), контроль	0,2742	0,3176	0,1134	0,3033

Примечание: полужирным шрифтом выделены статистически достоверные различия

Согласно таблице 36 статистически достоверное ($P < 0,05$) повышение количества *Enterococcus spp.* в пристеночной микрофлоре по сравнению с контрольной группой наблюдалось у животных, получавших LysAm24, в то время, как *in vitro* данный фермент был активен в отношении 70% исследованных штаммов *Enterococcus spp.*, что показывает различия в действии рекомбинантных эндолизиннов *in vitro* и *in vivo*.

Далее была определена динамика титра грибов в составе просветной и пристеночной микрофлоры, полученные результаты представлены в таблице 37.

Таблица 37 – Показатели титра грибов в образцах от животных

Группа животных	Номер животного	Просветная микрофлора, КОЕ/г			Пристеночная микрофлора, КОЕ/г
		До введения лизина	На пятый день после начала введения лизина	На седьмой день после начала введения лизина	
Контроль	1-К-1	10^4	10^4	10^4	10^4
	2-К-1	0	0	0	10^4
	3-К-1	10^4	10^4	10^4	10^4
	4-К-1	0	0	0	-
	5-К-1	0	-	-	-
	6-К-1	0	0	0	0
	1-К-2	10^2	0	0	0
	2-К-2	0	0	0	0
	3-К-2	0	0	0	0
	4-К-2	0	0	0	0
	5-К-2	10^2	0	0	0
	Среднее значение	$1,84 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$3,33 \times 10^3$
	Стандартное отклонение	$4,04 \times 10^3$	$4,22 \times 10^3$	$4,22 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$
P (t-тест), до введения	-	0,9286	0,9286	-	
LysAm24	1-1	0	0	-	0
	1-2	0	0	0	0
	1-3	0	0	0	0
	1-4	10^4	10^4	10^4	-
	1-5	10^4	10^4	10^4	10^4
	1-6	0	0	0	0
	1-7	0	0	0	0
	Среднее значение	$2,86 \times 10^3$	$2,86 \times 10^3$	$3,33 \times 10^3$	$1,67 \times 10^3$
	Стандартное отклонение	$4,88 \times 10^3$	$4,88 \times 10^3$	$5,16 \times 10^3$	$4,08 \times 10^3$
	P (t-тест), до введения	-	1,0000	0,8675	-
	P (t-тест), контроль	0,6357	0,7041	0,5816	0,5100

Продолжение таблицы 37

LysAp22	2-1	0	0	0	0
	2-2	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	0
	2-3	0	0	0	0
	2-4	0	0	0	0
	2-5	0	0	0	0
	Среднее значение	2,00×10 ³	2,00×10 ³	2,00×10 ³	0
	Стандартное отклонение	4,47×10 ³	4,47×10 ³	4,47×10 ³	0
	P (t-тест), до введения	-	1,0000	0,9151	-
	P (t-тест), контроль	0,9430	1,0000	1,0000	0,1689
LysECD7	3-1	0	0	0	0
	3-2	0	0	0	0
	3-3	0	0	0	-
	3-4	0	0	0	-
	3-5	0	0	0	-
	Среднее значение	0	0	0	0
	Стандартное отклонение	0	0	0	0
	P (t-тест), до введения	-	-	0,6377	-
	P (t-тест), контроль	0,3352	0,3169	0,3169	0,3893

Как видно из таблицы 37, статистически достоверных различий при применении рекомбинантных эндолизинов выявлено не было, что говорит об отсутствии влияния исследуемых ферментов на титр грибов в составе пристеночной и просветной микрофлоры.

Также, титр представителей рода *Lactobacillus* во всех группах животных во всех контрольных точках был равен 10⁵ КОЕ/г как в составе просветной, так и пристеночной микрофлоры. Титр представителей рода *Bifidobacterium* во всех группах животных был ниже порога чувствительности используемого метода 10² КОЕ/г, что говорит об отсутствии влияния исследуемых рекомбинантных эндолизинов на изменение состава данных представителей нормофлоры *in vivo*. Исследование *in vivo* выявило повышение количества *E. coli* и бактерий рода *Enterococcus* в составе пристеночной микрофлоры при применении LysAm24 к окончанию эксперимента по сравнению с контрольной группой животных. На фоне использования LysAp22 и LysECD7 не было выявлено статистически значимых изменений высеваемой просветной и пристеночной микрофлоры, что говорит об отсутствии влияния данных рекомбинантных эндолизинов на представителей

нормофлоры *in vivo* и показывает безопасность их применения в данном отношении.

4.2 Острая, субхроническая токсичность и местнораздражающее действие

Чтобы доказать безопасность применения разработанной ГЛФ была определена ее острая токсичность, субхроническая токсичность и местнораздражающее действие при однократном и курсовом применении.

4.2.1 Дизайн эксперимента

Животные после получения из питомника, были адаптированы в лаборатории в течение 7 дней до начала введения ГЛФ. Отбор в исследование проводился за 3 дня до начала введения ГЛФ, отбирались животные без признаков отклонений в состоянии здоровья (после клинического осмотра) с учетом массы тела: разброс массы тела между животными, отобранными в группы, не превышал 20%, среднее значение массы тела статистически не различалось между группами. Животных распределяли по группам случайным образом.

Для определения острой токсичности и местнораздражающего действия было сформировано 6 подгрупп по 6 животных в каждой, исследование проводили на аутбредных мышах CD-1. Самцы и самки формировались в разные группы. Исследование острой токсичности проводили при однократном местном нанесении ГЛФ или плацебо на кожу.

Для определения субхронической токсичности было сформировано 6 подгрупп по 10 животных в каждой. Самцы и самки формировались в разные группы. Исследование субхронической токсичности проводили при местном нанесении ГЛФ или плацебо на кожу 2 раза в день в течение 5 дней.

Исследование проводилось на трех образцах: плацебо, терапевтическая дозировка ГЛФ, 10-кратная терапевтическая дозировка ГЛФ. Образцы наносили местно в количестве 0,05 мл/см².

После введения ГЛФ за животными осуществлялось наблюдение с регистрацией проявления и выраженности возможных клинических признаков интоксикации, измерялась масса тела и потребление кормов. Плановая эвтаназия и

некропсия выполнялись на 15-й день исследования в случае изучения острой токсичности и местнораздражающего действия и на 6-й день исследования в случае изучения субхронической токсичности. При некропии были тщательно осмотрены внутренние органы, полости тела и ткани, определены масса органов и рассчитаны их массовые коэффициенты. Местнораздражающее действие определяли путем внешнего осмотра перед некропсией и путем гистологического исследования места нанесения образца.

4.2.2 Результаты

Оценка клинического состояния аутбредных мышей при изучении токсичности и местно-раздражающего действия свидетельствовала об отсутствии каких-либо негативных последствий. Гибели животных зафиксировано не было. Животные удовлетворительно переносили манипуляцию нанесения ГЛФ. На период окончания исследования признаков клинической интоксикации и какого-либо отсроченного влияния не отмечено. Как при однократном, так и при курсовом нанесении ГЛФ эндолизинов на кожу животных фиксировалось полное отсутствие функционально-морфологических нарушений кожи, что свидетельствует о том, что данная ГЛФ не обладает выраженным местнораздражающим действием.

При оценке поведенческих реакций было определено, что все животные сохраняют двигательную активность, не отличающуюся в контрольной и опытной группах. Отклонений в походке не наблюдалось ни в одной группе животных. Аномалий поведения не отмечено. Животные после нанесения исследуемой ГЛФ демонстрировали преимущественно уравновешенный тип поведения, с умеренной локомоторной и поисковой активностью без проявления признаков тревожности.

Проведенные исследования показали отсутствие негативного влияния испытуемой ГЛФ на динамику набора массы мышей. Среднесуточное потребление кормов не имело статистически достоверных различий в сравнении с группами плацебо.

В ходе патоморфологического исследования ни при однократном, ни при курсовом нанесении ГЛФ патологических изменений не выявлено. При

сопоставлении данных гистологического исследования органов опытных групп различий также выявлено не было.

4.3 Отработка инфекционной модели

Для отработки инфекционной модели необходимо было в первую очередь определить чувствительность выбранного возбудителя к действующим веществам *in vitro* для определения целесообразности его использования, провести отработку инфекционной модели на малом количестве животных для определения сроков формирования абсцесса и количества вводимой ГЛФ для расчета ее необходимого количества.

4.3.1 Определение чувствительности выбранного возбудителя к рекомбинантным эндолизинам

Перед проведением исследования эффективности разработанной ГЛФ на инфекционной модели *in vivo* была изучена чувствительность используемого для заражения инфекционного агента (*F. necrophorum* №89-5) к рекомбинантным эндолизинам в составе ГЛФ.

Исследование проводилось с учетом опубликованных ранее методик с модификациями [38, 39], необходимых для обеспечения роста микроорганизма:

Подготовка суспензий бактериальных клеток штамма *F. necrophorum* проводилась из двухсуточных культур, полученных на поверхности колумбийского агара (КА, Conda, Испания) с добавлением 10% стерильной дефибринированной крови в чашках Петри при инкубировании в анаэробной станции (испытуемая культура является анаэробным микроорганизмом) Vacutron 300-2 (Sheldon Manufacturing Inc., США) при $+37\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ и содержании в атмосфере углекислого газа 10%, водорода 10%, азота 80%. Культура смывалась в 1,5 мл 20 мМ Трис-НСI при $\text{pH}=7,5$ и ресуспендировалась, до получения однородной мутности. Перед использованием Трис-НСI был прогрет при температуре $+80^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут, с последующим охлаждением в холодной воде. Данная манипуляция использовалась для того, чтобы минимизировать наличие кислорода в буфере. В последующем по 100 мкл полученной суспензии переносилось в контрольные и опытные пробирки типа Эппендорф. Каждый рекомбинантный

эндолизин и контроль делался в двух повторах. В контрольные пробирки добавлялось по 100 мкл 20 мМ Трис-НСl, в опытные – 100 мкл каждого эндолизина или их смеси соответственно.

В дальнейшем после внесения всех компонентов и ресуспендирования пробирки типа Эппендорф помещались в анаэроустат при $37\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ на 30 минут. После окончания инкубирования по 100 мкл содержимого каждой пробирки переносилось на чашку Петри с колумбийским агаром с 10% лошадиной кровью и равномерно распределялось по его поверхности шпателем или петлей до полного высыхания. Чашки инкубировались в течение 48 часов при $37\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ в анаэробной станции после чего производился учет результатов.

Согласно полученным результатам, применение рекомбинантного эндолизина LysAm24 приводило к снижению числа клеток на 84,50%, а применение LysECD7 – на 87,70%, исследуемый вид бактерий не был чувствителен к рекомбинантному эндолизину LysAp22, его применение не привело к снижению числа клеток.

Таким образом, обоснованием выбора предложенного бактериального агента – *F. necrophorum* №89-5 для воспроизведения раневой инфекции на лабораторных животных является хорошо изученные характеристики штамма, чувствительность его к испытуемым ЛС, а также возможность получения контролируемой по срокам инфекции. Данный штамм используется рядом отечественных биопредприятий при контроле иммуногенной активности инактивированных вакцин против некробактериоза, в тесте серозащиты, в качестве штамма «пробойника». Подкожное введение суточной суспензии штамма *F. necrophorum* активно растущей в среде Китта-Тароцци в концентрации 3 млрд. микробных клеток в объеме 1 см³ вызывает гибель инфицированных животных в течении 10-14 дней.

4.3.2 Проведение эксперимента *in vivo*

Далее была проведена отработка инфекционной модели с использованием двух кроликов с целью определения сроков начала проведения лечения животных основного опыта, а также определения необходимого объема ГЛФ для однократной

обработки раны. На данном этапе исследований иные параметры не контролировались.

Заражение животных проводилось путем подкожной инъекции суспензии возбудителя в область холки, как описано выше. Выбор данной локализации, воспроизведения раневой инфекции был обусловлен, тем, что животные таким образом не смогли бы сорвать резиновый дренаж, установленный для обеспечения оттока гнойных масс. Заражение всех животных проводилось одновременно, с использованием одной и той же инфицирующей суспензии.

В результате проведенного исследования, по воспроизведению раневой инфекции у кроликов, было определено, что на месте инъекции суточной культуры *F. necrophorum* в область холки, к 7 дню образуется абсцесс.

Лечение инфекции с образованием раневых и абсцедирующих процессов требует проведения оперативного вмешательства (ОВ) путем вскрытия абсцесса для удаления экссудата, обеспечения доступа кислорода, промывания раны и закладки ЛС. Для удаления экссудата из раны оперативным путем делались два небольших надреза таким образом, чтобы один надрез находился ниже локализации второго. Данный подход позволял обеспечить отток экссудата. При проведении ОВ использовался пассивный тип дренирования, что объясняется локализацией абсцесса в неглубокой локализации (подкожной клетчатке). В качестве дренажа использовались небольшие полоски от стерильных латексных медицинских перчаток.

С целью определения необходимого объема ЛС для однократного применения при лечении раны, после установки дренажа и проведения спринцевания раны физиологическим раствором, было произведено введение испытуемой ГЛФ. Таким образом было установлено, что для однократной обработки полости абсцесса, образованной к 7 дню после инфицирования животных, достаточным объемом является 5 см³ ГЛФ.

После определения сроков начала терапии и необходимого для введения объема ГЛФ был проведен основной эксперимент, включавший 13 животных.

4.4 Дизайн эксперимента по определению эффективности разработанной ГЛФ *in vivo*

При проведении опыта было использовано 13 кроликов (самки) породы «советская шиншилла». Животные были распределены по группам следующим образом:

- опытная группа состояла из 10 кроликов (№2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 17), которые подвергались лечению ЛС в форме геля с действующими веществами (ДВ);
- контрольная группа состояла из 3 кроликов (№1, 14, 16), которые подвергались обработке плацебо в форме геля;

Оценка эффективности на лабораторных видах животных (кролики породы «советская шиншилла») проведены в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и статьей №11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (ред. от 04.06.2018).

