

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА»

На правах рукописи

Антонова Наталия Петровна

**Получение, стандартизация и фармакологическое изучение
субстанции эндолизина LysECD7**

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент
Балабаньян Вадим Юрьевич

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Гущин Владимир Алексеевич

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Проблема устойчивости бактерий к антимикробным средствам	10
1.2. Поиск новых антибактериальных средств	11
1.2.1. Низкомолекулярные соединения.....	11
1.2.2. Бактериофаги.....	14
1.2.3. Эндолизины	16
1.3. Особенности использования эндолизинов для борьбы с грамотрицательными бактериями	21
1.3.1. Добавление пермеабилizующих веществ	22
1.3.2. Эндолизины с пермеабилizующей активностью	23
1.3.3. Модификация эндолизинов пермеабилizующими пептидами	25
1.4. Перспективы применения эндолизинов для лечения инфекционных заболеваний	26
1.4.1. Животные модели инфекционных заболеваний	26
1.4.2. Клинические исследования препаратов на основе эндолизинов	28
1.5. Получение фармацевтических субстанций эндолизинов и анализ их качества.....	29
1.5.1. Получение рекомбинантных эндолизинов	29
1.5.2. Стандартизация субстанций эндолизинов.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. Получение и стандартизация субстанции эндолизина LysECD7	38
2.1.1. Создание генно-инженерной конструкции, кодирующей последовательность LysECD7.....	38
2.1.2. Получение культур-продуцентов эндолизина LysECD7	39
2.1.3. Масштабирование получения культур-продуцентов эндолизина LysECD7.....	40
2.1.4. Разрушение клеточных биомасс.....	41
2.1.5. Очистка рекомбинантного эндолизина LysECD7 и получение субстанции.....	41

2.1.6. Оценка стабильности ФС эндолизина LysECD7	42
2.2. Оценка специфической активности эндолизина LysECD7 <i>in vitro</i>	42
2.2.1. Изучение антибактериальной активности LysECD7 в отношении планктонных клеток	42
2.2.2. Изучение антибактериальной активности LysECD7 в отношении бактериальных биопленок	43
2.2.3. Микроскопия	44
2.2.4. Изучение спектра действия LysECD7.....	45
2.2.5. Оценка цитотоксического действия.....	48
2.2.6. Оценка гемолитического действия	49
2.2.7. Оценка действия в отношении представителей нормальной микрофлоры	50
2.2.8. Оценка нейтрализующего эффекта специфических антител	50
2.3. Изучение механизма действия	52
2.3.1. Оценка пермебилизирующей активности.....	52
2.3.2. Оценка взаимодействия с ЛПС.....	53
2.3.3. Оценка взаимодействия с ПГ	53
2.4. Оценка антибактериальной активности эндолизина LysECD7 <i>in vivo</i>	54
2.4.1. Раневая модель клебсиеллезной инфекции	54
2.4.2. Ожоговая модель синегнойной инфекции.....	55
2.4.3. Модель имплант-ассоциированной инфекции.....	57
2.5. Статистическая обработка данных	59
ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	60
3.1. Получение субстанции эндолизина LysECD7 и ее стандартизация.....	60
3.1.1. Разработка подходов к получению субстанции эндолизина LysECD7	60
3.1.2. Разработка подходов к стандартизации субстанции эндолизина LysECD7	70
3.2. Изучение фармакологической активности субстанции LysECD7 <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	76
3.2.1. Изучение антибактериальной активности эндолизина LysECD7 <i>in vitro</i>	76
3.2.2. Изучение аспектов механизма действия эндолизина LysECD7.....	88

3.2.3. Изучение антибактериального действия эндолизина LysECD7 на животных моделях	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
ВЫВОДЫ	107
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	111
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (ТАБЛИЦЫ)	125
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (РИСУНКИ)	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Существенной проблемой здравоохранения является стремительное распространение штаммов бактерий, устойчивых к существующим антибактериальным средствам, включая наиболее эффективные антибактериальные препараты, а отдельные патогены приобрели коллекции генов, обуславливающие множественную устойчивость, образуя пан-резистентные штаммы (Aslam et al., 2018). Особую значимость придают инфекционным заболеваниям, вызванным патогенными грамотрицательными возбудителями, в связи с их способностью быстро приобретать различные механизмы резистентности. Лечение таких инфекций существующими антибактериальными препаратами все менее эффективно (Tascopelli et al., 2017). Все это свидетельствует о необходимости борьбы с данным явлением, в том числе с помощью разработки новых классов антибактериальных препаратов с принципиально новым механизмом действия.

Значительный интерес представляют литические ферменты бактериофагов, а именно эндолизины. Это ферменты, которые используются бактериофагами для лизиса пептидогликана клеточных стенок бактерий в ходе высвобождения новообразованного потомства вирионов (Pastagia et al., 2013). К преимуществам эндолизинов по сравнению с другим антимикробными агентами можно отнести быстроту их действия, низкую вероятность развития резистентности к препаратам на их основе (Grishin et al., 2020), действие на антибиотикоустойчивые штаммы и способность разрушать бактериальные биопленки, зачастую являющиеся защитой и одновременно резервуаром для обмена генами устойчивости (Rodríguez-Rubio et al., 2016).

Таким образом, изучение антибактериальных молекул эндолизинов, позволяющих в определенной мере преодолеть проблему возникновения и распространения антибиотикорезистентности, является весьма актуальной задачей.

Степень разработанности. К настоящему времени накоплено достаточно много данных относительно исследования активности эндолизинов, действующих в отношении грамположительных бактерий, в том числе резистентных к стандартной антибиотикотерапии, в частности штаммы золотистого стафилококка (Schmelcher et al., 2012). Проводятся как доклинические, так и клинические исследования эндолизинов для лечения инфекций, вызванных грамположительными возбудителями, при этом показана эффективность и безопасность их применения как при монотерапии, так и в комбинации с антибактериальными средствами (Oliveira et al., 2018).

В то же время эндолизины, активные в отношении грамотрицательных возбудителей, находятся на стадии испытаний антибактериальной активности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

В мире проводится около двух десятков подобных исследований, однако накопленных данных об эффективности и безопасности этого класса антибактериальных средств на данный момент недостаточно (Ghose et al., 2020).

Более того, в доступной литературе отсутствуют данные о получении и стандартизации субстанций эндолизинов, а также отсутствуют зарегистрированные лекарственные средства, содержащие в качестве действующего вещества субстанцию эндолизина.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы явилось получение, стандартизация и фармакологическое изучение субстанции эндолизина LysECD7.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Разработать технологию получения субстанции эндолизина LysECD7;
2. Разработать проект спецификации и методы контроля качества субстанции эндолизина LysECD7;
3. Исследовать антибактериальную активность эндолизина LysECD7 в отношении грамотрицательных бактерий в экспериментах *in vitro*;
4. Изучить антибактериальную активность эндолизина LysECD7 в отношении грамотрицательных бактерий на моделях экспериментальных инфекций;
5. Исследовать аспекты механизма антибактериального действия эндолизина LysECD7.

Научная новизна. Впервые разработана технология получения рекомбинантного эндолизина LysECD7, обладающего антибактериальной активностью.

Впервые разработаны подходы к стандартизации оригинальной субстанции эндолизина LysECD7.

Впервые показано, что LysECD7 *in vitro* проявляет активность в отношении широкого спектра грамотрицательных бактерий, а также разрушает бактериальные биопленки, образованные *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*. Спектр антибактериального действия LysECD7 включает в себя клинические изоляты *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* и *Campylobacter jejuni*, в том числе обладающие лекарственной устойчивостью к стандартной антибактериальной терапии.

Впервые изучена антибактериальная активность LysECD7 на экспериментальных моделях раневой и ожоговой инфекций, а также на имплантат-ассоциированной модели биопленкообразования, вызванных грамотрицательными бактериями. В ходе проведенных экспериментов было показано, что применение эндолизина значительно снижает бактериальную

обсемененность органов и зараженных поверхностей, способствует более быстрому ранозаживлению у животных и уменьшает воспаление тканей.

Установлено, что эндолизин LysECD7 обладает бактерицидным действием и вызывает лизис бактериальных клеток. При этом, по всей видимости, литическое действие обусловлено как пермебилизирующей активностью, так и разрушением пептидогликана клеточной стенки вследствие эндопептидазного действия эндолизина.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработана технология и проведена стандартизация оригинальной субстанции эндолизина LysECD7. Установлено, что субстанция эндолизина LysECD7 обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении местных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, в том числе резистентными штаммами. Выявлено, что субстанция активна в отношении бактериальных биопленок, образованных на поверхности имплантируемых материалов.

На основе предложенной субстанции могут быть разработаны готовые лекарственные средства с высокой антибактериальной активностью, в том числе в отношении резистентных штаммов грамотрицательных микроорганизмов.

Создан существенный научно-технический задел для инициации фармацевтической разработки и регуляторных доклинических исследований субстанции эндолизина LysECD7 и лекарственных средств на ее основе.

Методология и методы исследования. В ходе исследования использовали современные биотехнологические методы получения рекомбинантных белков в клетках-продуцентах *E. coli* и последующей очистки с помощью аффинной и эксклюзионной хроматографии. Применяли физико-химические и микробиологические методы для отработки методик стандартизации субстанции эндолизина. Антибактериальная активность субстанции оценивалась в микробиологических тестах *in vitro*, а также при моделировании инфекционных заболеваний в экспериментах *in vivo* на животных моделях. Механизм действия изучался с помощью физико-химических (электрофоретические, микроскопические, флуоресцентные) и микробиологических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Получена субстанция рекомбинантного эндолизина LysECD7 методом микробиологического синтеза с хроматографической очисткой.

2. Разработана оригинальная методика определения специфической активности субстанции эндолизина LysECD7 на тест-штамме чувствительных грамотрицательных бактерий. Разработан проект спецификации на субстанцию.

3. Субстанция эндолизина LysECD7 проявляет активность в отношении различных грамотрицательных бактерий, в том числе обладающих лекарственной устойчивостью к стандартной химиотерапии, а также разрушает бактериальные биопленки.

4. Показана антибактериальная активность субстанции эндолизина LysECD7 на моделях раневой и ожоговой инфекции при местном применении. На имплантат-ассоциированной модели биопленкообразования показано снижение плотности биопленок.

5. Установлено, что бактерицидный тип действия эндолизина LysECD7 обусловлен лизисом бактериальных клеток вследствие пермеабилizующей активности фермента и разрушения пептидогликана.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.04.02 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 2 «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств» и пункту 3 «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления», а также паспорту специальности 14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология, а именно пункту 1 «Поиск новых биологически активных фармакологических веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, генной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях патологических состояний» и пункту 3 «Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях а также на культурах клеток».

Личный вклад автора. Автором был проведен обзор актуальной литературы, составлен план исследований, при личном участии проведена основная часть экспериментальных работ, представленных в диссертации, проанализированы полученные результаты и подготовлены публикации. Изучение спектра действия исследуемого эндолизина *in vitro* проводилось в сотрудничестве с ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Постановка инфекционных животных моделей для исследований *in vivo* проводилась в сотрудничестве с ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора и ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обоснована использованием достаточного числа повторностей и контролей, использованием современных методов исследований, а также статистической обработкой данных.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 5 международных и российских конференциях: Student Conference Life Sciences in the 21st Century: Looking into the Future (Москва, 2018), XXV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2018" (Москва, 2018), 4-ая научно-практическая конференция с международным участием: «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Нижний Новгород, 2018), XXVIII Национальный конгресс по болезням органов дыхания (Москва, 2018), XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2019" (Москва, 2019).

Результаты работы были включены в лабораторный регламент на производство (получение) активных фармацевтических субстанций рекомбинантных эндолизинов LysAm24, LysAp22, LysSi3, LysSt11, LysECD7, методики контроля качества субстанций, а также в отчет о научно-исследовательской работе «Создание лекарственных средств на основе эндолизинов и исследование их специфического действия», полученные в ходе реализации Договора № 0373100122119000013 от «15» мая 2019 г. на выполнение научно-исследовательской работы.

Апробация диссертации была проведена на расширенном заседании кафедр фармакологии и фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела МГУ им. М.В. Ломоносова (протокол № 3 от 15.09.2020).

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus/Web of Science и 1 статья в издании, рекомендованном ВАК РФ, 4 тезисов в сборниках, 5 патентов РФ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 130 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 33 рисунками. Список использованной литературы включает 142 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Проблема устойчивости бактерий к антимикробным средствам

Стремительное увеличение количества штаммов бактерий, устойчивых к существующим антибактериальным средствам, является одной из наиболее серьезных проблем в медицине. Появление бактерий с множественной устойчивостью к различным классам антибиотиков, в том числе наиболее эффективным, относящимся к группе резерва, или недавно вышедшим на рынок, в настоящее время не является редкостью [1, 2]. Таким образом, терапия инфекционных заболеваний различной степени тяжести зачастую бывает значительно затруднена или даже невозможна.

Механизмы действия существующих антибактериальных веществ чрезвычайно разнообразны. К ним относятся нарушение целостности клеточных стенок или проницаемости мембран, ингибирование синтеза белка, РНК или ДНК, нарушение обмена важных бактериальных метаболитов, повреждение ДНК бактерий и другое. В то же время бактерии в ответ выработали множество механизмов защиты от негативных внешних воздействий, таких как образование бактериальных биопленок, модификация или деградация антибиотика различными ферментами, активный эффлюкс с помощью транспортеров, изменение молекул-мишеней антибиотика, выработка антагонистов или других механизмов, выстраивая с их помощью множество линий защиты [3, 4].

Распространение этих механизмов устойчивости происходит от бактерии к бактерии, причем не обязательно только внутри одного вида. Наряду с хромосомными мутациями, приводящими к повышенной устойчивости отдельно взятых бактерий и закрепляющимися внутри популяции с помощью естественного отбора, обуславливающими вертикальный перенос устойчивости, часто встречается горизонтальный перенос генов резистентности с помощью плазмид, фагов и других агентов переноса генов [5]. В ходе этих процессов под действием различных антибиотиков выживают и размножаются бактерии, имеющие преимущество в виде генов устойчивости. Таким образом, антибиотики выступают фактором селективного давления, повышая процент резистентных бактерий в популяциях.

Появление и распространение резистентных бактерий определяется тремя основными факторами: неправильное использование антибиотиков при терапии заболеваний как в больницах, так и среди населения, неконтролируемое применение антибиотиков в сельском хозяйстве, а также накопление генов резистентности в окружающей среде из-за деятельности

человека [2]. Эти факторы говорят об острой необходимости рационального использования антибиотиков и регулирования их оборота во избежание дальнейшего ухудшения ситуации.

Для борьбы с данным явлением Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) предложила глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам. Среди необходимых мер отмечают оптимизацию использования существующих антибактериальных средств в охране здоровья человека и животных, а также разработку новых лекарственных средств, инструментов диагностики и вакцин [6]. Также ВОЗ отмечает, что среди устойчивых бактерий наиболее опасными для здоровья человека являются 12 видов, которые чаще всего являются причиной летального исхода: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobacteriaceae, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, *Salmonellae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Shigella spp* [7]. Именно на эти виды патогенных бактерий рекомендуется обращать особое внимание при разработке новых антибактериальных препаратов, так как они особенно склонны к развитию устойчивости.

1.2. Поиск новых антибактериальных средств

1.2.1. Низкомолекулярные соединения

Несмотря на неоптимистичные прогнозы относительно слишком быстрого появления штаммов бактерий, устойчивых к новым препаратам, появляющимся на рынке, фармацевтические компании и научно-исследовательские лаборатории продолжают разработку новых молекул среди старых классов антибиотиков, а также поиск инновационных подходов к лекарственной терапии инфекционных заболеваний, вызванных бактериями в том числе с множественной лекарственной устойчивостью.

За последние 10 лет FDA (Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) одобрило к применению несколько новых антибиотиков (Таблица 1).

Таблица 1 – Основные антибиотики, разрешенные к применению FDA за последние 10 лет

Наименование	Год	Класс	Показание к применению	Спектр активности	Ссылка
Цефтаролина фосамил (Ceftaroline fosamil)	2010	Цефалоспорины V поколения	Острые бактериальные инфекции кожи и кожных структур (ОБИККС), внебольничная бактериальная пневмония	Широкий	[8]
Цефтобипрола медокардил (Ceftobiprole Medocartil)	2013	Цефалоспорины V поколения	ОБИККС	Широкий	[9, 10]
Цефтолозан+тазобактам (Ceftolozane+tazobactam)	2014	Цефалоспорины III поколения + Ингибиторы β -лактамаз	Инфекции брюшной полости, мочевыводящих путей, нозокомиальная пневмония	Широкий	[10–12]
Тедизолид (Tedizolid)	2014	Оксазолидиноны	ОБИККС	Узкий, г/+ бактерии	[13, 14]
Оритаванцин (Oritavancin)	2014	Липогликопептиды	ОБИККС	Узкий, г/+ бактерии	[14, 15]
Далбаванцин (Dalbavancin)	2014	Липогликопептиды	ОБИККС	Узкий, г/+ бактерии	[14, 15]
Цефтазидим+авибактам (Ceftazidime+avibactam)	2015	Цефалоспорины III поколения + Ингибиторы β -лактамаз	Инфекции мочевыводящих путей, бактериальная пневмония	Узкий, г/- бактерии	[10, 16]
Меропенем+ваборбактам (Meropenem+vaborbactam)	2017	Карбапенемы + Ингибиторы β -лактамаз	Инфекции мочевыводящих путей	Широкий	[14, 17]
Делафлоксацин (Delafloxacin)	2017	Фторхинолоны	ОБИККС	Широкий	[18]
Омадациклин (Omadacycline)	2018	Тетрациклины	ОБИККС, бактериальная пневмония	Широкий	[19]

Продолжение таблицы 1

Наименование	Год	Класс	Показание к применению	Спектр активности	Ссылка
Эравациклин (Eravacycline)	2018	Тетрациклины	Инфекции брюшной полости	Широкий	[20, 21]
Плазомицин (Plazomicin)	2018	Аминогликозиды	Инфекции мочевыводящих путей	Узкий, г/- бактерии	[22]
Рифамицин (Rifamycin)	2018	Ансамицины	Диарея путешественников	Широкий	[21, 23]
Лефамулин (Lefamulin)	2019	Плевромутилины	Внебольничная пневмония	Широкий	[24]
Цефидерокол (Cefiderocol)	2019	Цефалоспорины	Инфекции мочевыводящих путей	Узкий, г/- бактерии	[25]

В основном, все вышеуказанные антибиотики принадлежат к ранее известным классам антибактериальных средств или же представляют собой комбинации антибиотиков с ингибиторами β -лактамаз.

Однако, есть и инновационные молекулы, которые можно отнести к совершенно новым классам антибактериальных средств. Например, полусинтетический лефамулин (препарат «Ксенлета») ингибирует синтез бактериальных белков за счет взаимодействия с центром связывания пептидилтрансферазы на 50S субъединице рибосомы [24]. Есть множество других примеров. Многие перспективные низкомолекулярные вещества в данный момент проходят различные стадии доклинических и клинических исследований [10, 12, 14]. Большинство из них обладают широким спектром действия, включающим как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Среди веществ узкого спектра действия преобладают антибиотики, действующие только в отношении грамположительных патогенов, причем в большинстве случаев мишенью является золотистый стафилококк [14]. При этом очевидно, что препаратов, действующих специфически на грамотрицательные бактерии, критически мало, и, в

условиях растущей устойчивости данной группы микроорганизмов, разработка новых агентов, действующих именно на них, приобретает все большую актуальность.

1.2.2. Бактериофаги

Альтернативой классическим антибиотикам являются препараты на основе бактериофагов. Сама идея использования специфических вирусов бактерий в качестве лекарственных средств возникла еще в начале 20 века, таким образом, этот класс антибактериальных агентов был известен еще до открытия первого антибиотика [26]. Данный вид инфекционной терапии получил значительное развитие в Советских Республиках, на территории которых он и сейчас довольно активно используется в клинической практике [27].

В настоящее время бактериофаги вновь обратили на себя внимание в связи с возрастающим кризисом антибиотиков. Данный класс антибактериальных агентов действительно обладает рядом неоспоримых преимуществ, к которым относятся:

- Бактерицидный механизм действия;
- Дозирование в зависимости от степени заражения и возможность единоразового применения низких доз, связанные с репродукцией бактериофагов;
- Самоустранение после того, как бактерии-хозяева убиты;
- Узкая специфичность действия, из которой следует минимальное нарушение естественной микрофлоры;
- Безопасность и низкая токсичность, т.к. отсутствует влияние на клетки млекопитающих;
- Вероятность развития устойчивости ниже, чем у антибиотиков, что связано с очень узким спектром действия, а также способностью бактериофагов эволюционировать в направлении преодоления устойчивости;
- Действие на бактериальные биопленки;
- Совместимость с антибиотиками;
- Отсутствие влияния на окружающую среду;
- Возможность быстрого поиска новых бактериофагов и скорость разработки лекарственных средств на их;
- Низкая стоимость производства [28–30].

Несмотря на внушительный список плюсов бактериофагов, есть и значительные минусы, которые зачастую ограничивают масштабное применение данного класса в качестве антимикробных агентов:

- Подходят только литические бактериофаги с высокой вирулентностью, которые полностью охарактеризованы;
- Бактериофаги могут переносить гены бактериальных токсинов;
- Высокая иммуногенность, которая снижает эффективность повторного применения;
- Низкое, но возможное развитие к ним устойчивости;
- Узкий спектр действия ограничивает применение, необходимость точного определения патогена перед проведением терапии;
- Быстрый лизис, особенно в случае грамотрицательных бактерий, может привести к серьезным нежелательным явлениям, например, септическому шоку;
- Необходимость проводить культивирование на близких к патогену видах и штаммах, для которых отсутствуют эффективные стандартные протоколы культивирования и применяются высокие требования к безопасности в работе;
- Сложность выделения из бактериальных культур с требуемой степенью чистоты;
- Необходимость нормирования фармакокинетических характеристик;
- Нестабильность при хранении [28–30].

Вероятно, именно из-за внушительного списка недостатков в настоящее время FDA не одобрило к применению ни одного препарата на основе бактериофагов. Однако, в связи с историческими предпосылками, в России зарегистрировано несколько препаратов бактериофагов компании «Микроген» для применения внутрь или местно: бактериофаги стафилококковый, сальмонеллезный, синегнойной палочки, дизентерийный, клебсиелл вызывающих пневмонии, а также комбинированные и комплексные препараты на основе коктейлей бактериофагов [31]. Также существует множество примеров препаратов бактериофагов в Европе и других странах [1, 26], которые направлены на элиминацию как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий.

Изучение бактериофагов в качестве потенциальных антибактериальных агентов стремительно развивается и открывает новые возможности в создании эффективных антибактериальных средств. Многочисленные белки, кодируемые бактериофагами и используемые ими в ходе сложного жизненного цикла, могут разрушать пептидогликан, наружные мембраны, экзополисахариды бактериальных капсул, влиять на репликацию ДНК, транскрипцию, синтез белка или же деление клеток бактерий [26]. Таким образом, изучение механизмов воздействия бактериофагов на бактериальные клетки является источником идей в создании новых эффективных антибактериальных молекул.

1.2.3. Эндолизины

Эндолизины представляют собой специфические литические ферменты бактериофагов, которые способны расщеплять пептидогликан клеточных стенок бактерий [32, 33].

В ходе жизненного цикла бактериофаги экспрессируют данные ферменты в конце репликации для высвобождения нового потомства вирионов из клетки-хозяина [26]. Для того, чтобы эндолизины смогли провзаимодействовать с пептидогликаном изнутри клетки, фаги также продуцируют холины, способные формировать отверстия в цитоплазматической мембране (Рисунок 1). За счет своей ферментативной активности эндолизины расщепляют специфические связи пептидогликана, нарушая целостность клеточной стенки бактерии, которая не может выдержать внутреннее давление, разрушается за счет гипотонического лизиса, и происходит высвобождение фаговых частиц [32].

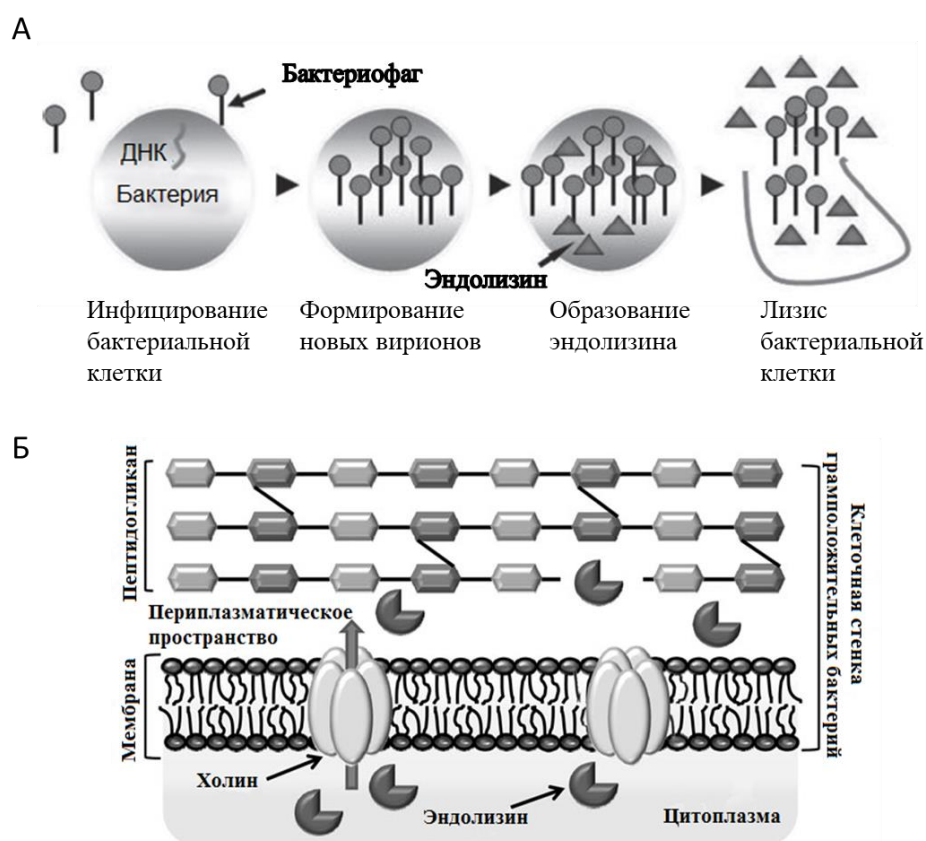


Рисунок 1 – Схематичное изображение действия эндолизин. А. Роль эндолизин в жизненном цикле бактериофагов. Б. Литическая активность эндолизин на примере клеточной стенки грамположительной бактерии. Адаптировано из [33]

Структура эндолизинов обычно различается в зависимости от того, действуют они на грамположительные или на грамотрицательные бактерии, что связано с различиями в строении клеточных стенок этих двух групп. В первом случае эндолизины имеют модульное строение, при этом функции ферментативной активности и распознавания субстрата выполняются отдельными функциональными доменами, разделенными пространственно: каталитическим и связывающим клеточную стенку (СКС) доменами [34, 35]. В то время как каталитический домен расщепляет различные связи в пептидогликане, СКС-домен направляет фермент к его субстрату и остается крепко с ним связанным даже после лизиса бактериальной клетки, что предотвращает нежелательное разрушение окружающих бактерий, которые еще не заражены фагом или в которых зреет фаговое потомство [34].

В то же время, наружная мембрана грамотрицательных бактерий ограничивает доступ эндолизинов снаружи клетки и предотвращает нежелательный лизис. В связи с этим, у большинства эндолизинов фагов, инфицирующих грамотрицательные бактерии присутствует только каталитический домен. Это может объяснить то, что большая часть эндолизинов этой группы (более 90%) представляет собой небольшие молекулы с однодоменной глобулярной структурой (Рисунок 2). Однако, также есть примеры эндолизинов с двухдоменной структурой, характерной для ферментов, расщепляющих грамположительные бактерии, или даже ферментов с двумя каталитическими доменами [36, 37].

