

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, директора по инновациям в биотехнологии Публичного Акционерного Общества «Артген биотех» (ПАО «Артген»), профессора кафедры биотехнологии Санкт-Петербургского Химико-Фармацевтического Университета Красильникова Игоря Викторовича на диссертационную работу Воробьева Алексея Максимовича «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов для профилактики и лечения раневой инфекции», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.6. – биотехнология, 1.5.11. – микробиология

Актуальность темы диссертационного исследования

Проблема антибиотикорезистентности становится все более острой. Нерациональное и неконтролируемое применение антибиотиков приводит к формированию штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), что ведет к возникновению инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), и представляет огромный риск для здоровья и благополучия населения. Одним из наиболее распространенных типов ИСМП являются инфекции, возникающие в хирургических отделениях, что связано с массовым применением в таких отделениях антибиотиков и дезинфицирующих средств, а также большим числом пациентов, что создает благоприятные условия для различных мутаций возбудителей, развития МЛУ и распространения возбудителя.

В связи с этим актуальной становится разработка новых противомикробных средств, отличных от традиционных антибиотиков и активных в отношении резистентных возбудителей. К одним из наиболее перспективных средств в данной области относятся бактериофаги, которые активно изучаются учеными со всего мира и препараты которых уже представлены на российском фармацевтическом рынке. Тем не менее, помимо очевидных преимуществ перед антибиотиками (активность в отношении резистентных возбудителей, низкая токсичность, отсутствие влияния на нормофлору и т.д.), применение бактериофагов обладает рядом ограничений, к которым можно отнести достаточно узкий спектр активности, иммуногенность, вследствие которой при повторном применении препаратов бактериофагов возникает иммунный ответ, а также трудоемкий процесс производства.

Рекомбинантные эндолизины бактериофагов, выбранные Воробьевым А.М. для разработки нового противомикробного средства, обладают всеми преимуществами бактериофагов и при этом показывают более широкий спектр противомикробной активности и низкую иммуногенность. Кроме того, технология получения рекомбинантных белков достаточно хорошо известна и отработана, что значительно упрощает и стандартизует процесс производства данных ферментов по сравнению с бактериофагами.

С учетом вышесказанного, диссертационная работа Воробьева А.М., направленная на разработку лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов для терапии и профилактики раневых инфекций, является актуальным направлением исследований.

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

В ходе выполнения диссертационного исследования Воробьевым А.М. получены новые данные о чувствительности 120 штаммов микроорганизмов к рекомбинантным эндолизинам бактериофагов ECD7, Si3, St11, Ap22 и Am24, на основе полученных данных выбраны кандидаты для включения в состав противомикробного препарата и обоснована перспективность применения эндолизинов для создания таких препаратов в целом.

Впервые определена совместимость данных эндолизинов с гидроксипропилметилцеллюлозой и гидроксиэтилцеллюлозой, и полиэтиленгликолями различных молекулярных масс, что позволило разработать состав и технология производства противомикробной композиции в форме геля для применения на раневой поверхности.

Впервые разработаны и валидированы в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи методики контроля качества готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность», изучена стабильность разработанной композиции, которая составила 6 месяцев хранения при температуре +2-8 °С. Составлен лабораторный регламент производства готовой лекарственной формы и проект нормативной документации.

В рамках изучения безопасности при применении *in vivo* доказано отсутствие острой, субхронической и хронической токсичности, иммуногенности, а также местнораздражающего действия. Профиль безопасности эндолизинов LysAm24, LysAp22 и LysECD7 изучен впервые.

Для проведения испытаний на животных впервые разработана иммуноферментная тест-система для определения наличия IgG-антител к рекомбинантным эндолизинам LysECD7, LysAm24 и LysAp22 в крови животных.

В эксперименте на инфекционной модели некробактериоза у кроликов впервые доказана эффективность применения разработанного геля на основе рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22, которая отражалась в значительном увеличении продолжительности жизни опытных животных, снижением температуры тела животных, а также в значительном замедлении развития абсцессов на месте введения возбудителя.

Научные положения, выводы и практические рекомендации рецензируемой работы, сформулированные соискателем, научно обоснованы и логически вытекают из результатов, полученных и обработанных с использованием современных микробиологических, иммунологических, физико-химических, биологических, биотехнологических и статистических методов исследований.

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

Достоверность результатов диссертационной работы Воробьева А.М. обоснована должным анализом научной литературы, большим объемом проведенных исследований, применением современных апробированных методов и адекватной статистической обработкой. Выводы, представленные автором, логически вытекают из полученных результатов и соответствуют положениям, выносимым на защиту.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Новые данные о противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов, полученные Воробьевым А.М. в ходе выполнения диссертационной работы, обосновывают перспективность применения рекомбинантных эндолизинов бактериофагов как противомикробных агентов.

Новые данные о совместимости рекомбинантных эндолизинов с различными вспомогательными веществами найдут применение при разработке новых препаратов на их основе.

Разработанные и валидированные аналитические методики контроля качества, а также алгоритм их разработки внесут вклад в стандартизацию подходов к контролю качества новых препаратов эндолизинов по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность».