4.4.1 Дозы, схема и способ введения испытуемого средства

При проведении испытания ГЛФ вводилась животным после предварительного вскрытия абсцесса, установки активного дренажа, спринцевания полости абсцесса стерильным физиологическим раствором с целью промывания ее от гнойных масс. Гель вносился из шприца (без иглы) в раневой ход, отверстие которого располагается выше нижерасположенного отверстия. Данная манипуляция должна способствовать самопроизвольному оттоку гнойных масс, в отличие от случаев, когда оба оперативных отверстия оставались бы в одной горизонтальной плоскости. Важным условием при проведении опыта была необходимость поддержания низкой температуры испытуемых форм ЛС. Так, шприцы постоянно находились в термоконтейнере с хладоэлементами и изымались из контейнера непосредственно перед их применением. Показателем успешного и корректного применения ГЛФ было то, что из нисходящего раневого отверстия ГЛФ должна была вытекать в небольшом количестве. Это говорит о том, что раневой ход полностью заполнен ЛС. Объем ЛС на однократное применение на 1

голову составлял 5 см³. Промывание раны, и внесение новой дозы ГЛФ проводилось дважды в день, в течение 5 дней подряд.

4.4.2 Осмотр животных и отбор проб для исследования

В течение исследования каждое животное осматривалось ежедневно. Осмотр включал в себя оценку общего поведения и общего состояния животных, термометрию, отбор образцов крови на клинический и биохимический анализ, а также на серологическую диагностику. Для оценки эффективности использования ЛС при лечении раневой инфекции были использованы следующие показатели: сохранность животных в группе; время гибели животных; внешний вид и активность животных; результаты биохимического анализа крови; результаты гематологического анализа крови. Кровь у кроликов отбиралась из краевой вены уха, в объеме необходимом для проведения исследования. Перед отбором крови ухо протиралось тампоном смоченным ксилолом. Кровь для биохимических показателей и общий анализ крови брали до заражения, на 11 и 20 день после заражения. Кровь для определения наличия антител к действующим веществам отбиралась до заражения, на 14 и 19 день после начала лечения из краевой вены уха кроликов.

Умерщвление животных, в случае необходимости, должно было осуществляться ответственным лицом в соответствии с требованиями, принятыми в лаборатории, путем декапитации после применения эфирного наркоза, без причинения страданий животным, в специальном помещении вивария. Трупы погибших кроликов извлекались из клеток сразу после обнаружения и констатации смерти ответственным лицом. Трупы осматривались визуально после чего проводилось их вскрытие и исследование возможных причин гибели. Лабораторная диагностика некробактериоза проводилась с целью подтверждения причины гибели животных, используемых в опыте.

4.5 Выживаемость кроликов опытной и контрольной групп

На 9 день нахождения в карантине от всех животных была получена сыворотка крови для изучения иммуногенности испытуемой ГЛФ, сыворотка крови для биохимического анализа крови и цельная кровь для проведения общего

анализа крови. Так же на 9 день было произведено инфицирование животных. Лечение было начато через 6-7 дней после инфицирования, так как к этому периоду у всех животных на месте инъекции был сформирован абсцесс. Так, на 6 день после заражения лечению было подвергнуто 5 кроликов, на 7 день после заражения лечению было подвергнуто 8 кроликов. Вид абсцесса у кроликов в области холки, вызванного используемым возбудителем, приведен на рисунке 56.

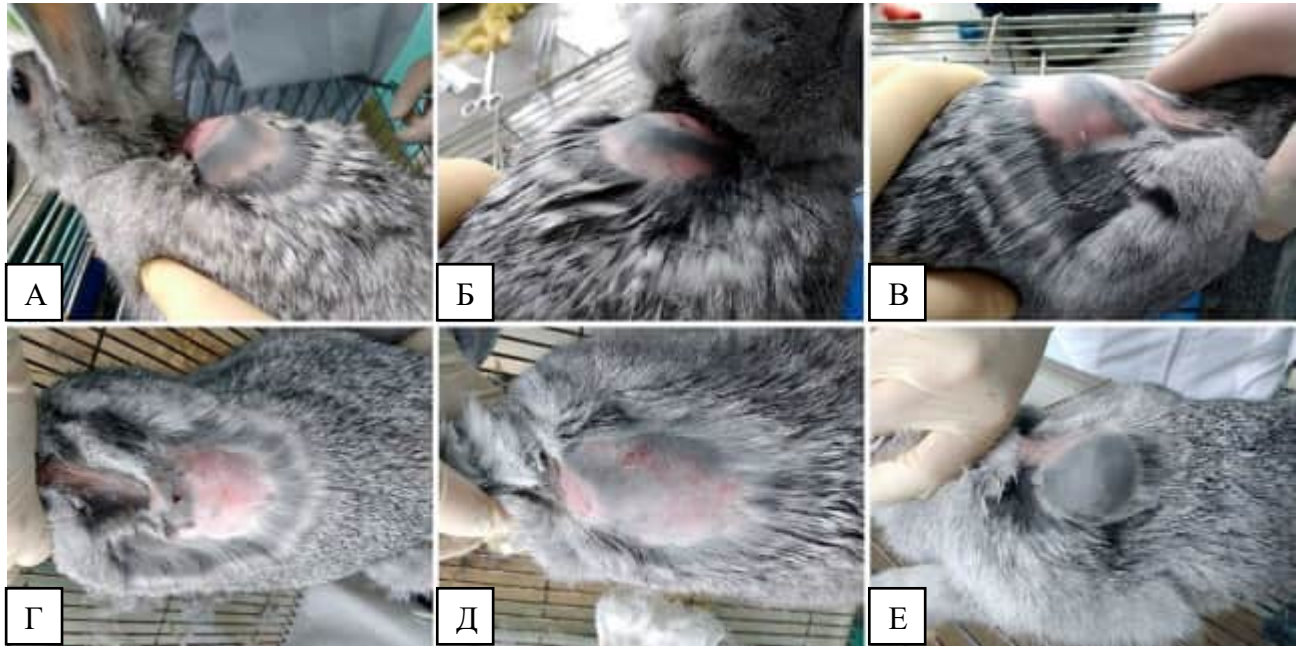


Рисунок 56 – Общий вид абсцесса у кроликов в области холки, вызванного *F. necrophorum*

Примечание: А – кролик №1; Б – кролик №2; В – кролик №3; Г – кролик №4; Д – кролик №5;
Е – кролик №6

После формирования абсцесса проводилось оперативное вмешательство с целью его вскрытия, промывки физиологическим раствором и установки дренажа. Фотографии животных с установленным дренажом представлены на рисунке 57.



Рисунок 57 – Животные с установленными дренажами

Примечание: А – кролик №1; Б – кролик №2; В – кролик №3;

Результаты определения выживаемости животных опытной и контрольной групп, с момента инфицирования до гибели животных, отражены в таблице 38. День гибели животных определялся в зависимости от времени обнаружения павших кроликов. Так, в случае если обнаружение произошло утром, при этом четко фиксировалось трупное окоченение и низкая температура тушки, то датой падежа обозначался предыдущий день. В случае, если при утреннем осмотре тушка павшего кролика была теплой и отсутствовало выраженное трупное окоченение, то временем гибели признавался текущий день.

Таблица 38 – Выживаемость животных опытной и контрольной групп

№	Группа	Продолжительность жизни после инфицирования (включая день гибели) дней
№ 1	Плацебо	13,00
№ 14	Плацебо	13,00
№ 16	Плацебо	14,00
Средняя продолжительность жизни кроликов (плацебо)		13,33±0,58*
№ 2	Лечение	23,00
№ 3	Лечение	24,00
№ 4	Лечение	17,00
№ 5	Лечение	23,00
№ 6	Лечение	21,00
№ 7	Лечение	23,00
№ 8	Лечение	21,00
№ 9	Лечение	22,00
№ 10	Лечение	26,00
№ 17	Лечение	24,00
Средняя продолжительность жизни кроликов (лечение)		22,40±2,18*

Примечание: * - $p < 0,05$ при сравнении опытной и контрольной групп

Как видно из представленных данных, кролики контрольной группы, подвергающиеся лечению при помощи плацебо, имели среднюю продолжительность жизни 13,33 дня. Средняя продолжительность жизни группы кроликов, подвергающихся лечению ГЛФ с рекомбинантными эндолизинами, составила 22,40 суток. ГЛФ показала статистически достоверные различия ($p < 0,05$) по выживаемости кроликов между опытной и контрольной группами.

4.6 Биохимические показатели крови (АСТ, АЛТ, общий белок) кроликов опытной и контрольной групп

Статистически обработанные данные исследования сыворотки крови, полученной от опытных и контрольных животных, по показателям АСТ, АЛТ, общий белок, до начала исследования, на 11 и 20 день после начала исследования отражены в таблице 39.

Таблица 39 – Статистически обработанные данные биохимического исследования крови кроликов опытной и контрольной групп

Группа	Плацебо		Препарат		
	Среднее значение	Стандартное отклонение	Среднее значение	Стандартное отклонение	p-value
АСТ					
До заражения	55,0	12,298455	66,2	18,759601	p>0,05
11 день после заражения	45,3	9,596457	51,3	16,170580	p>0,05
20 день после заражения	-	-	56,2	15,469899	-
АЛТ					
До заражения	69,9	11,930870	84,0	23,539508	p>0,05
11 день после заражения	56,7	8,268192	73,3	16,799632	p>0,05
20 день после заражения	-	-	87,5	6,453379	-
Общий белок					
До заражения	64,9	5,745752	67,0	4,542992	p>0,05
11 день после заражения	71,1	6,621908	75,2	3,971342	p>0,05
20 день после заражения	-	-	82,2	2,161018	-

Примечание: «-» - нет данных в связи со смертью животных

Из таблицы 39 видно, что динамика всех трех изучаемых показателей была одинакова для опытной и контрольной групп животных, статистически достоверных различий между опытной и контрольной группами при биохимическом анализе крови животных не выявлено, что говорит об отсутствии влияния разработанной лекарственной формы на данные показатели при данном способе применения.

4.7 Клинический анализ крови кроликов опытной и контрольной групп

Статистически обработанные данные клинического анализа крови, полученной от опытных и контрольных животных до заражения, на 11 день после заражения и на 20 день после заражения отражены в таблице 40.

Таблица 40 – Статистически обработанные данные клинического анализа крови кроликов опытных и контрольных групп

Группа		Лейкоциты	Нейтрофильные миелоциты	Нейтрофильные мегамиелоциты	Палочкоядерные нейтрофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Эозинофилы	Моноциты	Базофилы	Лимфоциты
До заражения										
Плацебо	Среднее значение	7,28	0,00	0,00	0,00	1,57	0,40	0,00	0,00	5,32
	Стандартное отклонение	0,56	0	0	0	0,33	0,25	0	0	0,67
Препарат	Среднее значение	6,94	0,00	0,00	0,00	1,47	0,40	0,02	0,00	5,05
	Стандартное отклонение	0,84	0	0	0	0,34	0,18	0,04	0	0,77
	p-value	p>0,05	-	-	-	p>0,05	p>0,05	p>0,05	-	p>0,05
Через 11 дней после заражения										
Плацебо	Среднее значение	15,68	0,00	0,00	0,00	13,67	0,30	0,02	0,00	1,70
	Стандартное отклонение	2,64	0	0	0	2,37	0,21	0,04	0	0,56
Препарат	Среднее значение	9,19	0,00	0,00	0,00	6,85	0,37	0,20	0,00	1,77
	Стандартное отклонение	0,87	0	0	0	0,82	0,61	0,35	0	0,53
	p-value	p<0,05	-	-	-	p<0,05	p>0,05	p>0,05	-	p>0,05
Через 20 дней после заражения										
Плацебо	Среднее значение	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Стандартное отклонение	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Препарат	Среднее значение	14,96	0,00	0,00	0,00	11,77	0,18	0,17	0,00	2,58
	Стандартное отклонение	1,61	0	0	0	1,52	0,11	0,30	0	0,60
	p-value	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечания:

«-» - показатель не рассчитывался; p-значение указано для сравнения группы плацебо с опытной группой, лечившейся гелем, достоверные различия выделены полужирным шрифтом

Данные, представленные в таблице 40, показывают резкое увеличение количества лейкоцитов и сегментоядерных нейтрофилов через 11 дней после заражения как в опытной, так и в контрольной группах. При этом, в опытной группе данные показатели были достоверно ниже по сравнению с контрольной. Также

отмечено снижение уровня лимфоцитов на 11 день после заражения в обеих группах. Остальные биохимические показатели крови кроликов остались без изменений. Таким образом, согласно полученным результатам, содержание лейкоцитов и сегментоядерных нейтрофилов в сыворотке крови животных было достоверно ниже в опытной группе по сравнению с контрольной на 11 день после заражения (на следующий день после окончания лечения), что может говорить о замедлении разработанной ГЛФ развития инфекционного процесса и, как следствие, уменьшению воспалительных процессов.

4.8 Результаты термометрии кроликов на протяжении всего периода проведения опытов

Статистически обработанные данные по термометрии кроликов до заражения, на день начала лечения, на 9 и 12 дни заражения отражены в таблице 41.

