

«Утверждаю»
И.о. директора
ИХБФМ СО РАН
кандидат химических наук, доцент
Коваль Владимир Васильевич

«28» сентября 2023 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук о научно-практической ценности диссертационной работы Воробьева Алексея Максимовича на тему: «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 выполненной работы

В 21 веке зарегистрирован рост антибиотикорезистентности бактерий, что обусловлено деятельностью человека в медицине и сельском хозяйстве. Пандемия COVID-19 спровоцировала на первых этапах не всегда обоснованные назначения клиницистами антибиотиков, а также их хаотичное применение населением. Все это привело к ускоренному росту доли антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. Особую опасность для здравоохранения представляют бактерии из группы ESKAPE, среди которых зарегистрировано появление не только штаммов с множественной резистентностью, но и панрезистентных штаммов. Для разработки способов преодоления этой проблемы была создана «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года», в рамках которой поставлена задача разработки альтернативных препаратов для лечения инфекций, вызванных антибиотикорезистентными бактериями.

Особенно сложным является лечение пациентов с острыми инфекциями, и в первую очередь, с раневыми инфекциями и инфекциями,

связанными с оказанием медицинской помощи. В первом случае, как правило, происходит смена микробного пейзажа в инфицированной ране с преимущественно грамположительных бактерий на грамотрицательные бактерии и низшие грибы, что было подмечено еще в середине прошлого века. В сложных случаях в ране развивается целое микробное сообщество, что требует постоянного контроля этиологической структуры такого сообщества при лечении. При инфекциях, связанных с оказанием медицинской помощи, основной проблемой является присутствие патогенов с множественной или панрезистентностью. И главное, в обоих случаях требуется быстрый выбор стратегии лечения.

С осознанием проблемы роста резистентности бактерий к антибиотикам возросло количество исследований в области фаготерапии, ушедшей было на второй план после открытия антибиотиков. Наряду с использованием в качестве антибактериальных агентов бактериофагов рассматриваются и фаговые белки эндолизины. Эти белки обладают каталитической активностью, разрушающей пептидогликаны клеточной стенки бактерий, вызывая их гибель. Показано, что эндолизины эффективно могут быть использованы как антимикробные средства при инфекциях, вызванных как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями. Поскольку грамотрицательные бактерии покрыты наружной мембраной, то эндолизины необходимо применять в сочетании с агентами, обеспечивающими проницаемость клеточных мембран. Современным подходом к разработке белковых препаратов является использование рекомбинантных технологий.

В связи с вышесказанным, не вызывает сомнений актуальность диссертационной работы Воробьева Алексея Максимовича, посвященной разработке безопасной и эффективной лекарственной формы препарата на основе сочетания рекомбинантных эндолизинов для местного применения с направленностью на грамотрицательные микроорганизмы, возбудители раневой инфекции.

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

В диссертационной работе Воробьева А.М. впервые представлены данные о противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11 в отношении 120 штаммов грамотрицательных бактерий, включая *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* и *Campylobacter jejuni*. У трех из пяти тестируемых эндолизинов установлена более высокая активность: LysECD7 (70,83 %), LysAm24 (64,17 %) и LysAp22 (55,0 %), что предопределило их включение в состав кандидатов при разработке нового комплексного антимикробного средства.

Впервые разработан состав и технология изготовления геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами. В процессе разработки определена совместимость эндолизинов с компонентами лекарственной формы, подобрана концентрация действующих веществ (1,0 % и 1,5 %) и два оптимальных варианта упаковки (шприцы и алюминиевые тубы), в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации разработан проект нормативной документации на препарат, определены сроки хранения, составлен лабораторный регламент.

Разработана и предложена методика контроля подлинности готовой лекарственной формы препарата методом иммуноэлектрофореза с использованием поликлональной антисыворотки к смеси рекомбинантных эндолизинов, входящих в состав готовой лекарственной формы. Для подтверждения пригодности методики проведена ее валидация в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации.

Автором впервые предложена модификация метода определения специфической противомикробной активности готовой лекарственной формы препарата на основе рекомбинантных эндолизинов в части

используемых контролей, питательных сред и микроорганизмов, что повышает достоверность результатов и сокращает сроки производства.

На примере некробактериоза кроликов, обусловленного *F. necrophorum*, автором впервые представлены данные, характеризующие положительный эффект от использования геля на основе рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22 на течение инфекционного процесса у животных опытной группы в виде снижения температуры тела, уменьшения площади абсцесса и увеличения периода выживания относительно контрольной группы. В ходе эксперимента по оценке острой и субхронической токсичности, а также местно-раздражающего действия и иммуногенности впервые определен профиль безопасности готовой лекарственной формы разработанного препарата. Создана оригинальная иммуноферментная тест-система на наличие IgG-антител к LysECD7, LysAm24 и LysAp22.

