

Воробьев Алексей Максимович

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

1.5.6 – Биотехнология

1.5.11 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа 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

Научные руководители:

кандидат фармацевтических наук, доцент
кандидат биологических наук

Анурова Мария Николаевна
Гущин Владимир Алексеевич

Официальные оппоненты:

Пименов Николай Васильевич – доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», кафедра иммунологии и биотехнологии, заведующий

Сухина Марина Алексеевна – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел микробиологических и иммунологических исследований, руководитель

Ведущая организация: Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 года в __ часов на заседании 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 адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте 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 адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время проблема антибиотикорезистентности приобрела глобальные масштабы (Земко В.Ю. и др., 2018; Белобородов Б.В. и др., 2020; Габриэлян Н.И. и др., 2020). Широкое применение антибиотиков приводит к возникновению штаммов микроорганизмов, которые могут быть устойчивы не только к одному, но и к нескольким антибиотикам (множественная лекарственная устойчивость) (Романов А.В. и др., 2019; Сухорукова М.В. и др., 2019). В ответ на данную проблему в Российской Федерации была разработана «Стратегия контроля антимикробной терапии» (СКАТ) 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 (Lei J. et al, 2019), средства растительного происхождения (Vadhana P. et al., 2015; Khan M.F. et al., 2018), препараты антител (Domenech M. et al., 2018; Zurawski D.V. et al., 2020; Covaco M. et al., 2022) и т.д. Одним из наиболее активно развивающихся направлений является использование бактериофагов, благодаря их эффективности в отношении полирезистентных возбудителей (Топчий Н.В. и др., 2015; Зефирова Т.П. и др., 2019). Бактериофаги не токсичны для человека и обладают узким спектром активности и активны в отношении устойчивых к антибиотикам возбудителей (Айзенштадт А.А. и др., 2015; Алешкин А.В. и др., 2018; Попова А.К. и др., 2019). 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 (Бочкарева С.С. и др., 2017; Алешкин А.В. и др., 2018; Бочкарева С.С. и др., 2019).

Данных недостатков лишены ферменты бактериофагов – эндолизины (Schmelcher M. et al., 2012; Lai W.C.B. et al., 2020). Эндолизины синтезируются в конце литического цикла бактериофага и разрушают клеточную стенку бактерий (Schmelcher M. et al., 2012). Они активны в отношении полирезистентных возбудителей и обладают зачастую более широким спектром активности, нежели бактериофаги (Son B. et al., 2012; Park S. et al., 2018; Pennone V. et al, 2019). Кроме того, технология получения эндолизинов не предусматривает использования патогенных микроорганизмов, а также позволяет получать активные и стабильные препараты белков (Gervasi T. et al., 2014; Lai W.C.B. et al., 2020).

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 (Schmelcher M. et al., 2012), что вызывает их осмотический лизис (Pastagia M. et al., 2013).

Обнаружены отличия в структуре молекул данных белков (Loessner M.J. et al., 2002; Schmelcher M. et al., 2012). Эндолизины могут иметь одномерную глобулярную структуру (Schmelcher M. et al., 2012) 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 (Garcia P. et al., 1990; Loessner M.J. et al., 1995; Zimmer M. et al., 2003).

Показана меньшая специфичность действия эндолизинов по сравнению с бактериофагами (Park S. et al., 2018; Fraga A.G. et al., 2019), а также их активность в отношении резистентных штаммов, включая штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (Cheng M. et al., 2018; Plotka M. et al., 2019), что показывает их перспективность для включения в составы противомикробных препаратов.

Получен опыт применения эндолизинов в комбинациях друг с другом (Schelcher M. et al., 2015) и с антибиотиками (Letrado P. et al., 2018), который показал значительное повышение эффективности применения исследуемых смесей по сравнению с применением отдельных компонентов.

Существует пример использования эндолизина в комбинации с полисахарид-деполимеразой, что обеспечило более эффективное разрушение биопленки *S. aureus* (Olsen N.M.C. et al., 2018).

Предложены способы модификации рекомбинантных эндолизинов в целях повышения стабильности и эффективности применения. Модификации заключаются в сшивании ферментативно-активных доменов и доменов связывания с клеточной стенкой различных эндолизинов (Kovalskaya N.Y. et al., 2019; Landlinger C. et al., 2021) и сшивании молекул эндолизинов с липополисахарид-дестабилизирующими пептидами, что повышает их активность в отношении грамотрицательных бактерий (Briers Y. et al., 2014).