Таблица 41 – Статистически обработанные данные по термометрии кроликов

Группа		До заражения	Начало лечения	9 дней после заражения	12 дней после заражения
Контроль	Среднее значение	38,6	39,6	40,7	41,5
	Стандартное отклонение	0,75	0,72	0,72	0,35
Гель	Среднее значение	38,6	39,4	39,7	40,5
	Стандартное отклонение	0,69	0,54	0,45	0,40
	p-value	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05

Примечание: полужирным шрифтом выделены статистически достоверные различия между опытной и контрольной группами

Полученные данные показывают статистически достоверное снижение температуры животных опытной группы через 9 дней после заражения (3-4 день после начала лечения), что говорит об антибактериальных свойствах разработанной ГЛФ, препятствующих генерализации инфекции.

4.9 Площади абсцессов у животных на протяжении всего периода проведения опытов

В таблице 42 приведены средние значения площади абсцесса в контрольной и опытной группах до заражения, на день начала лечения, на 9 и 12 дни заражения.

Таблица 42 – Статистически обработанные данные по площади абсцессов у животных опытной и контрольной групп

Группа		Начало лечения	Через 9 дней после заражения	Через 12 дней после заражения
Контроль	Среднее значение	5,18	6,65	8,12
	Стандартное отклонение	3,97	4,16	5,16
	Изменение площади, %	-	+62,07%	+94,88%
Гель	Среднее значение	12,88	14,27	15,94
	Стандартное отклонение	5,93	6,09	6,73
	Изменение площади, %	-	+12,97%	+26,52%
	p-value	p<0,05	p<0,05	p>0,05

Примечание: полужирным шрифтом выделены статистически достоверные различия между опытной и контрольной группами

Из таблицы 42 видно, что площади абсцессов изначально сильно различались в опытной и контрольной группах животных (5,18 см² в контрольной группе и 12,88 см² – в опытной), тем не менее, несмотря на изначальные различия площадей абсцессов, полученные данные показывают значительное замедление развития абсцесса в опытной группе (прирост площади абсцесса составил 25,52% через 12 дней после заражения в то время, как в контрольной группе площадь абсцесса за аналогичный период выросла на 94,88%), что говорит о замедлении разработанной ГЛФ инфекционного процесса и препятствии распространения инфекции.

4.10 Патологоанатомическое вскрытие, отбор секционного материала для диагностики

Согласно зафиксированным при некропии павших животных патологоанатомическим изменениям (результаты представлены в таблице 43).

Таблица 43 – Результаты патологоанатомического вскрытия павших кроликов

№	Группа	Абсцессы в печени	Инфаркт сердца	Застой желчи в желчных протоках	Напряженность капсулы печени	Краевой некроз каудальных долей печени	Пневмония*
1	Плацебо		+	+	+		+
2			+	+	+	+	+
3		+	+	+	+	+	
Частота встречаемости в группе животных		1	3	3	3	2	2
4	Лечение	+	+	+	+	+	+
5		+	+	+	+	+	+

Продолжение таблицы 43

№	Группа	Абсцессы в печени	Инфаркт сердца	Застой желчи в желчных протоках	Напряженность капсулы печени	Краевой некроз каудальных долей печени	Пневмония*
6		+		+	+		
7			+	+	+	+	+
8			+	+	+	+	+
9		+	+	+	+	+	+
10			+	+	+	+	+
11		+	+	+	+	+	+
12		+	+	+	+	+	
13		+	+		+		+
Частота встречаемости в группе животных		7	9	9	10	7	8

Примечание: * – Кусочек легкого тонет в воде, что говорит о начале процесса гепатизации

Из таблицы 43 видно, что раневая инфекция в области холки, вызванная *F. necrophorum* вызвала генерализованную форму, при которой вторичные очаги инфекции были обнаружены в печени у 7 опытных животных и у 1 контрольного животного, а также геморрагический инфаркт сердца (Рисунок 58, А) у 9 опытных и у 3 контрольных животных. Дополнительно были зафиксированы застой желчи в желчных протоках печени в 12 случаях, напряженность капсулы печени во всех случаях, краевой некроз каудальных долей печени (Рисунок 58, Б) в 9 случаях, пневмония легких (Рисунок 58, В) в 10 случаях. Зафиксированные патологоанатомические изменения являются типичными для некробактериоза кроликов.

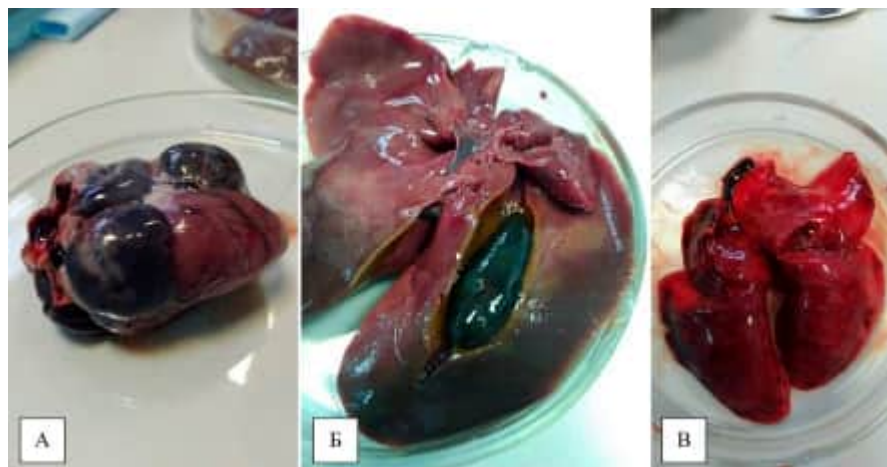


Рисунок 58 – Результаты патологоанатомического вскрытия

Примечание: А – геморрагический инфаркт сердца; Б – печень с краевым некрозом; В – легкие с проявлениями пневмонии

4.11 Результаты бактериологического исследования секционного материала полученного от опытных и контрольных кроликов после их гибели

С целью подтверждения причин гибели животных, после проведения их патологоанатомического исследования, был произведен отбор секционного материала – сердце и кусочек печени, с целью обнаружения в данных образцах *F. necrophorum*. Результаты исследования приведены в таблице 44. Отбор проб и их исследование производилось непосредственно в день гибели животных.

Таблица 44 – Результаты бактериологического исследования сердца и печени кроликов

№	Группа	Результаты выделения <i>Fusobacterium necrophorum</i> , и сопутствующей флоры, из органов павших кроликов *	
		Сердце	Печень
1	Плацебо	<i>F. necrophorum</i>	<i>Clostridium bifermentans</i> <i>F. necrophorum</i>
2	Плацебо	<i>F. necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i>
3	Плацебо	<i>F. necrophorum</i>	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>F. necrophorum</i>
4	Лечение	<i>F. necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i>
5	Лечение	<i>F. necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i> <i>Prevotella oris</i>
6	Лечение	<i>F. necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Clostridium cadaveris</i>
7	Лечение	<i>F. necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i> <i>Clostridium bifermentans</i>
8	Лечение	<i>F. necrophorum</i> <i>Prevotella oris</i>	<i>F. necrophorum</i>
9	Лечение	<i>F. necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i>
10	Лечение	Не обнаружено	<i>F. necrophorum</i>
11	Лечение	<i>F. necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i>
12	Лечение	<i>F. necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i>
13	Лечение	<i>F. necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i>

Примечание: * – Лабораторно-диагностические исследования были проведены исключительно в отношении анаэробных бактерий.

Согласно данным, представленным в таблице 44, *F. necrophorum* была выделена из печени всех исследованных животных, а также из сердца всех животных, за исключением кролика №10, что подтверждает переход инфекции в генерализованную форму, повлекшую гибель испытуемых животных.

4.12 Анализ иммуногенности ГЛФ

При введении разработанной ГЛФ в полость абсцесса существует вероятность попадания действующих веществ в кровь, что может повлечь за собой иммунный ответ, который может снизить эффективность текущего и последующего применения препарата, а также вызвать побочные эффекты. Для определения формирования данного эффекта необходимо было контролировать наличие антител к рекомбинантным эндолизинам в крови испытуемых животных, что требовало конструирования иммуноферментной тест-системы.

4.12.1 Конструирование иммуноферментной тест-системы

На первом этапе нами была сконструирована иммуноферментная тест-система для определения наличия антител к рекомбинантным эндолизинам методом косвенного (непрямого) иммуноферментного анализа в соответствии с ОФС.1.7.2.0033.15 «Метод иммуноферментного анализа» ГФ РФ XIV.

На первом этапе конструирования иммуноферментной тест-системы для выявления IgG-антител к эндолизинам был осуществлен подбор концентрации антигена (коктейля рекомбинантных эндолизинов, входящих в состав ГЛФ) для сорбции в лунках планшета. Для этого первоначально была осуществлена серия пробных сорбций каждого из эндолизинов в отдельности в различных концентрациях (от 100 мкг до 0,01 пг с кратностью, равной 10). Антигены (эндолизины) сорбировались в лунках полистиролового планшета, затем в лунки вносилась полученная кроличья антисыворотка к рекомбинантным эндолизинам в разведениях от 1/5 до 1/10000, для установления необходимого разведения антисыворотки в качестве положительного контроля. Связавшиеся с антигеном IgG-антитела выявлялись с помощью конъюгата «Белок А-пероксидаза» (Protein A-Peroxidase, Sigma, США) или конъюгата аффинно-очищенных поликлональных козьих антител к иммуноглобулинам кролика с пероксидазой хрена («Poly goat anti-rabbit HR», Биалекса, Россия), а ферментная реакция с добавленным затем субстратом (BCM Diagnostics, США) ингибировалась кислотой (стоп-реагент). Регистрацию оптической плотности в лунках проводили при 450 нм против воздуха.

Подбор условия проведения иммуноферментной реакции включал также подбор разведения конъюгата, отработку условий инкубации при различных температурных режимах (от +35°C до +44°C), времени проведения реакции (от 30 до 90 минут), необходимости или отсутствии встряхивания.

Конъюгат «Белок А-пероксидаза» в количестве 1 мг растворяли в 0,5 мл 0,01 М цитратного буфера (рН 6,4) с добавлением 0,5 мл глицерина (глицерин препятствует замораживанию реагента). Полученный раствор с концентрацией конъюгата 1 мг/мл хранили при температуре -20°C, периодически используя. Для подбора оптимального разведения конъюгата при проведении ИФА готовили его разведения в PBS-T в диапазоне 1/16000-1/128000. Конъюгат «Poly goat anti-rabbit HR» имелся в жидком виде с концентрацией 0,7 мг/мл. В исследованиях использовали другой диапазон разведения этого конъюгата в PBS-T – 1/2000-1/8000.

Условия проведения ИФА, сформулированные в ходе проведенной работы: содержание эндолизиннов в лунках – по 20 пг каждого, разведение конъюгата «Poly goat anti-rabbit HR» 1/8000, конъюгата «Protein A-Peroxidase» 1/32000, разведение исследуемых сывороток 1/100-1/1600, разведение положительного контрольного образца 1/200-1/1600. В качестве отрицательного контроля использовали Трис-НСI. Для дополнительного доказательства специфичности системы исследована сыворотка крови интактного кролика (в разведении 1/200-1/1600), а также сыворотки крови других животных (лошадь, курица, баран) в разведении 1/100. Кроме этого, все исследованные образцы были проанализированы в иммуноферментной тест-системе, где присутствовали все компоненты анализа, за исключением антигена в лунках (так называемые «пустые лунки»). Опыты по отработке данных условий были проставлены в 10 дублях (при анализе сывороток крови не кроликов – 5 дублей).

В результате проведенных исследований были получены следующие результаты (Таблица 45).

Таблица 45 – Среднее значение оптической плотности исследуемых образцов при анализе методом ИФА в сконструированной тест-системе

Образец	Разведение				
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
К ⁺ ср (положительный контроль – сыворотка крови кролика, иммунизированного коктейлем эндолизинов) (N=10)	-	1,807	1,333	0,949	0,731
Сыворотка крови интактного кролика (N=10)	-	0,417	0,423	0,341	0,343
Сыворотка крови лошади (N=5)	0,342	-	-	-	-
Сыворотка крови курицы (N=5)	0,297	-	-	-	-
Сыворотка крови барана (N=5)	0,299	-	-	-	-
К ⁻ ср (отрицательный контроль – буферный раствор) (N=10)	0,318				

Примечание: cut-off = К⁻ср × 2 = 0,636

Выраженная цветная реакция развивалась только в лунках с положительным контролем. В лунках с отрицательным контролем оптическая плотность находилась в районе 0,3 оптических единиц (ОЕ). В среднем около 0,3 ОЕ была также оптическая плотность в лунках с сыворотками других животных, а около 0,35 ОЕ – оптическая плотность в лунках с интактной сывороткой кролика. В «пустых лунках» реакция не развивалась.

Учет результатов проводили с помощью подсчета cut-off. Чтобы отсесть возможные ложноположительные результаты, было выбрано значение cut-off, равное удвоенной оптической плотности отрицательного контроля (буферный раствор).

4.12.2 Результаты

Оценка наличия антител к эндолизинам проводилась с использованием коэффициента позитивности (Кп), который представляет собой отношение оптической плотности образца к значению cut-off. Полученные результаты представлены в таблице 46.

Таблица 46 – Наличие антител к коктейлю эндолизинов в исследуемых образцах сывороток крови кроликов после лечения

Опытные образцы сывороток крови кроликов после лечения (разведение 1/200), №№ кроликов	Кп (Кп \geq 1 – результат положительный; Кп $<$ 1 результат отрицательный)	Наличие антител к коктейлю эндолизинов
1	0,51	Отсутствуют
2	0,58	Отсутствуют
3	0,64	Отсутствуют
4	0,73	Отсутствуют
5	0,72	Отсутствуют
6	0,74	Отсутствуют
7	0,62	Отсутствуют
8	0,53	Отсутствуют
9	0,78	Отсутствуют
10	0,54	Отсутствуют
11	0,64	Отсутствуют
12	0,53	Отсутствуют
13	0,53	Отсутствуют

Во всех исследуемых образцах сывороток крови наличие антител к эндолизинам не зафиксировано, Кп существенно меньше 1 (Таблица 46), что говорит об отсутствии гуморального иммунного ответа при применении разработанной ГЛФ данным способом.