Эндолизин, действующий на г/+ бактерии



Эндолизин, действующий на г/- бактерии



Рисунок 2 – Структуры эндолизинов, действующих на грамположительные (g/+) и грамотрицательные (g/-) бактерии. Адаптировано из [37]

Поскольку, пептидогликан бактерий представляет собой гетерополимерную молекулу с различными типами связей внутри цепей, его деградация под действием эндолизинов может происходить в различных направлениях. В настоящее время, в зависимости от специфических

связей в пептидогликане, которые расщепляют эндолизины, их разделяют на пять основных групп:

1. N-ацетилмурамидазы, которые также называют лизоцимы (лизоцим-подобные белки), гидролизуют гликозидные связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в гликановой цепи пептидогликана;
2. Литические трансгликозилазы также расщепляют гликозидные связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином, но другим способом;
3. N-ацетилглюкозаминидазы расщепляют гликозидные связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой;
4. N-ацетилмурамоил-L-аланин-амидазы гидролизуют амидные связи между гликаном L-аланином пептидного остова;
5. Эндопептидазы расщепляют пептидные связи между двумя аминокислотами в пептидной части пептидогликана (Рисунок 3) [34, 35, 38, 39].

Согласно номенклатуре ферментов Международного союза биохимии и молекулярной биологии мурамидазы и глюкозаминидазы также можно отнести к гликозидазам, а все эндолизины, кроме литических трансгликозилаз, являются гидролазами. Мурамидазы и трансгликозилазы расщепляют одну и ту же 1,4-гликозидную связь, однако используют различные механизмы при этом [34].

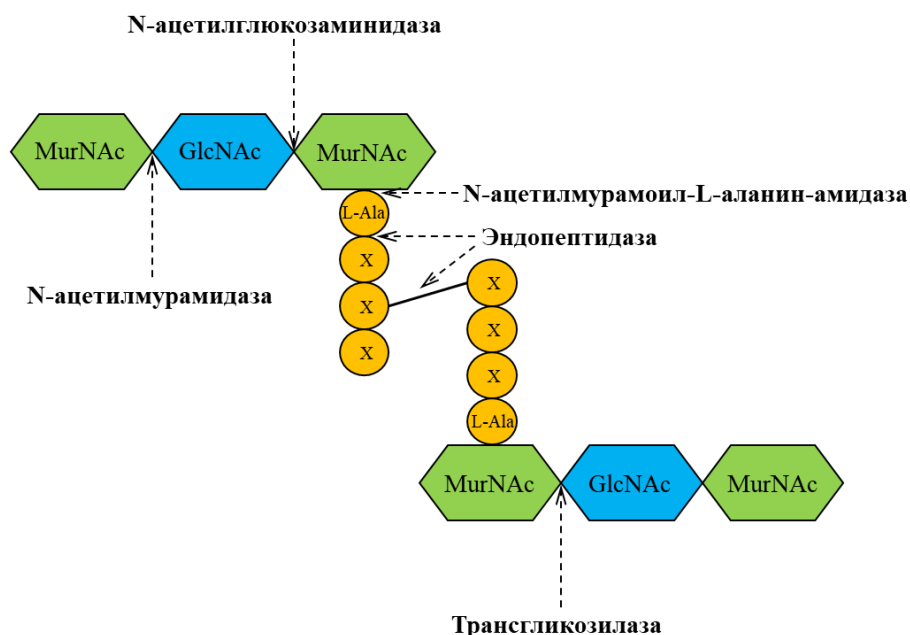


Рисунок 3 – Схематичное изображение пептидогликана и различных связей, расщепляемых эндолизинами. MurNAc - N-ацетилмурамовая кислота, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, X – аминокислоты, различающиеся у различных видов бактерий. Адаптировано из [38]

Таким образом, разнообразие каталитических активностей эндолизинов является одним из свойств, благодаря которому этот класс ферментов становится таким перспективным в плане разработки новых антибактериальных молекул. В совокупности с потенциалом рекомбинантных технологий и синтетической биологии, которые позволяют направленно изменять отдельные свойства эндолизинов различными путями (добавление, делеция или замена функциональных доменов, мутагенез, фьюжен с другими молекулами) возможно разрабатывать эффективные, стабильные и безопасные молекулы с желаемым спектром действия для применения в терапии инфекционных заболеваний (Рисунок 4) [40].



Рисунок 4 – Возможные стратегии инженерного подхода в создании эффективных, безопасных и стабильных молекул эндолизинов. Адаптировано из [40]

Эндолизины в качестве потенциальных антибактериальных средств обладают рядом преимуществ, которые выделяют их на фоне других антимикробных агентов:

- Низкая вероятность развития у микроорганизмов резистентности

На данный момент не было зафиксировано случаев возникновения устойчивых к эндолизинам штаммов при действии сублетальных доз ферментов как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии [41–44]. Считается, что эндолизины действуют на высококонсервативные, необходимые для жизнедеятельности бактерий специфические молекулы, в связи с чем возникновение устойчивых изолятов маловероятно, поскольку должно сопровождаться коренной перестройкой бактериальной клеточной стенки [34]. Более того, так как в качестве лекарства применяется готовый фермент генетические изменения также исключены.

- Безопасность

Множество доклинических исследований различных молекул эндолизинов показало отсутствие каких-либо токсических влияний на клетки млекопитающих при местном или системном применении [45]. Тем не менее, системное применение эндолизинов для лечения инфекционных заболеваний может привести к высвобождению компонентов бактериальных клеток, вызвать воспалительный ответ и повысить уровень цитокинов. Однако, существуют данные, что этот эффект не выше, чем при применении системных антибиотиков [46].

- Селективность действия

Характерное, в большинстве случаев, для эндолизинов, действующих в отношении грамположительных бактерий, воздействие на определенные виды или штаммы бактерий является одним из преимуществ, так как, в отличие от антибиотиков, это способствует сохранению нормальной микрофлоры организма [47].

- Действие на антибиотикоустойчивые штаммы бактерий

Способность действовать на бактерии даже с множественной лекарственной устойчивостью является одним из самых важных свойств эндолизинов. Это было показано как для клинически значимых грамположительных, так и для грамотрицательных бактерий из группы патогенов ESCAPE [48–51].

- Разрушение бактериальных биопленок

Одной из причин, благодаря которой бактерии развивают устойчивость к антибиотикам, является их способность образовывать бактериальные биопленки, внутри которых бактерии механически защищены, а также находятся в состоянии со сниженным метаболизмом [35]. Было показано, что эндолизины могут эффективно разрушать биопленки. И хотя точный механизм взаимодействия со сложными структурами биопленок еще не установлен, эффект эндолизинов был показан как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* [51–53].

Более того, возможно применение таких веществ не только для лечения инфекций человека, но и для дезинфекции или удаления биопленок на поверхностях имплантов или медицинских аппаратов, таких как ингаляторы или аппараты для искусственной вентиляции легких, так как они могут быть источниками внутрибольничных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью [33].

- Синергетическое действие, в том числе с антибиотиками

Применяя совместно эндолизины и антибиотики, возможно повысить эффективность противомикробной композиции, снизить терапевтические дозировки, расширить спектр чувствительных штаммов, а также снизить риски возникновения резистентности [45, 47, 54].

Таким образом, терапевтический потенциал и основные характеристики эндолизинов делают их одними из наилучших кандидатов для лечения опасных для жизни инфекций, вызванных, в том числе, бактериями с множественной лекарственной устойчивостью.

Несмотря на высокий потенциал применения препаратов на основе эндолизинов при лечении инфекционных заболеваний, вызванных грамотрицательными бактериями в настоящее время, наиболее изученными являются эндолизины, действующие на грамположительные бактерии [55]. Среди них наиболее обширную нишу занимают эндолизины, в чей спектр действия входит золотистый стафилококк, устойчивый к метициллину. Некоторые из них даже находятся в различных стадиях клинических исследований для лечения бактериемии, вызванной *Staphylococcus aureus* [56].

Однако, в последнее время были сделаны значительные успехи в изучении эндолизинов с активностью против грамотрицательных бактерий. Данная группа ферментов обладает своими особенностями структуры и функциональной активности и представляет особый интерес в разработках новых антибактериальных препаратов, обладающих клинической эффективностью и безопасностью.

1.3. Особенности использования эндолизинов для борьбы с грамотрицательными бактериями

Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий обуславливает особенности действия эндолизинов снаружи бактериальной клетки. Пептидогликан таких микроорганизмов, в отличие от грамположительных бактерий, довольно тонкий (1-3 слоя) [57]. Однако, основным труднопреодолимым барьером является наружная мембрана грамотрицательных бактерий, представляющая собой липидный бислой, покрытый отрицательно заряженными липополисахаридами (ЛПС) и стабилизированными катионами двухвалентных металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+}). Кроме того, ЛПС закорен на мембране с помощью липида А (Рисунок 5) [1].

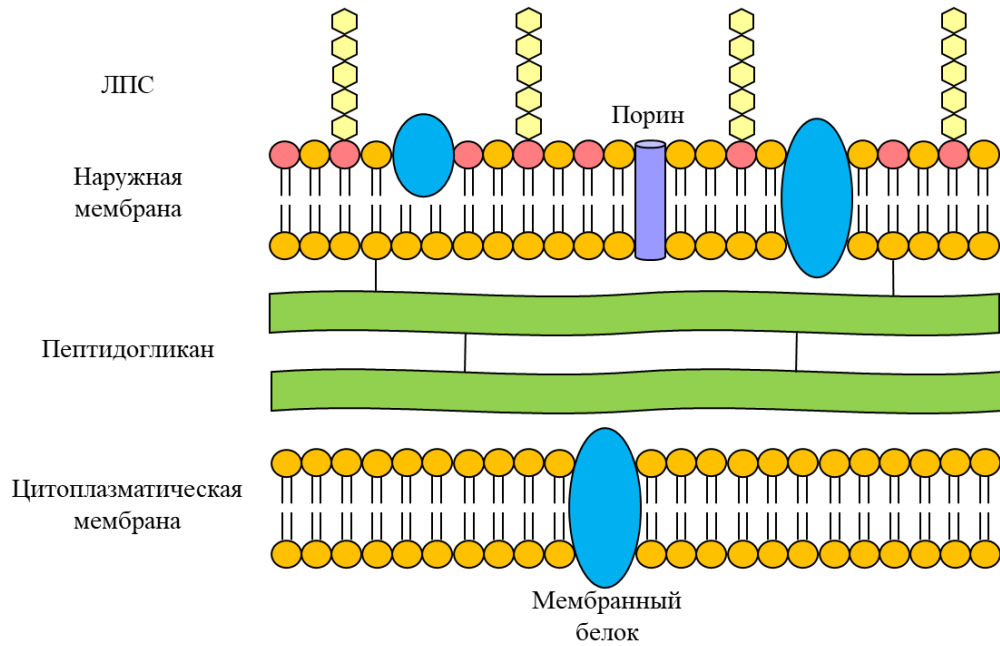


Рисунок 5 – Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий

Таким образом, наружная мембрана является непроницаемой как для гидрофильных, так и для гидрофобных молекул [58]. Тем не менее, существует несколько подходов для применения эндолизинов снаружи клетки, увеличивающих терапевтический потенциал данных молекул для борьбы с инфекциями, вызванными грамотрицательными патогенами.

1.3.1. Добавление пермебилизирующих веществ

Одним из подходов, который способствует действию эндолизинов снаружи клетки, является добавление различных химических веществ, увеличивающих проницаемость мембран. К таким веществам относятся поликатионные соединения, такие как полимиксины, аминогликозиды и полимеры лизина, а также хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и органические кислоты [59]. Их пермебилизирующая активность заключается в том, что они либо связывают дивалентные ионы металлов, стабилизирующие наружную мембрану, либо конкурентно вытесняют их из ЛПС, либо способствуют закислению среды, при этом мембрана становится более проницаемой.

Одним из примеров такого синергизма является совместное применение эндолизина EL188 и ЭДТА. Сам по себе эндолизин оказался не способен проникать через наружную мембрану бактерий синегнойной палочки, но в присутствии невысоких концентраций ЭДТА оказывал бактерицидное действие [60]. Аналогичные данные были получены для эндолизина

Lys68, проявляющего значительный антибактериальный эффект по отношению к широкому спектру штаммов в присутствии слабых органических кислот (лимонной и яблочной) [61], а также AVgr46, который начинает проявлять широкую видовую активность при добавлении тех же кислот [62].

Таким образом, можно создавать эффективные комбинации эндолизинов с пермеабилizаторами для достижения желаемой антибактериальной активности ферментов. Однако, препараты с высокой кислотностью или хелатирующие вещества, такие как ЭДТА, могут быть непригодны для лекарственных форм парентерального применения, в то время как лечение бактериемий является одним из наиболее актуальных направлений инфекционной терапии. В то же время, такие комбинации подходят для лечения раневых и ожоговых инфекций [1].

1.3.2. Эндолизины с пермеабилizующей активностью

Несмотря на то, что наружная мембрана грамотрицательных бактерий непроницаема для большинства молекул, кроме небольших, которые могут пройти через трансмембранные белки, существуют примеры эндолизинов, действие которых направлено против грамотрицательных бактерий, которые все же могут оказывать бактерицидный эффект [51, 63–65].

Было предположено, что способность эндолизинов к пермеабилizации наружной мембраны заключается в наличии положительно заряженной N- или C-концевой части молекулы. За счет положительного заряда молекула связывается с отрицательно заряженным ЛПС, вытесняя катионы двухвалентных металлов, происходит локальное разрушение мембраны, и эндолизин попадает к своей мишени – пептидогликану (Рисунок 6) [63].

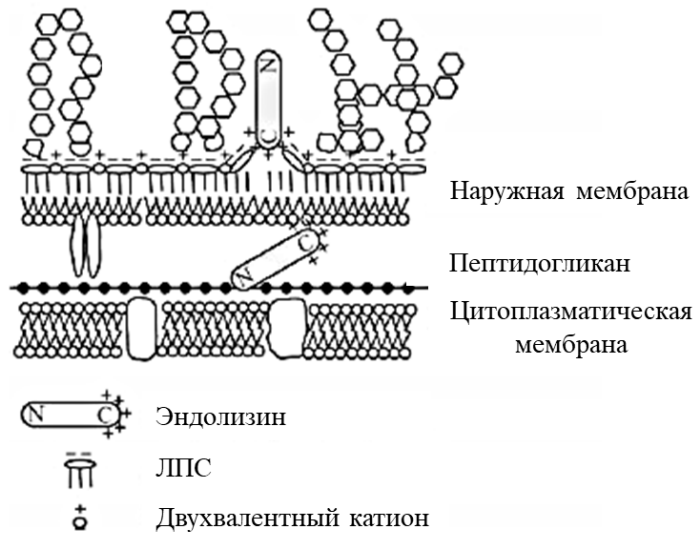


Рисунок 6 – Механизм действия эндолизина с внутренней пермеабилizующей активностью.

Адаптировано из [63]

Положительно заряженные или амфифильные участки на С-конце молекул являются частыми структурными элементами эндолизинов и определенно играют важную роль в активности, однако требуется более глубокое изучение их вклада.

Одним из примеров является глобулярный эндолизин LysAB2, полученный из бактериофага, поражающего клетки *Acinetobacter baumannii*. Было показано, что этот фермент обладает широким спектром действия, лизируя как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии. При удалении С-концевого фрагмента различной длины, антибактериальная активность фермента значительно снижалась, таким образом, подтверждая гипотезу вклада, заряженного С-конца в пермеабилizующую активность [65]. С-концевые пептиды данного эндолизина были получены в другом исследовании, в котором было показано, что пептид LysAB2 P3, обладающий выраженным положительным зарядом, обладает значительной антибактериальной активностью именно за счет способности увеличивать проницаемость мембраны [66].

Схожие исследования были проведены относительно эндолизина PlyF307, также полученного из бактериофага *A. baumannii*. Он показал свою активность *in vitro*, а также в экспериментах, моделирующих формирование биопленок на катетерах как *in vitro*, так и *in vivo* на мышах [51].

Существует значительное количество других эндолизинов, чье действие направлено против грамотрицательных бактерий, и которые оказывают антибактериальный эффект без добавления различных пермеабилizующих веществ [52, 67–71]. Однако, было показано, что для

проявления активности *in vitro* требуются гораздо большие концентрации (100-500 мкг/мл) по сравнению с эндолизинами, действующими на грамположительные бактерии (менее 10 мкг/мл) [40]. Это означает, что наружная мембрана все же тормозит проникновение эндолизинов сквозь нее, замедляя их действие.

1.3.3. Модификация эндолизинов пермеабилizующими пептидами

Другим подходом для дестабилизации наружной мембраны является слияние эндолизинов с дополнительными пермеабилizующими пептидами, которые, взаимодействуя с гидрофобными или ионными связями ЛПС наружных мембран, способствуют тому, что такие гибридные белки проникают к пептидогликану. В качестве таких ЛПС-дестабилизирующих пептидов можно использовать любые поликатионные, гидрофобные или амфифильные пептиды животного, растительного, бактериального, синтетического или другого происхождения, однако, при слиянии они не должны влиять на вторичную и третичную структуру белка, чтобы он не потерял свою ферментативную активность. Впервые такой подход был предложен компанией Lysando AG, а соответствующие гибридные молекулы были названы артилизинами (Artilysin®) [72].

Был изучен вклад пермеабилizующих пептидов различной природы, при их введении в последовательность эндолизинов как на N-конце, так и на C-конце, в активность эндолизинов в отношении грамотрицательных бактерий. Одним из наиболее активных артилизинов оказался LoGT-001, представляющий собой эндолизин OVPgp279, на N-конец которого через небольшой линкер добавлен поликатионный нонапептид (PCNP). Антибактериальная активность такого соединения повышалась как минимум на порядок по сравнению с исходной молекулой, а также расширялся спектр действия, в который вошли даже штаммы с множественной лекарственной устойчивостью [72].

На основе модифицированного фрагментом поликатионного пептида цекропина А эндолизина OVPgp279 также был получен PlyA – артилизин, обладающий высокой активностью по отношению к клеткам *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* в экспериментах *in vitro* [73].

Другими хорошо описанными примерами являются артилизины Art-085 и Art-175, представляющие собой нативную и немного модифицированную для повышения стабильности молекулы эндолизина KZ144, слитые с антимикробным пептидом SMAP-29 (антимикробный миелоидный пептид овцы). Было показано, что в отличие от KZ144 Art-175 и Art-085 могут проходить через наружную мембрану синегнойной палочки и уничтожать бактерии, в том числе

и с множественной резистентностью, а Art-085 также показал свою эффективность при лечении инфекции уха у собак [43, 44, 50].

На примере различных вариантов соединения OVPgp279 и KZ144 с антимикробными пептидами было показано, что потенциал синтетической биологии в отношении артилизинов практически безграничен. Подобрав оптимальные пермеабилзирующие пептиды, линкеры, каталитические или СКС-домены, возможно создать искусственные молекулы с желаемыми характеристиками [36, 40, 74–78].

1.4. Перспективы применения эндолизинов для лечения инфекционных заболеваний

1.4.1. Животные модели инфекционных заболеваний

В настоящее время большинство исследований по изучению активности эндолизинов в отношении грамотрицательных бактерий проведено *in vitro* на различных бактериальных штаммах (в том числе с множественной лекарственной устойчивостью) в различных метаболических состояниях, а также в различных условиях среды, сходных с условиями *in vivo* [79].

Однако, чтобы дать однозначный ответ об эффективности эндолизинов для терапии инфекционных заболеваний, нельзя опираться только на *in vitro* исследования, основным источником данных об эффективности препаратов в данном случае должны служить доклинические испытания на животных моделях.

Чаще всего в литературе встречаются системные модели животных инфекций, для которых изучается потенциал эндолизинов при лечении бактериемии, эндокардита, менингита, остеомиелита и других инфекций. При этом эндолизины вводят парентерально (внутривенно, внутрибрюшинно) спустя несколько часов после заражения, что оказывает протективный эффект и увеличивает выживаемость животных. Существуют данные, что наиболее эффективно применение эндолизинов в первые часы после заражения, в то время как более отсроченное лечение не приносит желаемого эффекта [51].

Примером является эндолизин PlyF307, который способствовал увеличению выживаемости мышей, зараженных *A. baumannii*, на 50% по сравнению с контрольной группой, в эксперименте, моделирующем сепсис [51]. Более того, этот же эндолизин показал свою эффективность для снижения обсемененности зараженных катетеров, вживляемых мышам. Инъекции эндолизина в область катетера снижали количество бактерий на 2 порядка [51]. Артилизин Art-175 также показал эффективность в случае сепсиса, вызванного *P. aeruginosa*, и

повышал выживаемость мышей на 80% относительно контрольной группы [43]. Эти и другие исследования, имитирующие бактериемии, подтверждают возможность применения эндолизинов системно как в качестве индивидуальных лекарственных средств, так и в комбинации с антибиотиками [49, 54, 66, 80, 81].

Однако, системное применение эндолизинов может иметь ряд ограничений, таких как короткий период полувыведения, иммуногенность, воспалительные реакции или потенциальный аллергический эффект [40]. Тем не менее, чтобы сделать однозначный вывод об эффективности и безопасности определенного эндолизина, необходимо изучать его при непосредственном применении *in vivo*.

Дыхательная система также часто подвергается бактериальным инфекциям, начиная от фарингита и заканчивая опасной для жизни пневмонией. Применение эндолизинов для лечения пневмоний изучалось на животных моделях. Например, интраназально зараженных *P. aeruginosa* мышей лечили интраназальным и интратрахеальным введением эндолизина PlyPa91. При этом выживаемость животных значительно повышалась (до 70%) [82]. Введение эндолизина SAL200 также повышало выживаемость мышей до 95% в летальной модели пневмонии при интраназальном применении, снижая бактериальную нагрузку в легких [83].

Применение эндолизинов для лечения местных инфекций является одним из наиболее перспективных направлений. Инфекции раневых или ожоговых поверхностей зачастую имеют затяжное течение и, при отсутствии должного лечения, могут привести к генерализации инфекционного процесса. Было показано, что эндолизины PlyPa03 и PlyPa91 значительно снижают (до 2 log) количество *P. aeruginosa* в инфицированных ранах [82]. Схожие результаты были получены для эндолизинов LysGH15, ClyS и CPP-JDlys в экспериментах на мышах [84–86] [2,3], что говорит о перспективе данных молекул в качестве индивидуальных или дополняющих лекарственных средств для лечения инфекций кожи и мягких тканей.

Местное применение эндолизинов при ожоговых инфекциях также оказывает антибактериальный эффект. Например, MR-10 и ClyF значительно снижали бактериальную нагрузку, ускоряли ранозаживление и разрушали формирующиеся биопленки *Staphylococcus aureus* [80, 81].

Таким образом, множество успешных экспериментов по применению эндолизинов на животных моделях инфекций говорит о терапевтическом потенциале данной группы антибактериальных средств для лечения различных инфекционных заболеваний человека, включая раневые и ожоговые инфекции, бактериемии и инфекции дыхательных путей.

1.4.2. Клинические исследования препаратов на основе эндолизинов

Несмотря на множество примеров эндолизинов, находящихся на различных этапах доклинических исследований, в клинических исследованиях находятся лишь несколько препаратов, причем все они обладают узким спектром действия и направлены на лечение инфекций, вызванных метициллин-устойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Например, корейский препарат N-Rephasin® SAL200 (компания Intron Biotechnology) является готовой лекарственной формой (ГЛФ), содержащей рекомбинантный эндолизин SAL-1, обладающий антистафилококковой активностью. Этот препарат показал высокую активность *in vitro*, а также эффективность на животной модели бактериемии [87]. Более того, доклинические исследования безопасности при однократном или многократном внутривенном применении на собаках показали, что это препарат не обладает токсичным действием и безопасен [88]. На основании этих данных SAL200 был переведен на I фазу клинических исследований на здоровых добровольцах, в ходе которой были изучены фармакокинетика, фармакодинамика, безопасность и иммуногенность препарата [89]. В настоящее время начата фаза IIa клинических исследований по изучению эффективности и безопасности препарата по показанию бактериемия, вызванная *S. aureus*.

Эндолизин CF-301, разрабатываемый компанией ContraFect для борьбы с инфекциями, вызываемыми устойчивыми штаммами золотистого стафилококка, показал высокую активность в отношении *S. aureus* и других грамположительных бактерий [49]. Этот эндолизин, также известный как PlySs2, показал выраженное синергетическое действие с различными антибиотиками, что дает потенциал к комбинированной терапии [54]. В виде препарата Eхеbacase он прошел I и II фазы клинических испытаний для изучения эффективности и безопасности при лечении бактериемии, вызванной *S. aureus*, в том числе и эндокардита, в дополнении к антибиотикам – стандарту лечения [90]. Данный препарат стал первым препаратом эндолизинов, допущенным к клиническим исследованиям в США. В настоящее время проводится III фаза клинических исследований.

Эндолизин Staphefekt™ (датская компания Microcos) в составе безрецептурного препарата Gladskin уже доступен для использования в инфекционных случаях атопического дерматита или акне, если возбудителем также является золотистый стафилококк. В ходе клинических испытаний была доказана его эффективность при местном применении для снижения бактериальной обсемененности кожи, а также уменьшения симптоматики дерматита [91].

Таким образом, в клинических исследованиях эндолизинов представлено всего три препарата. Несколько компаний интенсивно работают над тем, чтобы их ведущие продукты

достигли рынка, и один из них уже доступен в продаже. Показаниями к их применению являются местные или системные инфекционные заболевания, вызванные грамположительными бактериями, а именно *S. aureus* [40].

Растущая устойчивость к антибиотикам среди грамотрицательных бактерий диктует необходимость разработки инновационных антибактериальных препаратов для борьбы с ними. К сожалению, большинство данных *in vivo*, аналогично результатам *in vitro*, получено с использованием эндолизинов, действующих на грамположительные патогены, в то время как для эндолизинов, эффективных в отношении грамотрицательных бактерий таких экспериментальных данных крайне не хватает. Эндолизины для борьбы с грамотрицательными бактериями находятся только на стадии доклинических исследований эффективности и безопасности на животных моделях, и еще не достигли испытаний на людях. Тем не менее, полученные впечатляющие результаты дают возможность предположить, что некоторые из этих молекул могут достичь клинических испытаний и затем рынка антибактериальных препаратов для терапии инфекций человека.

1.5. Получение фармацевтических субстанций эндолизинов и анализ их качества

1.5.1. Получение рекомбинантных эндолизинов

В настоящее время молекулы эндолизинов, как нативных, так и содержащих различные модификации, получают биотехнологическим путем. Технология рекомбинантной ДНК позволят производить активные литические ферменты со стабильными свойствами, которые, можно модифицировать, изменяя исходную кодирующую последовательность, с целью улучшения антибактериальных свойств, повышения стабильности или растворимости белка или направленного изменения спектра активности [79].

Основными этапами получения рекомбинантных эндолизинов являются (Рисунок 7):

- Создание генно-инженерных конструкций, несущих кодирующие последовательности;
- Получение клеток-продуцентов;
- Экспрессия целевого белка;
- Очистка целевого белка.

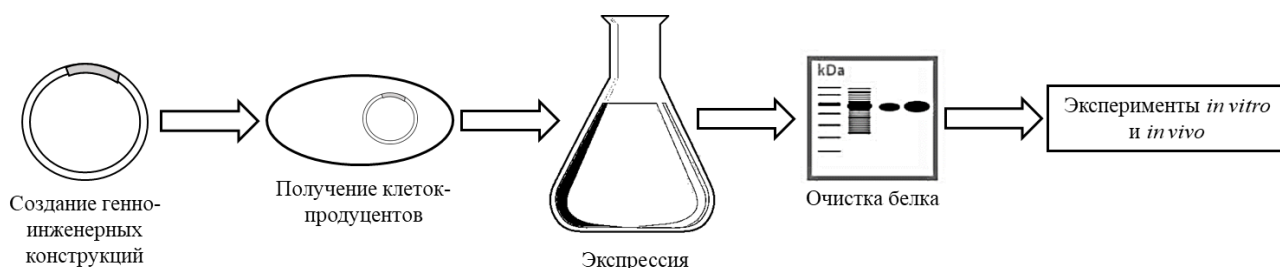


Рисунок 7 – Основные этапы получения рекомбинантных эндолизин. Адаптировано из [79]

Далее, в случае эндолизин, для оценки успешности проведенных биотехнологических операций, проводится оценка антибактериальных свойств фермента, которые должны сохраняться в ходе всего многостадийного процесса получения рекомбинантного эндолизина [79].