На этапе разработки находится несколько лекарственных форм рекомбинантных эндолизинов для инъекционного, местного и ингаляционного применения (Doehn J.M. et al., 2013; Jun S.Y. et al., 2013; Kaur J. et al., 2020; Portilla S. et al., 2020).

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 работы

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 эндолизинам LysECD7, LysAm24 и LysAp22 в крови животных методом косвенного (непрямого) иммуноферментного анализа.

Теоретическая и практическая значимость исследования

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 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.

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).

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

Материалы исследования

Рекомбинантные эндолизины. Исследование проводилось на 5 рекомбинантных эндолизинах: LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSt11 и LysSi3, выделенных из одноименных бактериофагов, которые были произведены лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России и представляли собой стерильные лиофилизаты в стеклянных флаконах объемом 5 мл.

Штаммы микроорганизмов. При изучении спектра противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов использовано 120 штаммов *S. enterica*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *Enterobacter spp.* и *C. jejuni*, полученных из национальных и рабочих коллекций различных медицинских и научных организаций. Для оценки специфической активности готовой лекарственной формы и действующих веществ, входящих в ее состав, использованы микроорганизмы *A. baumannii* TS 50-16 и *E. coli* ATCC 25922 из рабочих коллекций ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России и ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика соответственно. Для воспроизведения раневой инфекционной модели на лабораторных животных был использован контрольно-производственный штамм *Fusobacterium necrophorum* №89-5 (Всероссийская коллекция патогенных и вакцинных штаммов микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН). Для оценки действия рекомбинантных эндолизинов на представителей нормофлоры человека *in vitro* было использовано 11 штаммов *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. infantis*, *Lactobacillus helveticus* и *L. casei* (Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры человека и животных ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора).

Вспомогательные вещества. Для разработки состава готовой лекарственной формы на основе рекомбинантных эндолизинов изучали возможность применения следующих вспомогательных веществ: гидроксиэтилцеллюлозы марки Natrosol 250 ННХ (Ashland, США), гидроксипропилметилцеллюлозы марки Benecel K100M (Ashland, США), полиэтиленгликолей с молекулярными массами 400, 1500, 3000 и 6000 (Химмед, Россия) и 20 мМоль/л Трис-НСl буферный раствор рН 7,5, приготовленный согласно требованиям ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы» Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV).

Лабораторные животные. Изучение эффективности разработанной ГЛФ проводили на 13 кроликах породы «Советская шиншилла», массой 2 кг (питомник «Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). В опытах использованы самки. Изучение острой, субхронической токсичности и местнораздражающего действия проводили на аутбредных мышях линии CD-1 (48 самцов и 48 самок), массой 16-18 г.

Методы исследования

Изучение спектра противомикробной активности рекомбинантных эндолизинов проводилось по опубликованным ранее методикам путем 30-минутной экспозиции изучаемого эндолизина с изучаемым микроорганизмом в 96-луночном плоскодонном планшете при температуре $37 \pm 0,4^\circ\text{C}$ (Antonova N.P. et al, 2018; 2019).

Определение чувствительности представителей нормофлоры к рекомбинантным эндолизинам. Культивирование бифидобактерий и лактобацилл, определение титруемой кислотности и подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили в соответствии с ГОСТ 3624-92 «Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности», МУК 4.2.577-96 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы», МУК 4.2.999-00 «Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах» и ОФС.1.7.2.0008.15 «Определение концентрации микробных клеток» ГФ РФ XIV.

Определение технологических показателей качества экспериментальных образцов и ГЛФ. Стерильность определяли методом мембранной фильтрации согласно ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» ГФ РФ XIV. Вязкость определяли методом ротационной вискозиметрии в соответствии с ОФС.1.2.1.0015.15 «Вязкость» ГФ РФ XIV. Определение рН производилось потенциометрическим методом в соответствии с ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия» ГФ РФ XIV.

Подлинность геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами определяли методом иммуноэлектрофореза в соответствии с ОФС.1.8.2.0002.15 «Имуноэлектрофорез в агаровом геле» ГФ РФ XIV.

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.