Резюме. На данном этапе исследований было показано незначительное влияние рекомбинантных эндолизинов на представителей нормофлоры как *in vitro*, так и *in vivo*. Значительное угнетение роста *in vitro* наблюдалось только при воздействии LysAm24 на культуру *L. helveticus* NK-1. При этом не было отмечено влияния рекомбинантных эндолизинов ни на представителей рода *Lactobacillus*, ни на представителей рода *Bifidobacterium* при применении *in vivo*.

При изучении как острой токсичности и местнораздражающего действия, так и субхронической токсичности разработанной ГЛФ негативных изменений и отклонений от нормы у животных не выявлено, что позволяет говорить о безопасности ее применения.

Полученные на данном этапе исследования результаты подтверждают корректность выбранной инфекционной модели на кроликах для определения эффективности разработанной ГЛФ. Развитие раневой патологии в форме абсцесса наблюдалось у 100% подопытных животных в течение 6-8 дней с момента

инфицирования. Данный разброс по времени развития абсцесса может объясняться индивидуальными особенностями отдельных животных. При этом отмечается, что на момент начала опыта, все животные из опытной и контрольной групп не имели каких-либо достоверных отклонений в отношении параметров физиологического состояния и поведенческих реакций.

При определении чувствительности культуры *F. necrophorum* к эндолизинам было установлено, что бактерицидной активностью обладают LysECD7 и LysAm24, в то время как чувствительность культуры к LysAp22 доказана не была. Данные результаты говорят о возможности использования сконструированной ГЛФ на основе рекомбинантных эндолизинов в эксперименте лечения раневой инфекции, вызванной *F. necrophorum* на кроликах.

Анализ данных по выживаемости опытных и контрольных кроликов со дня их инфицирования по день их гибели (включительно) позволяет свидетельствовать о том, что средняя продолжительность жизни кроликов контрольных групп составляет $13,33 \pm 0,58$ дней, средняя продолжительность жизни кроликов опытной группы, подвергавшихся лечению разработанной ГЛФ – $22 \pm 2,18$ дня.

У кроликов, получавших ГЛФ, была достоверно ниже температура тела на 9 день после инфицирования (3-4 день после начала лечения) по сравнению с контролем. Это может указывать на антибактериальные свойства испытуемого средства, препятствующее генерализации инфекции.

Содержание лейкоцитов и сегментоядерных нейтрофилов в сыворотке крови животных было достоверно ниже в опытной группе по сравнению с контрольной на 11 день после заражения (на следующий день после окончания лечения), что косвенно говорит о замедлении развития инфекционного процесса и, как следствие, уменьшению воспалительных процессов при применении разработанной ГЛФ. Данное предположение также косвенно подтверждает значительное замедление развития абсцесса в контрольной группе животных.

Наличие антител во всех образцах сывороток крови обследованных кроликов зафиксировано не было, что свидетельствует о том, что при использовании разработанной ГЛФ в данные сроки антитела не вырабатываются.

Несмотря на местное лечение кроликов опытных групп, все животные погибли вследствие перехода раневой инфекции в генерализованную форму. Борьба с *F. necrophorum* требует комплексной схемы лечения с использованием средств местного и системного действия. Так, при исследовании образцов секционного материала (сердца и печени), полученных от павших животных, с целью подтверждения диагноза «некробактериоз», культура *F. necrophorum* была выделена в 12 случаях из сердца, и во всех случаях из печени (триада Коха). Несмотря на это, применение ГЛФ на основе рекомбинантных эндолизинов позволило увеличить срок жизни животных опытной группы по сравнению со сроком жизни кроликов, подвергавшихся лечению плацебо, более чем на 50%, и значительно замедлить распространение инфекции что говорит об эффективности применения разработанной ГЛФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Глобальное распространение антибиотикорезистентности [4, 11, 26, 29, 32, 33, 34,] ставит перед научным сообществом ряд задач по поиску новых путей борьбы с полирезистентными возбудителями. Изучается ряд возможных альтернатив антибиотикам, среди которых вновь на себя обратили внимание бактериофаги, обладающие высокой специфичностью действия и низкой токсичностью для человека. Разработаны концепции персонализированной фаготерапии, позволяющей с высокой эффективностью бороться с полирезистентными возбудителями [1], изучены иммунологические аспекты применения бактериофагов [5, 6]. Дальнейшим развитием фаготерапии может стать применение рекомбинантных эндолизинов – ферментов, синтезирующихся в конце литического цикла бактериофага и разрушающих клеточную стенку бактерий. Согласно существующим исследованиям [38, 42, 52, 76] рекомбинантные эндолизины могут обладать более широким спектром действия по сравнению с бактериофагами, что, учитывая сравнительно более простую и поддающуюся стандартизации технологию производства рекомбинантных белков [61, 81], делает их перспективными кандидатами для разработки препаратов на их основе. На фоне распространения антибиотикорезистентности разработка биотехнологических препаратов рекомбинантных эндолизинов является актуальной и перспективной темой исследований.

Целью представленного исследования явилась разработка безопасной и эффективной в отношении раневой инфекции ЛФ рекомбинантных эндолизинов. В работе применены общенаучные подходы и специальные методы: микробиологические, иммунологические, физико-химические, статистические.

На первом этапе исследования проведен скрининг пяти рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11 по спектру их противомикробной активности в отношении в общей сложности 120 штаммов бактерий *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.* и *C. jejuni*. Рекомбинантные эндолизины показали более широкий спектр противомикробной активности по сравнению с бактериофагами, являющимися их

источниками. Так, бактериофаг ECD7 активен только в отношении *E. coli*, *S. sonne* и *S. flexneri* [37], в то время как синтезируемый им эндолизин проявил бактерицидную активность в отношении всех исследуемых видов бактерий. Аналогичные свойства показали и рекомбинантные эндолизины других бактериофагов. Рекомбинантный эндолизин бактериофага Am24, активного в отношении *A. baumannii* [105], проявлял бактерицидные свойства в отношении всех исследуемых видов бактерий, эндолизин бактериофага Ap22, который также активен исключительно в отношении штаммов *A. baumannii* [106], элиминировал штаммы всех исследуемых видов бактерий, кроме *P. aeruginosa*, к рекомбинантному эндолизину бактериофага Si3 (активен в отношении *S. Infantis* [2]) были чувствительны все исследуемые виды, кроме *K. pneumoniae*, эндолизин бактериофага St11 (активен в отношении *S. Typhimurium* [2]) проявлял бактерицидные свойства в отношении всех исследуемых видов, кроме *P. aeruginosa*. Наиболее широким спектром противомикробной активности из исследуемых рекомбинантных эндолизинов обладал LysECD7, чувствительным к которому являлись 85 из 120 исследуемых штаммов (70,83%). К LysAm24 были чувствительны 77 из 120 исследуемых штаммов (64,17%), к LysAp22 – 66 из 120 штаммов (55,00%), к LysSi3 – 58 из 120 штаммов (48,33%), наименее широким спектром противомикробной активности обладал LysSt11, проявивший активность в отношении 45 из 120 исследуемых штаммов микроорганизмов (37,50%).

Полученные данные свидетельствуют о более широком спектре противомикробной активности исследуемых рекомбинантных эндолизинов по сравнению с бактериофагами, что согласуется с результатами исследований эндолизинов других бактериофагов [38, 42, 52, 75, 76, 99, 102, 104, 130] и показывает перспективность применения данных ферментов для разработки противомикробных препаратов. Кроме того, полученные данные позволили обосновать выбор рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22 в качестве действующих веществ разрабатываемой ГЛФ ввиду наиболее широкого спектра противомикробной активности.

Далее была проведена разработка состава и технологии изготовления ГЛФ рекомбинантных эндолизинов для применения на раневой поверхности и для введения в полости.

На данный момент в мире ведется разработка как терапевтических препаратов эндолизинов, так и композиций для профилактики инфекций. Существуют примеры препаратов для парентерального [50, 70], местного [48, 50] и ингаляционного [53] применения, а также предварительные исследования по инкапсулированию эндолизинов в наночастицы [63, 68, 72] и липосомы [107], что обеспечит возможное контролируемое высвобождение и таргетную доставку действующих веществ. Также эндолизины планируются к применению для профилактики имплант-ассоциированных инфекций [93] и продлению сроков годности продуктов питания [119].

Тем не менее, разрабатываемые препараты отличает сложность технологии изготовления с применением большого числа технологических этапов в случае с инкапсулированием эндолизинов, комплексность состава препаратов в случае с ЛФ для местного применения и короткий срок годности в случае с препаратами для парентерального применения (менее 2-х месяцев). В связи с этим в настоящей работе была поставлена задача разработки ЛФ для местного применения, обеспечивающей стабильность рекомбинантных эндолизинов и простой в производстве, что облегчит последующее масштабирование технологии.

Первым шагом в разработке ЛФ был подбор оптимальной концентрации действующих веществ, в ходе которого была определена бактерицидная активность растворов индивидуальных эндолизинов в диапазоне концентраций от 10 мкг/мл до 10 мг/мл, а также их комбинации. Наиболее высокую бактерицидную активность в отношении тест-штамма *A. baumannii* TS 50-16 показала смесь рекомбинантных эндолизинов с индивидуальными концентрациями 150 мкг/мл (100%) и 50 мкг/мл (98,17%). При использовании смеси с более высокой концентрацией эндолизинов наблюдалось резкое падение бактерицидной активности (48,55%) вследствие чего для дальнейших испытаний использовали вышеупомянутые смеси.

Далее был проведен подбор вспомогательных веществ, обеспечивающих стабильность действующих веществ и необходимые физико-химические свойства ЛФ. На первом этапе подбор осуществлялся путем анализа физико-химических свойств экспериментальных составов гелей (вязкость и рН до и после стерилизации). В качестве гелеобразователей были выбраны производные целлюлозы: Natrosol 250 ННХ (гидроксиэтилцеллюлоза) и Venecel К100М (гидроксипропилметилцеллюлоза), исходя из их индифферентности, простоты технологии изготовления, устойчивости к стерилизации, широкого диапазона вязкостей и нейтрального значения рН получаемого геля. Для варьирования показателей стабильности и реологических свойств ЛФ, а также придания осмотических свойств, облегчающих отток гнойного содержимого ран, в составы также включали полиэтиленгликоли 400, 1500, 3000 и 6000. В общей сложности был изготовлен и проанализирован 21 состав.

После определения физико-химических свойств экспериментальных образцов было выбрано 2 состава, обладающих оптимальными свойствами, не изменяющимися после стерилизации путем автоклавирования. Для вспомогательных веществ, входящих в данные составы, была определена совместимость с действующими веществами, которые вводили в растворы вспомогательных веществ в концентрациях 50 и 150 мкг/мл как по отдельности, так и в комбинации. Наиболее высокое значение бактерицидной активности в отношении тест-штамма *A. baumannii* TS-50-16 рекомбинантные эндолизины показали в присутствии Natrosol 250 ННХ и ПЭГ 1500 в концентрациях 1,0 и 1,5% соответственно (LysAp22 – 56,01% и 48,85% в Natrosol 250 ННХ и в ПЭГ 1500 соответственно, LysAm24 – 100,00% и 100,00%, LysECD7 – 99,76% и 100,00%, смесь – 99,26% и 99,82%). Основываясь на полученных данных, в дальнейшей разработке ГЛФ использовали состав с содержанием Natrosol 250 ННХ и ПЭГ 1500 в концентрациях 1,0% и 1,5% соответственно с использованием в качестве растворителя 20 мМ Трис-НСl с рН = 7,5 и использованием в качестве действующих веществ смеси рекомбинантных эндолизинов с концентрацией каждого белка 150 мкг/мл. Применение смеси рекомбинантных эндолизинов

позволит обеспечить наиболее широкий спектр действия ЛП и более эффективную элиминацию бактерий за счет комплексного действия на различные участки пептидогликана, о чем косвенно свидетельствуют данные, полученные другими авторами [115, 117], изучавшими эффективность комбинированного применения эндолизинов.

Данные о совместимости рекомбинантных эндолизинов с производными целлюлозы и полиэтиленгликолями получены впервые и показывают возможность применения данных эксципиентов для разработки ЛФ эндолизинов, что расширяет спектр вспомогательных веществ для данных целей.

Следующим шагом в разработке ГЛФ была стандартизация подхода к контролю качества, которая заключалась в разработке методики контроля по показателю «Подлинность», модификации методики контроля показателя «Специфическая активность» в части используемых питательных сред и отрицательного контроля, их валидации и составлении проекта нормативной документации в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV.

Контроль подлинности геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами проводили методом иммуноэлектрофореза в агаровом геле. Для разработки методики путем иммунизации кроликов с добавлением адьюванта Фрейнда была получена антисыворотка к смеси рекомбинантных эндолизинов, входящих в состав ЛФ и антисыворотка к LysSi3 для использования в качестве отрицательного контроля при постановке методики. Валидация методики контроля проводилась по показателю «Специфичность» путем изучения смеси рекомбинантных эндолизинов, входящих в состав ГЛФ, трех лабораторных серий препарата, плацебо и LysSi3. Испытания показали специфичность методики и ее пригодность для контроля ГЛФ по показателю «Подлинность».

Аналитическая методика контроля подлинности геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами разработана и валидирована впервые. Кроме того, при условии использования антисыворотки, полученной при иммунизации животных другими эндолизинами, методика после проведения повторной валидации может быть использована для контроля качества препаратов с другими

действующими веществами, что создает задел для стандартизации контроля качества препаратов рекомбинантных эндолизинов.