Алгоритм разработки новой иммуноферментной тест-системы для определения наличия IgG-антител к рекомбинантным эндолизинам в сыворотке крови животных может быть использован в ходе разработки аналогичных тест-систем для применения в доклинических испытаниях новых препаратов рекомбинантных эндолизинов и других областях.

Лабораторный регламент и проект нормативной документации, составленные Воробьевым А.М. в ходе выполнения диссертационной работы, будут полезны при разработке технологии производства и организации контроля качества других препаратов рекомбинантных эндолизинов.

Разработанный бактерицидный гель на основе рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22 после прохождения установленных процедур испытаний и регистрации расширит спектр противомикробных препаратов, применяемых для терапии инфекций, вызванных резистентными возбудителями.

Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

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

По теме диссертации Воробьева А.М. опубликовано 13 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, 7 – в материалах конференций (тезисы), получено 2 патента на изобретение РФ.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа Воробьева Алексея Максимовича является законченной научно-квалификационной работой. Изложена на 193 страницах машинописного текста, иллюстрирована 58 рисунками и 46 таблицами. Состоит из введения, основной части, четырех глав собственных исследований, заключения о выполненных исследованиях, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, изложен список сокращений и условных обозначений, список литературы (133 источника, из которых 34 работы отечественных и 99 иностранных авторов). Структура и содержание диссертации в необходимом объеме представлены в автореферате, соответствуют ГОСТ 7.0.11-2011.

Введение посвящено обоснованию актуальности проблемы, выбранной для проведения исследований, описанию степени разработанности темы исследований, определены цель и задачи работы, изложены научная новизна и научно-практическая значимость. Описаны используемые микробиологические, иммунологические, биотехнологические, физико-химические и статистические методы, применяемые в работе. Сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обоснована достоверность, проведена апробация полученных результатов, обосновано личное участие автора на всех этапах исследования.

В **первой главе** проведен подробный анализ научной литературы, касающейся изучения строения эндолизинов, их механизмов действия, современного опыта разработки лекарственных форм на их основе, а также эффективности применения *in vitro* и *in vivo* как в виде индивидуальных веществ, так и в комбинациях с антибиотиками, другими эндолизинами и различными ферментами,

Во **второй главе** автор приводит результаты изучения спектра противомикробной активности 5 рекомбинантных эндолизинов на 120 штаммах грамотрицательных микроорганизмов. На основе полученных данных автор делает вывод о перспективности использования эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22 для дальнейшей разработки готовой лекарственной формы.

Третья глава описывает процесс разработки готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов. Изучено множество экспериментальных составов, выбраны вспомогательные вещества,

обеспечивающие стабильность действующих веществ. Отработана технология изготовления готовой лекарственной формы, составлен лабораторный регламент. Разработана аналитическая методика контроля качества по показателю «Подлинность» и предложена модификация существующей методики контроля по показателю «Специфическая активность», составлен проект нормативной документации.

Обоснован выбор упаковки готовой лекарственной формы в тубы алюминиевые или в преднаполненные шприцы. Доказана стабильность готовой лекарственной формы в двух типах упаковки в течение 6 месяцев при температуре +2-8 °С.

В четвертой главе представлены результаты изучения профиля безопасности разработанной готовой лекарственной формы и ее эффективности. В рамках изучения безопасности доказано отсутствие у разработанной композиции острой, субхронической и хронической токсичности, местнораздражающего действия, а также иммуногенности. В эксперименте *in vivo* на модели некробактериоза у лабораторных животных показана эффективность применения разработанной готовой лекарственной формы в полости абсцесса.

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

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

Соответствие специальности

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

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

1. Применяемые препараты рекомбинантных эндолизинов были получены в производственных условиях, в связи с чем возникает вопрос о более детальном описании их свойств и приведении паспортных данных, свидетельствующих о гомогенности, степени очистки и стабильности отдельных эндолизинов.

2. Диссертант приводит данные о стабильности и сроках хранения разработанной готовой лекарственной формы, содержащей рекомбинантные эндолизины в течение полугода. Однако, такой уникальный препарат, по моему мнению, следует исследовать далее, чтобы увеличить сроки хранения. Есть ли данные о продолжении работ, связанных со сроками хранения.

Отмеченные замечания и вопросы – не принципиальны, не оказывают влияния на результаты исследований и не снижают положительную оценку представленной диссертационной работы.

Заключение

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

Диссертационная работа по актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, практической значимости соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 №723, от 21.04.2016 №335, 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 26.05.2020 №751, от 20.03.2021 №426, от 11.09.2021 №1539, от 26.09.2022 №1690, от 26.01.2023 №101, от 18.03.2023 №415), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Воробьев Алексей Максимович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6. – биотехнология и 1.5.11. – микробиология.

Официальный оппонент:

Директор по инновациям в биотехнологии Публичного Акционерного Общества «Артген биотех» (ПАО «Артген») (119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, корп. 1; Телефон +7 925 776-58-21; e-mail: kiv06@mail.ru),

доктор биологических наук

20.09.2023

Красильников Игорь Викторович

Подпись И.В. Красильникова заверяю:

Директор по науке Публичного Акционерного Общества «Артген биотех» (ПАО «Артген») (119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, стр. 1; Телефон +7 (495) 646-80-76; e-mail: romdey@gmail.com),

кандидат медицинских наук,
доцент

Деев Роман Вадимович