Создание генно-инженерных конструкций, несущих последовательности, кодирующие эндолизин

Для идентификации последовательностей, кодирующих молекулы эндолизин, анализируют геномы литических бактериофагов, желательнo с уже охарактеризованным спектром действия, чтобы хотя бы примерно иметь представление о видах бактерий, на которые будет действовать изолированный фермент. Выявленные последовательности пептидогликангидролаз анализируют на наличие гомологов [92] и изучают предсказанные физико-химические свойства для упрощения дальнейшего получения эндолизина.

Современные методы генной инженерии позволяют вводить в кодирующие последовательности генов специфические функциональные фрагменты, позволяющие упростить процесс получения конечного продукта. Например, возможно введение различных меток в одной рамке трансляции для проведения аффинной хроматографии, облегчающей процесс очистки ферментов, или для повышения растворимости белка, так как эндолизин из-за своего механизма действия могут быть токсичными для клеток-продуцентов в случае экспрессии в бактериальных штаммах и образовывать нерастворимые тельца включения, из которых может быть сложно ренатурировать стабильные и активные молекулы [93].

Тем не менее, в данном случае важно помнить, что дополнительные таги могут, в конечном итоге, повлиять на активность фермента, поскольку способны изменять структуру целевой молекулы. Таким образом, необходимо найти баланс для получения активных ферментов в растворимой форме и, в то же время, учесть особенности дальнейшей очистки.

Чаще всего в качестве тагов используют полигистидиновые метки, состоящие из 5-15 остатков гистидинов на N- или C-конце молекулы. Такой подход позволяет в дальнейшем очищать рекомбинантные белки с помощью высокоэффективного метода металл-хелатной

аффинной хроматографии (МХАХ) [94, 95]. Почти все известные примеры эндолизинов были получены именно таким путем, так как показано, что такие метки значительно не влияют на конечную структуру белковых молекул и не обладают токсичными или иммуногенными свойствами, поэтому их можно не удалять после завершения очистки [51, 61, 65, 69, 96]. Тем не менее, следует учитывать, что полигистидиновые метки могут влиять на активность ферментов, уменьшая, увеличивая или изменяя ее [97–99].

Другими распространенным подходом является введение в молекулу лиганд-связывающих доменов, таких как мальтоза-связывающий домен или глутатион-S-трансфераза. Они не только облегчают процесс очистки с помощью аффинных сорбентов, но и повышают экспрессию белкового продукта и увеличивают его растворимость [100]. Эндолизины являются токсичными для клеток-продуцентов ферментами, поэтому могут образовывать тельца включения, поэтому стратегия увеличения их растворимости путем введения дополнительного тага является перспективной. Для этих целей используют интеиновую метку, которая также способствует правильному сворачиванию белка, что очень важно для эндолизинов [101].

Значительным минусом такого подхода является необходимость удаления этих меток различными пептидазами на конечном этапе очистки, ведь они, являясь полноценными высокомолекулярными доменами, значительно увеличивают размер фьюжена, что может влиять на активность эндолизинов и увеличивать их иммуногенность [102]. Введение дополнительных стадий очистки не только влияет на длительность процесса, но и, в случае активных ферментов, может значительно повлиять на качество конечного продукта.

Выбор экспрессионного вектора также значительно влияет на дальнейший продукт. Одной из наиболее популярных для получения эндолизинов является коммерческая экспрессионная система рЕТ, основанная на T7 промоторе и содержащая ген устойчивости к антибиотику канамицину [102]. В совокупности со штаммом *Escherichia coli* BL21 или его производными, она позволяет получить высокий уровень экспрессии целевого продукта в течение небольшого промежутка времени. Однако, следует учитывать, что в этом случае высока вероятность образования телец включения или неправильного сворачивания белка [103].

Этих недостатков лишен второй по популярности экспрессионный вектор рBAD под слабым арабинозным промотором. Он подходит для экспрессии токсичных белков и оптимизации их растворимости в прокариотических клетках, однако, выход белка в такой системе обычно несколько ниже [104].

Получение клеток-продуцентов и экспрессия целевого белка

Самым широко распространенным способом экспрессии гетерологичных белков в лабораторных условиях является экспрессия в прокариотических клетках-продуцентах *E. coli* из-за ее удобства и низкой стоимости. Прокариотические штаммы *E. coli* подходят для белков с молекулярным весом меньше 100 кДа [93], что подходит для эндолизинов, особенно глобулярных, действующих на грамотрицательные бактерии. Более того, эндолизины не являются белками эукариот, и им не требуются дополнительные посттрансляционные модификации, которые не могут обеспечить прокариотические системы экспрессии.

В основном, выбор подходящего штамма *E. coli* опирается на используемый экспрессионный вектор. Например, для экспрессии генов в векторе, содержащем T7 промотор, предпочтителен штамм *E. coli* BL21, так как он продуцирует подходящую для промотора T7 РНК-полимеразу [105]. Производные этого штамма *E. coli* BL21 (DE3) и *E. coli* BL21 (DE3) pLysS не содержат внутриклеточных протеаз, таким образом обеспечивая более высокий выход белка, а также подходят для экспрессии токсичных для продуцентов белков, к которым как раз и относятся литические ферменты [102]. Экспрессионная система «вектор pET- *E. coli* BL21» очень часто встречается в литературе при получении рекомбинантных эндолизинов, действующих на грамотрицательные бактерии [43, 52, 61, 62, 65, 67–69, 73, 75, 106], так как обеспечивает стабильный и высокий выход целевого продукта.

Еще одной популярной среди эндолизинов системой является «pBAD - *E. coli*» [51, 96, 107]. В данных условиях экспрессия эндолизина при пониженной температуре (25-30°C) в течение длительного промежутка времени способствует правильному его сворачиванию и экспрессии в растворимой форме, если это невозможно в другой экспрессионной системе [108].

Тем не менее, *E. coli* может не всегда подходить для экспрессии эндолизинов. Например, если фермент настолько токсичен для продуцента, что подвергает его лизису при индукции, возможно использовать другие прокариотические или же эукариотические культуры [102]. Так, эндолизин PlyE146, чье действие направлено против широкого спектра грамотрицательных бактерий [67], а также антистафилококковые эндолизины LysH5 [109] и LysK [48] были получены в экспрессионных культурах *Lactococcus lactis*. А белок LysA2, направленный против *Lactobacillaceae* – в клетках *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Очистка целевого белка, получение ФС эндолизинов

Экспрессированный в растворимой форме эндолизин подвергается очистке с помощью различных способов [110]. Хроматография остается самым востребованным и эффективным способом выделения индивидуального белка из совокупности различных компонентов клеток-

продуцентов [111, 112]. Разнообразие белков и их биохимических характеристик делает затруднительным создание универсального способа очистки, но добавление генетически закодированных тагов для аффинной очистки – это доступный и популярный способ, в ходе которого специфические лиганды на хроматографическом сорбенте взаимодействуют с аффинной меткой [113].

Полигистидиновые метки зачастую используют для получения препаративных количеств эндолизинов для доклинических исследований эффективности и безопасности новых молекул. Связывание таких меток с ионами металлов позволяет направленно выделять целевой белок с высокой степенью чистоты в одну стадию или с последующей гель-фильтрацией [94]. В настоящее время получаемые впервые молекулы эндолизинов выделяют именно таким путем [51, 61, 65, 69, 96].

Наличие меток или доменов для аффинной очистки значительно упрощает процесс выделения целевого белка из клеточного лизата, однако, не всегда возможно получить такой белковый фьюжен, например, в связи с особенностями строения белка или предполагаемого способа применения. Например, крайне нежелательно использование металл-хелатной аффинной хроматографии при получении препаратов для системного введения, к которым предъявляются высокие требования к безопасности, так как при этом способе в препаратах белка могут оставаться ионы тяжелых металлов (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}) [100]. В таких случаях очистку проводят в несколько этапов, задействуя ионообменную, гидрофобную или гель-эксклюзионную хроматографию. Примером является эндолизин PlySs2, при чьей очистке использовались последовательные этапы анионообменной и катионообменной хроматографии [49], или SAL-1, очищаемый двухстадийно с помощью ионообменной, а затем гидрофобной хроматографии [87]. Оба эти эндолизина использовали как субстанции для создания инъекционных препаратов для лечения стафилококковых инфекций.

Тем не менее, на эндолизины, которые предполагается применять местно, не налагаются такие ограничения по способу очистки, поэтому металл-хелатная аффинная хроматография является удобным методом.

В дальнейшем полученные с помощью хроматографической очистки эндолизины переводят в оптимальные для активности и стабильности ферментов буферные растворы, также добавляя различные вспомогательные вещества [87, 114].

Полученные в ходе такого многостадийного биотехнологического пути рекомбинантные эндолизины представляют собой активные субстанции, которые необходимо стандартизовать при крупномасштабном производстве для обеспечения стабильной эффективности и безопасности при последующем получении лекарственных препаратов.

1.5.2. Стандартизация субстанций эндолизинов

Одним из ключевых преимуществ рекомбинантных эндолизинов при разработке новых лекарственных препаратов на их основе, по сравнению с препаратами родительских бактериофагов, является возможность стандартизации субстанции согласно требованиям Государственной Фармакопеи (ГФ), которая является основным документом, регламентирующим методы контроля качества [115]. Включенные в Фармакопею общие и частные фармакопейные статьи в полной мере рассматривают все показатели качества как субстанции, так и ГЛФ.

Субстанции рекомбинантных эндолизинов можно отнести к биологическим или биотехнологическим субстанциям, требования к испытаниям которых отражены в ОФС.1.7.1.0010.18 ГФ XIV «Биологические лекарственные препараты», ОФС.1.7.1.0011.18 ГФ XIV «Биотехнологические лекарственные препараты», а также ОФС.1.7.1.0007.15 ГФ XIV «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

Требования к качеству биотехнологических фармацевтических субстанций (ФС) регламентируются следующими показателями: описание, подлинность, прозрачность и цветность раствора, рН, чистота, остаточные белки и ДНК штамма-продуцента, микробиологическая чистота, стерильность, бактериальные эндотоксины, химические показатели, содержание белка, специфическая активность, транспортирование и хранение.

Определение подлинности биотехнологической ФС может проводиться различными методами, к которым относятся определение специфической активности, пептидное картирование, электрофорез в полиакриламидном геле, капиллярный электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и другие валидированные методы. Для ФС рекомбинантных белков и, в частности, эндолизинов простым и доступным методом определения подлинности является электрофорез в полиакриламидном геле (ОФС.1.2.1.0023.15 ГФ XIV), который дает информацию о молекулярном весе целевого белка.

Помимо общих показателей качества, характерных для всех рекомбинантных белков, эндолизины, как вещества, обладающие антибактериальной активностью, необходимо стандартизовать по специфической антимикробной активности. Нормированные в ОФС.1.2.4.0010.18 ГФ XIV «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар» диффузионные методы и, в частности, диско-диффузионный метод, может дать лишь косвенное представление об активности эндолизинов, потому что позволят определить

лишь степень чувствительности микроорганизма к исследуемому веществу (чувствительность, промежуточная чувствительность, резистентность).

Наиболее популярными среди исследователей экспериментальными методиками изучения активности эндолизинов являются турбидиметрический метод (изучение литической активности), изучение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) путем серийных разведений в питательной среде (изучение бактериостатического действия), зимографию, диффузионный метод, а также метод подсчета жизнеспособных колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий после инкубации с эндолизином (изучение бактерицидного действия) [79].

Тем не менее, изучение МИК не всегда подходит для эндолизинов, так как их активность значительно зависит от условий среды. В многокомпонентной питательной среде, поддерживающей рост бактерий, эндолизины могут не проявлять свое антибактериальное действие [34, 35, 79]. В то же время зимография не является количественным методом и дает представление лишь о способности фермента расщеплять пептидогликан или целые бактериальные клетки с помощью электрофоретического исследования [35]. При постановке метода диффузии в агар следует изучить связывание молекул эндолизинов с материалом диска, чтобы убедиться, что все молекулы фермента могут диффундировать на поверхность питательной среды с бактериальным газоном, что может быть затруднительно при разработке новых молекул [35].

Из всех перечисленных методик наиболее являются турбидиметрический метод и метод оценки бактерицидного действия, так как в них возможно нормировать количество взятых в реакцию бактериальных клеток тест-штамма, точную концентрацию эндолизина, условия и время инкубации. Таким образом, именно их можно использовать для определения подлинности субстанций эндолизинов (Рисунок 8).

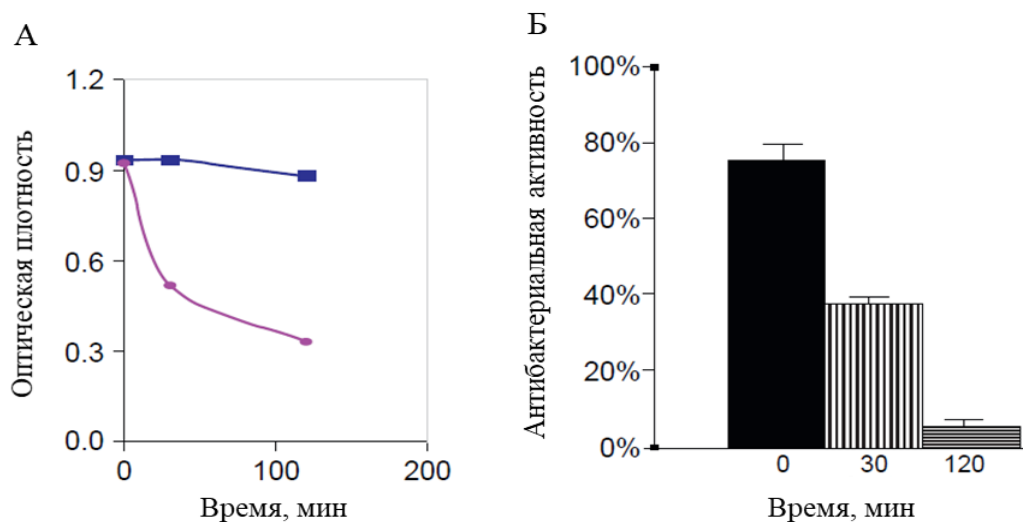


Рисунок 8 – Методы оценки антибактериальной активности эндолизинов. А.

Турбидиметрический метод, оценка снижения мутности раствора по сравнению с контролем без добавления эндолизина. Б. Метод оценки бактерицидного действия, подсчет жизнеспособных КОЕ бактерий после инкубации с эндолизинном или с контрольным образцом.

Адаптировано из [4]

Для оценки чистоты ФС могут использоваться различные физико-химические, химические или иммунохимические методы: электрофорез в полиакриламидном геле, изоэлектрическое фокусирование, ВЭЖХ, иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг или другие подходящие методы. Электрофорез в полиакриламидном геле дает представление не только о подлинности, но еще и о чистоте ФС, предоставляя информацию о наличии различных примесных белков, как родственных, например, олигомеров целевого белка, так и посторонних примесей, связанных с процессом производства.

Содержание активного вещества является одним из основных показателей качества. ОФС.1.2.3.0012.15 ГФ XIV «Определение белка» предлагает спектрофотометрические, колориметрические, а также спектрофлуориметрические методы количественного определения содержания белка в ФС. Концентрация белка определяется на основании калибровочной кривой, построенной на основе стандартных растворов (например, бычьего сывороточной альбумина (БСА) с известными концентрациями).

Таким образом, для стандартизации субстанций на основе рекомбинантных эндолизиннов, можно рекомендовать следующие методы анализа: электрофорез в полиакриламидном геле, который дает информацию о подлинности и о чистоте субстанции, изучение специфической активности на модельном штамме бактерий, позволяющее сделать заключение об антибактериальной (бактерицидной) активности, количественное определение действующего

вещества колориметрическим или спектрофотометрическим методом, а также определение стерильности субстанции и содержания в ней бактериальных эндотоксинов.

Таким образом, можно использовать различные методики для стандартизации субстанций на основе рекомбинантных эндолизинов по требуемым показателям. Наиболее информативным является комплекс из нескольких методов, выбор которых должен быть обоснован в каждом конкретном случае. Только обеспечение должного качества субстанции способствует получению стабильного, эффективного и безопасного лекарственного препарата на его основе.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Получение и стандартизация субстанции эндолизина LysECD7

2.1.1. Создание генно-инженерной конструкции, кодирующей последовательность LysECD7

Кодирующая последовательность эндолизина LysECD7 была выявлена в полногеномной последовательности литического бактериофага ECD7, поражающего клетки *Escherichia* (NCBI: txid1981499) и синтезирована в коммерческом векторе pAL-TA (Евроген, Россия). Открытая рамка считывания LysECD7 была амплифицирована из синтетического вектора с помощью ген-специфичных праймеров и помещена в экспрессионную кассету pET42b(+) (Таблица 2), содержащим кодирующую 8-гистидиновую метку последовательность, с помощью коммерческого набора GeneArt™ Gibson Assembly HiFi Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Таблица 2 – Последовательности праймеров, используемых для получения экспрессионного вектора

Направление	5'-Последовательность Праймера-3'
pET42vecF	5'-CTCGAGCACCACCACCACCACCACCACTAA-3'
pET42vecR	5'-CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAAT-3'
ECD7F	5'-AAGAAGGAGATATACATATGTTTAAATTAT CTCAAAGAAGCA-3'
ECD7R	5'-TGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGTTTTGGATCTGGGTATTTGCT-3'

Корректность сборки векторной конструкции проверяли методом секвенирования по Сэнгеру на секвенаторе Applied Biosystems® Sanger Sequencing 3500 Series Genetic Analyzer (Thermo).

2.1.2. Получение культур-продуцентов эндолизина LysECD7

Трансформация клеток E. coli штамма BL21(DE3)pLysS плазмидой, содержащей последовательность, кодирующую эндолизин LysECD7

Экспрессионный вектор помещали в компетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) pLysS (Novagen, Германия) с помощью протокола трансформации по методу «heat shock». Для этого две пробирки компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3)pLysS размораживали на льду 20 минут, в одну добавляли 1 мкл плазмидной ДНК (концентрация 24 нг/мкл) и плавно пипетировали, а вторую использовали в качестве контроля. Обе пробирки инкубировали на льду в течение 30 минут. После окончания инкубации пробирки помещали в термостат при 42 °С на 30 с («тепловой шок»), затем переносили на 2 минуты в лед и добавляли в каждую пробирку по 0,4 мл прогретой при 37 °С среды LB (10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl на 1 литр среды). После, клетки подращивали в термостате в течение часа при 37 °С, высевали аликвоты (200 мкл) на чашки Петри с агаром, содержащие селективные антибиотики (34 мкг/мл хлорамфеникола и 50 мг/мл канамицина), и выращивали в течение 16-18 часов при 37 °С в термостате.

Получение культур-продуцентов растворимого эндолизина LysECD7

Полученные на чашках индивидуальные колонии трансформантов рассеивали на твердую питательную среду для получения отдельных клонов и подращивали при 37 °С в течение 16-18 часов, далее из отдельных клонов готовили ночные культуры. Для этого брали 15 мл пробирки с 1,5 мл жидкой среды LB (комнатной температуры) и селективными антибиотиками (34 мкг/мл хлорамфеникола и 50 мг/мл канамицина). Клоны стерильно помещали в пробирки со средой с помощью бактериологической петли и инкубировали в шейкере в течение ночи при постоянном перемешивании (250 об/мин) при 37 °С.

На следующий день полученную ночную культуру *E. coli* рассеивали в соотношении 1:50 в свежую питательную среду LB. Культивирование клеток после пересева (37°С, 250 об/мин) проводили до достижения $OD_{600} = 0,55-0,65$ ед., добавляли 1 мМ ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) и продолжали инкубировать в тех же условиях еще 3-4 часа. Полученные клетки осаждали центрифугированием (6000 g, 10 мин, при 4°С), ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 20 мМ Трис HCl pH 8,0, 250 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, инкубировали с 100 мкл/мл лизоцима при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем разрушали с помощью обработки ультразвуком. Полученный лизат центрифугировали при 10 000 g в течение 30 минут при 4°С.

Для анализа белкового состава клеток в системе денатурирующего электрофореза отбирали аликвоты до и после индукции (по 1 мл), а также пробы супернатанта и осадка после центрифугирования лизата.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Перед началом работы заливали двухслойные гели (4% концентрирующий и 16% разделяющий) для денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

В качестве электродного буферного раствора использовали трис-глициновый буферный раствор (3,0 г Трис, 14,4 г глицина и 1,0 г ДСН на 1 литр).

Перед нанесением на гель подготавливали образцы: кипятили в течение 5 минут при 95°C в буферной системе Лэммли (100мМ Трис рН 6,8, 100 мМ β-меркаптоэтанола, 10% глицерина, 4% ДСН, 0,1% бромфенолового синего), центрифугировали и вносили в лунки геля наряду с маркером молекулярных весов

После окончания электрофореза гели окрашивали 0,05%-ным раствором кумасси бриллиантовый синий R-250 (Хеликон, Россия). Для визуализации гелей использовали систему гель-документирования Gel Doc™ EZ Imager.

2.1.3. Масштабирование получения культур-продуцентов эндолизина LysECD7

Масштабирование культур-продуцентов проводят в ферментере BioFlo 415 (New Brunswick Scientific), рабочий объем 10 л. Перед работой ферментер стерилизовали автоклавированием (121°C, 45 минут) вместе с 10 л среды для культивирования (15 г триптона, 7,5 г дрожжевого экстракта, 15 г натрия хлористого, 3 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ на 1 литр среды).

После стерилизации и охлаждения до 37°C в ферментер вносили 10% раствора NaOH до рН 7,0-7,5, растворы селективных антибиотиков, пеногаситель (М-30, Serva) и 40% раствор глюкозы до конечной концентрации 0,4-0,5%.

В подготовленный ферментер вносят выращенную ночную культуру для засева в соотношении 1:50 и начинают процесс ферментации, при котором значения технологических параметров процесса культивирования поддерживают следующими: температура 37°C, 500 об/мин, аэрация 1,0 об/об/мин, рН 7,0-7,5. Культуру выращивают в течение 2-3 часов до оптической плотности 5 – 7 ед., после в ферментер вносят раствор ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжают культивирование еще 1-2 часа, увеличивая перемешивание при снижении концентрации растворенного кислорода ниже 10%. Об окончании процесса судят по увеличению показателей рН и DO, а также по прекращению роста биомассы. Конечная

оптическая плотность культуры составляет не менее 9,0 ед. Далее культуральную жидкость охлаждают до температуры 10-12°C и концентрируют с помощью центрифугирования (7000 g, 15 мин, 4°C).

До и после индукции отбирают по 1 мл проб для проверки наличия экспрессии целевого белка с помощью денатурирующего электрофореза в 16% ПААГ.

2.1.4. Разрушение клеточных биомасс

К клеточному осадку, исходя из соотношения 1 г клеток в 20 мл буферного раствора для разрушения клеток, добавляют холодный раствор 20 мМ Трис НСl (рН 8,0), 250 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF. Суспензию клеток в буферном растворе пропускают через лабораторный гомогенизатор APV 2000 (SPX Flow), после чего центрифугируют лизат в течение 15 мин при 12000 g при температуре 4°C, отбирая надосадочную жидкость (растворимая фракция лизата). Затем проводят однократную заморозку надосадочной жидкости при -80°C с дальнейшей разморозкой в емкости, наполненной ледяной водой, а затем пропускают под давлением через фильтрующую насадку с размером пор 0,22 мкм.

2.1.5. Очистка рекомбинантного эндолизина LysECD7 и получение субстанции

Очистка фермента проводилась на хроматографе NGC Discovery™ 10 (Bio-Rad, США) с использованием колонки HisTrap FF объемом 5 мл (GE Healthcare, США), заряженной Ni²⁺ ионами. Растворимую фракцию лизата смешивали с 30 мМ имидазола и 1 мМ MgCl₂ и наносили на колонку, предварительно уравновешенную с помощью буферного раствора, содержащего 20 мМ Трис НСl (рН 8,0), 250 мМ NaCl, 30 мМ имидазола. Фракции белка элюировали с сорбента с помощью линейного градиента до 100% буферного раствора, содержащего 20 мМ Трис НСl (рН 8,0), 250 мМ NaCl, 500 мМ имидазола.

Объединенные фракции элюата, содержащие эндолизин, наносили на колонку с сорбентом Superdex 75, предварительно уравновешенную раствором 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5). Фракции эндолизина объединяют и фильтруют через фильтрующую насадку с размером пор 0,22 мкм.

Чистоту белка определяли с помощью электрофореза в 16% ПААГ в денатурирующих условиях. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм

(Implen NanoPhotometer, IMPLen, Германия). Концентрация рассчитывалась с учетом теоретического коэффициента поглощения $E^{0,1\%}_{280\text{нм}}$, равного 1,4595.

2.1.6. Оценка стабильности ФС эндолизина LysECD7

Термозависимость полученного эндолизина определяли по изменению гидродинамического диаметра частиц в растворе и интенсивности светорассеяния с использованием прибора ZetaSizer Nano-ZS (Malvern Instruments LTD, США) в полистироловых кюветках (1 см) при длине волны лазера 633 нм [116]. Образец раствора эндолизина с концентрацией 1 мг/мл центрифугировали (16 000 g, 15 мин) непосредственно перед проведением анализа, а затем постепенно нагревали в ячейке прибора со скоростью 0,5°C/минуту и проводили измерение в диапазоне температур от 25°C до 70°C с шагом в 2,5°C. Каждое измерение представляет собой среднее из 3 повторностей, сделанных с разницей в 15 с. Полученные данные обрабатывали с помощью программы Dispersion Technology Software version 5.10 (Malvern, США).

Стабильность субстанции эндолизина (раствор с концентрацией 1 мг/мл, а также лиофилизованная субстанция) при длительном хранении при 2°C - 8°C оценивалась в течение 1 года с промежуточными точками 1, 3 и 6 месяцев. Для этого по три пробы субстанции на каждую временную точку фасовали по 100 мкл, герметично упаковывали в пробирках типа Eppendorf и хранили в холодильнике при 2°C - 8°C и относительной влажности 60±5%. В ходе эксперимента проводили оценку внешнего вида, оптической плотности OD_{600} , анализировали состав пробы с помощью денатурирующего электрофореза в 16% ПААГ и исследовали бактерицидную активность микробиологическим методом.

2.2. Оценка специфической активности эндолизина LysECD7 *in vitro*

2.2.1. Изучение антибактериальной активности LysECD7 в отношении планктонных клеток

Ночную культуру бактериальных клеток модельного штамма *A. baumannii* Ts 50-16 ($OD_{600} = 1,2-1,6$) используют в качестве культуры бактерий в стационарной фазе роста или разбавляют в 30 раз средой LB, подращивают до экспоненциальной фазы роста ($OD_{600}=0,6$), осаждают центрифугированием при 6000 g, 10 мин и ресуспендируют в фосфатно-солевом буфере (PBS) до

конечной мутности суспензии, соответствующей стандарту мутности МакФарланда 0,5 (около 10^8 КОЕ/мл). Далее суспензию разбавляют в 100 раз 20 mM Трис-НСl буфером pH 7,5 (около 10^6 КОЕ/мл) и смешивают 1:1 со 100 мкл субстанции эндолизина LysECD7 в исследуемой концентрации, либо 100 мкл буфера в качестве отрицательного контроля.

Полученные смеси инкубируют полчаса при $+37^\circ\text{C}$, 200 об/мин, после разводят в 10 и 100 раз в PBS и высевают смеси на чашки Петри с агаризованной питательной средой LB. Все эксперименты проводят в трех биологических повторностях. После инкубации чашек при 37°C в течение 16-18 часов подсчитывают колонии и оценивают результат в КОЕ/мл. Антибактериальную активность исследуемого эндолизина в опытных образцах также рассчитывают в процентах по отношению к количеству КОЕ в контрольных образцах по формуле:

$$X = 100 - ((\text{КОЕ}_{\text{об}} * 100) / \text{КОЕ}_{\text{кон}}), \quad (1)$$

где X – антибактериальная активность исследуемого вещества, %;

КОЕ_{об} – количество колониеобразующих единиц в испытуемом образце, КОЕ/мл;

КОЕ_{кон} – количество колониеобразующих единиц в контрольном образце, КОЕ/мл.