Контроль специфической активности ГЛФ проводили по опубликованной ранее методике [38, 39]. Для обеспечения быстрого достижения тест-штаммами экспоненциальной фазы роста и корректного расчета специфической активности ГЛФ при культивировании микроорганизмов использовали МПБ и агар Мюллера-Хинтона и в качестве отрицательного контроля использовали плацебо. Валидация модифицированной методики проводилась по показателям «Правильность (сходимость)» и «Внутрилабораторная прецизионность». В качестве тест-штаммов были выбраны *E. coli* ATCC 25922 и *A. baumannii* TS 50-16 ввиду простоты культивирования и быстрого достижения экспоненциальной фазы роста, что является критичным при поточном посерийном анализе производимых ЛП.

При определении правильности методики процентное соотношение практического значения к теоретической бактерицидной активности действующих веществ составило в среднем 99,28% при контроле с использованием *E. coli* ATCC 25922 и 100,81% при контроле с использованием *A. baumannii* TS 50-16, что соответствовало критериям приемлемости.

При определении внутрилабораторной прецизионности значение относительного стандартного отклонения между значениями, полученными двумя аналитиками в разные дни, не превышало 5%, а относительное стандартное отклонение всех полученных результатов составляло 1,66% при контроле с использованием *E. coli* ATCC 25922 и 0,09% при контроле с использованием *A. baumannii* TS 50-16, что соответствовало критериям приемлемости. Таким образом, методика успешно прошла валидацию по заданным показателям и признана пригодной для проведения контроля геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами по показателю «Специфическая активность».

Был разработан проект нормативной документации в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV. В нормативную документацию были включены следующие показатели качества: описание, подлинность, рН, аномальная

токсичность, стерильность, специфическая активность, бактериальные эндотоксины, герметичность упаковки и масса содержимого упаковки.

Далее были определены сроки хранения для двух типов упаковок: преднаполненных пластиковых шприцев и алюминиевых туб. Выбор двух упаковок обусловлен различными способами применения ГЛФ и призван обеспечить удобство ее использования. Так, шприцы позволяют вводить ГЛФ в полости (например, в полость абсцесса) и обеспечивают точное дозирование за счет конструкции шприца, тубы в свою очередь обеспечивают удобство нанесения на раневые поверхности. Учитывая состав ЛФ, а именно использование в качестве действующих веществ термолабильных эндолизинов, для обеспечения наиболее продолжительного срока годности гель бактерицидный с рекомбинантными эндолизинами необходимо хранить при температуре от +2 до +8 °С. Согласно требованиям ГФ РФ XIV и правилам ЕАЭС определение срока хранения проводилось методом долгосрочных испытаний отдельно для каждого типа упаковки при температуре +2 °С и +8 °С. Стабильность определяли в течение 6 месяцев, контроль проводили после изготовления, через 1 месяц хранения, через 3 месяца хранения и через 6 месяцев хранения по всем показателям качества, описанным в проекте Нормативного документа на гель бактерицидный с рекомбинантными эндолизинами. ГЛФ в двух вариантах упаковки была стабильна в течение 6 месяцев хранения при заданных условиях.

ЛФ, обеспечивающая срок хранения равный 6 месяцам, разработана впервые. Из известных на данный момент ЛФ эндолизинов данные о стабильности представлены только для парентеральной формы (8 недель при температуре +4°С) [70], для других композиций с эндолизинами данные о стабильности либо отсутствуют, либо не представлены в публикациях.

Проведена отработка технологии изготовления геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами, составление лабораторного регламента. Технология изготовления заключалась в приготовлении гелевой основы с учетом последующего введения в состав растворов рекомбинантных эндолизинов, ее стерилизации путем автоклавирования, стерилизации растворов действующих

веществ путем стерилизующей фильтрации (фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, материал мембраны – полиэфирсульфон), введении действующих веществ в стерильную гелевую основу в асептических условиях, последующей фасовке, укупорке и маркировке.

После отработки технологии изготовления были наработаны лабораторные серии ГЛФ, в ходе изготовления которых фиксировались условия проведения работы, выход полупродуктов и продукта, а также их потери. На основе полученных данных был разработан лабораторный регламент производства геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами, в котором были приведены: характеристика ГЛФ, технологическая и аппаратурная схемы производства, спецификации используемого оборудования, характеристика сырья и вспомогательных материалов, перечень промежуточных продуктов, параметры режима и безопасности технологического процесса, материальный баланс и т.д.

Впервые разработана технология, которая позволяет получить стерильный гель со смесью рекомбинантных эндолизинов, избегая при этом термического воздействия на термолабильные действующие вещества, и которая легко поддается масштабированию ввиду отсутствия нестандартных операций, которые сложно воспроизвести в условиях промышленного производства, и простоте состава.

Заключаящим этапом проведенных исследований была оценка эффективности разработанной ГЛФ на инфекционной модели некробактериоза у кроликов (возбудитель – *F. necrophorum*), изучение острой, субхронической токсичности, местнораздражающего действия на мышцах и изучение влияния рекомбинантных эндолизинов на представителей нормофлоры.

При изучении влияния рекомбинантных эндолизинов на представителей нормофлоры *in vitro* было выявлено незначительное угнетение штамма *B. longum* В379М эндолизинами LysECD7 и LysSi3, незначительное снижение активности штамма *B. breve* OV-12 под действием LysAm24 и LysECD7, не превышающее изменений в отрицательном контроле. LysAp22 и LysSi3 снижали количество жизнеспособных колониеобразующих единиц штаммов *B. infantis* 73-15 и *B. longum* OV-20. Было отмечено снижение развития популяции штамма *B. longum* Я-3 под

воздействием LysAp22 и *B. bifidum* 791 под воздействием LysSt11. Также LysSi3, LysAm24 и LysAp22 угнетали рост *L. helveticus* NK-1. Рекомбинантные эндолизины не оказывали влияния на *B. bifidum* OV-19, *B. adolescentis* ГО-13, *L. casei* КНМ-12 и *L. casei* КЗШ24.

Изучение влияния рекомбинантных эндолизинов на просветную и пристеночную микрофлору показало достоверное снижение титра коагулазоотрицательных стафилококков в просветной микрофлоре и повышение количества *E. coli* и бактерий рода *Enterococcus* в составе пристеночной микрофлоры на пятый день применения LysAm24. LysSt11 повышал количество коагулазоотрицательных стафилококков и снижал количество энтерококков в составе пристеночной микрофлоры и повышал титр грибов в составе просветной микрофлоры на пятый день эксперимента. LysSi3 снижал титр бактерий рода *Enterococcus* в просветной микрофлоре на пятый день эксперимента. LysAp22 и LysECD7 не оказывали влияния на представителей нормофлоры *in vivo*.

Данные о влиянии рекомбинантных эндолизинов на исследованных представителей нормофлоры получены впервые и показывают индивидуальность такого влияния для каждого белка, что говорит о необходимости контроля данных свойств эндолизинов при разработке ЛФ для энтерального и других путей введения, при которых возможно действие препарата на представителей нормальной микрофлоры.

Изучение острой токсичности и местнораздражающего действия проводили на 36 аутбредных мышах CD-1 (18 самцов и 18 самок). ГЛФ вводили однократно в терапевтической дозе и 10-кратной терапевтической дозе, контрольной группе вводили плацебо. Негативных изменений и отклонений от нормы у животных выявлено не было, что говорит об отсутствии острой токсичности и местнораздражающего действия при однократном применении.

Изучение субхронической токсичности и местнораздражающего действия проводили на 60 аутбредных мышах ICR (CD-1) (30 самцов и 30 самок). ЛФ вводили 2 раза в день в течение 5 дней в терапевтической дозе и 10-кратной терапевтической дозе, контрольной группе вводили плацебо. Негативных

изменений и отклонений от нормы у животных также выявлено не было, что говорит об отсутствии острой токсичности и местнораздражающего действия при курсовом применении.

Изучение параметров безопасности геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами проведено впервые. Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов, показавших безопасность применения эндолизинов в определенных концентрациях и отсутствие цитотоксичности [63, 75], что показывает возможность разработки безопасных препаратов на основе рекомбинантных эндолизинов.

Изучение эффективности разработанной ГЛФ проводили на инфекционной модели некробактериоза у кроликов. В результате проведенных исследований *in vivo* было выявлено статистически достоверное различие в продолжительности жизни кроликов опытной и контрольной групп. Так, средняя продолжительность жизни кроликов, получавших плацебо, составила 13,33 дней, в то время как средняя продолжительность жизни в опытной группе составила 22,40 дня. У животных опытной группы по сравнению с контрольной была достоверно ниже температура тела на 3-4 день после начала лечения (40,7 °С в контрольной группе, 39,7 °С – в опытной). Кроме того, было показано значительное замедление роста площадей абсцесса в опытной и контрольной группах животных (прирост площади к концу курса лечения 26,52% и 94,88% соответственно), и достоверно более низкое содержание лейкоцитов и сегментоядерных нейтрофилов в крови опытных животных по сравнению с контрольными, что может свидетельствовать о замедлении развития инфекционного процесса и препятствии генерализации инфекции при применении разработанной ГЛФ.

Антител к коктейлю из рекомбинантных эндолизинов в крови кроликов опытной группы выявлено не было, что говорит об отсутствии иммуногенности геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами при данном способе введения и схеме лечения.

Результаты исследований действия эндолизинов при применении *in vivo* в научной литературе представлены широко [48, 49, 53, 58, 70, 74, 75, 85, 99, 117,

128] и все они говорят о высокой эффективности как индивидуального, так и комбинированного применения данных ферментов при различных инфекциях, в том числе вызванных антибиотикорезистентными микроорганизмами. Указанные результаты подтверждаются и дополняются данными, полученными в настоящей работе, и обосновывают актуальность и перспективность их применения для терапии бактериальных инфекций различной локализации и вызванных различными возбудителями.

Несмотря на лечение животных опытной группы, все животные пали вследствие перехода инфекции в генерализованную форму (в ходе патологоанатомического вскрытия культура *F. necrophorum* была выделена в 12 из 13 случаев из сердца и во всех случаях из печени), что связано с высокой агрессивностью возбудителя, борьба с которым требует комплексного подхода с использованием средств местного и системного действия.

Изложенное выше доказывает перспективность использования разработанной ГЛФ для терапии и профилактики инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, при применении на раневой, ожоговой поверхности и при введении в полости.

Итогом представленной диссертационной работы является определение спектра бактерицидной активности рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11 в отношении 120 штаммов ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.* и *C. jejuni*. Впервые разработана ГЛФ на основе смеси трех рекомбинантных эндолизинов для терапии раневых инфекций и введения в полости. Разработаны и валидированы методики контроля качества геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами, технология его изготовления, составлены проекты нормативной документации и лабораторного регламента. Проведена оценка эффективности разработанной ГЛФ на инфекционной модели некробактериоза у кроликов и ее острой, субхронической токсичности и местнораздражающего действия на мышцах.

ВЫВОДЫ

1. На 120 штаммах бактерий установлен более широкий спектр противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11 по сравнению с бактериофагами ECD7, Am24, Ap22, Si3 и St11. К LysECD7 были чувствительны 70,83% исследованных штаммов, к LysAm24 – 64,17%, к LysAp22 – 55,00%, к LysSi3 – 48,33%, а к LysSt11 – 37,50%. Для включения в состав готовой лекарственной формы выбраны рекомбинантные эндолизины с наиболее широким спектром противомикробной активности – LysECD7, LysAm24 и LysAp22.

2. На основе изучения биосовместимости лекарственных веществ с компонентами лекарственной формы, изучения физико-химических и технологических свойств экспериментальных составов был обоснован состав вспомогательных веществ для геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами: Natrosol 250 ННХ и полиэтиленгликоль 1500 в концентрациях 1,0% и 1,5% соответственно в качестве вспомогательных веществ и буферный раствор 20 мМ Трис-НСl с рН = 7,5 в качестве растворителя.

3. Разработана технология изготовления готовой лекарственной формы, заключающаяся в приготовлении гелевой основы, ее стерилизации, приготовлении концентрированных растворов рекомбинантных эндолизинов, их введении в стерильную гелевую основу, фасовкой в шприцы или тубы алюминиевые с последующей маркировкой. Разработан лабораторный регламент получения геля на основе рекомбинантных эндолизинов.

4. Разработана методика контроля качества геля на основе рекомбинантных эндолизинов по показателю «Подлинность» и модифицирована методика контроля показателя «Специфическая активность». Методики валидированы по показателям «Специфичность», «Повторяемость (сходимость)» и «Внутрилабораторная прецизионность» в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания. Разработан проект нормативной документации на готовую лекарственную форму, включающий показатели: «Описание», «Подлинность»,

«рН», «Аномальная токсичность», «Стерильность», «Специфическая активность», «Бактериальные эндотоксины», «Герметичность упаковки» и «Масса содержимого упаковки».

5. Показана стабильность разработанной готовой лекарственной формы, в течение 6 месяцев хранения при температуре от +2 до +8 °С в двух типах упаковки.

6. У разработанной готовой лекарственной формы отсутствует острая, субхроническая токсичность, иммуногенность при местном применении и местнораздражающее действие, что демонстрирует безопасность препарата. Показана эффективность разработанной готовой лекарственной формы на инфекционной модели некробактериоза у кроликов, которая выражалась в увеличении продолжительности жизни кроликов более, чем на 50% (13,33 дней в контрольной группе и 22,40 дня – в опытной), достоверном снижении температуры тела (40,7°С в контрольной группе и 39,7°С – в опытной, на 9 день после заражения) и значительном замедлении развития абсцесса (замедление на 49,1% на 9 день после заражения и на 68,36% - на 12 день).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения эффективности борьбы с раневыми и ожоговыми инфекциями, вызванными резистентными возбудителями, в том числе с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, рекомендуется использовать гель бактерицидный с рекомбинантными эндолизинами после регистрации в установленном законодательством порядке.