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 определяли на биохимическом анализаторе «ChemWell+» (Awareness, США). Оценивали следующие показатели: Аминотрансферазы (АЛТ 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. Использовали венозную кровь, которую отбирали в стерильную пластмассовую пробирку, затем кровь центрифугировали 6 мин при 4000 об/мин. Полученная сыворотка переносилась во вторичные пробирки, которые затем загружали в анализатор.

Гематологические исследования цельной крови животных 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» №13-7-2/2137. Вскрытие трупов павших и вынужденно убитых животных осуществляли методом полной эвисцерации. Оценку полученных результатов проводили в соответствии с методологией, описанной Жаровым А.В. (Жаров А.В. и др., 2021).

Диагностика некробактериоза проводилась согласно методическим рекомендациям «Лабораторные методы диагностики некробактериоза сельскохозяйственных животных», 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.

Валидация аналитических методик контроля качества ГЛФ по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность» проводилась согласно требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV 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. Определение стабильности проводилось в течение 6 месяцев при температурных режимах +2°C и +8°C. Анализ образцов производился

перед закладкой на хранение, через 1, 3 и 6 месяцев хранения. Показатели качества определялись в соответствии со составленной спецификацией.

Статистические методы исследования. 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 эндолизинов 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 гидроксипропилцеллюлозы, 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 «Медицинская биотехнология» 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.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых изданиях, 7 тезисов – в материалах конференций.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертационной работы изложены на 193 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 46 таблицами и 58 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 133 источника, из них 99 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Изучение субстанций рекомбинантных эндолизинов

На первом этапе исследования проведен скрининг пяти рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11 по спектру их противомикробной активности в отношении 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* (Aleshkin A.V. et al., 2016), в то время как синтезируемый им эндолизин проявил бактерицидную активность в отношении всех исследуемых видов бактерий. Рекомбинантный эндолизин бактериофага Am24, активного в отношении *A. baumannii* (Pорова A.V. et al, 2019), проявлял бактерицидные свойства в отношении всех исследуемых видов бактерий, эндолизин бактериофага Ap22, который также активен в отношении штаммов *A. baumannii* (Pорова A.V. et al., 2012), элиминировал штаммы всех исследуемых видов бактерий, кроме *P. aeruginosa*, к рекомбинантному эндолизины бактериофага Si3 (активен в отношении *S. Infantis* (Алешкин А.В. и др., 2016)) были чувствительны все исследуемые виды, кроме *K. pneumoniae* и *Enterobacter spp.*, эндолизин бактериофага St11 (активен в отношении *S. Typhimurium* (Алешкин А.В. и др., 2016)) проявлял бактерицидные свойства в отношении всех исследуемых видов, кроме *P. aeruginosa*. В таблице 1 представлена доля чувствительных к исследуемым рекомбинантным эндолизинам штаммов микроорганизмов.

Таблица 1 – Доля чувствительных к рекомбинантным эндолизинам бактерий

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 таблицы 1, наиболее широким спектром противомикробной активности из исследуемых рекомбинантных эндолизинов обладал LysECD7, чувствительным к которому оказались 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 (Díez-Martínez R. et al., 2013; Briers Y. et al., 2014; Antonova N.P. et al., 2018; Park S. et al., 2018) 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.

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

Первым этапом в разработке ГЛФ был подбор оптимальной концентрации действующих веществ, в ходе которого была определена противомикробная активность растворов индивидуальных эндолизинов в диапазоне концентраций от 10 мкг/мл до 10 мг/мл, а также их комбинации (Таблица 2).

Таблица 2 – 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

Наиболее высокую противомикробную активность в отношении тест-штамма *A. baumannii* TS 50-16 показала смесь рекомбинантных эндолизинов с индивидуальными концентрациями 150 мкг/мл и 50 мкг/мл. При использовании смеси с более высокой концентрацией эндолизинов наблюдалось резкое падение противомикробной активности (48,55%).

Далее был проведен подбор вспомогательных веществ, обеспечивающих стабильность действующих веществ и необходимые физико-химические свойства ЛФ. 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 Venesol K100M (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. Был изготовлен и проанализирован 21 состав.

Стерилизация экспериментальных составов, содержащих Venesol K100M, приводила к расслоению геля и потере технологических свойств, что говорит о невозможности их использования для дальнейшей разработки, так как одним из наиболее значимых 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 были изучены значение pH и вязкость до и после стерилизации для выявления возможных изменений данных параметров в процессе автоклавирования.