Влияние pH, солей и сыворотки крови на специфическую активность эндолизина оценивали на экспоненциально растущем штамме *A. baumannii* Ts 50-16. Для этого бактерии в 20 mM Трис HCl буфере со значениями pH от 5,0 до 9,0 инкубировали с белком, разведенном в тех же буферных растворах. Эффект пермеабиллизатора на активность оценивали добавлением 0,5 mM ЭДТА во время инкубации бактериальной суспензии с эндолизином. Для оценки влияния солей щелочных металлов в инкубационную смесь добавляли различные концентрации NaCl или KCl (от 10 до 500 mM). Влияние сыворотки крови определяли, разбавляя бактериальную культуру модельного штамма до 10^6 КОЕ/мл сывороткой крови человека.

2.2.2. Изучение антибактериальной активности LysECD7 в отношении бактериальных биопленок

Для изучения антибактериальной активности эндолизина в отношении сформированных бактериальных биопленок в лунках 96-луночного планшета в 200 мкл триптиказо-соевого бульона (17,0 г гидролизата казеина, 3,0 г гидролизата сои, 2,5 г глюкозы, 5,0 г хлорида натрия, 2,5 г гидрофосфата калия двузамещенного на 1 л среды) в течение 24 ч при 37°C и постоянном перемешивании 250 об/мин выращивали биопленки *Acinetobacter baumannii* Ts 50-16, *Klebsiella pneumoniae* Ts 104-14 *Pseudomonas aeruginosa* Ts 38-16 (коллекция штаммов НИЦЭМ им. Н.Ф.

Гамалеи). Сформированные плотные биопленки трижды отмывали PBS от планктонных клеток, добавляли раствор эндолизина в различных концентрациях или контрольный Трис HCl буфер pH 7,5 и проводили инкубацию в течение 2 часов при 37°C, 250 об/мин. Далее лунки трижды отмывали PBS, подсушивали в течение 5 минут и прокрашивали 0,1% раствором кристаллического фиолетового при комнатной температуре. Затем вновь трижды отмывали PBS, подсушивали и добавляли 200 мкл 33% уксусной кислоты для растворения оставшегося красителя [117]. Оптическую плотность полученных растворов измеряли при 600 нм (OD_{600}), а затем рассчитывали нормализованные значения OD_{600} путем деления полученных значений в опытных лунках на значения в контрольных. Оценку эффективности биопленкообразования и антибиопленочное действие эндолизина проводили согласно методике Stepanovic et al. [118]

2.2.3. Микроскопия

Сканирующая электронная микроскопия препаратов зоны лизиса

Для получения препаратов для микроскопии ночную культуру штамма *Acinetobacter baumannii* Ts 50-16 разбавляли свежей средой LB и подращивали до оптической плотности $OD_{600}=0,6$, 200-300 мкл культуры наносили на чашку Петри с агаризованной средой и давали высохнуть при комнатной температуре. На поверхность полученного бактериального слоя газона наносили 10 мкл эндолизина LysECD7 в концентрации 1 мг/мл (всего 10 мкг белка) или 10 мкл контрольного 20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), давали подсохнуть, а затем инкубировали в течение 16-18 часов при 37°C. Выросший бактериальный газон с зоной лизиса в месте нанесения эндолизина фиксировали в парах 10% формалина в течение ночи.

С использованием кремниевой пластины были сделаны отпечатки зоны лизиса, включая ее край и нетронутый бактериальный газон. Пластина была подсушена в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего было проведено напыление слоя золота (5 нм) (SPI Inc., США). Готовый препарат анализировали с помощью сканирующего двухлучевого электронного микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, США) в режиме глубоко вакуума (10 кВ) [119].

Микроскопия бактериальных биопленок

Культуру штамма *Acinetobacter baumannii* Ts 50-16 выращивали в питательной среде LB в течение 16-18 часов, помещали в нее стерильные покровные стекла (Hampton Research, США) и инкубировали в термостате при 37°C без перемешивания в течение 24 часов для формирования бактериальной биопленки. Стекла трижды промывали дистиллированной водой для удаления планктонных клеток и подсушивали на воздухе. Два стекла помещали в раствор контрольного

буфера 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), еще два стекла - в раствор эндолизина LysECD7 с концентрацией 100 мкг/мл на 2 часа. Далее стекла снова трижды промывали водой, подсушивали на воздухе. По одному стеклу из каждой группы фиксировали парами 10% формалина в течение 18-24 часов и анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии как указано в п. 2.3.1.

Оставшиеся два стекла окрашивали 0,1% раствором кристаллического фиолетового при комнатной температуре 15 мин, трижды промывали водой и подсушивали при комнатной температуре. Полученные препараты анализировали в проходящем свете с помощью светового микроскопа Axiostar plus (Zeiss AG, Германия) при общем увеличении 400×.

2.2.4. Изучение спектра действия LysECD7

Спектр активности фермента в концентрации 100 мкг/мл изучали согласно методике 2.1. «Изучение антибактериальной активности LysECD7 в отношении планктонных клеток» в 20 мМ Трис НСl буфере с использованием 120 штаммов грамотрицательных бактерий различных родов и видов и 10 штаммов грамположительных бактерий. Все использованные штаммы депонированы в коллекциях ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи», ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск), ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (Таблица 3).

Таблица 3 – Использованные в исследовании спектра действия LysECD7 бактериальные штаммы и клинические изоляты, источники их получения и методы идентификации

Название штамма	Источник	Метод идентификации
<i>S. enteritidis</i> «Калуга»	Инфекционный материал птиц	Культурально-морфологические, биохимические и масс-спектрометрические методы, серотипизация
<i>S. infantis</i> 4632		
<i>S. tiphymurium</i> «Ло»		
<i>S. enteritidis</i> 3Б		
<i>S. infantis</i> 2511		
<i>S. tiphymurium</i> 415		
<i>S. tiphymurium</i> 1281		
<i>S. tiphymurium</i> Уфа		
<i>S. tiphymurium</i> №3		
<i>S. tiphymurium</i> №24		
<i>S. enteritidis</i> 25		
<i>S. infantis</i> 4631		
<i>S. infantis</i> 4522		
<i>S. dublin immobilin</i> 2		

Продолжение таблицы 3

Название штамма	Источник	Метод идентификации
<i>S. enteritidis</i> «4Б»	Инфекционный материал птиц	Культурально-морфологические, биохимические
<i>S. infantis</i> «Кузн»		
<i>S. london</i> N2		
<i>S. typhimurium</i> Г1	Стоки животноводческих комплексов	Культурально-морфологические, биохимические и масс-спектрометрические
<i>S. infantis</i> 1271		
<i>S. enteritidis</i> SEM4		
<i>P. aeruginosa</i> 1	Пациенты стационаров РФ	Культурально-морфологические, биохимические и масс-спектрометрические
<i>P. aeruginosa</i> 2		
<i>P. aeruginosa</i> 3		
<i>P. aeruginosa</i> 4		
<i>P. aeruginosa</i> 5		
<i>P. aeruginosa</i> 6		
<i>P. aeruginosa</i> 7		
<i>P. aeruginosa</i> 8		
<i>P. aeruginosa</i> 9		
<i>P. aeruginosa</i> 10		
<i>P. aeruginosa</i> 11		
<i>P. aeruginosa</i> 12		
<i>P. aeruginosa</i> 13		
<i>P. aeruginosa</i> 14		
<i>P. aeruginosa</i> 15		
<i>P. aeruginosa</i> 16		
<i>P. aeruginosa</i> 3086		
<i>P. aeruginosa</i> 1805		
<i>P. aeruginosa</i> PA01	Общелабораторный штамм	
<i>P. aeruginosa</i> B-1304		
<i>K. pneumoniae</i> 1	Пациенты стационаров	Культурально-морфологические, биохимические
<i>K. pneumoniae</i> 2		
<i>K. pneumoniae</i> 3		
<i>K. pneumoniae</i> 4		
<i>K. pneumoniae</i> 5		
<i>K. pneumoniae</i> 6		
<i>K. pneumoniae</i> 7		
<i>K. pneumoniae</i> 8		
<i>K. pneumoniae</i> 9		
<i>K. pneumoniae</i> 10		
<i>K. pneumoniae</i> 11		
<i>K. pneumoniae</i> 12		
<i>K. pneumoniae</i> 13		
<i>K. pneumoniae</i> 14		
<i>K. pneumoniae</i> 15		
<i>K. pneumoniae</i> 16		
<i>K. pneumoniae</i> 17		

Продолжение таблицы 3

Название штамма	Источник	Метод идентификации
<i>K. pneumoniae</i> 18	Пациенты стационаров	Культурально-морфологические, биохимические
<i>K. pneumoniae</i> 19		
<i>K. pneumoniae</i> 20		
<i>E. coli</i> 96	Пациенты стационаров	Культурально-морфологические, биохимические и масс-спектрометрические
<i>E. coli</i> 532		
<i>E. coli</i> 502		
<i>E. coli</i> 125		
<i>E. coli</i> 636		
<i>E. coli</i> 16		
<i>E. coli</i> 110		
<i>E. coli</i> 158		
<i>E. coli</i> 452		
<i>E. coli</i> 510		
<i>E. coli</i> 663		
<i>E. coli</i> 185		
<i>E. coli</i> 515		
<i>E. coli</i> 682		
<i>E. coli</i> 108		
<i>E. coli</i> 503		
<i>E. coli</i> 632		
<i>E. coli</i> 179		
<i>E. coli</i> 201		
<i>E. coli</i> 533		
<i>A. baumannii</i> 145	Пациенты стационаров	Культурально-морфологические, биохимические и масс-спектрометрические
<i>A. baumannii</i> 402		
<i>A. baumannii</i> МА 65		
<i>A. baumannii</i> 474		
<i>A. baumannii</i> 869		
<i>A. baumannii</i> Бор		
<i>A. baumannii</i> РА		
<i>A. baumannii</i> 67ГКБ		
<i>A. baumannii</i> В-05		
<i>A. baumannii</i> Гар	Пациент отделения реанимации	
<i>Enterobacter</i> sp.	Пациенты клинико-диагностического центра	Культурально-морфологические, биохимические и масс-спектрометрические
<i>Enterobacter</i> sp.		
<i>Enterobacter</i> sp.		
<i>Enterobacter</i> sp.		
<i>Enterobacter</i> sp.		
<i>Enterobacter</i> sp.		
<i>Enterobacter</i> sp.		
<i>Enterobacter</i> sp.		
<i>Enterobacter</i> sp.		
<i>Enterobacter</i> sp.		
<i>C. jejuni</i> 36 (321)	Пациенты стационаров	Культурально-морфологические, биохимические
<i>C. jejuni</i> 11 (ЛП4)		
<i>C. jejuni</i> 1 (ATCC 11168)		

Окончание таблицы 3

Название штамма	Источник	Метод идентификации
<i>C. jejuni</i> 7 (B12)	Пациенты стационаров	Культурально-морфологические, биохимические, молекулярно-генетические и масс-спектрометрические
<i>C. jejuni</i> 2 (J12)		
<i>C. jejuni</i> 3 (J14)		
<i>C. jejuni</i> 6 (B14)		
<i>C. jejuni</i> 32 (П23)		
<i>C. jejuni</i> 40 (K105)		
<i>C. jejuni</i> 20 (ПК80)		
<i>C. jejuni</i> 12 (ЭЛ2)		
<i>C. jejuni</i> 21 (ПК87)		
<i>C. jejuni</i> 10 (П1)		
<i>C. jejuni</i> 44 (K30)		
<i>C. jejuni</i> 22 (ПК70)		
<i>C. jejuni</i> G12		
<i>C. jejuni</i> F3		
<i>C. jejuni</i> C8		
<i>C. jejuni</i> G1		
<i>C. jejuni</i> F12		
<i>S. aureus</i> Ts 39-15	Пациент отделения реанимации	Культурально-морфологические, биохимические, молекулярно-генетические и масс-спектрометрические
<i>S. aureus</i> Ts B 13/4-16	Пациенты стационаров	
<i>S. aureus</i> Ts B 10-16		
<i>S. aureus</i> Z 988-16		
<i>S. aureus</i> In 17-0916		
<i>S. aureus</i> R 116-14		
<i>S. aureus</i> Z 73-14		
<i>S. aureus</i> F 832-14		
<i>S. haemolyticus</i> F 1059-16	Пациенты стационаров	
<i>S. haemolyticus</i> G 58-0916		

2.2.5. Оценка цитотоксического действия

Клетки НЕК 293 (ATCC-CRL-1573) засевают в 96-луночный планшет из расчета 45 000 клеток в лунке и культивируют в 100 мкл среды DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамина и смеси антибиотиков пенициллина (50 Ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) до конfluenceности монослоя 80-90 % в течение суток при +37°C, в увлажненной атмосфере с содержанием 5 % CO₂. После из лунок с клетками удаляют среду и вносят 50 мкл растворов с разведениями эндолизина в среде DMEM, концентрации белка составляют от 2000 мкг/мл до 31,1 мкг/мл, каждую анализируют в трех повторностях. В качестве отрицательного контроля используют 50 мкл базовой среды DMEM, при анализе данных значения в данных

лунках принимают за 100 % (Y_{\max}). В качестве положительного контроля используют значения в лунках, содержащих 50 мкл 0,1 % раствора Тритон X-100, при анализе данных их принимают за 0 % (Y_{\min}).

Планшет инкубируют в течение 1 часа (при + 37 °С, 5 % CO₂), далее в лунки вносят по 50 мкл тетразолиевого красителя МТТ, растворенного в DMEM, чтобы его концентрация в лунке составила 0,5 мг/мл и инкубируют в течение еще 4 часов (при + 37 °С, 5 % CO₂). Далее из лунок планшета удаляют всю жидкость и добавляют по 100 мкл диметилсульфоксида и измеряют OD₅₇₀. Долю живых клеток в каждой лунке для каждой концентрации препарата вычисляют, используя следующую формулу:

$$ЖС = (Y_{об} - Y_{мин}) / (Y_{макс} - Y_{мин}), \quad (2)$$

где ЖС – жизнеспособность, % живых клеток;

$Y_{об}$ – значение OD₅₇₀ в конкретной лунке для образца;

$Y_{макс}$ – среднее значение OD₅₇₀ в лунках с контролем клеток (среда DMEM);

$Y_{мин}$ – среднее значение OD₅₇₀ в лунках с 0,1 % Тритон X-100, контроль мертвых клеток.

2.2.6. Оценка гемолитического действия

Свежую гепаринизированную кровь центрифугировали (500g, 4°С, 10 мин) для осаждения эритроцитов. Осадок трижды отмывали в PBS и готовили 10% суспензию эритроцитов в PBS. В пробирках смешивали в соотношении 1:1 раствор LysECD7 (конечная концентрация 100 мкг/мл и 1 мг/мл), Тритон X-100 (конечная концентрация 0,1%) в качестве положительного контроля или PBS в качестве отрицательного контроля с 10% суспензией эритроцитов. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Смеси инкубировали в течение 1 часа при 37°С, центрифугировали 10 мин при 500g, 4°С и измеряли оптическую плотность супернатанта (OD₄₀₅) для оценки выхода гемоглобина из клеток. Процент гемолиза рассчитывали по формуле:

$$\text{Гемолиз, \%} = (OD_{об} - OD_{PBS}) / (OD_{Тритон} - OD_{PBS}), \quad (3)$$

где Гемолиз, % - процент гемолиза;

OD_{об} – среднее значение OD₄₀₅ опытного образца;

OD_{PBS} – среднее значение OD₄₀₅ отрицательного контроля (PBS);

OD_{Тритон} – среднее значение OD₄₀₅ положительного контроля (0,1% Тритон X-100) [66, 120].

2.2.7 Оценка действия в отношении представителей нормальной микрофлоры

Для исследования действия эндолизина в отношении представителей нормальной микрофлоры использовали штаммы бифидо- и лактобактерий: *Bifidobacterium bifidum* OV-19, *Bifidobacterium bifidum* 79, *Bifidobacterium longum* OV-20, *Bifidobacterium longum* Я-3, *Bifidobacterium longum* В379М, *Bifidobacterium breve* OV-12, *Bifidobacterium adolescentis* ГО-13, *Bifidobacterium infantis* 73-15, *Lactobacillus helveticus* НК-1, *Lactobacillus casei* КНМ-12, *Lactobacillus helveticus/casei* КЗШ24, депонированные в коллекции ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. Для выращивания культур бактерий использовали среду для выращивания и выделения бифидобактерий, сухая, производства ГНЦ ПМБ г. Оболенск, для лактобацилл – МРС-2, ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.

Лиофильно высушенные культуры регидратировали 1 мл стерильной среды в ампулу, отбирали полученную суспензию и готовили предельные десятикратные разведения. Посевы инкубировали 24 часа при температуре $+37,5\pm 1^\circ\text{C}$, получая при этом первую генерацию. Выросшие колонии дважды пересевали в свежую среду, получая при этом вторую и третью генерации. Четвертую генерацию выращивали на поверхности агаризованных сред в анаэроостате и переносили культуры в стерильный физраствор, готовя суспензию по стандарту мутности МакФарланда 5,0. Далее делали 50-кратные разведения в 20 мМ Трис-НСI буфере рН 7,5 и разливали по 9 мл в стерильные пробирки, к каждой из которых добавляли по 1 мл раствора эндолизина с концентрацией 1 мг/мл (конечная концентрация 100 мкг/мл) или контрольный 20 мМ Трис-НСI буфер.

Смеси инкубировали 30 минут при $+37,5\pm 1^\circ\text{C}$ и готовили десятикратные разведения в питательной среде, которые инкубировали 48 часов при температуре $+37,5\pm 1^\circ\text{C}$. Предварительный подсчет выросших колоний проводили через 24 часа, окончательный – через 48 часов. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

2.2.8. Оценка нейтрализующего эффекта специфических антител

Иммунизация кроликов и оценка титра специфических антител в сыворотке

Иммунизация двух кроликов проводилась путем введения 250 мкг эндолизина LysECD7 за один раз с промежутками 10-14 дней, первый подкол с полным адьювантом Фрейнда, далее – с неполным. В качестве контроля использовали кроликов, получавших адьювант без добавления белка. После 8 иммунизаций в течение 3 месяцев производили забор крови, отделяя сыворотку.

Титр специфических антител в сыворотке крови определяли методом непрямого твердофазного ИФА. Для этого в лунках планшета сорбировали по 0,2 мкг белка в карбонат-бикарбонатном буфере рН 9,3-9,6 на термошейкере в течение 90 минут при 37°C, 600 об/мин. После удаления несвязавшегося антигена, блокировали лунки в течение 1 часа с помощью 10 мМ раствора PBS с добавлением 0,1% БСА. Далее лунки промывали PBS буфером, содержащим 0,1% Твин-20, вносили 10-краткие разведения сывороток в буфере PBS с добавлением 0,1% БСА и 0,1% Твин-20 или чистый буфер в качестве отрицательного контроля и инкубировали 1 час при 37°C, 600 об/мин. Несвязавшиеся антитела сыворотки трехкратно отмывали PBS с 0,1% Твин-20 и затем добавляли по 100 мкл 1:25000 разведения антивидового пероксидазного конъюгата (anti-Rabbit-HRP), исходная концентрация антивидовых антител 0,7 мг/мл, и инкубировали в течение 30 мин. По истечении времени лунки планшета промывали 5 раз, добавляли по 100 мкл тетраметилбензидина, инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 5-10 минут и вносили 50 мкл 10% H₂SO₄ для остановки реакции. В полученных растворах измеряли оптическую плотность OD₄₅₀.

Хроматографическая очистка специфических антител

Для выделения специфических антител из гипериммунной сыворотки подготавливали аффинный сорбент путем конюгации эндолизина LysECD7 с аминоэтилсефарозой. Для этого уравновешенный буфером 50 мМ MES рН 5,5, 150 мМ NaCl сорбент инкубировали при комнатной температуре в течение 16-18 часов с 20 мг/мл раствором эндолизина в том же буфере с добавлением 200 мкг/мл 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Затем добавляли 25-30 мМ Трис-HCl рН 7,5 для связывания свободных участков и уравновешивали буфером, представляющим собой PBS с добавлением 500 мМ NaCl и 0,1% NaN₃.

Далее на подготовленную колонку с сорбентом наносили сыворотку, промывали тем же буфером и элюировали ацетатным буфером (100 мМ CH₃COOH, 500 мМ NaCl рН 2,5-2,8), собирая фракции элюата. Выделенные антитела переводили в PBS буфер с помощью гель-фильтрации и концентрировали в центрифужном концентраторе Amicon Ultra-15 (Millipore) с размером пор 3 кДа. Титр полученных антител измеряли методом непрямого твердофазного ИФА аналогично пункту 3.4.5.1, а концентрация была измерена спектрофотометрически при 280 нм.

Изучение антибактериальной активности LysECD7 в присутствии гипериммунных сывороток

Для изучения ингибирующего влияния гипериммунных сывороток 20 мкл раствора LysECD7 инкубировали с 80 мкл сывороток иммунизированных и контрольных животных в

течение 10 минут в термостате при 37°C [42, 121, 122]. В качестве отрицательного контроля вместо белка использовали 20 мкл буфера Трис-НСl pH 7,5, а в качестве положительного – белок с добавлением PBS вместо сыворотки. Конечная концентрация эндолизина составила 100 и 500 мкг/мл. После инкубации смесей к образцам добавляли по 100 мкл суспензии *A. baumannii* Ts 50-16 и проводили эксперимент согласно пункту 2.1. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

Изучение антибактериальной активности LysECD7 в присутствии специфических антител

Для оценки нейтрализующего действия специфических антител 50 мкл эндолизина с конечной концентрацией 50 мкг/мл инкубировали с 50 мкл раствора антител в различных массовых соотношениях (1:1, 1:2 и 1:5) в течение 10 минут в термостате при 37°C. В качестве отрицательного контроля вместо белка использовали 50 мкл 20 мМ Трис-НСl буфера pH 7,5, а в качестве положительного – белок с добавлением PBS вместо антител. После инкубации смесей к образцам добавляли по 100 мкл суспензии *A. baumannii* Ts 50-16 и проводили эксперимент согласно методике п.2.1. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

2.3. Изучение механизма действия

2.3.1. Оценка пермебилизирующей активности

Бактериальную культуру *A. baumannii* Ts 50-16 подращивали до экспоненциальной фазы роста ($OD_{600}=0,6$), осаждали центрифугированием (6000 g, 10 мин), ресуспендировали в буферном растворе 20 мМ Трис-НСl, pH 7,5 и разбавляли до 10^6 КОЕ/мл. Полученную бактериальную суспензию смешивали 1:1 с раствором эндолизина в конечных концентрациях 0,01, 0,1 и 1 мкг/мл, 0,1 мМ раствором ЭДТА, раствором БСА 1 мкг/мл или 20 мМ Трис-НСl, pH 7,5, и инкубировали смеси в течение 30 мин при 37°C.

После инкубации к смесям добавляли 6 мМ этидия бромида (EtBr) и сразу же измеряли флуоресценцию комплекса EtBr с нуклеиновыми кислотами при длинах волн возбуждения и эмиссии, соответственно, 545 и 600 нм (FluoroMax®-4 and FluoroMax®-4P, HORIBA Scientific, США) [123]. Длина оптического пути составляла 1 см.

Параллельно проводили эксперимент в таких же условиях для высевов на выживаемость бактерий по п.2.1. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

2.3.2. Оценка взаимодействия с ЛПС

Анализ взаимодействия эндолизина с ЛПС проводили с использованием препарата «Пирогенал», представляющим собой раствор ЛПС *P. aeruginosa* в PSB в концентрации 100 мкг/мл.

Эндолизин LysECD7 в количестве 2,5 мкг инкубировали с раствором ЛПС в массовом соотношении белок:ЛПС 10:1, 5:1 и 1:1 в течение 3 часов при комнатной температуре [120], затем центрифугировали образцы (16000 g, 10 мин) и наносили в лунки 16% ПААГ. Денатурирующий электрофорез проводили согласно методике 1.2.3. «Электрофорез в полиакриламидном геле».

Антибактериальную активность LysECD7 в концентрации 5 мкг/мл после инкубации с ЛПС в соотношении белок:ЛПС 5:1, 1:1 и 1:5 в течение 1 часа при комнатной температуре проводили согласно методике 2.1.

2.3.3. Оценка взаимодействия с ПГ

Выделение пептидогликана E. coli M15

Взаимодействие с пептидогликаном проводили на выделенном препарате ПГ *E. coli* штамма M15. Для этого в 1 л LB выращивали культуры клеток с оптической плотностью $OD_{600}=0,6$ и осаждали центрифугированием (6000 g, 4 °C, 20 мин). Клеточный осадок ресуспендировали в 20 мл ледяной воды, медленно добавляли к тому же объему кипящего 8% ДСН и кипятили в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Лизат клеток охлаждали, перемешивая при комнатной температуре, и осаждали ПГ центрифугированием 130 000 g, 1 ч (Optima XPN-100, Beckman Coulter). Затем осадок вновь ресуспендировали в 20 мл воды и кипятили с 20 мл 8% ДСН еще 15 мин. Полученный осадок трижды отмывали в 20 мл воды и ресуспендировали в 10 мл воды. К суспензии добавляли буферный раствор Трис-НСl (рН 7,5) до концентрации 10 мМ и 1 мг трипсина, инкубировали 45 мин при комнатной температуре, и осаждали ПГ при 130 000 g, 1 ч. Образец снова кипятили 15 мин в эквивалентном объеме 8% ДСН, четырежды отмывали 20 мл воды и ресуспендировали конечный осадок ПГ в 2 мл воды [124, 125].

Для определения концентрации полученного ПГ измеряли оптическую плотность при длине волны 206 нм, что соответствует поглощению карбоксильных, сложноэфирных и пептидных групп в составе ПГ. В соответствии с калибровочной кривой, построенной по стандартному препарату ПГ *Micrococcus lysodeikticus* (Lysozyme Detection Kit, Sigma-Aldrich, США), была выявлена концентрация ПГ *E. coli* M15.

Изучение связывания ПГ с эндолизином

Анализ связывания с полученным ПГ проводили после инкубации 5 мкг эндолизина LysECD7 в соотношении с ПГ 10:1, 1:1, 1:10 и 1:20 полчаса при комнатной температуре с последующим осаждением пептидогликана центрифугированием (16000 g, 10 мин) [126]. Электрофоретическое исследование супернатанта проводили согласно методике 1.2.3. «Электрофорез в полиакриламидном геле».

Антибактериальную активность 10 мкг/мл LysECD7 после инкубации с ПГ в тех же условиях в соотношении 10:1, 1:1, 1:10 и 1:100 проводили согласно методике по п.2.1.

2.4. Оценка антибактериальной активности эндолизина LysECD7 *in vivo*

2.4.1. Раневая модель клебсиеллезной инфекции

Раневая модель клебсиеллезной инфекции была поставлена на беспородных мышах с использованием клинического изолята *K. pneumoniae* Ts 141-14 (депонирован в коллекции ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи»). Ранее было показано, что данный штамм чувствителен к исследуемому эндолизины в экспериментах *in vitro*.

В эксперименте участвовало 40 беспородных мышей с массой тела 20-22 г, которым за сутки до заражения удаляли шерстяной покров в области левого бока, после чего внутривенно вводили в две точки взвесь культуры *K. pneumoniae* Ts 141-14 с инфицирующей дозой 2×10^8 КОЕ/мышь. В месте укола формировался бубон. Через 24 ч после инфицирования происходило самопроизвольное вскрытие бубона с формированием открытой раневой поверхности, которую начинали лечить 100 мкл раствора эндолизина в концентрации 500 мкг/рану или контрольного 20 мМ Трис-НСl буферного раствора pH 7,5 каждые 24 часа в течение 5 дней согласно схеме эксперимента (Таблица 4).

Таблица 4 – Схема эксперимента по оценке действия LysECD7 на клебсиеллезной раневой инфекции мышей

Группа	Кол-во мышей	Доза заражения КОЕ/мышь	Препарат		Введение препарата
			Объем, мкл/мышь	LysECD7, мкг/мышь	
Контроль заражения	20	2×10^8	-	-	Без лечения
Контроль буфер	10	2×10^8	100	-	Пятикратно на поверхность раны
Лечение LysECD7	10	2×10^8	100	500	Пятикратно на поверхность раны

На 1, 3 и 7 дни после заражения проводили наблюдение за состоянием и размером раневой поверхности, а также измерение микробной нагрузки в ране. Смыть с раневой поверхности осуществляли ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором. Для этого по поверхности раны проводили 10 раз ватным тампоном и помещали его в пробирку, содержащую 1 мл физиологического раствора. Выдерживали 30 минут и проводили высеv на чашки с ГРМ-агаром (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) в объеме 100 мкл и инкубировали при температуре 37°C в течение 18 часов.

