

Заключение комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01 при 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 по кандидатской диссертации Воробьева Алексея Максимовича на тему: «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов для профилактики и лечения раневой инфекции» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.6. – Биотехнология, 1.5.11. – Микробиология.

Научные руководители:

Анурова Мария Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент (15.00.01. – технология лекарств и организация фармацевтического дела), доцент кафедры фармацевтической технологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)),

Гущин Владимир Алексеевич – кандидат биологических наук (03.01.03 – Молекулярная биология), заведующий лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов 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).

Диссертационная работа Воробьева А.М. соответствует специальностям: 1.5.6. – Биотехнология (биологические науки), 1.5.11. – Микробиология (биологические науки).

Работа посвящена разработке готовой лекарственной формы рекомбинантных эндолизинов, определению спектра противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов, их совместимости с компонентами лекарственной формы, разработке технологии изготовления готовой лекарственной формы, лабораторного регламента, разработке проекта нормативной документации и аналитических методик контроля качества, определению стабильности готовой лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов, определению ее безопасности в части острой, субхронической токсичности и местнораздражающего действия, определению иммуногенности и определению эффективности разработанной готовой лекарственной формы на модели раневой инфекции.

В ходе диссертационного 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. 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 эндолизином LysECD7, LysAm24 и LysAp22 в крови животных методом косвенного (непрямого) иммуноферментного анализа.

Теоретическая значимость работы заключается в установлении более широкого спектра противомикробной активности изучаемых рекомбинантных эндолизинов по сравнению с бактериофагами, которые их синтезируют, и их активности в отношении антибиотикорезистентных микроорганизмов. Полученные данные дополняют теоретические знания о противомикробной активности эндолизинов и обосновывают перспективность использования рекомбинантных эндолизинов в качестве действующих веществ при разработке противомикробных препаратов.

Получены новые знания о совместимости рекомбинантных эндолизинов 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.

Практическая значимость работы заключается в том, что 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 эндолизином 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 эндолизином.

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.).

Диссертационная работа выполнена с использованием совокупности современных и апробированных методов исследований. Достоверность результатов обеспечена достаточным количеством фактических данных, адекватно сформулированными целями и задачами, корректно проведенным статистическим анализом результатов, обоснованными выводами, положениями, рекомендациями. Научные положения и выводы, сформулированные Воробьевым А.М., логически вытекают из результатов, полученных в ходе диссертационной работы.

По объему проведенных исследований, их новизне и практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.6. – Биотехнология, 1.5.11. – Микробиология.

Комиссия не установила в диссертации и автореферате фактов некорректного заимствования материалов без ссылок на первоисточники. Отчет о проверке на заимствования с помощью системы «Антиплагиат» на сайте www.antiplagiat.ru показал, что оригинальность текста составляет 84,94%, самоцитирование – 8,19%, цитирование 1,77%, заимствование – 5,1%.

Диссертация содержит достоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых изданиях и 7 в материалах конференций (тезисы), получено 2 патента на изобретение РФ.

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета 64.1.004.01.

В качестве **ведущей организации** предлагается утвердить Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН). Согласие ведущей организации имеется.

В качестве **официальных оппонентов** предлагаются:

- Красильников Игорь Викторович – доктор биологических наук (03.00.23 – биотехнология), директор по инновациям в биотехнологии Публичного Акционерного Общества «Артген» (ПАО «Артген»).
- Царев Виктор Николаевич – Заслуженный работник высшей школы РФ, доктор медицинских наук (03.00.07 - микробиология), профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России).

Согласия оппонентов имеются.

Заключение: комиссия Диссертационного совета 64.1.004.01. рекомендует диссертацию Воробьева Алексея Максимовича «Разработка лекарственной формы рекомбинантных эндוליзинов для профилактики и лечения раневой инфекции» по специальностям: 1.5.6 – биотехнология, 1.5.11 – микробиология к приему к защите.

Заключение подготовили члены комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01:

Председатель:

Руководитель отдела медицинской биотехнологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук, доцент



Е.А. Воропаева

Члены комиссии:

Главный научный сотрудник
лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии
бактериофагов
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук



В.М. Лахтин

Заместитель директора по клинической работе
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук, доцент



Т.А. Руженцова

Главный научный сотрудник
лаборатории биологии бифидобактерий
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук, профессор



Е.А. Шмелева