После определения физико-химических свойств экспериментальных образцов были выбраны 2 состава, содержащих Natrosol 250 ННХ в концентрации 1% м/о, а также ПЭГ 1500 или 3000 в концентрации 1,5% м/о и 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 (Таблица 3).

Таблица 3 – Оценка совместимости АФС с гелевыми основами

Эндолизин	Активность в присутствии ВВ, %			
	Трис-НСl (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

Как видно из таблицы 3, наиболее высокое значение противомикробной 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. Дальнейшую разработку ГЛФ проводили с составом, содержащим Natrosol 250 ННХ и ПЭГ 1500 в концентрациях 1,0% и 1,5% соответственно с использованием в качестве растворителя 20 мМ Трис-НСl с pH = 7,5 и смеси рекомбинантных эндолизинов LysECD7, LysAm24 и LysAp22 с концентрацией каждого белка 150 мкг/мл в качестве действующих веществ. Такая комбинация 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 (Schmelcher M. et al., 2015; Schuch R. et al., 2019), изучавшими эффективность комбинированного применения эндолизинов.

Следующим шагом в разработке ГЛФ была стандартизация подхода к контролю качества, которая заключалась в разработке методики определения показателя «Подлинность», модификации методики определения 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 издания.

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 данной методики контроля проводилась по показателю «Специфичность» путем изучения смеси рекомбинантных эндолизинов, входящих в состав ГЛФ, трех лабораторных серий препарата, плацебо и LysSi3. Полученные результаты представлены на рисунке 1, линии преципитации отмечены красными стрелками, сыворотка иммунизированного кролика отмечена как «Антисыворотка +», сыворотка интактного кролика отмечена как «Антисыворотка –».

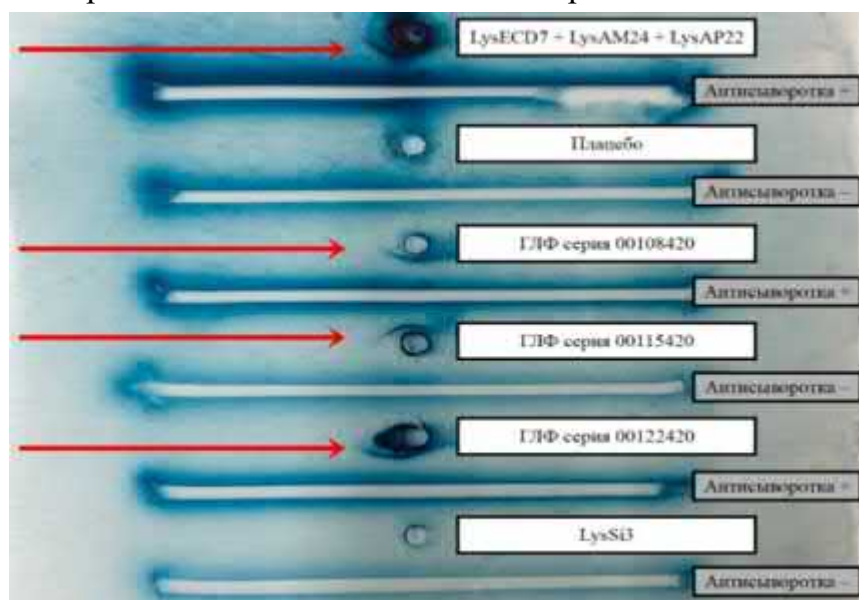


Рисунок 1 – Результаты анализа образцов методом иммуноэлектрофореза

Испытания показали специфичность методики и ее пригодность для контроля ГЛФ по показателю «Подлинность».

Контроль специфической активности ГЛФ проводили по опубликованной ранее методике (Antonova N.P. et al, 2018, 2019). Для обеспечения быстрого достижения тест-штаммами экспоненциальной фазы роста и корректного расчета специфической активности ГЛФ при культивировании микроорганизмов использовали мясо-пептонный бульон и агар Мюллера-Хинтона и в качестве отрицательного контроля использовали плацебо. Методика успешно прошла валидацию по показателям «Правильность (сходимость)» и «Внутрилабораторная прецизионность» 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 (Таблица 4).