На 7 день методом CO₂-ингаляции проводили эвтаназию животных, извлекали кожный лоскут области раны и селезенку гомогенизировали их в ступке с 1 мл физиологического раствора и высевали по 100 мкл на плотную питательную среду ГРМ-агар с дальнейшим культивированием в течение 18 ч при температуре 37°C для оценки их обсемененности.

2.4.2. Ожоговая модель синегнойной инфекции

Ожоговая модель синегнойной инфекции была поставлена на крысах линии «Вистар» с использованием штамма *P. aeruginosa* Ts 38-16 (депонирован в коллекции ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи»). Ранее было показано, что данный штамм чувствителен к исследуемому эндолизину в экспериментах *in vitro*.

В эксперименте участвовало 50 крыс линии «Вистар» (самцы, 8-10 недель, вес 180-210 г), которым за сутки до заражения удаляли шерстяной покров. Термические ожоги III степени (все слои кожи до подкожной клетчатки) воспроизводили контактным высокотемпературным способом с использованием металлической пластины на правом боку животных под наркозом. К депилированному участку кожи на 4 сек прикладывали разогретую до 300°C медную пластину (площадь поверхности 150 мм²). Для восстановления водно-электролитного баланса после ожогового стресса подкожно вводили 1 мл физиологического раствора. Через 5 минут на поверхность раны наносили 100 мкл суспензии *P. aeruginosa* в дозе $3,5 \times 10^{10}$ КОЕ/крысу.

Через 24 ч после инфицирования начинали лечить ожоговую инфекцию нанесением 100 мкл раствора эндолизина в концентрации 2500 мкг/рану или контрольного 20 мМ Трис-НСl буфера pH 7,5 каждые 24 часа в течение 5 дней согласно схеме эксперимента (Таблица 5).

Таблица 5 – Схема эксперимента по оценке действия ФС эндолизина LysECD7 в отношении синегнойной раневой (ожоговой) инфекции у крыс линии «Вистар»

Группа	Кол-во животных	Доза заражения КОЕ/крысу	Препарат		Введение препарата
			Объем мкл/крысу	LysECD7, мкг/крысу	
Контроль ожога без заражения	10	$3,5 \times 10^{10}$	-	-	Без лечения
Контроль заражения	20	$3,5 \times 10^{10}$	-	-	Без лечения
Контроль буфера	10	$3,5 \times 10^{10}$	100	-	Пятикратно на поверхность раны
Лечение LysECD7	10	$3,5 \times 10^{10}$	100	2500	Пятикратно на поверхность раны

При оценке действия эндолизина на ожоговой модели синегнойной инфекции на 1, 3 и 7 сутки изучали патоморфологические изменения ожоговой поверхности и ее площадь (с помощью программного обеспечения ImageJ), а также микробную нагрузку в области ожога. Смывы с ожоговой поверхности осуществляли ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором. Для этого по поверхности раны проводили 10 раз ватным тампоном и помещали его

в пробирку, содержащую 1 мл физиологического раствора, выдерживали 30 минут и проводили высеив на чашки с ГРМ-агаром в объеме 100 мкл и инкубировали при температуре 37°C в течение 18 часов.

На 7 день методом CO₂-ингаляции проводили эвтаназию животных, извлекали кожный лоскут области ожога и селезенку, гомогенизировали их в ступке с 1 мл физиологического раствора и высевали по 100 мкл на плотную питательную среду ГРМ-агар с дальнейшим культивированием в течение 18 ч при температуре 37°C для оценки их обсемененности.

2.4.3. Модель имплант-ассоциированной инфекции

Модель имплант-ассоциированной инфекции была проведена на беспородных крысах с использованием клинического изолята *K. pneumoniae* Ts 141-14 (депонирован в коллекции ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи»). Ранее было показано, что данный штамм образует плотные бактериальные биопленки, чувствительные к исследуемому эндолизину в экспериментах *in vitro*.

В эксперименте участвовало 30 беспородных крыс (самцы, 4 месяца, вес 250-270 г), 3 из которых участвовали в предварительном опыте по оценке биопленкообразования, а 27 – в основном по оценке эффективности применения ФС эндолизина. В брюшную полость животным под общим наркозом имплантировали диффузионную камеру, наполненную 200 мкл бактериальной культуры *K. pneumoniae* Ts 141-14 с концентрацией бактерий ~ 5×10⁸ КОЕ/мл. Диффузионные камеры, представляющие собой герметично замкнутые емкости с внутренней полостью объемом 380-400 мм³, были выполнены из акрилового каркаса и нитроцеллюлозной пористой мембраны с эквивалентным диаметром пор 150 нм, которая имела эффективную площадь 150-170 мм². Герметичность камеры не позволяла бактериальным клеткам покидать пределы камеры после имплантации в организм животного.

На 4 день эксперимента, когда внутри камер сформировались плотные бактериальные биопленки, а состояние животных еще не ухудшилось, группы крыс получали внутрибрюшинное лечение раствором эндолизина в количестве 50 мкг/животное, амикацина в количестве 7,5 мг/кг в качестве положительного контроля или буферным раствором стерильного 20 мМ Трис-НС1 буфера рН 7,5 в качестве отрицательного контроля. Лечение проводили ежедневно в течение 7 дней согласно схеме эксперимента (Таблица 6).

Таблица 6 – Схема основного эксперимента по оценке действия ФС эндолизина LysECD7 в отношении клебсиеллезной имплант-ассоциированной инфекции у беспородных крыс

Группа	Количество животных	Препарат		Введение препарата
		Объем мкл/крысу	ФС, мкг/крысу	
Контроль буфер	9	500	-	Внутрибрюшинно пятикратно в область камеры
Контроль амикацин	9	500	2500	Внутрибрюшинно пятикратно в область камеры
Лечение LysECD7	9	500	50	Внутрибрюшинно пятикратно в область камеры

Для оценки показателей биопленкообразования по 3 животных из каждой группы подвергали эвтаназии с последующим вскрытием и извлечением диффузионной камеры на второй, пятый и восьмой день после начала лечения.

После извлечения диффузионных камер каждую камеру разделяли на составные части (каркас цилиндра с приклеенными частями мембран и два образца мембран диаметром 1 см) с использованием стерильных хирургических инструментов. Каждая составная часть камеры подвергалась трёхкратному промыванию в стерильном PBS с целью удаления планктонных бактерий.

Соскоб с половины внутренней поверхности каркаса камеры помещали в 1 мл PBS и обрабатывали ультразвуком при частоте 22 кГц и диапазоне излучаемой акустической мощности 75-110 Вт в течение 20 мин при комнатной температуре. Десятикратные разведения полученной суспензии высевали на агаризованную питательную среду CHROMagar Orientation (CHROMagar, Франция). Посевы инкубировали при температуре плюс 37 ± 1 °C в термостате 24 часа и проводили подсчеты характерных колоний.

Каркас камеры после удаления половины образовавшейся биопленки окрашивали 3 мл 1% раствора кристаллического фиолетового в течение 10 минут при комнатной температуре с последующей трёхкратной промывкой раствором PBS. Связавшийся с биопленкой краситель

растворяли в 3 мл смеси этилового и изопропилового спиртов 1:1, и измеряли оптическую плотность OD_{595} образца объемом 200 мкл.

2.5. Статистическая обработка данных

Построение графиков и статистическая обработка данных проводилась в программе GraphPad Prism 6. Используемые методы статистического анализа указаны под рисунками с соответствующими результатами.

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Получение субстанции эндолизина LysECD7 и ее стандартизация

3.1.1. Разработка подходов к получению субстанции эндолизина LysECD7

Анализ последовательности и создание генно-инженерной конструкции для экспрессии целевого белка

Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего эндолизин LysECD7, была целенаправленно найдена в составе полногеномной последовательности литического бактериофага семейства *Myoviridae* ECD7, поражающего клетки *Escherichia* (NCBI: txid1981499). Данный бактериофаг ранее был изолирован из культуры шигатоксин-продуцирующего штамма *E. coli* O104:H4 [127]. [5]. Известно, что родительский бактериофаг ECD7 обладает литическим действием по отношению к некоторым клинически значимым штаммам *E. coli*, а также *Shigella sonnei* и *Shigella flexneri* [128]. Тем не менее, эндолизин данного бактериофага ранее не был описан в научной литературе. Отсутствуют данные о том, что ранее он был получен в индивидуальном виде из фагового лизата бактерий или биотехнологическим путем через рекомбинантную ДНК. В составе баз данных последовательность, кодирующая LysECD7, числится как предположительно кодирующая белок. Результаты разработки технологии получения субстанции эндолизина LysECD7 вошли в публикации [129, 130].

На основе нуклеотидной последовательности была предсказана последовательность аминокислот, анализ которой с помощью BLAST [92] показал, что данный фермент представляет собой молекулу с одним каталитическим доменом, который обладает значительным сходством с цинк-зависимыми D-аланил-D-аланин карбоксипептидазами (пептидазы семейства M15), что позволяет отнести данный фермент к эндопептидазам. Однодоменная структура LysECD7 является характерной для эндолизинов, действующих в отношении грамотрицательных бактерий.

Также по аминокислотной последовательности с помощью электронного ресурса Protcalc (<http://protcalc.sourceforge.net/>) были рассчитаны основные теоретические характеристики эндолизина, включающего полигистидиновую метку на С-конце, необходимую для биотехнологического получения белка (Таблица 7).

Таблица 7 – Основные характеристики эндолизина LysECD7.

Аминокислотная последовательность	Количество аминокислот	Молекулярный вес	Изоэлектрическая точка	Коэффициент экстинкции
MFKLSQRSKDRLVGV HPDLVKVVHRALELT PVDFGITEGVRSLTQ KKYVAEGKSKTMKS RHLHGLAVDVVAYP KDKDTWNMKYYRMI ADAFKQAGRELGVSV EWGGDWVSFKDGVH FQLPHSKYPDPKLEH NNNNNNN	139	16,1 кДа	9,40	1,4595 (мг/мл) ⁻¹ см ⁻¹

Кодирующая LysECD7 нуклеотидная последовательность была получена синтетическим путем в коммерческом векторе pAL-TA (Евроген, Россия) и далее, с использованием рекомбинантных технологий, помещена в экспрессионную кассету pET42b (+), содержащую последовательность, кодирующую С-концевую 8-гистидиновую метку.

Таким образом, была получена генно-инженерная конструкция на основе вектора pET42b (+), кодирующая последовательность рекомбинантного эндолизина LysECD7 для дальнейшей экспрессии рекомбинантного фермента в системе *E. coli*. С-концевая 8-гистидиновая метка была добавлена в структуру рекомбинантного белка для очистки с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии.

Получение культур-продуцентов растворимого эндолизина LysECD7 на основе клеток E. coli штамма BL21(DE3)pLysS

Для полученного экспрессионного вектора pET наиболее подходящим штаммом-продуцентом является штамм *E. coli* BL21 и его производные штаммы. Более того, экспрессионная система «вектор pET- *E. coli* BL21» очень часто встречается в литературе при получении рекомбинантных эндолизинов. Нами был выбран штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS, так как он способен обеспечить стабильную экспрессию целевого белка с высоким выходом, а также подходит для экспрессии потенциально токсичных для продуцента белков, к которым можно отнести эндолизины. Кроме того, данный штамм, обладающий устойчивостью к хлорамфениколу, позволяет более строго контролировать экспрессию белков под T7

промотором. При индукции синтетическим аналогом лактозы - ИПТГ, промотор преодолевает ингибирующий эффект белка-репрессора, запускается транскрипция *lac*-оперона и происходит экспрессия необходимого белкового продукта.

Методом высокоэффективной трансформации по методу «heat shock» по протоколу производителя компетентных клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS получили индивидуальные колонии продуцента рекомбинантного LysECD7 на чашках Петри с агаризованной селективной питательной средой. Затем была проведена пробная индукция бактериальной культуры нескольких клонов в жидкой среде в конических колбах Эрленмейера для проверки наличия экспрессии целевого белка. Индукцию проводили в стандартных условиях для культивирования клеток *E. coli*: питательная среда LB, отношение объема жидкой культуры к объему колбы 1:5, температура культивирования - 37°C, скорость перемешивания при культивировании – 250 об/мин, индукция - 1 мМ ИПТГ.

Известно, что оптимальной для начала индукции экспрессии белков в колбах является логарифмическая фаза роста, при которой оптическая плотность бактериальной культуры достигает $OD_{600} = 0,55-0,65$ ед. Было показано, что, после разбавления ночной культуры свежей питательной средой в соотношении 1:100, культура продуцентов достигала необходимой плотности в течение 3 часов. Далее для индукции экспрессии эндолизина в культуральную среду добавляли ИПТГ в концентрации 1 мМ, и проводили дальнейшее культивирование при постоянном перемешивании в течение 3-4 часов. Динамика роста культуры-продуцента эндолизина представлена на Рисунке 9.

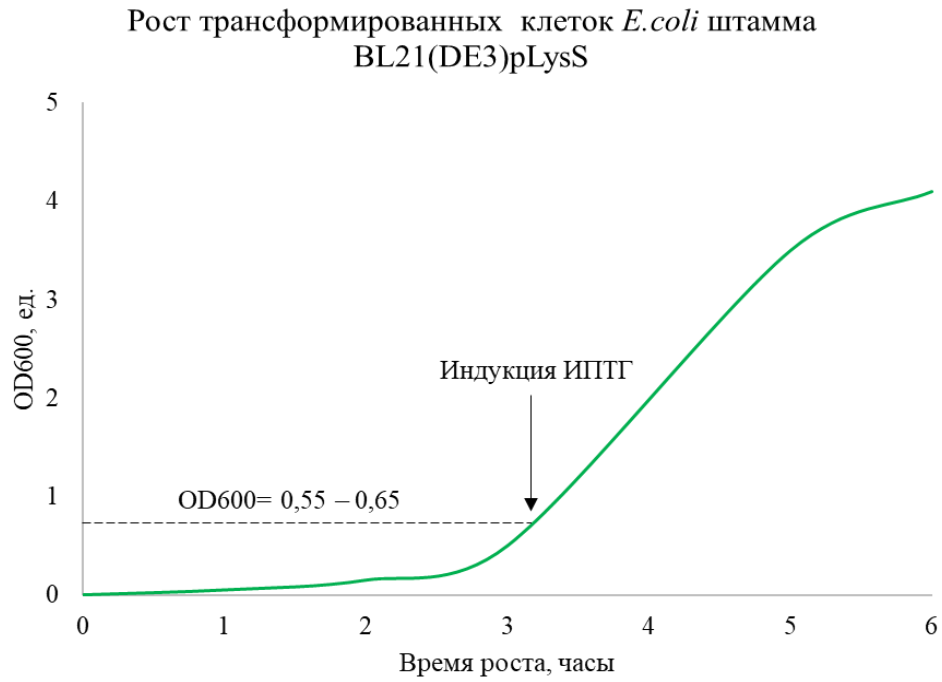


Рисунок 9 – Кривая роста клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS, несущего экспрессионный вектор pET42b (+), кодирующий последовательность рекомбинантного эндолизина LysECD7

Далее проводили осаждение клеток с помощью центрифугирования и изучали пробы культур двух клонов до и после индукции на наличие полосы с нужным молекулярным весом (16,1 кДа) с помощью денатурирующего электрофореза в 16% полиакриламидном геле (Рисунок 10А).

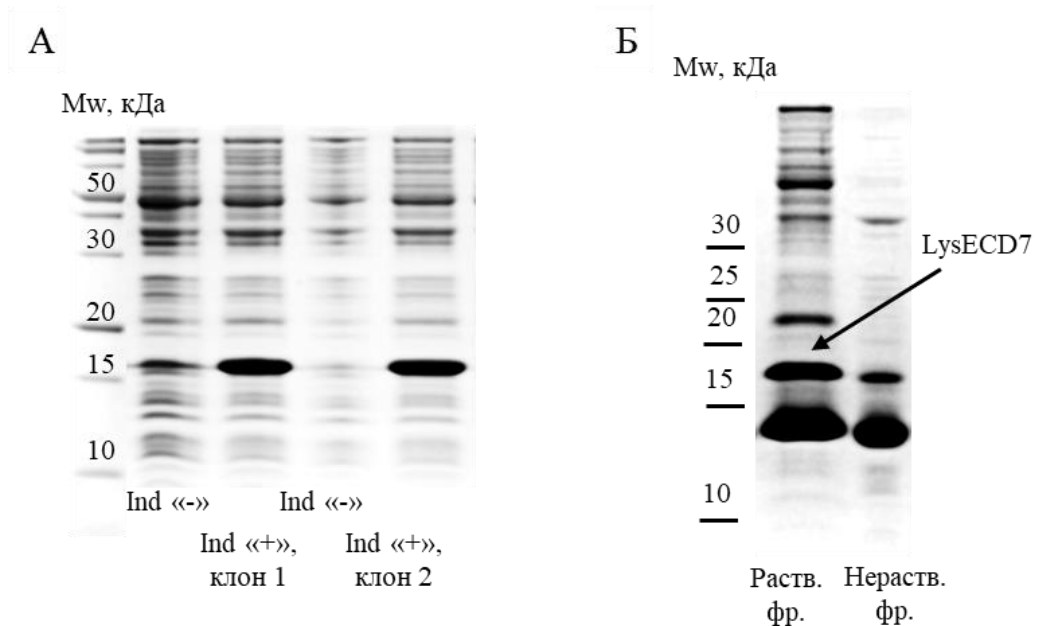


Рисунок 10 – А. Электрофореграмма образцов клеток-продуцентов двух клонов, экспрессирующих рекомбинантный LysECD7. Б. Электрофореграмма растворимой

(супернатант) и нерастворимой (осадок) фракций LysECD7 после пробного лизиса индуцированных клеток E. coli (Mw-маркер молекулярных весов)

Было показано наличие экспрессии целевого белка в обоих случаях без визуальных различий в количестве экспрессируемого продукта. В дальнейшем работали с первым клоном *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS.

Далее была проведена оценка растворимости полученного LysECD7 методом денатурирующего электрофореза в 16% полиакриламидном геле после пробного лизиса индуцированных клеток *E. coli* с помощью обработки суспензии клеток лизоцимом с дальнейшим разрушением ультразвуком (Рисунок 10Б). Было показано, что большая часть LysECD7 находится в растворимой фракции лизата, с которой удобнее работать при очистке с целью получения активного фермента. Тем не менее, небольшая часть белка образует нерастворимые тельца включения, вероятно, из-за некоторой токсичности белка по отношению к продуценту. Таким образом, дальнейшая очистка проводилась из растворимой фракции клеточного лизата.

Оптимизация экспрессии эндолизина LysECD7 и масштабирование культур-продуцентов

В ходе дальнейшей работы была проведена оптимизация условий экспрессии рекомбинантного LysECD7 в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS для обеспечения оптимального выхода белка.

Культуру клеток подращивали до логарифмической фазы роста при 37°C и проводили индукцию экспрессии целевого белка в течение 4 часов в конических колбах Эрленмейера с вариацией следующих условий:

- температура индукции – 25°C, 30°C, 37°C;
- концентрация индуктора – 0,1 мМ, 0,5 мМ и 1 мМ ИПТГ;
- внесение индуктора в начале, середине или в конце логарифмической фазы роста.

Затем проводили осаждение клеток с помощью центрифугирования и изучали пробы культур до и после индукции, а также растворимые фракции лизатов с помощью денатурирующего электрофореза в 16% полиакриламидном геле.

Было показано, что оптимальными условиями индукции являются 37°C и концентрация индуктора ИПТГ 0,5 мМ при внесении в середине логарифмической фазы роста при оптической плотности при 600 нм от 0,6 до 1,0 ед. Концентрация ИПТГ 0,1 мМ была недостаточна для полного синтеза белка, а увеличение от 0,5 мМ до 1,0 мМ не сказывалось на конечной экспрессии белка, однако концентрация 1,0 мМ приводила к более быстрому включению белка в тельца включения, что снижало его растворимость.

Для получения рекомбинантного LysECD7 в количествах, достаточных для разработки ФС на его основе и изучения его активности в экспериментах на животных, было проведено масштабирование процесса получения.

Для этого биомассу штамма-продуцента получали культивированием в ферментере BioFlo 415 с использованием параметров, полученных для культивирования в колбах Эрленмейера. В ходе процесса ферментации проводилось обогащение среды глюкозой, используемой в качестве источника углерода, что увеличивает выход биомассы, а также велось рН-статирование 10% едким натром. Еще до индукции плотность культуры, измеряемую по оптической плотности при 600 нм, удалось увеличить до 5 – 7 ед. (для сравнения в колбах максимальная оптическая плотность на этом этапе не превышала 1 ед). Далее вносили ИПТГ в концентрации 0,5 мМ и продолжали инкубировать культуру еще 1-2 часа. Об окончании процесса судили по увеличению показателей рН и DO, а также по прекращению роста биомассы. Оптическая плотность на конец ферментации составляла 9 – 10,5 ед. По окончании ферментации культуральную жидкость центрифугировали и подтверждали успешность экспрессии и растворимость экспрессированного белка с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Профиль полученных на электрофореграмме белков до и после индукции, а также соотношение растворимой и нерастворимой фракций LysECD7, полученных при культивировании в ферментере, соответствовала данным, полученным в колбах Эрленмейера. Однако, выход при культивировании в ферментере составлял 11-13 г биомассы/л, что значительно выше, чем в случае культивирования в колбах Эрленмейера (3-4 г/л).

Оптимизация разрушения клеточных биомасс

Для получения рекомбинантного эндолизина LysECD7 из биомассы клеток-продуцентов необходимо провести лизис клеточной биомассы. Опытным путем было установлено, что оптимальное по эффективности разрушение клеточного материала можно провести, если замороженную биомассу продуцентов рекомбинантных белков ресуспендировать в 20-кратном по объему избытке ледяного лизирующего буфера (1 г биомассы в 20 мл буфера), разрушить биомассу оптимальным методом и затем провести однократную заморозку и разморозку лизата.

В качестве методов для разрушения биомассы использовали обработку ультразвуком и лизис с использованием френч-пресса. В первом случае ресуспендированную клеточную биомассу инкубировали с лизоцимом и затем обрабатывали ультразвуком при постоянном охлаждении пробы на льду. Этот способ является оптимальным для небольших количеств биомассы.

Однако, при работе с большими количествами клеток-продуцентов становится затруднительным разрушение биомассы вышеописанными методами. Более того, в ходе обработки ультразвуком происходит значительное нагревание раствора, что может сказаться на активности эндолизина. Разрушение биомассы клеток-продуцентов с помощью гомогенизатора APV 2000 (клеточный сепаратор типа френч-пресс) способствовало быстрой гомогенизации клеток без повышения температуры раствора и позволило эффективно разрушать большие количества клеточной биомассы. Этот способ является более технологичным и масштабируемым.

Оптимизация процесса очистки рекомбинантного эндолизина LysECD7 и получение субстанции

Очистку целевого белка проводили в несколько этапов. Наличие полигистидиновой метки позволило провести металл-хелатную аффинную хроматографию на колонке, упакованной сорбентом GE Ni-Sepharose HP.

Аффинная хроматография отличается чрезвычайно высокой избирательностью. В данном случае молекулы белка, за счет наличия в их структуре 8-гистидиновой метки, обратимо связываются с ионами Ni^{2+} , а все нежелательные примеси оказываются во фракциях, не связавшихся с колонкой.

В ходе первого этапа очистки размороженный и осветленный лизат смешивали с 30 мМ имидазола для уменьшения неспецифического связывания примесей с сорбентом и 1 мМ $MgCl_2$ для нейтрализации ЭДТА, и наносили под давлением с постоянной скоростью потока на предварительно уравновешенную колонку. Это позволило связать сорбент с молекулами эндолизинов из лизата, в то время как большинство прочих компонентов прошло через сорбент без взаимодействия с ним. После отмывки неспецифически связавшихся компонентов лизата, фракции целевого белка элюировали с сорбента с помощью буфера с высокой концентрацией имидазола, в ходе чего происходит вытеснение молекул белка из комплекса с никелем.

Следует отметить, что проведение всех этапов очистки, в том числе хроматографии, при пониженной температуре является важным условием при получении ферментов, в том числе, эндолизинов. Длительное воздействие комнатной или повышенных температур может привести к значительному снижению их стабильности, к их агрегации и, как следствие, снижению или даже полной потере антибактериальной активности. Обычно для этого все процедуры проводят в холодной комнате, в холодильнике или же на льду.

Второй стадией очистки стала гель-фильтрация (гель-эксклюзионная хроматография, ГФХ), в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности

проникать в поры неподвижной фазы, что позволяет избавиться от нежелательных примесей большего и меньшего размера, таких как агрегаты белка или избыток солей.

Данный этап проводили с использованием сорбента Superdex 75. Для этого, объединенные после первой стадии хроматографии фракции целевого белка, наносили на колонку, предварительно уравновешенную 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5 буферным раствором. В первую очередь с колонки сходят высокомолекулярные агрегаты, затем фракция целевого эндолизина, а в конце элюируются примеси и низкомолекулярные вещества. Помимо очистки на этом этапе происходит смена буферного раствора на бессолевой 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, что важно для конечной активности LysECD7.

Полученные в ходе очистки хроматограммы и электрофореграмма эндолизина приведены на Рисунке 11.

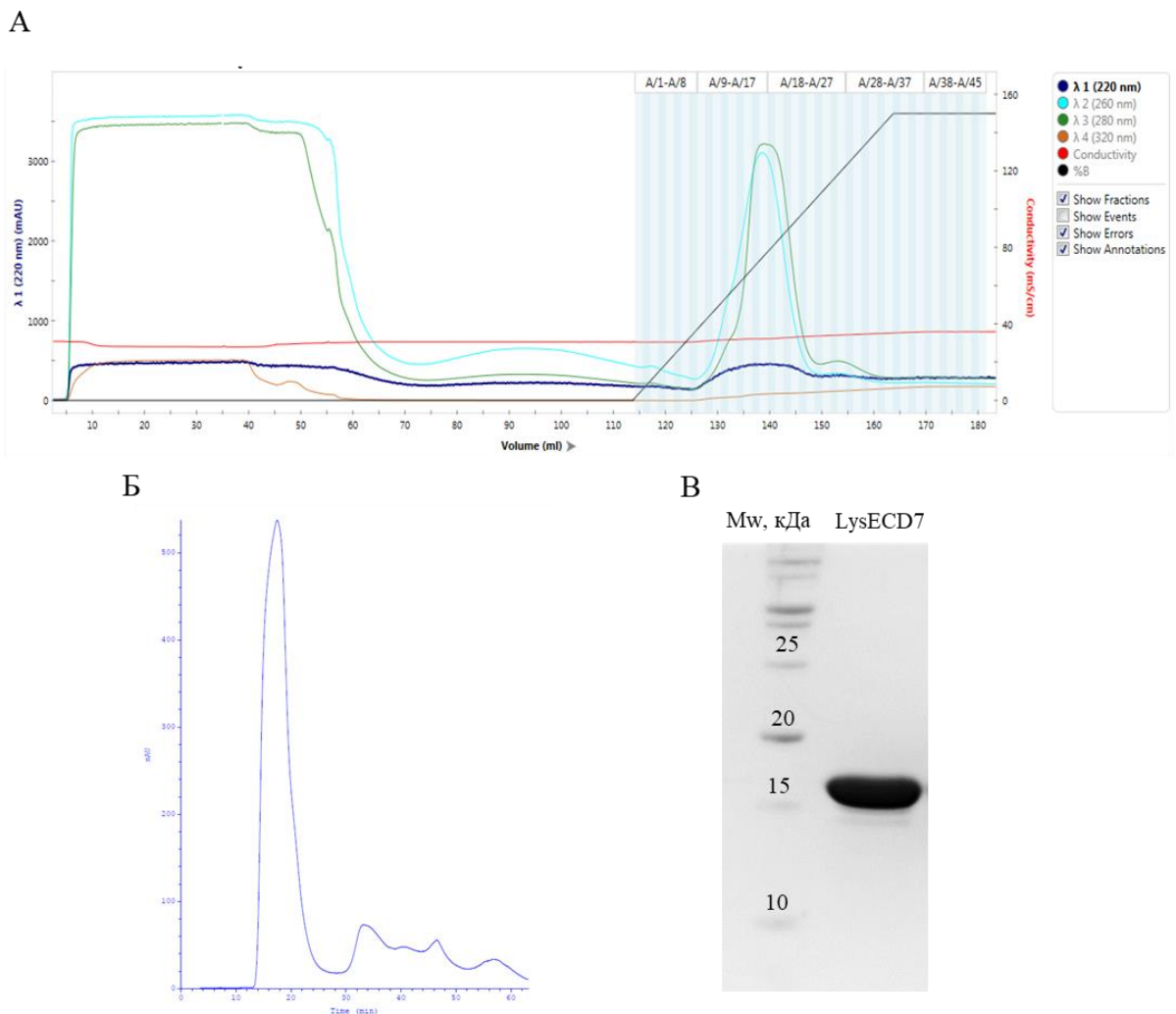


Рисунок 11 – А. Хроматограмма, полученная в ходе первого этапа очистки. Б. Хроматограмма, полученная в ходе второго этапа очистки. В. Электрофореграмма полученного эндолизина LysECD7

Как видно из представленных данных, двухэтапная очистка обеспечивает необходимую чистоту целевого продукта. На представленной электрофореграмме присутствуют полосы примесей, но их концентрация незначительна.

