

«УТВЕРЖДАЮ»



Директор ФБУН МНИИЭМ
им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора
д.б.н. С.Ю. Комбарова

С.Ю. Комбарова

«28» *Сентября* 2022 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10).

Диссертация Воробьева Алексея Максимовича: «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизиннов для профилактики и лечения раневой инфекции» по специальностям: 1.5.6 – «Биотехнология» и 1.5.11 – «Микробиология» выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов.

В 2019 году Воробьев Алексей Максимович окончил Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) по специальности «Фармация».

С 01.09.2019 года и по настоящее время Воробьев Алексей Максимович обучается в аспирантуре Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по специальности 1.5.6 – биотехнология. С 2019 года и по настоящее время совмещает работу в должности младшего научного сотрудника лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Справка об обучении №431 от 24.06.2022 выдана Федеральным бюджетным учреждением науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научные руководители:

1. Анурова Мария Николаевна, кандидат фармацевтических наук (15.00.01 – технология лекарств и организация фармацевтического дела), доцент кафедры фармацевтической технологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);

2. Гушин Владимир Алексеевич, кандидат биологических наук (03.01.03 – молекулярная биология) заведующий лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Диссертационная работа Воробьева А.М. планировалась и выполнялась в рамках государственного задания Министерства Здравоохранения Российской Федерации «Создание лекарственных средств на основе эндוליзинов и исследование их специфического действия» (№ госрегистрации 0373100122119000013).

По результатам обсуждения диссертационной работы принято следующее **заключение**.

Диссертация Воробьева А.М. «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндוליзинов для профилактики и лечения раневой инфекции» является законченным научным исследованием, выполненном на должном и современном методическом уровне. В диссертации отражены важные данные о спектре противомикробной активности рекомбинантных эндוליзинов LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11 и их влиянии на представителей нормальной микрофлоры, показана перспективность их применения для борьбы с бактериальными инфекциями.

Разработана готовая лекарственная форма (ГЛФ) на основе трех рекомбинантных эндOLIзинов для местного применения в виде геля. Разработана методика контроля подлинности ГЛФ методом иммуноэлектрофореза. Разработана иммуноферментная тест-система для определения наличия в сыворотке крови антител класса G к эндOLIзинам, входящих в состав ГЛФ.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в непосредственном участии и выполнении всех этапов исследования: определении спектра бактерицидной активности рекомбинантных эндOLIзинов, разработке готовой лекарственной формы (ГЛФ), скрининге свойств экспериментальных образцов, разработке и валидации аналитических методик контроля качества, определении стабильности разработанной ГЛФ, разработке технологии изготовления ГЛФ, составлении нормативной документации и лабораторного регламента, испытаниях препарата на животных, статистической обработке результатов. Изучение влияния рекомбинантных эндOLIзинов 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 проводились совместно с сотрудниками лаборатории иммунобиологических препаратов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (рук. лаборатории, к.м.н. Новикова Л.И.). Изучение безопасности и эффективности разработанной ГЛФ на животных проводилось на базе Лаборатории диагностики и контроля антибиотикорезистентности возбудителей наиболее клинически значимых инфекционных болезней животных ВИЭВ РАН (зав. лабораторией, к.б.н. Лаишевцев А.И.).

О достоверности полученных результатов свидетельствует большой объем проведенных исследований (120 штаммов микроорганизмов, 5 рекомбинантных эндוליзинов, 21 экспериментальный состав ГЛФ), применение современных методов анализа и адекватная статистическая обработка.

Новизна исследования: впервые определен спектр противомикробной активности рекомбинантных эндוליзинов бактериофагов в отношении возбудителей инфекций: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter spp.* и *Salmonella enterica*. Показан более широкий спектр противомикробной активности изучаемых эндוליзинов LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11 по сравнению с бактериофагами, из которых они были получены.

Впервые разработан стабильный при хранении гель рекомбинантных эндOLIзинов. Осуществлен экспериментально-обоснованный выбор вспомогательных веществ для получения лекарственной формы, обладающей оптимальными технологическими характеристиками. Разработаны и валидированы методики анализа рекомбинантных эндOLIзинов в лекарственной форме.