Таблица 4 – Показатели качества, включенные в проект нормативной документации на гель бактерицидный с рекомбинантными эндолизинами

№ 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%
		<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
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	-

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 свойства действующих веществ (термолабильность), для обеспечения наиболее продолжительного срока годности разработанную ГЛФ необходимо хранить при температуре от +2 до +8 °С. При изучении стабильности согласно требованиям ГФ РФ XIV и правилам ЕАЭС был показан срок годности 6 месяцев при заданном температурном режиме.

Проведена отработка технологии изготовления геля бактерицидного с рекомбинантными эндолизинами, составление лабораторного регламента. Технологическая схема производства представлена на рисунке 2.

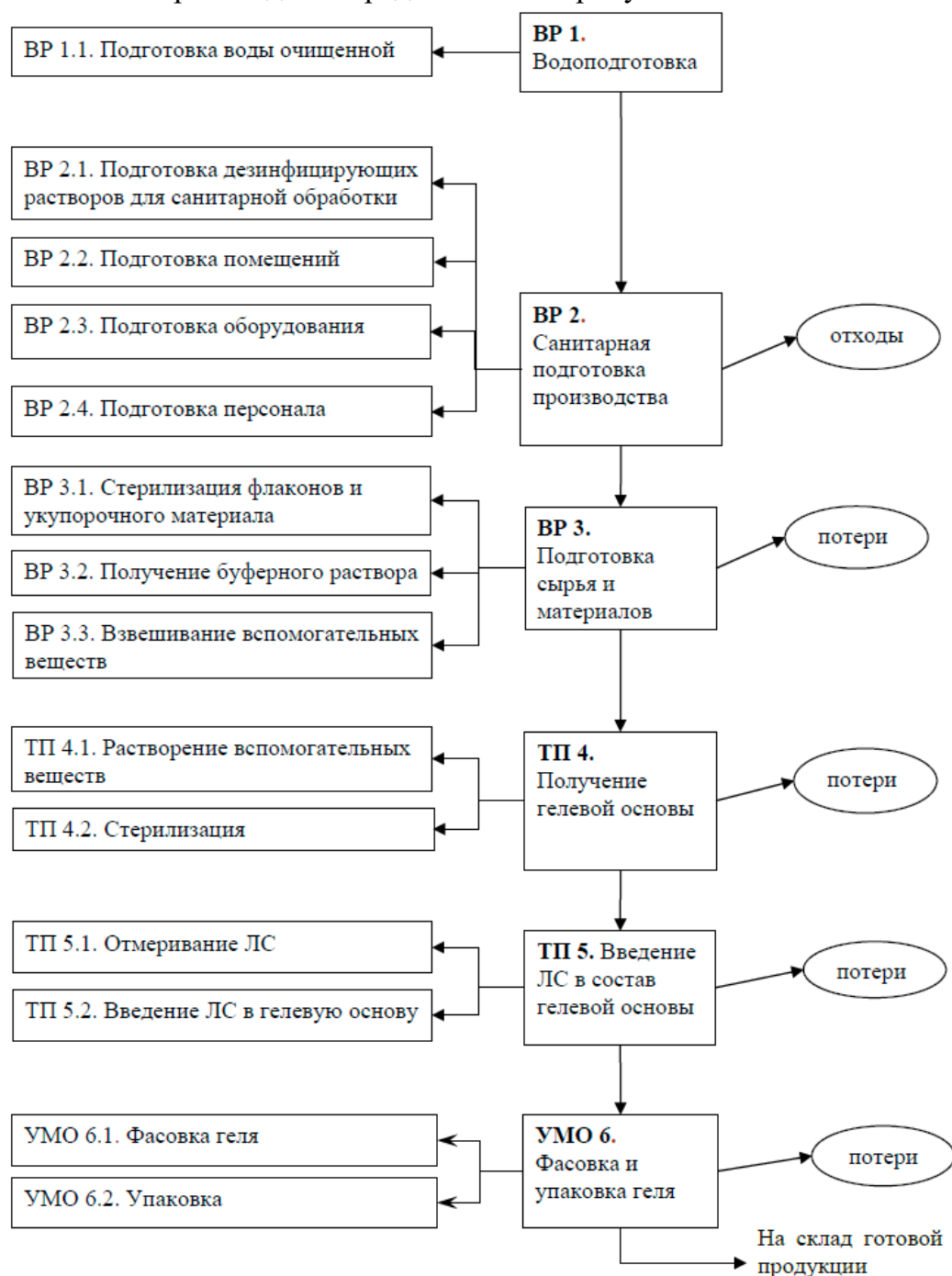


Рисунок 2 – Технологическая схема производства разработанной ГЛФ

После отработки технологии изготовления были наработаны лабораторные серии ГЛФ для ее изучения на лабораторных животных.