Концентрацию полученного раствора белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм с учетом теоретического коэффициента экстинкции, и было показано, что выход белка составляет 15-20 мг/г клеток.

Далее полученный раствор эндолизина подвергали мембранной стерилизации, для чего пропускали раствор через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм в асептических условиях. Таким образом, в итоге была получена субстанция эндолизина LysECD7, представляющая собой стерильный раствор белка в 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5.

По результатам исследований, в итоговую лабораторную технологию получения субстанции эндолизина LysECD7 были включены этапы, представленные на Рисунке 12.



Рисунок 12 – Схема технологии получения субстанции эндолизина LysECD7

Данная технология обеспечивает воспроизводимый результат при получении различных опытных партий исследуемой субстанции.

Оценка стабильности субстанции рекомбинантного эндолизина LysECD7

Для полученной субстанции эндолизина LysECD7 была проведена оценка стабильности в растворе. Использование метода динамического лазерного светорассеяния позволяет изучить гидродинамический радиус частиц в растворе. Радиус частиц в растворе при комнатной температуре составляет $3,94 \pm 1,33$ нм, при этом отсутствуют частицы другого размера. Это говорит о том, что LysECD7 находится в растворе в виде мономеров и не образует агрегаты (Рисунок 13А).

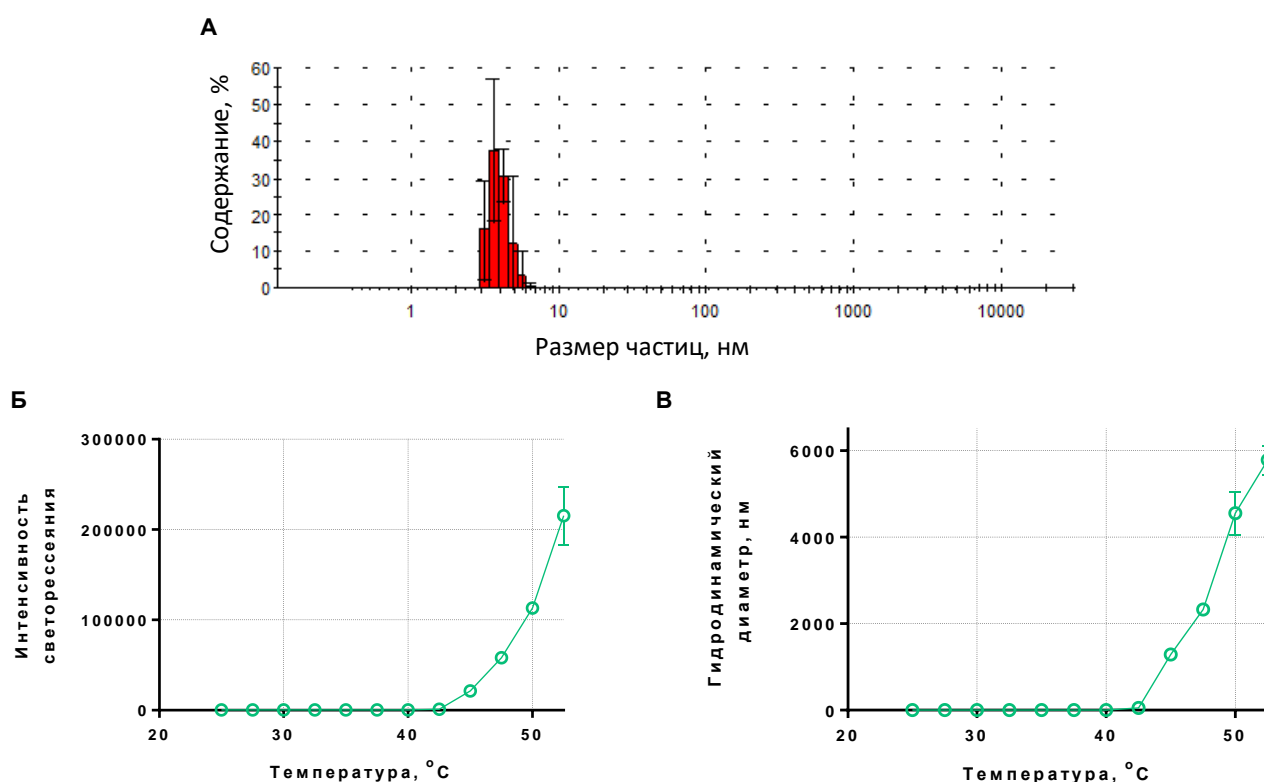


Рисунок 13 – Оценка стабильности субстанции LysECD7 в растворе. А. Динамическое лазерное светорассеяние в растворе белка. Б. Зависимость интенсивности светорассеяния от температуры. В. Зависимость гидродинамического диаметра частиц в растворе от температуры. Адаптировано из [130]

Температурная стабильность раствора эндолизина была изучена с помощью измерения интенсивности светорассеяния и гидродинамического радиуса частиц в растворе (Рисунок 13Б,

13В). Наблюдаемые резкие повышения данных параметров при температуре 42,5°C говорят о начале агрегации белка. Следовательно, раствор LysECD7 не обладает выраженной термостабильностью, а значит резкие скачки температуры могут отразиться на хранении субстанции. Тем не менее, соблюдение режима хранения позволит сохранить субстанцию в течение длительного промежутка времени.

Хранение раствора субстанции эндолизина LysECD7 при +2°C...+8°C показало, что субстанция сохраняет свои физико-химические и антибактериальные свойства в течение 1 месяца, что является приемлемым для пилотных испытаний активности *in vitro* и *in vivo*. В течение данного периода времени не наблюдалось явной деградации или агрегации белка (оценка внешнего вида раствора, оптическая плотность раствора при длине волны OD₆₀₀, результаты электрофореза в денатурирующих условиях), а также сохранялась антибактериальная активность субстанции в отношении модельного штамма *A. baumannii*. Дальнейшее хранение образцов в указанных условиях в течение 3 месяцев и более привело к деградации молекулы, что выражалось в отсутствии полосы с нужным молекулярным весом на электрофореграмме, а также в полной потере антибактериальной активности. Таким образом, для более длительного хранения раствора изучаемой субстанции необходима оптимизация состава раствора для хранения, например, смена буферной системы или добавление вспомогательных веществ и стабилизаторов (регуляторы тоничности, сурфактанты и др.) [88, 114].

Тем не менее, было показано, что лиофилизация раствора субстанции эндолизина LysECD7 приводит к увеличению стабильности и срока хранения в тех же условиях до 1 года. Полученные данные позволяют провести дальнейшую разработку нормативной документации на субстанцию и лекарственных средств на ее основе.

3.1.2. Разработка подходов к стандартизации субстанции эндолизина LysECD7

Лекарственные препараты, содержащие в качестве действующего вещества рекомбинантные эндолизины, можно отнести к биологическим лекарственным средствам [131], требования к испытаниям которых описаны в ОФС.1.7.1.0010.18 ГФ XIV «Биологические лекарственные препараты», ОФС.1.7.1.0011.18 ГФ XIV «Биотехнологические лекарственные препараты», а также ОФС.1.7.1.0007.15 ГФ XIV «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК».

На основе этих ОФС был предложен проект спецификации на субстанцию эндолизина LysECD7, включающий в себя следующие показатели: Описание, Подлинность, Примеси,

Стерильность, Бактериальные эндотоксины, Количественное определение, Упаковка, Маркировка, Хранение, Срок годности (Таблица 8).

Таблица 8 – Проект спецификации на субстанцию эндолизина LysECD7

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Прозрачный бесцветный раствор
Подлинность	ОФС.1.2.1.0023.15 «Электрофорез в полиакриламидном геле» ГФ XIV	Электрофоретическая подвижность субстанции в геле относительно белковых маркеров должна соответствовать ее молекулярному весу в диапазоне 16,0 – 18,0 кДа
	Специфическая антибактериальная активность	Значение бактерицидной активности должно быть не менее 90%
Примеси	ОФС.1.2.1.0023.15 «Электрофорез в полиакриламидном геле» ГФ XIV	Не менее 95%
Стерильность	ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» ГФ XIV	Отсутствие бактериального роста в питательной среде
Бактериальные эндотоксины	ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины» ГФ XIV	Содержание БЭ не должно превышать 5 ЕЭ/кг в 1 час
Количественное определение	ОФС.1.2.3.0012.15 «Определение белка» ГФ XIV	Концентрация белка должна быть не менее 1 мг/мл
Упаковка	В стеклянных флаконах по 1 мл, 5 мл, 10 мл, укупорка резиновым колпачком под обкатку алюминиевым колпачком	
Маркировка	В соответствии с НД	
Хранение	В защищенном от света месте при температуре +2°С...+8°С	
Срок годности	1 месяц	

Для контроля качества по вышеуказанным показателям были разработаны методики контроля качества, к которым относятся денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле, специфическая активность на тест-штамме, количественное определение действующего вещества колориметрическим методом, а также определение стерильности субстанции и содержания в ней бактериальных эндотоксинов. Контроль качества на трех опытных сериях

субстанции показал, что эти испытания воспроизводимы и обеспечивают соответствие субстанции требованиям спецификации.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Наличие полосы белка с молекулярным весом, соответствующим теоретическому весу мономера LysECD7 (16,1 кДа), было подтверждено с помощью вертикального денатурирующего электрофореза согласно методике ОФС.1.2.1.0023.15 «Электрофорез в полиакриламидном геле» ГФ XIV (Рисунок 11В), что подтверждает подлинность субстанции.

Более того, этот метод анализа позволяет сделать вывод и о чистоте субстанции, выявляя различные примесные белки с несоответствующим молекулярным весом, к которым можно отнести агрегаты белка, его укороченные формы, остаточные белки штамма-производителя и другие. С помощью анализа интенсивности окраски основной полосы белка и примесных полос на геле с помощью программного обеспечения Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories, США) было показано, что при получении субстанции LysECD7 по описанной технологии, чистота субстанции составляет более 95%, не содержит остаточных белков штамма-производителя в визуализируемых количествах и позволяет применять такие препараты для дальнейшей разработки лекарственных средств на основе эндолизина LysECD7.

Специфическая активность

Важным показателем качества эндолизина LysECD7 является его специфическая антибактериальная активность. Фармакопейная методика ОФС.1.2.4.0010.18 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар» ГФ XIV издания предлагает диско-диффузионный метод, основанный на определении зон угнетения роста тест-штаммов микроорганизмов на поверхности агаризованной питательной среды, подходит для изучения антибактериальных качеств эндолизинов. Однако этот метод не является достаточно информативными, поскольку говорит о способности веществ угнетать рост бактерий, то есть о бактериостатическом эффекте, однако механизм действия эндолизинов бактерицидный, поэтому этот метод может дать ложные представления об активности данной группы ферментов.

Поэтому для оценки качества субстанции LysECD7 был предложен метод оценки бактерицидного действия по снижению КОЕ модельного штамма при инкубации с эндолизином. В качестве модельного был выбран штамм *A. baumannii* Ts 50-16, представляющем собой клинический изолят, изолированный из мокроты пациента, идентифицированный по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам и депонированный в коллекции ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени

почётного академика Н. Ф. Гамалеи», так как этот штамм обладает оптимальными ростовыми свойствами на простых питательных средах, что обеспечивает быстрое проведение эксперимента. Более того, вид *A. baumannii* является представителем группы патогенов ESKAPE, что делает это использование в качестве модельного штамма крайне актуальным.

Активность оценивали при инкубации суспензии экспоненциально растущих клеток тест-штамма *A. baumannii* (10^5 - 10^6 КОЕ) и 100 мкг/мл LysECD7 в течение 30 минут. При последующем высеве смеси на чашки Петри с твердой питательной средой и инкубации в термостате было показано отсутствие роста бактерий, что говорит о 100% бактерицидной активности субстанции (Рисунок 14).

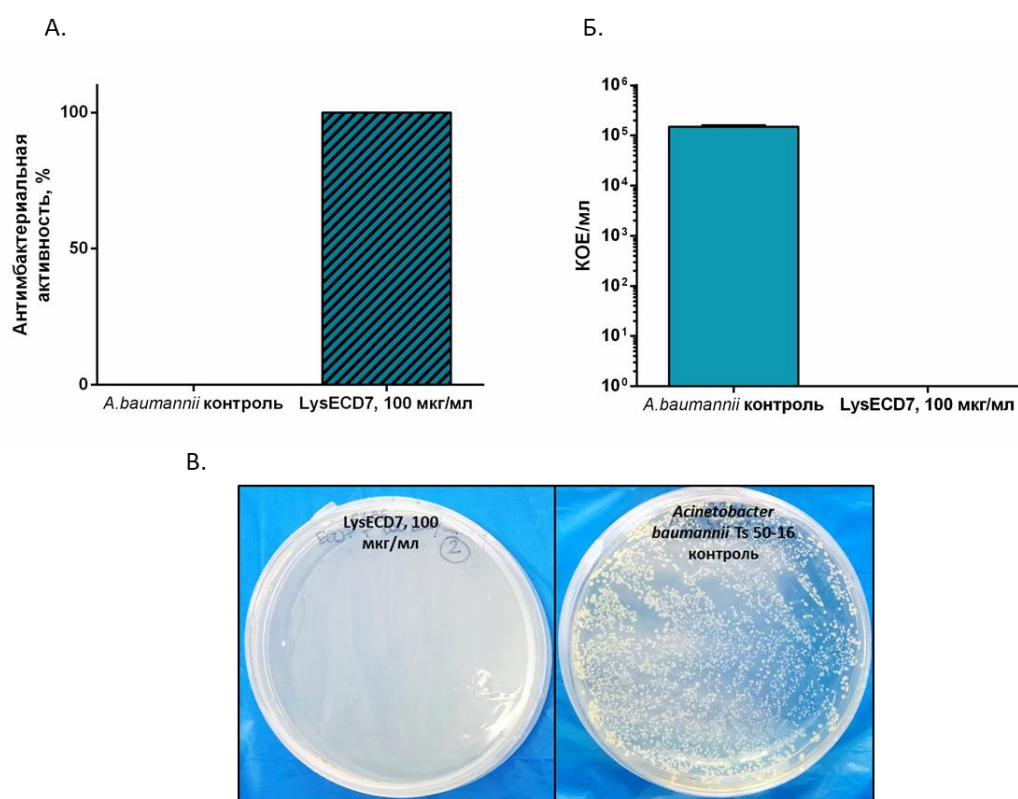


Рисунок 14 – Антибактериальная активность субстанции эндолизина LysECD7 (100 мкг/мл) в отношении модельного тест-штамма *A. baumannii* Ts 50-16, выраженная в % (А) или в КОЕ/мл (Б). Чашки Петри с нанесенной смесью эндолизина и бактериальных клеток по сравнению с отрицательным контролем в 20 мМ Трис-НСI буферном растворе, рН 7,5 (В). [132]

Стерильность субстанции

Для всех биологических и, в частности, биотехнологических ФС необходимо введение показателя стерильности, так как такие ФС получают из биологического материала, такого как вирусные, бактериальные или эукариотические культуры, кровь, эмбрионы, ткани животных или

другие источники. В связи с этим в ходе процесса производства в них могут остаться какие-либо микроорганизмы, что недопустимо при хранении ФС и дальнейшем изготовлении ЛС, так как может повлиять на свойства продукта. Испытания проводятся в соответствии с ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» ГФ XIV. При этом следует учитывать, что эндотоксины сами по себе обладают антимикробной активностью, которую необходимо нейтрализовать для предупреждения ложноотрицательных результатов. В связи с этим, для анализа был выбран метод мембранной фильтрации с последующим промыванием фильтров стерильным физиологическим раствором для устранения антимикробного действия исследуемой субстанции. Было показано отсутствие микробного роста при помещении фильтра в тиогликолевую питательную среду, что обозначает соответствие субстанции требованиям испытания на стерильность.

Бактериальные эндотоксины

Содержание бактериальных эндотоксинов (БЭ) оценивалось с помощью одного из вариантов ЛАЛ-теста по ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины» ГФ XIV - хромогенного теста по конечной точке (метод Е) с использованием коммерческого набора Endpoint Chromogenic (Charles River Endosafe, США), основанного на спектрофотометрическом измерении интенсивности окраски реакционной смеси. Предварительно построив стандартную кривую по трем концентрациям контрольного стандарта эндотоксина, измеряли содержание БЭ в опытном образце согласно инструкции производителя набора. Экспериментальное значение БЭ опытных партий субстанции LysECD7 составляло $\leq 0,5$ ЕЭ/мг субстанции, что укладывается в пределы допустимых по ОФС значений исходя из предполагаемых терапевтических дозировок для введения человеку.

Количественное определение

Количественное определение белка проводилось согласно ОФС.1.2.3.0012.15 «Определение белка» ГФ XIV. Был выбран высокочувствительный колориметрический метод с бицинхониновой кислотой (метод 4), так как, в отличие от других популярных методик количественного определения белка (методы Лоури и Брэдфорда), он подходит для измерений в широком диапазоне концентраций белка (до 2 мг/мл), при этом во всем диапазоне сохраняется линейность калибровочного графика [133]. Данный метод основан на способности белка восстанавливать Cu^{2+} до ионов Cu^+ , образующих окрашенный комплекс с бицинхониновой кислотой с максимальным поглощением при длине волны 562 нм. Концентрация белка определяется спектрофотометрически на основании калибровочной кривой, построенной на

основе растворов бычьего сывороточной альбумина (БСА) с концентрациями 0,1-1,0 мг/мл (Рисунок 15).

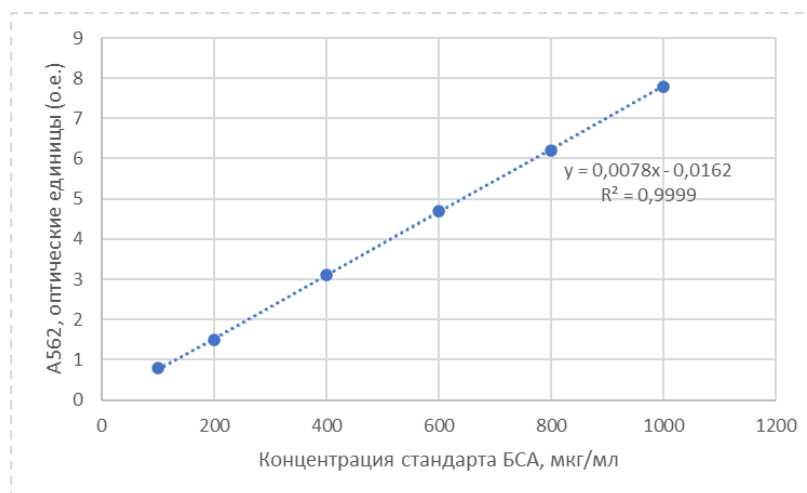


Рисунок 15 – Калибровочный график зависимости оптической плотности окрашенного раствора от концентрации белка. [132]

Согласно полученному уравнению градуировочного графика, можно рассчитать концентрацию белка. При анализе полученных для дальнейших исследований опытных образцов субстанции LysECD7 было показано, концентрация белка составляет 1,0 – 1,5 мг/мл. Таким образом, этот метод позволяет количественно определить содержание активного вещества и является приемлемым для стандартизации субстанции LysECD7 по показателю «Количественное определение».

Таким образом, в ходе проведенной работы был предложен проект спецификации, а также основные методики контроля качества субстанции LysECD7 с целью дальнейшей разработки нормативной документации на субстанцию и лекарственных средств на ее основе. Результаты данного раздела опубликованы в статье [132].

На основе полученных данных был разработан лабораторный регламент на получение субстанции эндолизина LysECD7, включающий проект нормативной документации на субстанцию.

3.2. Изучение фармакологической активности субстанции LysECD7 *in vitro* и *in vivo*

3.2.1. Изучение антибактериальной активности эндолизина LysECD7 *in vitro*

В ходе проведения исследования была также изучена специфическая активность рекомбинантного эндолизина LysECD7 в условиях *in vitro*, моделирующих различные условия среды, в том числе и в сыворотке крови, а также, способность эндолизина действовать на бактерии, находящиеся в различных метаболических состояниях (экспоненциальная и стационарная фазы роста, бактериальные биопленки). Кроме того, был охарактеризован спектр действия фермента в отношении грамотрицательных бактерий, включая патогены, входящие в ESKAPE группу, такие как *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. и другие. Результаты данного раздела были опубликованы в статьях [130, 134].

Специфическая активность LysECD7 при различных условиях среды

Изучение антибактериального действия LysECD7 проводили на модельном штамме *A. baumannii* Ts 50-16. Была показана высокая бактерицидная активность фермента при инкубации с бактериями в течение получаса. Бактерицидный эффект LysECD7 носит дозозависимый характер, эндолизин проявляет активность в отношении экспоненциально растущих клеток бактерий в концентрациях от 0,5 мкг/мл, снижая количество КОЕ до двух порядков, с увеличением концентрации наблюдалось снижение бактерий на 10^5 КОЕ (Рисунок 16А).

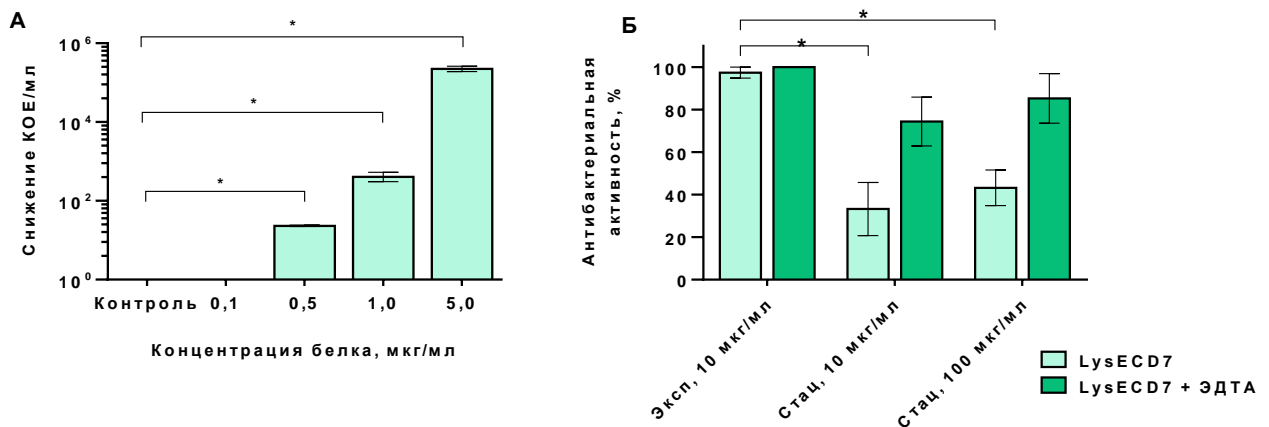


Рисунок 16 – Антибактериальная активность эндолизина LysECD7 в отношении клинического изолята *Acinetobacter baumannii* Ts 50-16. А. Бактерицидная активность различных концентраций LysECD7 в отношении бактерий в экспоненциальной фазе роста, выражена в виде снижения КОЕ/мл по сравнению с контролем без добавления белка. Б. Активность

LysECD7 в отношении бактерий в экспоненциальной (Эксп) и стационарной (Стац) фазах роста без и с добавлением 0,5 мМ ЭДТА, выражена в % относительно контроля без добавления белка. Для всех экспериментов показаны средние значения со стандартной ошибкой среднего после трех независимых экспериментов. Звездочка (*) обозначает значимый бактерицидный эффект, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни. Адаптировано из [130]

Однако, при действии на бактерии в стационарной фазе роста бактерицидный эффект эндолизина значительно снижается: до 33% и 43% в концентрациях 10 мкг/мл и 100 мкг/мл, соответственно, по сравнению со 100% активностью по отношению к бактериям в экспоненциальной фазе роста (Рисунок 16Б). Снижение антибактериальной активности эндолизинов по отношению к бактериям в стационарной фазе роста – это известное явление [67, 135]. Считается, что оно может быть связано с изменением состава клеточной стенки при старении бактерий. Тем не менее, при добавлении 0,5 мМ ЭДТА – вещества, увеличивающего проницаемость мембран, бактерицидный эффект частично восстанавливается (до 75-85%). Таким образом, данное явление может быть отчасти обусловлено снижением способности белка проникать сквозь наружную мембрану микроорганизмов.

Для подтверждения того, что под действием эндолизина бактериальные клетки погибают именно вследствие лизиса, было проведено исследование с помощью сканирующей электронной микроскопии. Для этого были сделаны микрофотографии отпечатка бактериального газона *A. baumannii* Ts 50-16 с зоной лизиса, полученной в ходе воздействия 10 мкг эндолизина *LysECD7* (Рисунок 17).

После обработки бактериальной культуры *LysECD7* хорошо видны лизированные клетки, и остатки компонентов бактериальной клеточной стенки. Процесс разрушения клеток хорошо виден на краю зоны лизиса (Рисунок 17В). Глубже в зоне лизиса бактерий практически нет, что свидетельствует о полном разрушении клеток *A. baumannii* (Рисунок 17Г).

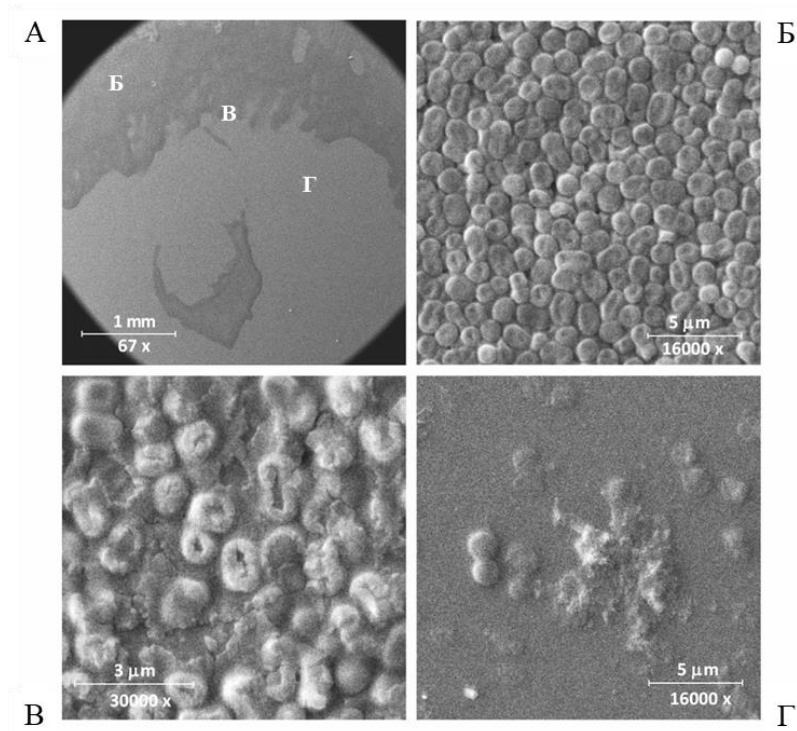


Рисунок 17 – Микрофотографии отпечатка зоны лизиса бактериальной культуры *A. baumannii* Ts 50-16 под действием *LysECD7* на твердой питательной среде. А. Общий вид отпечатка. Б. Зона без лизиса клеток (контрольная зона). В. Край зоны лизиса. Г. Зона глубокого лизиса.