В ходе проведенных исследований *in vivo* показана эффективность разработанной ГЛФ. Кроме того, впервые проведена оценка иммуногенности, острой, субхронической токсичности и местнораздражающего действия лекарственной формы рекомбинантных эндOLIзинов. Разработанная ГЛФ увеличила продолжительность жизни животных опытной группы более, чем на 50% по сравнению с контрольной. Показано отсутствие острой и субхронической токсичности, а также гуморального иммунного ответа на применение ГЛФ.

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых данных о спектре противомикробной активности рекомбинантных эндOLIзинов, что показывает их перспективность в качестве кандидатов для разработки препаратов для борьбы с бактериальными инфекциями, включая инфекции, вызванные полирезистентными возбудителями. Кроме того, получены данные о совместимости эндOLIзинов с компонентами лекарственной формы, их стабильности в составе ГЛФ и эффективности, что

обосновывает подходы к разработке и контролю качества препаратов рекомбинантных эндолизинов. Получены новые данные о влиянии эндолизинов на нормофлору.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанные в ходе исследования аналитическая методика и технология изготовления препарата позволяют унифицировать подход к контролю качества препаратов на основе эндолизинов и обеспечивают возможность последующего масштабирования и организации промышленного производства таких препаратов. Применение разработанного препарата позволит повысить эффективность борьбы с резистентными возбудителями и расширит спектр препаратов, применяемых для этой цели.

Результаты исследований и разработок Воробьева А.М. внедрены в работу предприятия АО «Биннофарм» (Москва) и Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (Москва).

Научные положения и выводы, сформулированные Воробьевым А.М., аргументированы, экспериментально подтверждены и логически вытекают из результатов проведенных исследований. По объему проведенных исследований, их новизне и научно-практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6 – Биотехнология и 1.5.11 – Микробиология.

Основные материалы диссертации в полном объеме отражены в 11 публикациях, из них в рецензируемых журналах – 4, в материалах конференций (тезисы) – 7.

Публикации.

1. **Воробьев А.М.** Определение спектра бактерицидной активности рекомбинантных эндолизинов бактериофагов ECD7, Am24, Ap22, Si3 и St11 / **А.М. Воробьев**, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин, В.А. Гуцин, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, И.А. Киселева, Е.О. Рубальский, Э.Р. Зулкарнеев, А.И. Лапшевцев, Э.Р. Мехтиев, В.В. Каминский, Е.О. Бахрушина, С.С. Бочкарева, А.В. Караулов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 170, №11. – С. 597-601.

2. **Воробьев А.М.** Эндолизины и перспективы их применения для лечения инфекций, вызванных полирезистентными бактериями / **А.М. Воробьев**, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин, И.А. Киселева, К.М. Багандова, Т.Э. Мизаева, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, В.А. Гуцин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24, № 10. – С. 13-22.

3. Vasina D.V. Discovering the Potentials of Four Phage Endolysins to Combat Gram-Negative Infections / D.V. Vasina, N.P. Antonova, I.V. Grigoriev, V.S. Yakimakha, A.M. Lendel, M.A. Nikiforova, A.A. Pochtovyi, T.A. Remizov, E.V. Usachev, N.V. Shevlyagina, V.G.

Zhukhovitsky, M.V. Fursov, V.D. Potapov, **A.M. Vorobev**, A.V. Aleshkin, A.I. Laishevtsev, V.V. Makarov, S.M. Yudin, A.P. Tkachuk, V.A. Gushchin // *Frontiers in microbiology*. – 2021. – Vol. 12, № FEB. – e748718.

4. Vasina D.V. Efficacy of the Endolysin-Based Antibacterial Gel for Treatment of Anaerobic Infection Caused by *Fusobacterium necrophorum* / D.V. Vasina, N.P. Antonova, **A.M. Vorobev**, A.I. Laishevtsev, A.V. Kapustin, E.R. Zulkarneev, S.S. Bochkareva, I.A. Kiseleva, M.N. Anurova, A.V. Aleshkin, A.P. Tkachuk, V.A. Gushchin // *Antibiotics*. – 2021. – Vol. 10, № 10. – e1260.