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

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 мышах 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* B379M 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 коагулазо-отрицательных 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 коагулазо-отрицательных 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*.

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 суток 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 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 (Таблица 5).

Таблица 5 – Выживаемость животных опытной и контрольной групп

№	Группа	Продолжительность жизни после инфицирования (включая день гибели), сут
№ 1	Плацебо	13,00
№ 2	Плацебо	13,00
№ 3	Плацебо	14,00
Средняя продолжительность жизни кроликов (плацебо)		13,33±0,58*
№ 4	Лечение	23,00
№ 5	Лечение	24,00
№ 6	Лечение	17,00
№ 7	Лечение	23,00
№ 8	Лечение	21,00
№ 9	Лечение	23,00
№ 10	Лечение	21,00
№ 11	Лечение	22,00
№ 12	Лечение	26,00
№ 13	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 таблицы 5, средняя продолжительность жизни кроликов, получавших плацебо, составила 13,33 суток, в то время как средняя продолжительность жизни в опытной группе составила 22,40 суток.

У животных опытной группы по сравнению с контрольной была достоверно ниже температура тела на 3-4 сутки 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 (Таблица 6).

Таблица 6 – Статистически обработанные данные по площади абсцессов у животных опытной и контрольной групп

Группа		Начало лечения	Через 9 суток после заражения	Через 12 суток 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

Как видно из таблицы 6, прирост площади к концу курса лечения 26,52% и 94,88% соответственно, что говорит о замедлении скорости развития инфекции при лечении разработанной ГЛФ.

Также отмечено 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.

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

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°C в контрольной группе и 39,7°C – 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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. Зулькарнеев, А.И. Лаишевцев, 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.** Перспективы применения рекомбинантных белков бактериофагов для терапии инфекций, вызванных полирезистентными бактериями / **А.М. Воробьев, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин, В.А. Гуцин, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, А.И. Лаишевцев, И.А. Киселева, Э.Р. Зулькарнеев, 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», 5-9 октября 2020 г., г. Пермь. – Пермь, 2020. – С. 188-192.

3. **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** // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», 21-22 октября 2020 г., г. Ростов-на-Дону. – Ростов-на-Дону, 2020. – С. 317-318.

4. **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. Гуцин, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, Э.Р. Мехтиев** // VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio-2020», 27-30 октября 2020 г., г. Новосибирск. – Новосибирск, 2020. – С. 36-37.

5. **Воробьев, А.М.** Разработка лекарственных форм на основе эндолизинов для терапии раневых инфекций / **А.М. Воробьев, А.В. Алешкин, В.А. Гуцин, М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, И.А. Киселева, Э.Р. Зулькарнеев, 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** // Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 28-30 октября 2020 г., г. Москва. – Москва, 2020. – С. 21-23.

6. **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.

7. 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.

8. 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.

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. Гуцин // Сборник тезисов Международной конференции «Эпидемиологическое благополучие», 20-21 апреля 2021 г., г. Москва. – Москва, 2021. – С. 41-43.

10. Воробьев, А.М. Разработка и оценка эффективности препаратов для местного применения на основе трех рекомбинантных эндолизинов бактериофагов / А.М. Воробьев, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин, А.И. Лаишевцев, Э.Р. Зулкарнеев, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, В.А. Гуцин // Сборник статей Всероссийской научно-практической конференции «Иммунбиотех-2021. Разработка, производство и применение биологических лекарственных препаратов», 13-14 октября 2021 г., г. Томск. – Томск, 2021. – С. 118-120.

11. Воробьев, А.М. Разработка лекарственной формы эндолизинов 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 // Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», 15-17 сентября 2021 г., г. Екатеринбург. – Екатеринбург, 2021. – С. 240-242.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФС	– активная фармацевтическая субстанция
ГЛФ	– готовая лекарственная форма
ЛФ	– лекарственная форма
ГФ	– Государственная фармакопея
РФ	– Российская Федерация
ОСТ	– отраслевой стандарт
RSD	– relative standard deviation (относительное стандартное отклонение)