Адаптировано из [134]

Тем не менее, единичные неразрушенные клетки также были обнаружены, однако не вполне ясно, остаются ли они жизнеспособными или нет. С одной стороны, эксперименты *in vitro* в жидкой среде с соответствующими концентрациями эндолизина показывают полное отсутствие роста колоний *A. baumannii* Ts 50-16, хотя результаты со сплошным бактериальным газоном могут отличаться, т.к. соотношения диффундирующего в слое по поверхности белка и клеток отличается. В свою очередь, известны случаи применения литических ферментов бактериофагов для производства пустых клеточных оболочек грамотрицательных бактерий («теней» бактериальных клеток), лишенных цитоплазматического содержимого, но сохраняющих форму [136]. Сходную картину с отдельными неразрушенными бактериальными клетками можно увидеть на микрофотографиях препаратов после добавления других эндолизинов [59].

Способность *LysECD7* действовать в отношении сформированных бактериальных биопленок было изучено на трех представителях грамотрицательных бактерий: клинических штаммах *A. baumannii* Ts 50-16, *K. pneumoniae* Ts 104-14 и *P. aeruginosa* Ts 38-16, которые были способны формировать плотные биопленки в лунках планшета *in vitro*. Активность эндолизина *LysECD7* оценивали по поглощению растворов после двухчасовой инкубации сформированных

в течение суток биопленок с эндолизином и дальнейшей окраски смеси кристаллическим фиолетовым красителем (Рисунок 18).

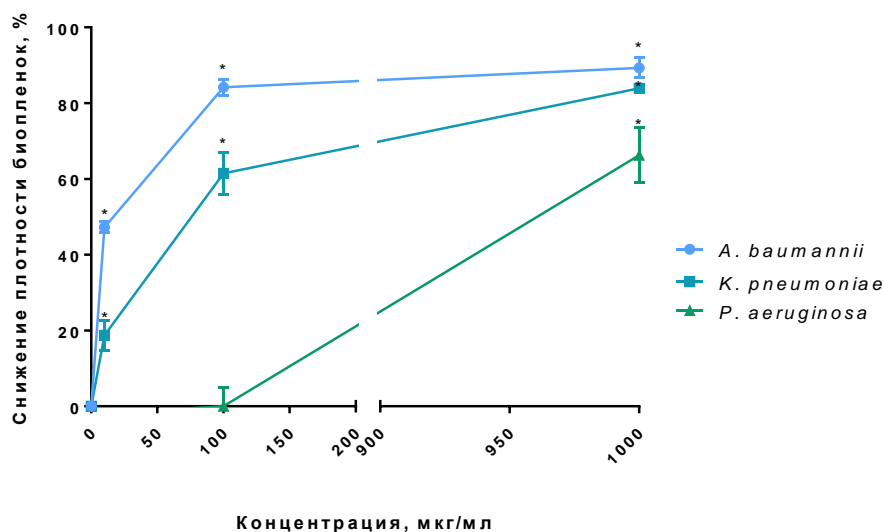


Рисунок 18 – Активность LysECD7 в различных концентрациях в отношении сформированных биопленок *A. baumannii* Ts 50-16, *K. pneumoniae* Ts 104-14 и *P. aeruginosa* Ts 38-16 после инкубации с ферментом в течение 2 часов, выражена в снижении оптической плотности биопленок OD600. Для всех экспериментов показаны средние значения с SEM после трех независимых экспериментов. Звездочка (*) обозначает значимый бактерицидный эффект относительно контроля ($p < 0,05$), однофакторный дисперсионный анализ

Было показано, что LysECD7 разрушает сформированные биопленки *A. baumannii* Ts 50-16 и *K. pneumoniae* Ts 104-14 в концентрации от 10 мкг/мл, при этом полная или почти полная элиминация биопленок (до 100%) достигается при концентрации 1 мг/мл. Биопленки штамма *P. aeruginosa* Ts 38-16 оказались более устойчивыми к разрушающему действию фермента, однако при концентрации 1 мг/мл оптическая плотность биопленки снижалась в 6-8 раз (примерно на 66%). Таким образом, был выявлен потенциал применения LysECD7 для воздействия на бактериальные биопленки различных представителей грамотрицательных бактерий.

Разрушение бактериальной биопленки на примере *A. baumannii* Ts 50-16 было подтверждено с помощью световой, а также сканирующей электронной микроскопии после двухчасовой инкубации сформированных на покровных стеклах биопленок с раствором эндолизина (100 мкг/мл) либо контрольным буфером. Микроскопия после окраски препаратов кристаллическим фиолетовым красителем показала, что плотная структура биопленки действительно нарушается, при этом уменьшается количество окрашенных бактериальных клеточных стенок (Рисунок 19А, 19Б).

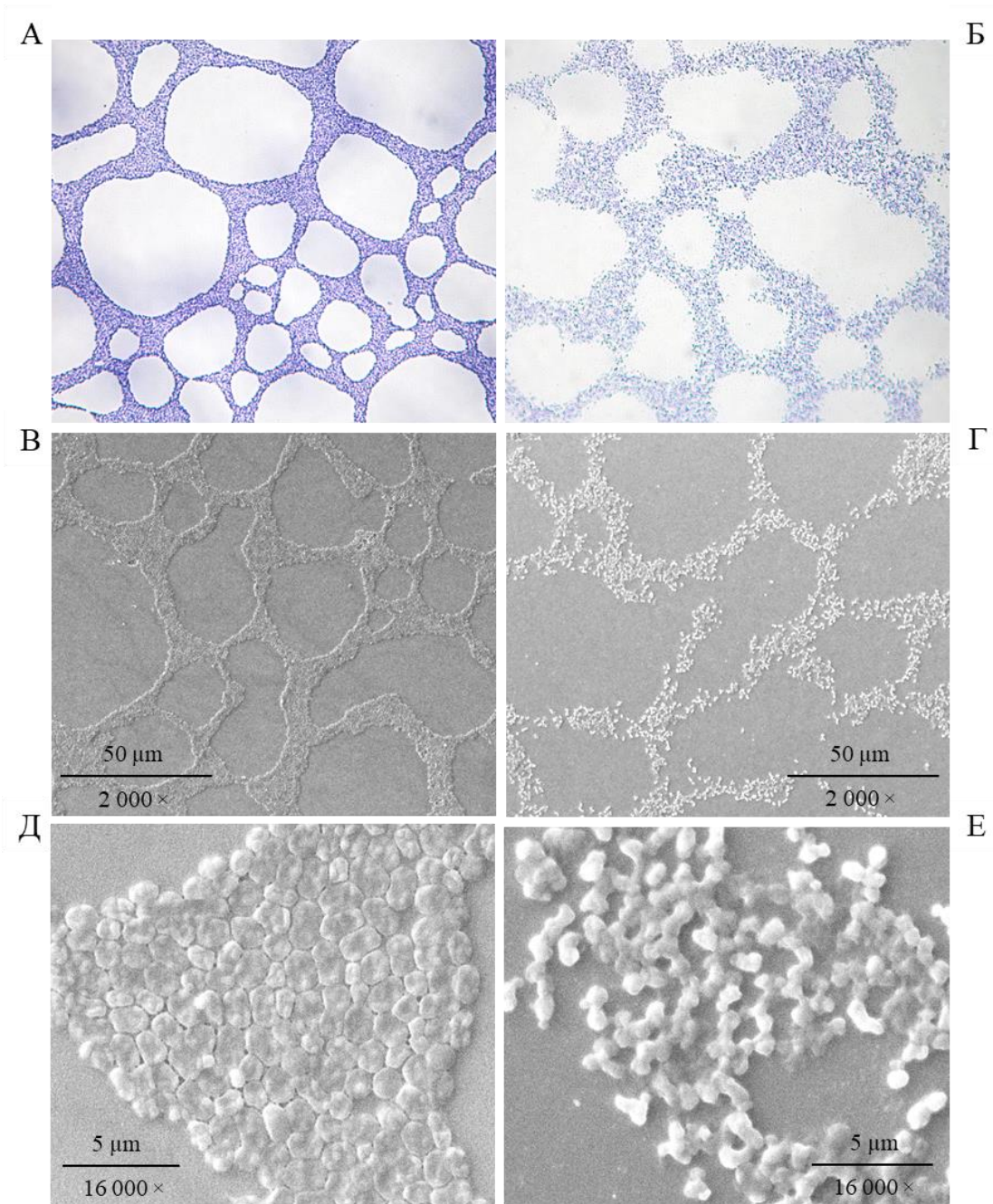


Рисунок 19 – Микрофотографии сформированных на поверхности покровных стекол бактериальных биопленок *A. baumannii* Ts 50-16 после инкубации в течение 2 часов со 100 мкг/мл LysECD7 либо контрольным буфером 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5.

А, Б. Световая микроскопия (общее увеличение 400×) биопленок, обработанных буферным раствором (А) или раствором LysECD7 (Б). В, Г, Д, Е. Сканирующая электронная микроскопия (увеличение 2 000× и 16 000×) сформированных биопленок в контроле (В, Д) или под действием эндолизина (Д, Е)

Сканирующая электронная микроскопия подтвердила полученные результаты. Микрофотографии биопленок после обработки контрольным буфером (Рисунок 19В, 19Д) или раствором эндолизина LysECD7 в концентрации 100 мкг/мл (Рисунок 19Г, 19Е) показали не только нарушение структуры биопленки, но и полное разрушение целостности бактериальных клеток, входящих в ее состав. При увеличении $16\ 000\times$ хорошо видны лизированные клетки и остатки компонентов бактериальной клеточной стенки.

Также в ходе исследования была проведена оценка бактерицидной активности LysECD7 в различных условиях среды: при изменении pH раствора, при добавлении солей, а также при добавлении сыворотки крови (Рисунок 20).

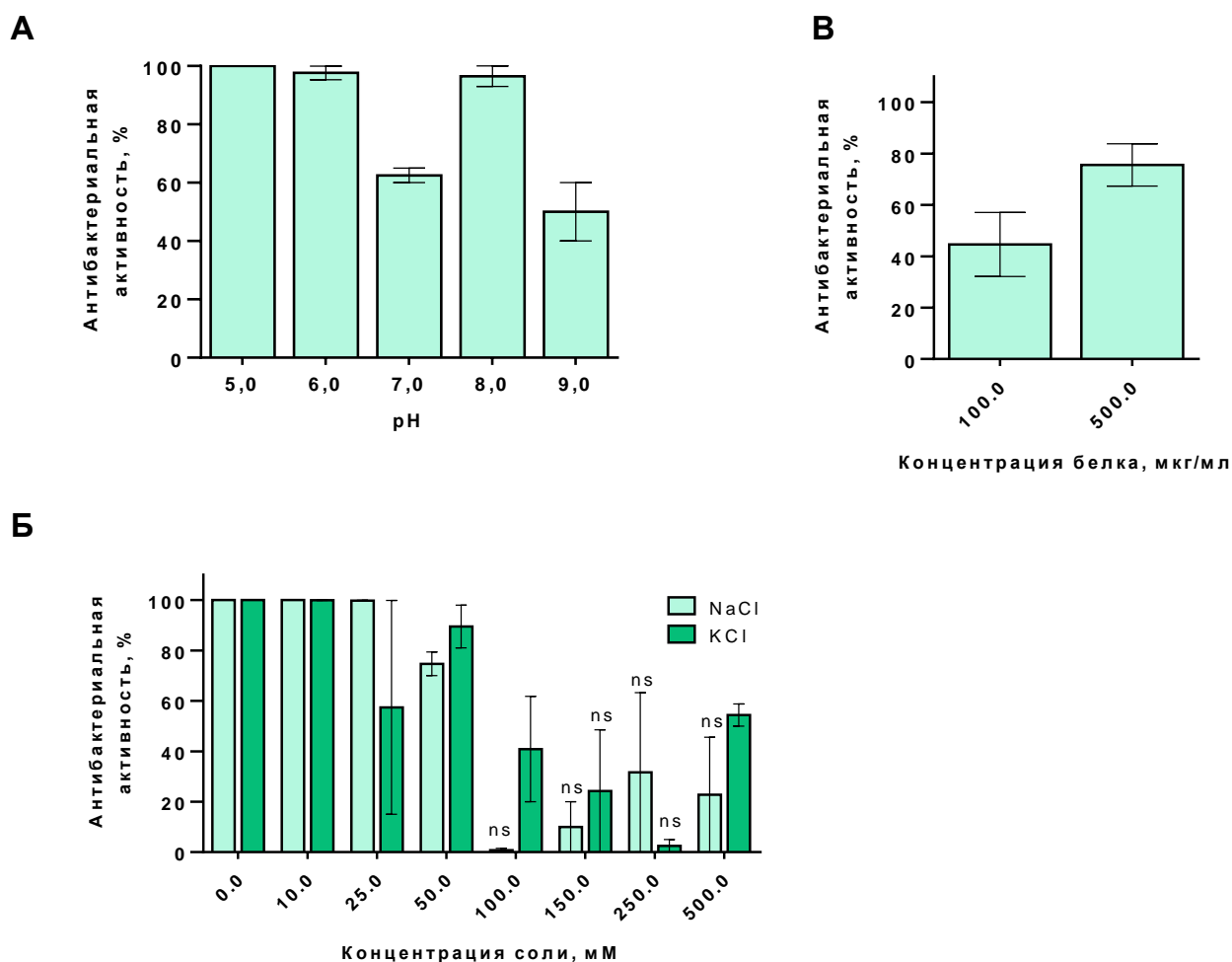


Рисунок 20 – Влияние различных условий среды на антибактериальную активность LysECD7 в отношении клинического изолята *A. baumannii* Ts 50-16. А. Бактерицидная активность LysECD7 в концентрации 1 мкг/мл при различных pH. Б. Бактерицидная активность 10 мкг/мл LysECD7 в присутствии различных концентраций солей. В. Бактерицидная активность различных концентраций LysECD7 в присутствии сыворотки крови. Приведена

антибактериальная активность фермента (%) по сравнению с контролем без добавления белка, ns - нет статистически достоверного отличия от контрольной культуры ($p > 0,05$, критерий Манна-Уитни), все остальные значения статистически достоверно отличаются от контроля. Для всех экспериментов показаны средние значения со стандартной ошибкой среднего после трех независимых экспериментов. Адаптировано из [130]

Было показано, что кислотность среды значительно влияет на активность фермента (Рисунок 20А). Так, оптимальными условиями оказались слабокислые значения рН от 5,0 до 6,0, при которых активность LysECD7 составляет 98-100%. С точки зрения терапевтического применения фермента, это имеет значение для местных ЛС, так как рН кожи и слизистых оболочек является слабокислым. При слабощелочном рН 8,0 активность фермента также высока и составляет 96,5%. Тем не менее, наблюдается значительное снижение активности при нейтральном рН 7,0 (до 62,5%) и при слабощелочном рН 9,0 (до 50%). Это может объясняться изменениями в поверхностном заряде белка и неоптимальным рН для осуществления каталитической активности, а также возможными структурными изменениями клеточной стенки самих бактерий.

Изучение влияния солей на активность эндолизина проводили при введении в буферный раствор солей NaCl и KCl в различных концентрациях (Рисунок 20Б). Как KCl, так и NaCl оказывали ингибирующее влияние на активность эндолизина, что сравнимо с литературными данными [51, 67, 73], хотя присутствие KCl влияло менее выражено. Видимое снижение активности фермента было отмечено при концентрации NaCl от 50 мМ и KCl от 100 мМ. Этот эффект можно объяснить тем, что наличие солей в среде влияет на межмолекулярные взаимодействия, ослабляя ионные и гидрофобные связи, а том числе эндолизина со своей мишенью (пептидогликаном). Более того, проницаемость наружной мембраны для фермента также может снижаться из-за ее стабилизации в высокосолевых условиях. Тем не менее, небольшой литический эффект сохранялся даже при высоких концентрациях солей.

Учитывая, что наиболее сложной средой является внутренняя среда организма нами была исследована возможность применения LysECD7 в условиях биологических образцов, таких как сыворотка крови человека (Рисунок 20В). Известно, что сложные биологические среды ингибируют активность эндолизинов [73]. Активность LysECD7 значительно снижалась по сравнению с модельными условиями, что может быть связано, в том числе, с нейтрализующим воздействием иммуноглобулинов или ингибирующим действием других компонентов сыворотки крови, однако в концентрациях 100-500 мкг/мл она достигала 60-80%, что говорит о неполном блокировании антибактериального действия в сложноконпонентных системах.

Таким образом, для исследуемого эндолизина LysECD7 было показано, что даже в низких концентрациях он оказывает выраженный бактерицидный эффект *in vitro*, способен действовать в отношении бактерий в экспоненциальной или стационарной фазах роста, активен в отношении сформированных бактериальных биопленок и характеризуется приемлемой степенью устойчивости к различным условиям сред, что говорит об перспективности эндолизина LysECD7 в дальнейших разработках лекарственных средств.

Оценка действия LysECD7 в отношении патогенных бактерий

При оценке спектра действия эндолизина LysECD7 на различных представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий, находящихся в экспоненциальной фазе роста, было показано, что эндолизин способен действовать на широкий спектр грамотрицательных микроорганизмов, в том числе представителей группы ESKAPE и внутрибольничных возбудителей инфекционных заболеваний: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *E. coli*, *S. enterica* и *C. jejuni*.

Было показано, что в концентрации 100 мкг/мл фермент действовал на 111 из 120 штаммов грамотрицательных бактерий с антибактериальной активностью выше 33% (Рисунок 21).

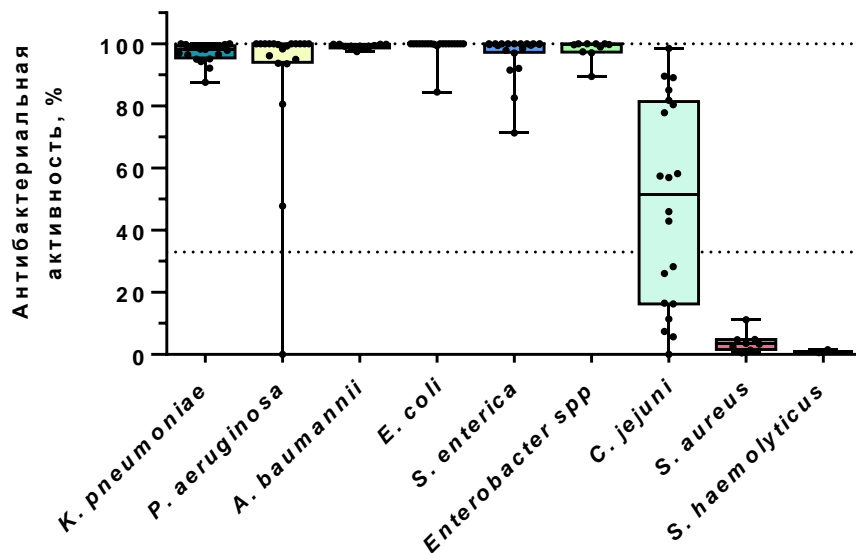


Рисунок 21 – Результаты оценки действия 100 мкг/мл LysECD7 на штаммы грамотрицательных и грамположительных бактерий. Результаты представлены диаграммами размаха: линии - медианы; ящики – интерквартильный диапазон; усы - мин-макс. Линия отсечения - активность в 33%, обозначена пунктирной линией. Адаптировано из [134]

В отношении *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *E. coli* и *S. enterica* медианное значение антибактериальной активности составило 98 - 100% (Таблица 9).

Таблица 9 – Антибактериальная активность LysECD7 в отношении исследуемых штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий

Исследуемый вид	Количество изученных штаммов	Количество чувствительных к LysECD7 штаммов	Медианные значения активности, %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	20	98,28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	18	99,88
<i>Escherichia coli</i>	20	20	100,0
<i>Salmonella enterica</i>	20	20	98,95
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	10	99,25
<i>Enterobacter spp</i>	10	10	99,66
<i>Campylobacter jejuni</i>	20	13	43,27
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	0	2,38
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	0	0,55

Сниженная активность наблюдалась только в отношении представителей вида *C. jejuni*, где медианное значение активности составило 43,27%. В отношении изученных представителей грамположительных бактерий (*S. aureus*, *S. haemolyticus*) бактерицидного эффекта не было выявлено. Таким образом, спектр действия LysECD7 ограничивается грамотрицательными бактериями, что может быть объяснено различиями в строении клеточных стенок.

Изучение цитотоксического и гемолитического действия эндолизина LysECD7

При разработке новых лекарственных веществ необходимо учитывать нежелательные эффекты, которые они могут вызывать. Для субстанции исследуемого эндолизина оценивали некоторые параметры безопасности, которые можно смоделировать в условиях *in vitro*. К ним относятся цитотоксическое действие на культуре эукариотических клеток НЕК293, гемолитическое действие в отношении эритроцитов крови человека, оценка действия в отношении представителей нормальной микрофлоры, а также изучение нейтрализующего действия специфических антител.

Цитотоксическое действие

Оценку цитотоксического действия эндолизина проводили на культуре эукариотических клеток НЕК 293 в ходе колориметрического МТТ-теста. Концентрации LysECD7 варьировали от 31 мкг/мл до 2 мг/мл, а в качестве положительного контроля использовали 0,1% раствор Тритона Х-100. Было показано, что в изученных условиях окраска красителем МТТ по сравнению с контролем достоверно не изменялась, эндолизин не оказывает влияния на жизнеспособность клеток, которая во всех случаях составляла около 100% (Рисунок 22).

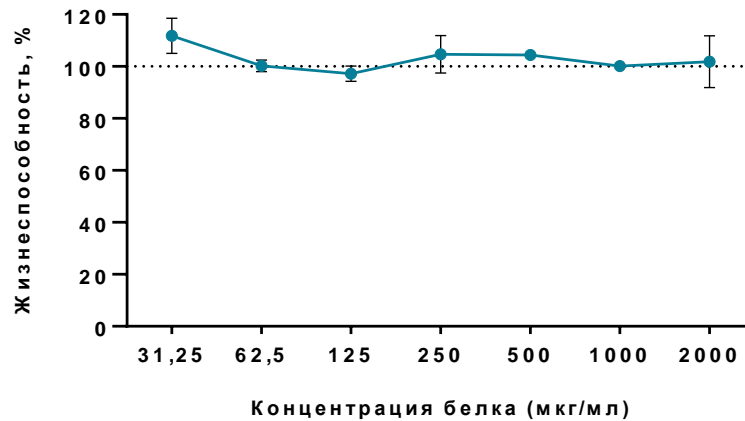


Рисунок 22 – Жизнеспособность эукариотических клеток НЕК 293 после инкубации с различными концентрациями LysECD7

Гемолитическое действие

При инкубации суспензии эритроцитов с раствором эндолизина LysECD7 в концентрации 100 мкг/мл и 1 мг/мл в течение 1 часа при 37°C не было выявлено достоверного повышения оптической плотности при 405 нм, что соответствует отсутствию выхода гемоглобина из эритроцитов. Рассчитанный процент гемолиза не превышал 0,2%, что говорит об отсутствии гемолитического эффекта LysECD7.

Оценка действия LysECD7 в отношении представителей нормальной микрофлоры

При разработке лекарственных средств на основе эндолизинов, необходимо учитывать, какое влияние данные ферменты могут оказывать на представителей нормальной микрофлоры. Известно, что дисбиотические осложнения после применения антибиотиков являются одним из наиболее распространенных побочных эффектов их применения. Так как наиболее подверженной является нормофлора кишечника, то для изучения действия LysECD7 на представителей нормальной микрофлоры человека использовались консорциумы нормофлоры, входящие в состав бактериальных препаратов, предназначенных для коррекции микрофлоры трех

возрастных групп: детей в возрасте до 3-х лет, детей в возрасте от 3-х до 14 лет и людей старше 14 лет (Таблица 10) [137–139].

Таблица 10 – Штаммы представителей нормальной микрофлоры человека, использованные для оценки антибактериальной активности LysECD7

Штамм	Присутствие в консорциуме		
	до 3х лет	3-14 лет	старше 14 лет
<i>Bifidobacterium bifidum</i> OV-19	✓		✓
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 791	✓	✓	✓
<i>Bifidobacterium longum</i> OV-20		✓	✓
<i>Bifidobacterium longum</i> Я-3			✓
<i>Bifidobacterium longum</i> B379M	✓	✓	
<i>Bifidobacterium breve</i> OV-12	✓	✓	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ГО-13			✓
<i>Bifidobacterium infantis</i> 73-15	✓		
<i>Lactobacillus helveticus</i> NK-1	✓	✓	✓
<i>Lactobacillus casei</i> KHM-12	✓	✓	✓
<i>Lactobacillus helveticus/casei</i> К3Ш24	✓	✓	✓

При обработке жидких культур 11 штаммов бактерий *Bifidobacterium* sp и *Lactobacillus* sp эндолизином в концентрации 100 мкг/мл в течение 30 минут не было отмечено значительного влияния фермента на бактериальный рост. По всей видимости, это связано с ограниченным воздействием исследуемого эндолизина на представителей грамположительных бактерий, что в целом характерно для эндолизинов, полученных из фагов грамотрицательных бактерий [37]. Таким образом, нарушение нормальной микрофлоры вследствие применения препаратов на основе LysECD7 представляется маловероятным.

Нейтрализующее действие специфических антител

При многократном введении препаратов на основе чужеродных организму белков, образуются нейтрализующие антитела, что может стать проблемой при разработке инъекционных лекарственных средств. Ранее на примере эндолизинов, чье действие направлено против грамположительных бактерий, было показано, что гипериммунные сыворотки животных, содержащие специфические антитела, не блокируют бактерицидное действие [81, 121, 122]. Для эндолизинов, действующих в отношении грамотрицательных бактерий, схожих экспериментов не проводилось, несмотря на различия данных групп молекул по структуре и свойствам.

Была получена сыворотка крови кролика, иммунизированного в течение трех месяцев эндолизином LysECD7 совместно с адьювантом Фрейнда. Было показано, что гипериммунная

кроличья сыворотка содержит антиген-специфичные антитела к LysECD7 (титр антител выше 1:100 000), которые в дальнейшем были очищены с помощью аффинной хроматографии.

Антибактериальную активность LysECD7 оценивали как в присутствии гипериммунной сыворотки, так и в присутствии специфичных антител на модельном штамме *A. baumannii* (Рисунок 23).

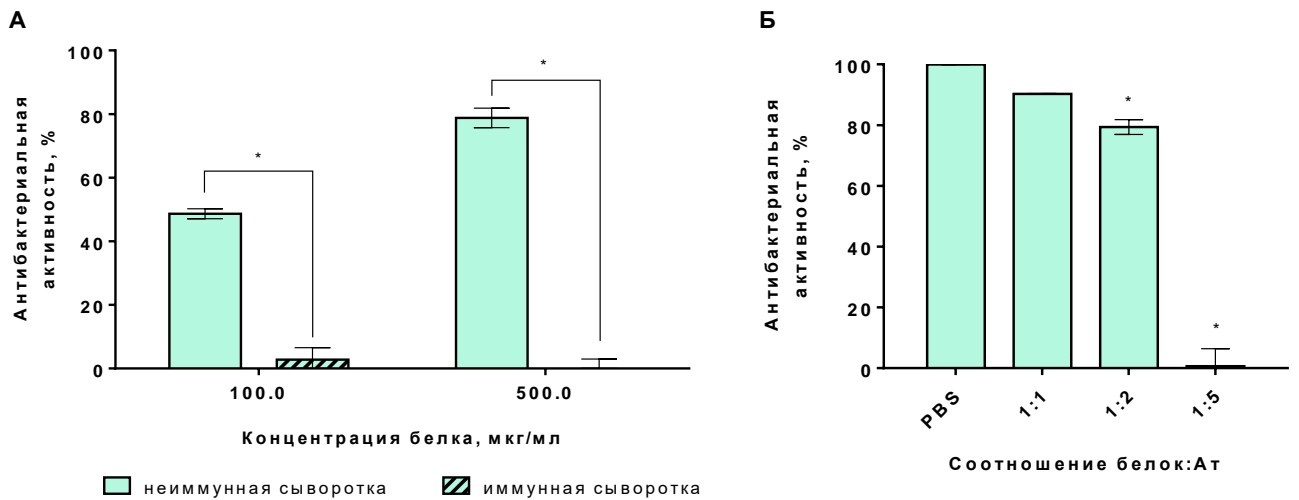


Рисунок 23 – Антибактериальная активность LysECD7 в отношении штамма *A. baumannii* Ts 50-16 в присутствии (А) гипериммунной кроличьей сыворотки, (Б) очищенных специфических антител, концентрация белка 50 мкг/мл. Для всех экспериментов показаны средние значения со стандартной ошибкой среднего после трех независимых экспериментов. Звездочка (*) обозначает значимый бактерицидный эффект, $p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ

Гипериммунная кроличья сыворотка, содержащая специфичные антитела, оказывает ингибирующее действие на антибактериальные свойства эндолизина LysECD7 в концентрации 100 и 500 мкг/мл, полностью блокируя его активность, что косвенно говорит о нейтрализующей активности специфических антител.