5. **Воробьев А.М.** Перспективы применения рекомбинантных белков бактериофагов для терапии инфекций, вызванных полирезистентными бактериями / **А.М. Воробьев**, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин, В.А. Гушин, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, А.И. Лаишевцев, И.А. Киселева, Э.Р. Зулкарнеев, Е.О. Рубальский, Э.Р. Мехтиев // *Материалы всероссийской научно-практической интернет-конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения»*. – 2020. – С. 188-192.

6. **Воробьев А.М.** Изучение стабильности геля модифицированного рекомбинантного эндолизина ранозаживляющего действия / **А.М. Воробьев**, А.В. Алешкин, М.Н. Анурова, Э.Р. Мехтиев, Л.И. Новикова, С.С. Бочкарева, К.М. Багандова, Т.Э. Мизаева // *Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора*. – 2020. – С. 317-318.

7. **Воробьев А.М.** Разработка состава и технологии геля с артилизином для терапии раневых инфекций / **А.М. Воробьев**, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин, В.А. Гушин, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, Э.Р. Мехтиев // *VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. OpenBio-2020*. – 2020. – С. 36-37.

8. **Воробьев А.М.** Разработка лекарственных форм на основе эндолизинов для терапии раневых инфекций / **А.М. Воробьев**, А.В. Алешкин, В.А. Гушин, М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, И.А. Киселева, Э.Р. Зулкарнеев, А.И. Лаишевцев, О.Г. Ефимова, Э.Р. Мехтиев, Е.О. Рубальский, Л.И. Новикова, С.С. Бочкарева, О.Г. Жиленкова, В.В. Каминский, Н.П. Антонова, Д.В. Васина, А.П. Ткачук // *Биотехнология: состояние и перспективы развития*. – 2020. – С. 21-23.

9. **Воробьев А.М.** Оценка эффективности новой лекарственной формы рекомбинантных ферментов бактериофагов / **А.М. Воробьев**, А.И. Лаишевцев, М.Н. Анурова, Э.Р. Зулкарнеев, А.В. Алешкин, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, В.А. Гушин //

Международная конференция «Эпидемиологическое благополучие». Сборник тезисов. – 2021. – С. 41-43.

10. **Воробьев А.М.** Разработка и оценка эффективности препаратов для местного применения на основе трех рекомбинантных эндолизингов бактериофагов / **А.М. Воробьев**, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин, А.И. Лаишевцев, Э.Р. Зилькарнеев, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, В.А. Гуцин // Всероссийская научно-практическая конференция «Иммунбиотех-2021. Разработка, производство и применение биологических лекарственных препаратов». Приуроченная к 125-летию научно-производственного объединения «Вирион». Сборник статей конференции. – 2021. – С. 118-120.

11. **Воробьев А.М.** Разработка лекарственной формы эндолизингов бактериофагов ECD7, Am24 и Ap22 для терапии раневых инфекций // **А.М. Воробьев**, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин, Е.О. Рубальский, Т.Э. Мизаева, К.М. Багандова, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, В.А. Гуцин // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2021. – С. 240-242.

Диссертация Воробьева Алексея Максимовича «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизингов для профилактики и лечения раневой инфекции» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6 – Биотехнология и 1.5.11 – Микробиология.

Заключение принято на заседании секции «Медицинская биотехнология» Ученого Совета Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Присутствовали на заседании всего 12 человек. В состав секции Ученого совета «Медицинская биотехнология» входит 18 человек, из них присутствовали 12 человек. Результаты голосования: «за» – 12 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол №2 от 28.06.2022 г.

Заместитель директора по медицинской биотехнологии
д.б.н., член-корр. РАН
Ученый секретарь ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора
к.м.н.



А.В. Алешкин

А.В. Сафронова