2. Показанный в рамках диссертационного исследования алгоритм разработки иммуноферментной тест-системы позволит создать линейку тест-систем для определения наличия антител к рекомбинантным эндолизинам в крови животных в ходе доклинических испытаний новых препаратов рекомбинантных эндолизинов.

3. Рекомендуется проводить контроль подлинности методом иммуноэлектрофореза для стандартизации контроля качества препаратов рекомбинантных эндолизинов ввиду специфичности и воспроизводимости данного метода в условиях контрольно-аналитических лабораторий фармацевтических производственных предприятий и экспертных организаций.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Дальнейшее проведение доклинических исследований для определения таких показателей безопасности разработанной готовой лекарственной формы, как «Хроническая токсичность», «Аллергизирующее воздействие», «Иммунотоксичность при однократном введении», «Иммунотоксичность при курсовом введении» для включения отчета в регистрационное досье на лекарственный препарат.

2. Проведение масштабирования технологии получения разработанной готовой лекарственной формы и ее адаптация к условиям промышленного производства, наработка серий для клинических исследований.

3. Целесообразна разработка лекарственных форм рекомбинантных эндолизинов для парентерального, ингаляционного и других путей введения.

4. Перспективным направлением исследований является создание лекарственных препаратов, представляющих комбинацию эндолизинов и бактериофагов. Комбинация этих двух агентов позволит не только избирательно воздействовать на бактериальные штаммы планктонной формы, но и разрушать бактериальные биопленки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ	– антиген
АЛТ	– аланинаминотрансфераза
АСТ	– аспартатаминотрансфераза
АФС	– активная фармацевтическая субстанция
ВВ	– вспомогательное вещество
ГЛФ	– готовая лекарственная форма
ГФ	– государственная фармакопея
ЕАЭС	– Евразийский экономический союз
ИСМП	– инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
ИФА	– иммуноферментный анализ
КА	– кровяной агар
ЛП	– лекарственный препарат
ЛС	– лекарственное средство
МПБ	– мясо-пептонный бульон
НД	– нормативная документация
ОФС	– общая фармакопейная статья
ПАВ	– поверхностно-активное вещество
ПЭГ	– полиэтиленгликоль
РФ	– Российская Федерация
ATCC	– American Type Culture Collection
PES	– polyethersulfone (полиэфирсульфон)
rpm	– rounds per minute (обороты в минуту)
RSD	– relative standard deviation (относительное стандартное отклонение)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айзенштадт, А.А. Использование бактериофагов в комплексной терапии острых бактериальных синуситов у детей с выявленной антибиотикорезистентностью / А.А. Айзенштадт // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. – 2015. – Т. 23, №18. – С. 1106-1108.
2. Алешкин, А.В. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации / А.В. Алешкин, Э.А. Светоч, Н.В. Воложанцев, И.А. Киселева, Е.О. Рубальский, О.Н. Ершова, Л.И. Новикова // Бактериология. – 2016. – Т. 1, №1. – С. 22-31.
3. Алешкин, А.В. Концепция персонализированной фаготерапии пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи / А.В. Алешкин, Е.П. Селькова, О.Н. Ершова, И.А. Савин, А.С. Шкода, С.С. Бочкарева, С.Д. Митрохин, И.А. Киселева, О.Е. Орлова, Е.О. Рубальский, Э.Р. Зулькарнеев // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2018. – Т. 3, №2. – С. 66-74.
4. Белобородов, Б.В. Диагностика и антимикробная терапия инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами / Б.В. Белобородов, В.Г. Гусаров, А.В. Дехнич, М.Н. Замятин, Н.А. Зубарева, С.К. Зырянов, Д.А. Камышова, Н.Н. Климко, Р.С. Козлов, В.В. Кулабухов, Ю.С. Полушин, В.А. Руднов, С.В. Сидоренко, И.В. Шлык, М.В. Эдельштейн, С.В. Яковлев // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2020. – Т. 17, №1. – С. 52–83.
5. Бочкарева, С.С. Иммунологические аспекты фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в отделении нейрореанимации / С.С. Бочкарева, А.В. Алешкин, О.Н. Ершова, Л.И. Новикова, С.С. Афанасьев, И.А. Киселева, Э.Р. Зулькарнеев, Е.О. Рубальский, О.Ю. Борисова, А.В. Караулов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – №4. – С. 42-48.
6. Бочкарева, С.С. Методические подходы к оценке некоторых параметров гуморального и клеточного иммунного ответа на бактериофаги / С.С.

Бочкарева, А.В. Караулов, А.В. Алешкин, Л.И. Новикова, И.М. Федорова, М.С. Бляхер, С.И. Котелева, И.В. Капустин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 237-242.

7. Габриэлян, Н.И. Вопросы эпидемиологии в проблеме антибиотикорезистентности клинических патогенов / Н.И. Габриэлян, С.О. Шарапченко, О.В. Кисиль, В.Г. Кормилицина, И.В. Драбкина, Т.Б. Сафонова, М.И. Петрухина, Р.Ш. Сайтгареев, В.М. Захаревич // Медицинский алфавит. – 2020. – №34. – С. 6–8.

8. ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности: Межгосударственный стандарт: дата введения 1994-01-01 / Федеральное агентство по техническому регулированию. – Изд. официальное. – Москва: Стандартинформ, 2009. – 7 с.

9. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание // Федеральная электронная медицинская библиотека: [сайт]. – 2018. – URL: <https://femb.ru/record/pharmasorea14> (дата обращения: 15.07.2019).

10. Директива 2010/63 EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. // СПб., – 2010. – 48 с.

11. Земко, В.Ю. Мониторинг антибиотикорезистентности микроорганизмов в отделении реанимации и интенсивной терапии многопрофильного стационара / В.Ю. Земко, В.К. Окулич, А.М. Дзядзько // Трансплантология. – 2018. – Т. 10, №4. – С. 284–297.

12. Зефирова, Т.П. Вирусная польза: бактериофаги и профилактическая медицина / Т.П. Зефирова, А.В. Алешкин // StatusPraesens. Гинекология. Акушерство. Бесплодный брак. – 2019. – Т. 59, №4. – С. 125–130.

13. Иванова, И.А. Бактериофаги и иммунная система макроорганизма / И.А. Иванова, А.А. Труфанова, А.В. Филиппенко, И.А. Беспалова, Н.Д. Омельченко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – №6. – С. 79-84.

14. Карпенко, В.В. Обезболивание животных в эксперименте: методические рекомендации / М-во здравоохранения СССР; [Сост. Карпенко В. В., Сачков В.И.] – М.: Центр. Ин-т усоверш. врачей, 1985. – 53 с.

15. Краснюк, И.И. Фармацевтическая технология. Промышленное производство лекарственных средств. В двух томах. Том 1 : учебник / И.И. Краснюк, Н.Б. Демина, Е.О. Бахрушина, М.Н. Анурова; под ред. И.И. Краснюка, Н.Б. Деминой. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 352 с.

16. Краснюк, И.И. Фармацевтическая технология. Промышленное производство лекарственных средств. В двух томах. Том 2 : учебник / И.И. Краснюк, Н.Б. Демина, Е.О. Бахрушина, М.Н. Анурова; под ред. И.И. Краснюка, Н.Б. Деминой. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 448 с.

17. Лабораторные методы диагностики некробактериоза сельскохозяйственных животных : Методические рекомендации / А.А. Пилипенко, А.М. Силков, Л.М. Борисова, В.А. Жиров, О.И. Соломаха. – Новосибирск: Сибирское отд. ВАСХНИЛ, 1987. - 43 с.

18. Методические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике некробактериоза, пальцевого дерматита и болезней копыт крупного рогатого скота незаразной этиологии / Д.А. Хузин, Х.Н. Макаев, А.И. Никитин, А.Н. Чернов. – Москва: Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, 2017. – 41 с.

19. Методические указания. МУК 4.2.577-96 Методы контроля биологические и микробиологические факторы. Методы микробиологического контроля продуктов детского и лечебного питания и их компонентов: утверждены заместителем Главного государственного санитарного врача РФ 29.10.1996 – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 84 с.

20. Методические указания. МУК 4.2.999-00 Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах: утверждены Главным государственным санитарным врачом 08.11.2000 – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 79 с.

21. Методические указания по патоморфологической диагностике болезней животных, птиц и рыб в ветеринарных лабораториях №13-7-2/2137:

утверждены Заместителем руководителя Департамента ветеринарии Минсельхоза России 11.09.2000 – М.: Департамент ветеринарии Минсельхозпрода России, 2000. – 28 с.

22. ОФС.1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание // Федеральная электронная медицинская библиотека: [сайт]. – 2018. – URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 15.07.2019).

23. Патологическая физиология и патологическая анатомия животных : учебник для СПО / А.В. Жаров, Л.Н. Адамушкина, Т.В. Лосева, А.П. Стрельников ; под редакцией А.В. Жарова. – Санкт-Петербург: Лань, 2021. – 416 с.

24. Попова, А.К. Применение бактериофагов как альтернативный метод антибактериальной терапии на фоне кризиса антибиотикорезистентности / А.К. Попова, М.А. Кожевников // Молодой ученый. – 2019. – Т. 30, №268. – С. 34-36.

25. Программа СКАТ (Стратегия Контроля Антимикробной Терапии) при оказании стационарной медицинской помощи: Российские клинические рекомендации / под ред. С.В. Яковлева, Н.И. Брико, С.В. Сидоренко, Д.Н. Проценко. - М.: Издательство “Перо”, 2018. – 156 с.

26. Романов, А.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2013-2014 / А.В. Романов, А.В. Дехнич, М.В. Сухорукова, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, М.В. Эйдельштейн, Р.С. Козлов, С.М. Розанова, Е.Ю. Перевалова, Н.З. Яранцева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 19, №. 1. – С. 57-61.

27. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2013. – 536 с.

28. Седова, Д.А. Антибиотикорезистентность и чувствительность к коммерческим препаратам бактериофагов клинических изолятов бактерий *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* / Д.А. Седова, А.С. Калюжин, Ю.А. Романовская // Санитарный врач. – 2021. – Т. 9. – С. 73-80.

29. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacterales* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон 2015-2016». / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, А.В. Микотина, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов, С.М. Розанова, Е.Ю. Перевалова, Н.З. Яранцева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21, №. 2. – С. 143-155.
30. Тец, В.В. Микробные биопленки и проблемы антибиотикотерапии / В.В. Тец, Г.В. Тец // Практическая пульмонология. – 2013. – № 4. – С. 60-64.
31. Топчий, Н.В. Бактериофаги в лечении острых кишечных инфекций / Н.В. Топчий, А.С. Топорков // Медицинский совет. – 2015. – №8. – С. 74-81.
32. Устойчивость к противомикробным препаратам // ВОЗ : [сайт]. – 2020. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (Дата обращения: 11.02.2021).
33. Шек, Е.А. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp.* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон 2015-2016» / Е.А. Шек, М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, Э.Р. Шайдуллина, А.Ю. Кузьменков, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов, Н.В. Семенова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21, №. 2. – С. 178-187.
34. Эйдельштейн, М.В. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон 2015-2016» / М.В. Эйдельштейн, Е.А. Шек, М.В. Сухорукова, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, Э.Р. Шайдуллина, А.В. Микотина, А.Ю. Кузьменков, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 168-178.
35. 2019 Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline / World Health Organization : [документ]. –

2019. – URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330420/9789240000193-eng.pdf> (дата обращения: 14.02.2021).

36. Abaev, I. Staphylococcal phage 2638A endolysin is lytic for *Staphylococcus aureus* and harbors an inter-lytic-domain secondary translational start site / J. Foster-Frey, O. Korobova, N. Shishkova, N. Kiseleva, P. Kopylov, S. Pryamchuk, M. Schmelcher, S.C. Becker, D.M. Donovan // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97 (8). – P. 3449-3456.

37. Aleshkin, A.V. Bacteriophages as probiotics: phage-based probiotic dietary supplement in prophylaxis against foodborne infections / A.V. Aleshkin, N.V. Volozhantsev, E.A. Svetoch, I.A. Kiseleva, E.O. Rubal'sky, S.S. Afanas'ev, A.I. Borzilov, A.M. Zatevalov, D.A. Vasil'ev, S.N. Zolotukhin // *Infectious Diseases.* – 2016. – Vol. 14(2). – P. 31-40.

38. Antonova, N.P. Physical and chemical properties of recombinant KPP10 phage lysins and their antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* / N.P. Antonova, V.Y. Balabanyan, A.P. Tkachuk, V.V. Makarov, V.A. Gushchin // *Bulletin of Russian State Medical University.* – 2018. – № 1. – P. 21-27.

39. Antonova, N.P. Broad bactericidal activity of the *Myoviridae* bacteriophage lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against Gram-negative ESKAPE pathogens / N.P. Antonova, D.V. Vasina, A.M. Lendel, E.V. Usachev, V.V. Makarov, A.L. Gintsburg, A.P. Tkachuk, V.A. Gushchin // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11, № 3. – P. 284.

40. Ashraf, S. Snapshot of phase transition in thermoresponsive hydrogel PNIPAM: Role in drug delivery and tissue engineering / S. Asharf, H.K. Park, H. Park, S.H. Lee // *Macromolecular Research.* – 2016. – Vol. 24. – P. 297–304.

41. Bastos, M.D. Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications / M.D. Bastos, B.G. Coutinho, M.L. Coelho // *Pharmaceuticals.* – 2010. – Vol. 3(4). – P. 1139–1161.

42. Briers, Y. Engineered endolysin-based "Artilyns" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens / Y. Briers, M. Walmagh, V.V. Puyenbroeck, A. Cornelissen, W. Cenens, A. Aertsen, H. Oliveira, J. Azeredo, G. Verween, J.P. Pirnay // *mBio.* – 2014. – Vol. 5(4). – P. e01379-14.