Сформулированные автором положения, выводы и практические рекомендации имеют научное обоснование и подтверждены результатами экспериментальных исследований.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа выполнена в рамках государственного задания Министерства Здравоохранения Российской Федерации «Создание лекарственных средств на основе эндолизинов и исследование их специфического действия» (№ госрегистрации 0373100122119000013).

Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации

В работе Воробьева А.М. представлены результаты научно-практического исследования, обладающие несомненной практической значимостью.

Данные о противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов в отношении ряда актуальных для медицины грамотрицательных

микроорганизмов, представленные в диссертационной работе, свидетельствуют о возможности разработки новых противомикробных терапевтических препаратов, полученных на их основе.

Новые знания о совместимости рекомбинантных эндолизинов с различными вспомогательными веществами могут быть использованы для разработки последующих антимикробных средств на основе эндолизинов.

Методика контроля подлинности готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов путем иммуноэлектрофореза, разработанная в ходе выполнения диссертационного исследования, позволит обеспечить стандартизацию методов контроля качества препаратов.

Оригинальная иммуноферментная тест-система для определения IgG антител к эндолизинам в сыворотке крови животных будет в дальнейшем востребована в рамках доклинических испытаний новых лекарственных средств на основе эндолизинов.

Разработанные автором лабораторный регламент и проект нормативной документации по получению геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами в дальнейшем могут быть востребованы при масштабировании их промышленного производства.

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

Достоверность полученных результатов, обоснованность научных положений и выводов диссертационной работы определяется объёмом экспериментальных данных и использованием современных и адекватных методов исследования. Данные, полученные в ходе исследования доступны. Кроме того, результаты исследований неоднократно докладывались на различных конференциях и подвергались независимому рецензированию специалистами в данной области исследований при публикации. (иммунологических, биотехнологических и статистических).

Разработанная технология производства готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов внедрена в работу предприятия АО

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

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

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Разработанные в результате выполнения диссертационной работы Воробьева А.М. технология изготовления готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов и аналитические методики могут быть использованы фармацевтическими предприятиями для производства и контроля качества противомикробных препаратов на основе рекомбинантных эндолизинов.

Разработанная готовая лекарственная форма геля на основе рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22 после прохождения всех необходимых испытаний и регистрации в установленном законодательством Российской Федерации порядке, включая проведение дополнительных исследований по оценке эффективности в отношении актуальных микроорганизмов-возбудителей раневой инфекции, может быть рекомендована в качестве лекарственного средства при сочетанной антимикробной терапии.

Соответствие специальности

Тема диссертации, цели, задачи, основные положения и выводы, сформулированные автором, соответствуют специальностям 1.5.6. – биотехнология, 1.5.11. – микробиология.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертация изложена на 193 страницах машинописного текста, иллюстрирована 58 рисунками и 46 таблицами. Работа представлена следующими структурными элементами: введением, основной частью, состоящей из четырех глав собственных исследований, заключением, выводами, практическими рекомендациями, разделом о перспективах дальнейшей разработки темы, в рукописи имеется список сокращений с условными обозначениями и список литературы (133 источника, из которых 34 работы отечественных и 99 иностранных авторов).

Содержание работы в целом соответствует поставленной цели. Выводы соответствуют задачам исследования и полученным результатам.

Автореферат оформлен согласно требованиям и полностью отражает все необходимые разделы и принципиальные положения текста диссертации. Существенных замечаний к представленной диссертационной работе нет. Хочется лишь пожелать соискателю внимательнее относиться к написанию таксономических названий микроорганизмов.

В целом, диссертация производит очень благоприятное впечатление. Особенно хочется отметить несомненную практическую направленность представленной диссертационной работы, а также наличие рекомендаций по дальнейшему использованию полученных результатов.

Заключение

Диссертационная работа Воробьева Алексея Максимовича на тему «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизиннов для профилактики и лечения раневой инфекции», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6. – биотехнология, 1.5.11. – микробиология, выполненная под руководством кандидата фармацевтических наук, доцента Ануровой Марии Николаевны и кандидата биологических наук Гущина Владимира Алексеевича, является законченным научным исследованием, содержащим важные решения в области разработки технологии производства и состава новой лекарственной

формы на основе рекомбинантных эндолизинов с антимикробной направленностью на грамотрицательные микроорганизмы, актуальные возбудители раневой инфекции.

Диссертационная работа Воробьева Алексея Максимовича 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.

Отзыв заслушан и одобрен на заседании Ученого совета ИХБФМ СО РАН (протокол № 8 от « 8 » сентября 2023 года).

Отзыв составил:

Заведующая лабораторией молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (Российская Федерация, г. Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, д. 8, +7 (383) 363-51-57, tikunova@niboch.nsc.ru)

доктор биологических наук

Тикунова Нина Викторовна

Подпись Тикуновой Нины Викторовны заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (Российская Федерация, г. Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, д. 8, +7 (383) 363-51-55, secretary@niboch.nsc.ru)

кандидат биологических наук

Логашенко Евгения Борисовна