43. Burillo, A. Risk stratification for multidrug-resistant Gram-negative infections in ICU patients / A. Burillo, P. Muñoz, E. Bouza // *Current Opinion in Infectious Diseases*. – 2019. – Vol. 32(6). – P. 626–637.
44. Bustamante, N. Thermal stability of Cpl-7 endolysin from the *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-7; cell wall-targeting of its CW_7 motifs / N. Bustamante, P. Rico-Lastres, E. García, P. García, M. Menéndez. // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(10). – P. e46654.
45. Cavaco, M. The Use of Antibody-Antibiotic Conjugates to Fight Bacterial Infections / M. Cavaco, M.A.R.B. Castanho, V. Neves // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 835677.
46. Cha, Y. Characterization and Genome Analysis of *Staphylococcus aureus* Podovirus CSA13 and Its Anti-Biofilm Capacity / Y. Cha, J. Chun, B. Son, S. Ryu // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11(1). – P. 54.
47. Cha, Y. Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13 / Y. Cha, B. Son, S. Ryu // *Food Microbiology*. – 2019. – Vol. 84. – P. 103245.
48. Cheng, M. An Ointment Consisting of the Phage Lysin LysGH15 and Apigenin for Decolonization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Skin Wounds / M. Cheng, L. Zhang, H. Zhang, X. Li, Y. Wang, F. Xia, B. Wang, R. Cai, Z. Guo, Y. Zhang // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10(5). – P. 244.
49. Chopra, S. Potential of combination therapy of endolysin MR-10 and minocycline in treating MRSA induced systemic and localized burn wound infections in mice / S. Chopra, K. Harjai, S. Chhibber // *International journal of medical microbiology*. – 2016. – Vol. 306(8). – P. 707-716.
50. De Maesschalck, V. Advanced engineering of third-generation lysins and formulation strategies for clinical applications / V. De Maesschalck, D. Gutiérrez, J. Paeshuyse, R. Lavigne, Y. Briers // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2020. – Vol. 46(5). – P. 548-564.
51. Díez-Martínez, R. A novel chimeric phage lysin with high in vitro and in vivo bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* / R. Díez-Martínez, H.D. De

Paz, E. García-Fernández, N. Bustamante, C.W. Euler, V.A. Fischetti, M. Menendez, P. García // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2015. – Vol. 70(6). – P. 1763–1773.

52. Díez-Martínez, R. Improving the lethal effect of cpl-7, a pneumococcal phage lysozyme with broad bactericidal activity, by inverting the net charge of its cell wall-binding module / R. Díez-Martínez, H.D. de Paz, N. Bustamante, E. García, M. Menéndez, P. García // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – Vol. 57(11). – P. 5355–5365.

53. Doehn, J.M. Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia / J.M. Doehn, K. Fischer, K. Reppe, B. Gutbier, T. Tschernig, A.C. Hocke, V.A. Fischetti, J. Löffler, N. Suttorp, S. Hippenstiel // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 68(9). – P. 2111–2117.

54. Domenech, M. Combination of Antibodies and Antibiotics as a Promising Strategy Against Multidrug-Resistant Pathogens of the Respiratory Tract / M. Domenech, J. Sempere, S. de Miguel, J. Yuste // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2700.

55. Entenza, J.M. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats / J.M. Entenza, J.M. Loeffler, D. Grandgirard, V.A. Fischetti, P. Moreillon // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49(11). – P. 4789–4792.

56. Fenton, M. Bacteriophage-Derived Peptidase CHAP(K) Eliminates and Prevents Staphylococcal Biofilms / M. Fenton, R. Keary, O. McAuliffe, R.P. Ross, J. O'Mahony, A. Coffey // *International journal of microbiology*. – 2013. – P. 625341.

57. Fernández-Ruiz, I. Thousands of novel endolysins discovered in uncultured phage genomes / I. Fernández-Ruiz, F.H. Coutinho, F. Rodriguez-Valera // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1033.

58. Fraga, A.G. Antimicrobial activity of Mycobacteriophage D29 Lysin B during *Mycobacterium ulcerans* infection / A.G. Fraga, G. Trigo, R.K. Murthy, S. Akhtar, M. Hebbur, A.R. Pacheco, J. Dominguez, R. Silva-Gomes, C.M. Gonçalves, H. Oliveira // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. – 2019. – Vol. 13(8). – P. e0007113.

59. Garcia, P. Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages / P. Garcia, J.L. Garcia, E. Garcia, J.M. Sanchez-Puelles, R. Lopez // *Gene*. – 1990. – Vol. 86(1). – P. 81–88.
60. Geladari, A. Epidemiological surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacteria in a solid organ transplantation department / A. Geladari, T. Karampatakis, C. Antachopoulos, E. Iosifidis, O. Tsiatsiou, L. Politi, A. Karyoti, V. Papanikolaou, A. Tsakris, E. Roilides // *Transpl Infect Dis*. – 2017. – Vol. 19(3). – P. e12686.
61. Gervasi, T. Expression and delivery of an endolysin to combat *Clostridium perfringens* / T. Gervasi, N. Horn, U. Wegmann, G. Dugo, A. Narbad, M.J. Mayer // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2014. – Vol. 98(6). – P. 2495–2505.
62. Gilmer, D.B. The Phage Lysin PlySs2 Decolonizes *Streptococcus suis* from Murine Intranasal Mucosa / D.B. Gilmer, J.E. Schmitz, M. Thandar, C.W. Euler, V.A. Fischetti // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12(1). – P. e0169180.
63. Gondil, V.S. Comprehensive evaluation of chitosan nanoparticle based phage lysin delivery system; a novel approach to counter *S. pneumoniae* infections / V.S. Gondil, T. Dube, J.J. Panda, R.M. Yennamalli, K. Harjai, S. Chhibber // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 5. – P. 118850.
64. Gu, J. Structural and biochemical characterization reveals LysGH15 as an unprecedented "EF-hand-like" calcium-binding phage lysin / J. Gu, Y. Feng, X. Feng, C. Sun, L. Lei, W. Ding, F. Niu, L. Jiao, M. Yang, Y. Li // *PLoS Pathog*. – 2014. – Vol. 10(5). – P. e1004109.
65. Gu, J. LysGH15B, the SH3b domain of staphylococcal phage endolysin LysGH15, retains high affinity to staphylococci / J. Gu, R. Lu, X. Liu, W. Han, L. Lei, Y. Gao, H. Zhao, Y. Li, Y. Diao // *Current Microbiology*. – 2011. – Vol. 63(6). – P. 538–542.
66. Gutiérrez, D. Two Phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, Lyse Mono- and Dual-Species Staphylococcal Biofilms / D. Gutiérrez, D. Vandenheuvel, B. Martínez, A. Rodríguez, R. Lavigne, P. García // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2015. – Vol. 81(10). – P. 3336–3348.

67. Gutiérrez, D. Phage Lytic Protein LysRODI Prevents Staphylococcal Mastitis in Mice / D. Gutiérrez, V. Garrido, L. Fernández, S. Portilla, A. Rodríguez, M.J. Grilló, P. García // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 7.
68. Hathaway, H. (2017). Thermally triggered release of the bacteriophage endolysin CHAPK and the bacteriocin lysostaphin for the control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / H. Hathaway, J. Ajuebor, L. Stephens, A. Coffey, U. Potter, J.M. Sutton, A.T. Jenkins // *Journal of Controlled Release*. – 2017. – Vol. 245. – P. 108–115.
69. Hermoso, J.A. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics / J.A. Hermoso, J.L. Garcia, P. Garcia // *Current Opinion in Microbiology*. – 2007. – Vol. 10(5). – P. 461–472.
70. Jun, S.Y. Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1 / S.Y. Jun, G.M. Jung, S.J. Yoon, M.D. Oh, Y.J. Choi, W.J. Lee, J.C. Kong, J.G. Seol, S.H. Kang // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2013. – Vol. 41(2). – P. 156–161.
71. Jun, S.Y. (2011). Comparison of the antibacterial properties of phage endolysins SAL-1 and LysK / S.Y. Jun, G.M. Jung, J.S. Son, S.J. Yoon, Y.J. Choi, S.H. Kang // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2011. – Vol. 55(4). – P. 1764–1767.
72. Kaur, J. Exploring Endolysin-Loaded Alginate-Chitosan Nanoparticles as Future Remedy for Staphylococcal Infections / J. Kaur, A. Kour, J.J. Panda, K. Harjai, S. Chhibber // *AAPS PharmSciTech*. – 2020. – Vol. 21(6). – P. 233.
73. Khan, M.F. Antibacterial Properties of Medicinal Plants From Pakistan Against Multidrug-Resistant ESKAPE Pathogens / M.F. Khan, H. Tang, J.T. Lyles, R. Pineau, Z.U. Mashwani, C.L. Quave // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 815.
74. Kim, N.H. Effects of Phage Endolysin SAL200 Combined with Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Infection / N.H. Kim, W.B. Park, J.E. Cho, Y.J. Choi, S.J. Choi, S.Y. Jun, C.K. Kang, K.H. Song, P.G. Choe, J.H. Bang // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2018. – Vol. 62(10). – P. e00731-18.

75. Kim, S. Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* / S. Kim, D.W. Lee, J.S. Jin, J. Kim // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2020. – Vol. 22. – P. 32-39.
76. Kim, S. Characterization of a *Salmonella* Enteritidis bacteriophage showing broad lytic activity against Gram-negative enteric bacteria / S. Kim, S.H. Kim, M. Rahman, J. Kim // Journal of Microbiology. – 2018. – Vol. 56. – P. 917–925.
77. Kisil, O.V. Development of antimicrobial therapy methods to overcome antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* / O.V. Kisil, T.A. Efimenko, N.I. Gabrielyan, O.V. Efremenkova // Acta Naturae. – 2020. – Vol. 3(46). – P. 34–45.
78. Kovalskaya, N.Y. Antimicrobial activity of bacteriophage derived triple fusion protein against *Staphylococcus aureus* / N.Y. Kovalskaya, E.E. Herndon, J.A. Foster-Frey, D.M. Donovan, R.W. Hammond // AIMS Microbiology. – 2019. – Vol. 5(2). – P. 158-175.
79. La Fauci, V. Trend of MDR-microorganisms isolated from the biological samples of patients with HAI and from the surfaces around that patient / V. La Fauci, G.B. Costa, A. Arena, S.E. Ventura, C. Genovese, M.A. Palamara, R. Squeri // New Microbiology. – 2018. – Vol. 41(1). – P. 42–46.
80. Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections / World Health Organization [сайт]. – 2020. – URL: <https://www.who.int/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections> (дата обращения: 11.06.2021).
81. Lai, W.C.B. Bacteriophage-derived endolysins to target gram-negative bacteria / W.C.B. Lai, X. Chen, M.K.Y. Ho, J. Xia, S.S.Y. Leung // International Journal of Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 589. – P. 119833.
82. Landlinger, C. Engineered Phage Endolysin Eliminates *Gardnerella* Biofilm without Damaging Beneficial Bacteria in Bacterial Vaginosis Ex Vivo / C. Landlinger, L. Tisakova, V. Oberbauer, T. Schwebs, A. Muhammad, A. Latka, L. Van Simaey, M. Vanechoutte, A. Guschin, G. Resch // Pathogens. – 2021. – Vol. 10(1). – P. 54.

83. Lee, K.O. Structural Basis for Cell-Wall Recognition by Bacteriophage PBC5 Endolysin / K.O. Lee, M. Kong, I. Kim, J. Bai, S. Cha, B. Kim, K.S. Ryu, S. Ryu, J.Y. Suh // *Structure*. – 2019. – Vol. 27(9). – P. 1355-1365.
84. Lei, J. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications / J. Lei, L. Sun, S. Huang, C. Zhu, P. Li, J. He, V. Mackey, D.H. Coy, Q. He // *American Journal of Translational Research*. – 2019. – Vol. 11(7). – P. 3919-9391.
85. Letrado, P. Bactericidal synergism between antibiotics and phage endolysin Cpl-711 to kill multidrug-resistant pneumococcus / P. Letrado, B. Corsini, R. Díez-Martínez, N. Bustamante, J.E. Yuste, P. García // *Future Microbiology*. – 2018. – Vol. 13(11). – P. 1215-1223.
86. Lin, L. Isolation and characterization of an extremely long tail *Thermus* bacteriophage from Tengchong hot springs in China / L. Lin, W. Hong, X. Ji, J. Han, L. Huang, Y. Wei // *Basic Microbiology*. – 2010. – Vol. 50. – P. 452–456.
87. Loessner, M.J. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates / M.J. Loessner, K. Kramer, F. Ebel, S. Scherer // *Molecular Microbiology*. – 2002. – Vol. 44(2). – P. 335–349.
88. Loessner, M.J. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes / M.J. Loessner, G. Wendlinger, S. Scherer // *Molecular Microbiology*. – 1995. – Vol. 16(6). – P. 1231–1241.
89. Lopez, R. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage / R. Lopez, E. Garcia // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2004. – Vol. 28(5). – P. 553–580.
90. Rodríguez-Rubio, L. DUF3380 Domain from a *Salmonella* Phage Endolysin Shows Potent N-Acetylmuramidase Activity / L. Rodríguez-Rubio, H. Gerstmans, S. Thorpe, S. Mesnage, R. Lavigne, Y. Briers // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2016. – Vol. 82(16). – P. 4975-4981.

91. Ma, YX. Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections / Y.X. Ma, C.Y. Wang, Y.Y. Li, J. Li, Q.Q. Wan, J.H. Chen, F.R. Tay, L.N. Niu // *Advanced Science*. – 2019. – Vol. 7(1). – P. 1901872.
92. Maciejewska, B. Modular endolysin of *Burkholderia* AP3 phage has the largest lysozyme-like catalytic subunit discovered to date and no catalytic aspartate residue / B. Maciejewska, K. Żrubek, A. Espaillet, M. Wiśniewska, K.P. Rembacz, F. Cava, G. Dubin, Z. Drulis-Kawa // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 14501.
93. Nilebäck, L. Bioactive Silk Coatings Reduce the Adhesion of *Staphylococcus aureus* while Supporting Growth of Osteoblast-like Cells / L. Nilebäck, M. Widhe, J. Seijsing, H. Bysell, P.K. Sharma, M. Hedhammar // *ACS Appl Mater Interfaces*. – 2019. – Vol. 11(28). – P. 24999-25007.
94. Nordmann, P. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria / P. Nordmann, L. Poirel // *Clinical Infectious Diseases*. – 2019. – Vol. 69. – P. S521–S528.
95. O'Flaherty, S. The Recombinant Phage Lysin LysK Has a Broad Spectrum of Lytic Activity against Clinically Relevant Staphylococci, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* / S. O'Flaherty, A. Coffey, W. Meaney, G.F. Fitzgerald, R.P. Ross // *Journal of Bacteriology*. – 2005. – Vol. 187(20). – P. 7161–7164.
96. Oechslin, F. In vitro characterization of PlySK1249, a novel phage lysin, and assessment of its antibacterial activity in a mouse model of *Streptococcus agalactiae* bacteremia / F. Oechslin, J. Daraspe, M. Giddey, P. Moreillon, G. Resch // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 57(12). – P. 6276-6283.
97. Ohnuma, T. LysM domains from *Pteris ryukyuensis* chitinase-A: a stability study and characterization of the chitin-binding site / T. Ohnuma, S. Onaga, K. Murata, T. Taira, E. Katoh // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283(8). – P. 5178–5187.
98. Olsen, N.M.C. Synergistic removal of static and dynamic *Staphylococcus aureus* biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase / N.M.C. Olsen, E. Thiran, T. Hasler, T. Vanzielegem,

G.N. Belibasakis, J. Mahillon, M.J. Loessner, M. Schmelcher // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10(8). – P. E438.

99. Park, S. Characterisation of the antibacterial properties of the recombinant phage endolysins AP50-31 and LysB4 as potent bactericidal agents against *Bacillus anthracis* / S. Park, S.Y. Jun, C.H. Kim, G.M. Jung, J.S. Son, S.T. Jeong, S.J. Yoon, S.Y. Lee, S.H. Kang // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 18.

100. Park, Y. Structure of bacteriophage SPN1S endolysin reveals an unusual two-module fold for the peptidoglycan lytic and binding activity / Y. Park, J.A. Lim, M. Kong, S. Ryu, S. Rhee // *Molecular Microbiology*. – 2014. – Vol. 92(4). – P. 316-325.

101. Pastagia, M. Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives / M. Pastagia, R. Schuch, V.A. Fischetti, D.B. Huang // *Journal of Medical Microbiology*. – 2013. – Vol. 62. – P. 1506–1516.

102. Pennone, V. Inhibition of *L. monocytogenes* Biofilm Formation by the Amidase Domain of the Phage vB_LmoS_293 Endolysin / V. Pennone, M. Sanz-Gaitero, P. O'Connor, A. Coffey, K. Jordan, M.J. van Raaij, O. McAuliffe // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – P. 722.

103. Plotka, M. Biochemical Characterization and Validation of a Catalytic Site of a Highly Thermostable Ts2631 Endolysin from the *Thermus scotoductus* Phage vB_Tsc2631 / M. Plotka, A.K. Kaczorowska, A. Morzywolek, J. Makowska, L.P. Kozlowski, A. Thorisdottir, S. Skírnisdottir, S. Hjörleifsdottir, O.H. Fridjonsson, G.O. Hreggvidsson // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10(9). – P. e0137374.

104. Plotka, M. Ts2631 Endolysin from the Extremophilic *Thermus scotoductus* Bacteriophage vB_Tsc2631 as an Antimicrobial Agent against Gram-Negative Multidrug-Resistant Bacteria / M. Plotka, M. Kapusta, S. Dorawa, A.K. Kaczorowska, T. Kaczorowski // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – P. 657.

105. Popova, A.V. Characterization of myophage AM24 infecting *Acinetobacter baumannii* of the K9 capsular type / A.V. Popova, M.M. Shneider, V.P. Myakinina, V.A. Bannov, M.V. Edelstein, E.O. Rubalskii, A.V. Aleshkin, N.K. Fursova, N.V. Volozhantsev // *Archives of Virology*. – 2019. – Vol. 164. – P. 1493-1497.

106. Popova, A.V. Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii* / A.V. Popova, E.L. Zhilenkov, V.P. Myakinina, V.M. Krasilnikova, N.V. Volozhantsev // FEMS Microbiology Letters. – 2012. – Vol. 332(1). – P. 40-46.
107. Portilla, S. Encapsulation of the Antistaphylococcal Endolysin LysRODI in pH-Sensitive Liposomes / S. Portilla, L. Fernández, D. Gutiérrez, A. Rodríguez, P. García // Antibiotics. – 2020. – Vol. 9(5). – P. 242.
108. Pritchard, D.G. LambdaSa1 and lambdaSa2 prophage lysins of *Streptococcus agalactiae* / D.G. Pritchard, S. Dong, M.C. Kirk, R.T. Cartee, J.R. Baker // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73(22). – P. 7150–7154.
109. Pritchard, D.G. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30 / D.G. Pritchard // Microbiology. – 2004. – Vol. 150(7). – P. 2079–2087.
110. Proença, D. Phage endolysins with broad antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* clinical strains / D. Proença, S. Fernandes, C. Leandro, F.A. Silva, S. Santos, F. Lopes, R. Mato, P. Cavaco-Silva, M. Pimentel, C. São-José // Microbial Drug Resistance. – 2012. – Vol. 18(3). – P. 322-332.
111. Proença, D. EC300: a phage-based, bacteriolysin-like protein with enhanced antibacterial activity against *Enterococcus faecalis* / D. Proença, C. Leandro, M. Garcia, M. Pimentel, C. São-José // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2015. – Vol. 99. – P. 5137–5149.
112. Radoshevich, L. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis / L. Radoshevich, P. Cossart // Nature Reviews Microbiology. – 2018. – Vol. 16. – P. 32–46.
113. Ramasubbu, N. Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* / N. Ramasubbu, L.M. Thomas, C. Rangunath, J.B. Kaplan // Journal of Molecular Biology. – 2005. – Vol. 349(3). – P. 475-86.

114. Schmelcher, M. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials / M. Schmelcher, D.M. Donovan, M.J. Loessner // *Future Microbiology*. – 2012. – Vol. 7(10). – P. 1147–1171.
115. Schmelcher, M. Synergistic streptococcal phage λ SA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis / M. Schmelcher, A.M. Powell, M.J. Camp, C.S. Pohl, D.M. Donovan // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 99. – P. 8475–8486.
116. Schuch, R. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis* / R. Schuch, D. Nelson, V. Fischetti // *Nature*. – 2002. – Vol. 418. – P. 884–889.
117. Schuch, R. The PlyB Endolysin of Bacteriophage ν B_BanS_Bcp1 Exhibits Broad-Spectrum Bactericidal Activity against *Bacillus cereus* Sensu Lato Isolates / R. Schuch, A.J. Pelzek, D.C. Nelson, V.A. Fischetti // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2019. – Vol. 85(9). – P. e00003–19.
118. Seal, B.S. *Clostridium perfringens* bacteriophages Φ CP39O and Φ CP26F: genomic organization and proteomic analysis of the virions / B.S. Seal, D.E. Fouts, M. Simmons, J.K. Garrish, R.L. Kuntz, R. Woolsey, K.M. Schegg, A.M. Kropinski, H.W. Ackermann, G.R. Siragusa // *Archives of Virology*. – 2011. – Vol. 156(1). – P. 25–35.
119. Solanki, K. Enzyme-based listericidal nanocomposites / K. Solanki, N. Grover, P. Downs, E.E. Paskaleva, K.K. Mehta, L. Lee, L.S. Schadler, R.S. Kane, J.S. Dordick // *Scientific reports*. – 2013. – Vol. 3. – P. 1584.
120. Son, B. Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4 / B. Son, J. Yun, J.A. Lim, H. Shin, S. Heu, S. Ryu // *BMC Microbiology*. – 2012. – Vol. 12. – P. 33.
121. Sozhamannan, S. Molecular characterization of a variant of *Bacillus anthracis*-specific phage AP50 with improved bacteriolytic activity / S. Sozhamannan, M. McKinstry, S.M. Lentz, M. Jalasvuori, F. McAfee, A. Smith, J. Dabbs, H.W. Ackermann, J.K. Bamford, A. Mateczun // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – Vol. 74(21). – P. 6792-6796.
122. Swift, S.M. A Thermophilic Phage Endolysin Fusion to a *Clostridium perfringens*-Specific Cell Wall Binding Domain Creates an Anti-Clostridium

Antimicrobial with Improved Thermostability / S.M. Swift, B.S. Seal, J.K. Garrish, B.B. Oakley, K. Hiett, H.Y. Yeh, R. Woolsey, K.M. Schegg, J.E. Line, D.M. Donovan // *Viruses*. – 2015. – Vol. 7(6). – P. 3019-3034.

123. Swift, S.M. Characterization of LysBC17, a Lytic Endopeptidase from *Bacillus cereus* / S.M. Swift, I.V. Etobayeva, K.P. Reid, J.J. Waters, B.B. Oakley, D.M. Donovan, D.C. Nelson // *Antibiotics*. – 2019. – Vol. 8(3). – P. 155.

124. Tseng, WP. Risk for subsequent infection and mortality after hospitalization among patients with multidrug-resistant gram-negative bacteria colonization or infection / W.P. Tseng, Y.C. Chen, S.Y. Chen, S.Y. Chen, S.C. Chang // *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. – 2018. – Vol. 7. – P. 93.

125. Vadhana, P. Emergence of Herbal Antimicrobial Drug Resistance in Clinical Bacterial Isolates / P. Vadhana, B.R. Singh, M. Bharadwaj, S.V. Singh // *Pharmaceutica Analytica Acta*. – 2015. – Vol. 6(10). – P. 434.

126. Visweswaran, GR. Murein and pseudomurein cell wall binding domains of bacteria and archaea – a comparative view / G.R. Visweswaran, B.W. Dijkstra, J. Kok // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 92(5). – P. 921–928.

127. Walmagh, M. Characterization of Modular Bacteriophage Endolysins from Myoviridae Phages OBP, 201φ2-1 and PVP-SE1 / M. Walmagh, Y. Briers, S.B. dos Santos, J. Azeredo, R. Lavigne // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7(5). – P. e36991.

128. Wang, F. TSPphg Lysin from the Extremophilic *Thermus* Bacteriophage TSP4 as a Potential Antimicrobial Agent against Both Gram-Negative and Gram-Positive Pathogenic Bacteria / F. Wang, X. Ji, Q. Li, G. Zhang, J. Peng, J. Hai, Y. Zhang, B. Ci, H. Li, Y. Xiong // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12(2). – P. 192.

129. Ye, T. Characterization of a lysin from deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2 / T. Ye, X. Zhang // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – Vol. 78(4). – P. 635-641.

130. Yu, J.H. Characteristics and Lytic Activity of Phage-Derived Peptidoglycan Hydrolase, LysSAP8, as a Potent Alternative Biocontrol Agent for *Staphylococcus aureus* / J.H. Yu, J.A. Lim, H.J. Chang, J.H. Park // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – №29. – P. 1916-1924.

131. Zhou, B. Structural and functional insights into a novel two-component endolysin encoded by a single gene in *Enterococcus faecalis* phage / B. Zhou, X. Zhen, H. Zhou, F. Zhao, C. Fan, V. Perčulija, Y. Tong, Z. Mi, S. Ouyang // PLoS Pathogens. – 2020. – Vol. 16(3). – P. e1008394.

132. Zimmer, M. Genome and proteome of *Listeria monocytogenes* phage PSA: an unusual case for programmed + 1 translational frameshifting in structural protein synthesis / M. Zimmer, E. Sattelberger, R.B. Inman, R. Calendar, M.J. Loessner // Molecular Microbiology. – 2003. – Vol. 50(1). – P. 303–317.

133. Zurawski, D.V. Antibodies as an Antibacterial Approach Against Bacterial Pathogens / D.V. Zurawski, M.K. McLendon // Antibiotics (Basel). – 2020. – Vol. 9(4). – P. 155.

БЛАГОДАРНОСТИ

В заключение хочу выразить глубочайшую благодарность руководителям, рецензентам и коллегам за помощь в выполнении и оформлении работы:

Руководителям: к.ф.н. Ануровой М.Н.
к.б.н. Гущину В.А.

Рецензентам: д.м.н., профессору Борисовой О.Ю.
к.б.н. Сухиной М.А.

Коллегам: д.б.н., профессору, член-кор. РАН Алешкину А.В.
к.б.н. Киселевой И.А.
к.б.н. Ефимовой О.Г.
к.б.н. Лаишевцеву А.И.
к.б.н. Зулькарнееву Э.Р.
к.м.н. Новиковой Л.И.
к.б.н. Бочкаревой С.С.
к.б.н. Жиленковой О.Г.
к.б.н. Васиной Д.В.
к.ф.н. Антоновой Н.П.
к.б.н. Усачеву Е.В.
к.б.н. Ткачуку А.П.
Григорьеву И.В.
асп. Мехтиеву Э.Р.
асп. Багандовой К.М.
асп. Мизаевой Т.Э.
асп. Медведовской М.П.
асп. Каминскому В.В.