Аффинно-очищенные LysECD7-специфические антитела, выделенные из той же сыворотки, также оказывают нейтрализующее действие на фермент. При достижении массового соотношения концентрации эндолизина к нейтрализующим антителам 1:5 антимикробная активность белка полностью блокируется. Это соответствует соотношению молярных концентраций эндолизина и антител примерно 1:1.

Несмотря на полное блокирование антибактериальной активности LysECD7 в изученных условиях, следует помнить, что в реальных условиях иммунный ответ на системное применение

такого препарата, будет отличаться из-за отсутствия адьюванта и более короткого периода воздействия фермента, чем три месяца регулярного системного введения (иммунизации). Титр антител в сыворотке крови будет значительно ниже, чем в модельных условиях. Таким образом, несмотря на выраженное действие антител на антибактериальную активность фермента, разработка препарата на основе субстанции эндолизина LysECD7 для системного применения при бактериемии остается перспективным направлением, а развитие иммунного ответа в процессе применения субстанции и ГЛФ на основе LysECD7 – отдельной научной задачей для исследования на стадии доклинических и клинических исследований.

3.2.2. Изучение аспектов механизма действия эндолизина LysECD7

Как было показано в разделах выше, LysECD7 лизирует клетки грамотрицательных бактерий. Анализ аминокислотной последовательности показал, что LysECD7, предположительно, является цинк-зависимой D-Ala-D-Ala эндопептидазой (семейство M15) и имеет сходство с бактериальной L-Ala-D-Glu эндопептидазой ChiX [140] и L-Ala-D-Glu эндопептидазой Ply500 (эндолизин листерийного бактериофага) [141]. В настоящее время Ply500 является единственным примером эндолизина с эндопептидазной активностью, для которого известна структура, хотя этот класс ферментов потенциально достаточно разнообразен.

Показано, что активный центр подобных ферментов включает в себя консервативные аминокислотные остатки гистидина и аспартата, и, кроме того, в него входит ион цинка, координированный этими аминокислотами. В случае фермента Ply500, это остатки His80, Asp87, His133, а также молекула воды, которую депротонирует Asp130 для нуклеофильной атаки [39]. В случае ChiX ион цинка координируют аминокислотные остатки His68, Asp75 и His123 в активном центре, а Asp120 необходим для выполнения функции активации молекулы воды [140]. Моделирование структуры LysECD7 по модели ChiX (PDB 5OQ1) показало, что в ней содержатся схожие аминокислотные остатки His62, Asp75, Asp114, His117, которые могут выполнять аналогичную роль, однако, у ферментов семейства D-Ala-D-Ala эндопептидаз депротонирование воды может осуществляться не через остаток аспартата, а остатком глутамата [38] (Рисунок 24), поэтому для точной характеристики механизма действия необходимы структурные исследования (кристаллография с последующим рентгеноструктурным анализом), в том числе при взаимодействии с субстратом, а также масс-спектрометрические исследования для анализа конкретных пептидных связей, расщепляемых эндолизином.

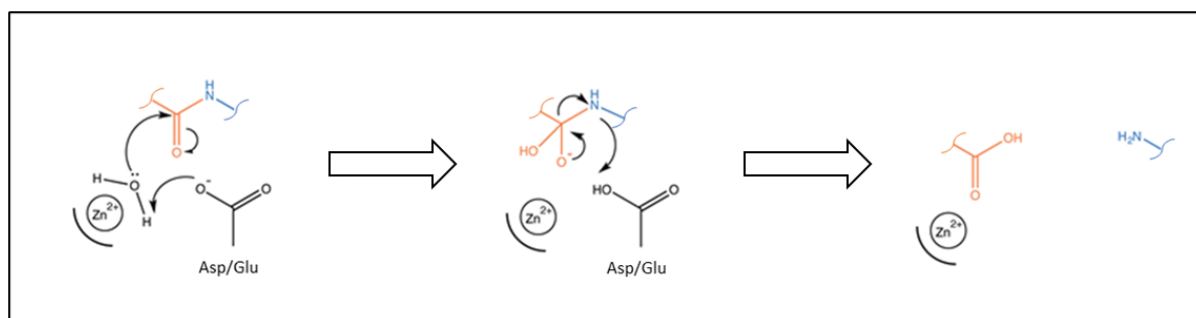


Рисунок 24 – Предполагаемый механизм эндопептидазной активности *LysECD7*, который включает в себя реакцию нуклеофильного замещения активированной молекулой воды при атоме углерода карбонильной группы амидной связи. Активация воды может происходить благодаря депротонированию аминокислотным остатком аспартата или глутамата в присутствии иона Zn^{2+} . Адаптировано из [140]

Таким образом *LysECD7* гидролизует амидные связи в пептидных мостиках между слоями гликана или в поперечных шивках, что приводит к расщеплению клеточной стенки и последующему лизису бактерий. Результаты исследования аспектов механизма действия эндолизина *LysECD7* частично опубликованы в статьях [130, 134].

Бактерицидный тип действия был подтвержден в эксперименте по увеличению флуоресценции непроникающего красителя (Рисунок 25).

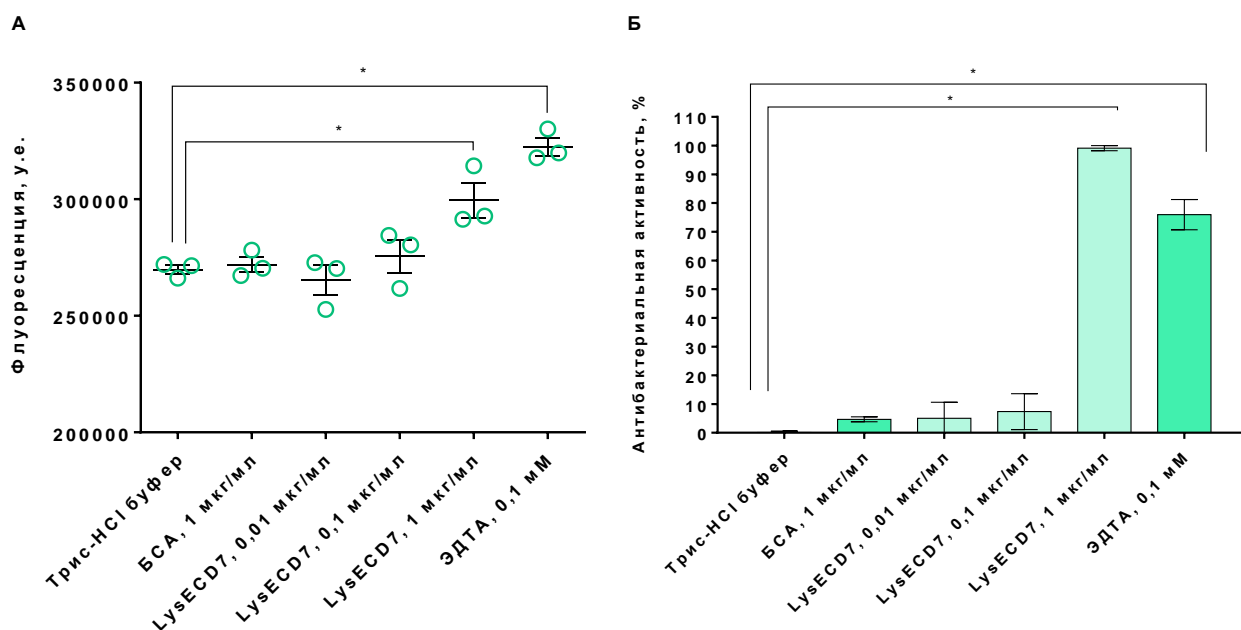


Рисунок 25 – Изучение бактерицидной активности *LysECD7*. А. Изменение флуоресценции бромистого этидия после добавления к бактериальной суспензии *A. baumannii* Ts 50-16,

инкубированной с LysECD7 в различных концентрациях, контрольным 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, бычьим сывороточным альбумином (БСА) или ЭДТА. Б. Антибактериальная активность LysECD7 в различных концентрациях в сравнении с контрольными образцами в отношении *A. baumannii* Ts 50-16. Для всех экспериментов приведены средние значения с SEM после трех независимых измерений. Звездочка (*) обозначает значимый эффект, $p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ

Бромистый этидий (EtBr) представляет собой интеркалирующий флуоресцентный краситель, связывающийся с нуклеиновыми кислотами и не способный проникать через наружную мембрану самостоятельно [123]. Было зафиксировано увеличение флуоресценции, вызванное добавлением EtBr к бактериальной суспензии *A. baumannii*, инкубированной с различными концентрациями LysECD7, в сравнении с контрольными образцами 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5 буферным раствором, 1 мкг/мл БСА (отрицательный контроль) или 0,1 мМ ЭДТА (положительный контроль) (Рисунок 25А). Это говорит о взаимодействии красителя с нуклеиновыми кислотами, а значит под действием LysECD7 происходит нарушение целостности наружной мембраны (пермеабиллизация мембран). Данные по флуоресценции коррелируют с данными по выживаемости бактерий на чашках Петри (Рисунок 25Б). Все вышесказанное свидетельствует о том, что эндолизин обладает бактерицидным действием на клетки, вследствие которого бактерии погибают из-за лизиса и выхода содержимого клеток в окружающее пространство.

Анализ последовательности белка не выявил наличие каких-либо выраженных положительно заряженных или амфифильных участков, которые могли бы участвовать в нарушении целостности клеточных мембран. В случае небольших молекул антибиотиков проникновение может происходить через поры, а в случае белковых молекул такой вариант невозможен [59]. Тем не менее, при изменении рН среды наблюдаются значительные изменения и в антибактериальной активности эндолизина LysECD7, что может зависеть от способности фермента преодолевать мембрану (Рисунок 26).

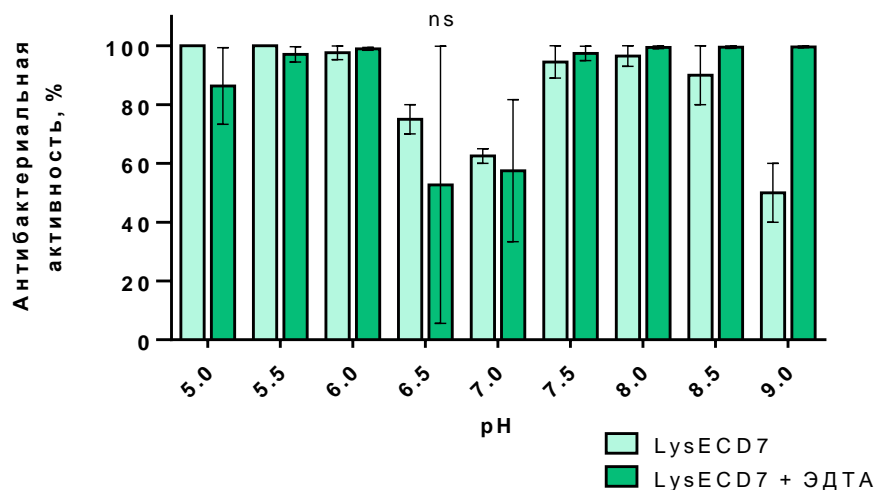


Рисунок 26 – Бактерицидная активность *LysECD7* в отношении *A. baumannii* Ts 50-16 в концентрации 1 мкг/мл при различных рН без и с добавлением 0,5 мМ ЭДТА. Приведена антибактериальная активность фермента (%) по сравнению с контролем без добавления белка, ns - нет статистически достоверного отличия от контрольной культуры ($p > 0,05$, критерий Манна-Уитни), все остальные значения статистически достоверно отличаются от контроля. Для всех экспериментов показаны средние значения со стандартной ошибкой среднего после трех независимых экспериментов. Адаптировано из [130]

Так, в слабокислых условиях с рН среды от 5,0 до 6,0 активность фермента максимальна. С одной стороны, в этих условиях заряд молекулы наиболее положительный, что может играть роль в ее взаимодействии с отрицательно заряженными компонентами внешней мембраной бактерий, то есть в пермеабиллизации. В структуре *LysECD7* нет выраженных пермеабиллизующих участков, поэтому отчасти, хотя и не полностью, такой эффект может быть обусловлен наличием неспецифической С-концевой гистидиновой метки. С другой стороны, кислый рН сам по себе увеличивает проницаемость мембран, дестабилизируя ионы двухвалентных металлов в ее составе, поэтому общий бактерицидный эффект фермента может быть более выражен. При значениях рН 6,5-7,0 наблюдается некоторое снижение активности фермента до 60-80%, что может быть связано с менее выраженной ролью пермеабиллизующих структур в активности, стабилизацией мембран бактерий в нейтральных и щелочных условиях и вкладом непосредственно каталитического центра фермента. Тем не менее, при повышении рН до 7,5-8,5 активность полностью восстанавливается до 95-100%, что может быть обусловлено оптимальными для катализа условиями. Схожая динамика изменения активности эндолизинов в зависимости от рН были выявлены и в других исследованиях, однако однозначного объяснения данного явления не было предоставлено [70].

Добавление 0,5 мМ ЭДТА в реакционные смеси показало, что пермеабиллизатор мембран несколько увеличивает бактерицидную активность LysECD7 в нейтральных и щелочных условиях (рН 7,5-9,0). Это подтверждает гипотезу о том, что в этих условиях общая антибактериальная активность эндолизина в наибольшей степени зависит именно от активности каталитического домена, в то время как в кислых условиях – от пермеабиллизации мембран.

Одним из вариантов проникновения через наружную мембрану является связывание с ЛПС, что приводит к дестабилизации мембраны [59]. Денатурирующий электрофорез в ПААГ после инкубации белка в различных соотношениях с ЛПС *P. aeruginosa* не показал видимого взаимодействия между ЛПС и LysECD7, которое могло бы приводить к увеличению молекулярного веса белка за счет образования комплекса (Рисунок 27А).

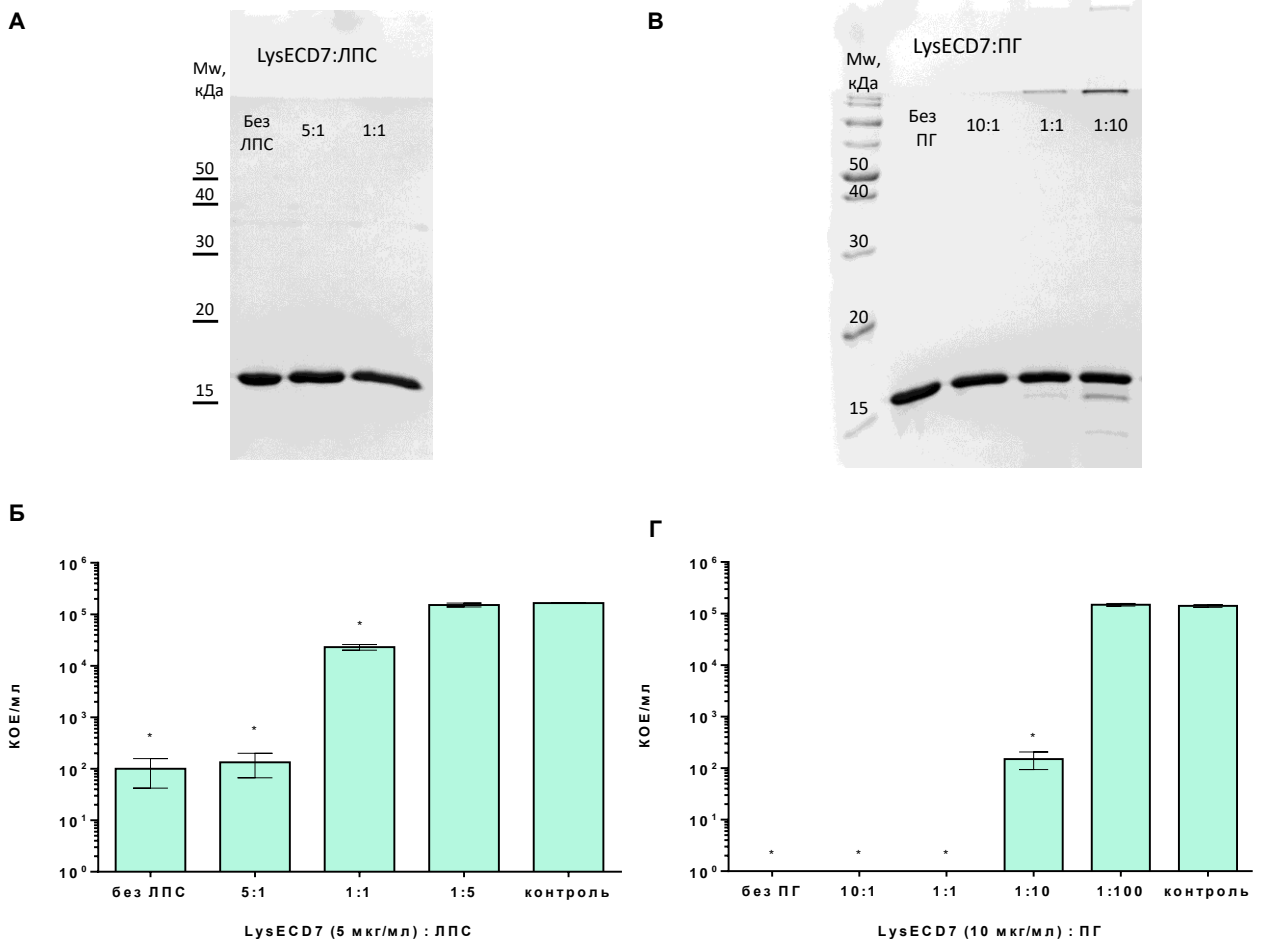


Рисунок 27 – Анализ прямого связывания LysECD7 с компонентами клеточной стенки. А. Электрофореграмма LysECD7 после инкубации с различными концентрациями ЛПС *P. aeruginosa*. Б. Антибактериальная активность 5 мкг/мл LysECD7 после инкубации с ЛПС. В. Электрофореграмма LysECD7 после инкубации с различными концентрациями ПГ *E. coli*. Г.

Антибактериальная активность 10 мкг/мл LysECD7 после инкубации с ПГ. Для всех экспериментов показаны средние значения со стандартной ошибкой среднего после трех независимых экспериментов. Звездочка () обозначает значимый бактерицидный эффект по отношению к контролю, $p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ*

Однако нельзя исключать, что в условиях живой бактериальной клетки такое взаимодействие может быть, будучи стабилизированным через другие взаимодействия. В этой связи было проведено исследование бактерицидных свойств LysECD7 в присутствии ЛПС. Так, изучение антибактериальной активности LysECD7 в отношении модельного штамма *A. baumannii* Ts 50-16 после инкубации белка в течение 1 часа с ЛПС *P. aeruginosa* показало, что активность фермента значительно снижается при массовом соотношении белок:ЛПС 1:1, по сравнению с инкубацией фермента без ЛПС, а достигая соотношения 1:5 активность эндолизина полностью пропадает и уже не отличается от отрицательного контроля (Рисунок 27Б).

Таким образом, активность LysECD7 в присутствии ЛПС очевидно меняется. Не ясно, снижается ли при этом бактерицидная активность фермента посредством прямого взаимодействия с ЛПС в условиях живой бактерии за счет истощения фермента или за счет непосредственного взаимодействия ЛПС с поверхностью клеток, что приводит к дополнительной стабилизации мембраны и блокированию проникновения фермента сквозь нее. Ответ на этот вопрос позволит прояснить, необходимо ли взаимодействие с ЛПС для литического действия LysECD7 или оно, напротив, блокирует литическое действие, экранируя поверхность клетки.

Для осуществления каталитической функции LysECD7 связывается с пептидогликаном и гидролизует пептидные связи, что приводит к расщеплению пептидогликанового остова. Косвенно, способность фермента взаимодействовать с пептидогликаном было показано с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ после инкубации фермента с препаратом выделенного из *E. coli* пептидогликана и центрифугирования полученной суспензии (Рисунок 27В). На полученной электрофореграмме отмечено появление высокомолекулярных соединений, которые не входят в лунки геля или в разделяющий гель. Предположительно, они представляют собой фермент, связанный с расщепленным пептидогликаном. Таким образом, по всей видимости, наблюдается образование комплексов LysECD7 и фрагментов ПГ, при этом их концентрация увеличивается с увеличением концентрации пептидогликана в среде. Более того, при окрашивании геля в образцах в присутствии ПГ видны дополнительные полосы с молекулярным весом ниже исходного белка. Это говорит о том, что LysECD7 взаимодействует с пептидогликаном.

Также в ходе изучения динамики антибактериальной активности эндолизина в присутствии ПГ было выявлено, что при увеличении концентрации пептидогликана в смеси активность в отношении *A. baumannii* Ts 50-16 значительно падает, начиная с соотношения белок:ПГ 1:10, а при достижении соотношения 1:100 антибактериальная активность не отличается от контроля без добавления белка (Рисунок 27Г). Это может говорить о связывании LysECD7 с пептидогликаном, в ходе которого ферментативная активность теряется из-за необратимого взаимодействия активного центра белка со своим субстратом или расходования ферментативной активности на экзогенный субстрат, что приводит к снижению целевой активности лизина непосредственно на клетках бактерий.

Таким образом, установлено что LysECD7 обладает бактерицидной активностью, обусловленной лизисом бактериальных клеток вследствие пермеабилizующей активности и разрушения пептидогликана, вероятно, за счет эндопептидазного действия эндолизина.

3.2.3. Изучение антибактериального действия эндолизина LysECD7 на животных моделях

По результатам *in vitro* исследований более перспективным направлением представляется изучение антибактериального эффекта субстанции эндолизина LysECD7 при местном применении на различных животных моделях локализованных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями.

Для оценки специфического действия исследуемой субстанции *in vivo* на базе ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора было исследовано несколько инфекционных моделей животных: раневая модель клебсиеллезной инфекции, вызванной штаммом *K. pneumoniae* на беспородных мышах, а также ожоговая модель синегнойной инфекции у крыс линии «Вистар» с использованием штамма *P. aeruginosa*. Совместно с ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России была проведена постановка имплант-ассоциированной модели клебсиеллезной инфекции мышей для оценки способности эндолизина контролировать биопленки *in vivo* в том числе на поверхности экспериментальных имплантов. Исследования специфической антибактериальной активности субстанции эндолизина LysECD7 были опубликованы в статье [142], а также вошли в отчет о научно-исследовательской работе «Создание лекарственных средств на основе эндолизинов и исследование их специфического действия», полученные в ходе реализации Договора № 0373100122119000013 от «15» мая 2019 г. на выполнение научно-исследовательской работы.

Модель раневой инфекции у беспородных мышей с использованием штамма K. pneumoniae Ts 141-14

Исследование эффективности местного применения LysECD7 при развитии раневого инфекционного процесса было проведено на мышинной модели клебсиеллезной раневой инфекции.

Инфекционный процесс в результате внутрикожного заражения клетками клинического изолята *K. pneumoniae* Ts 141-14 в дозе 2×10^8 КОЕ/животное позволяет формировать абсцесс, а затем открытую раневую поверхность, из которой при проведении смывов высевается до 10^3 КОЕ/мл. Инфекционный процесс достаточно стабилен в течение семи дней наблюдения. Визуально, наблюдается сначала увеличение и нагноение раневой поверхности с последующим ее уменьшением. Нагноение сохраняется до последнего дня наблюдений. Животные прибавляют в весе, а смертность находится в пределах 10%, что свидетельствует в том, что инфекционный процесс не носит летального характера. Тем не менее, существенным является факт проникновения *K. pneumoniae* Ts 141-14 в селезенку, что позволяет изучать влияние эндолизина не только в зоне раневой поверхности локально, но и на развитие системного заражения.

Всего в исследование было включено 3 группы: контроль заражения, контроль лечения буфером и местное лечение эндолизином. При этом исходя из литературных данных [51, 66, 70], а также на основании данных изучения активности эндолизина *in vitro*, была выбрана доза LysECD7 - 500 мкг/животное. Лечение эндолизином LysECD7 проводили нанесением раствора на поверхность раны спустя 24 ч после заражения, когда формировалась открытая раневая поверхность, ежедневно в течение пяти дней. Данная схема лечения позволяла оценить влияние исследуемого белка в наиболее острой фазе заражения животных, до генерализации инфекции. Кроме того, поскольку к 7 суткам у животных наблюдалось уменьшение размера раны при сохранении нагноения, пятидневная схема лечения позволяет оценить влияние LysECD7 на процесс и скорость заживления ран.

Во всех группах после введения культуры наблюдалось характерное развитие инфекционного процесса: образовывалась папула, на вторые сутки в месте введения наблюдали гиперемию с образованием раны, к 3 суткам наблюдалось увеличение площади раны с нагноением, нагноение сохранялось до 7 дня. Изучение патоморфологических изменений раневой поверхности показало, что к 7 суткам в группе контроля заражения отмечено уменьшение размера раны, с сохранением нагноения. В опытной группе при накожном нанесении LysECD7 к 7 суткам после заражения отмечали эпителизацию ткани и заживление раны.

Для оценки процесса заживления вскрытого бубона были измерены линейные размеры раневой поверхности. При этом, в опытной группе показано снижение размера или полное исчезновение бубона, по сравнению с контрольными группами (Рисунок 28). При этом статистически значимые изменения относительно контроля заражения наблюдались начиная с третьего дня наблюдения. На 7 день размер раны был уменьшен на 2,1 мм и 2,2 мм по сравнению с контролем заражения и контролем буфера, соответственно.

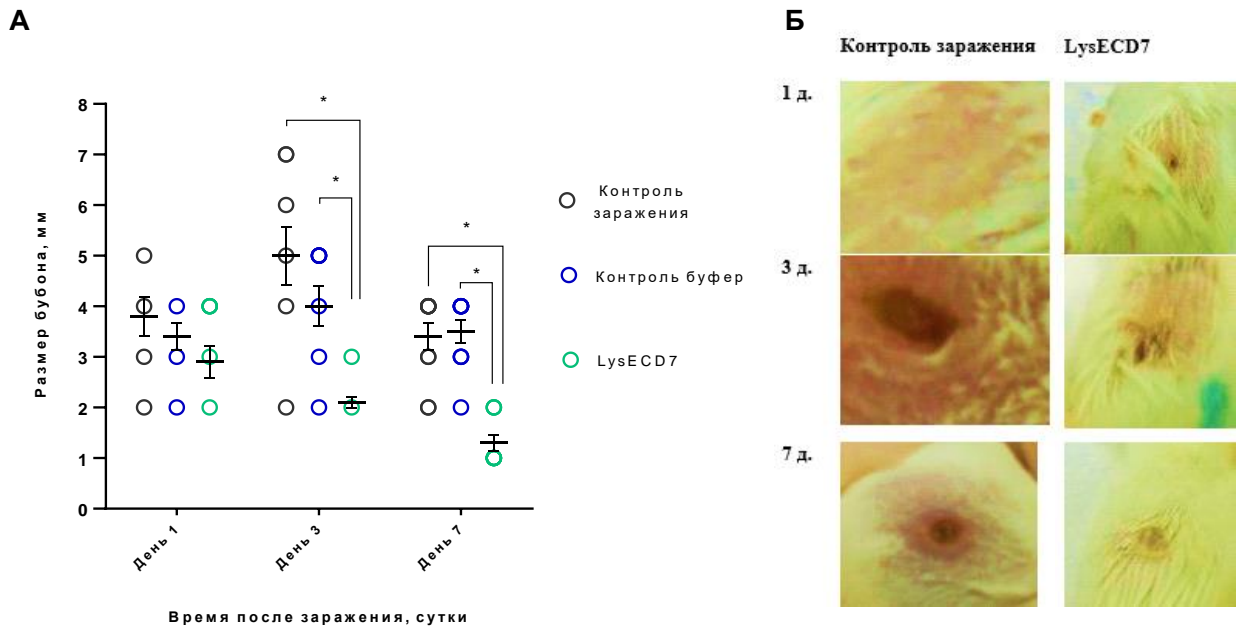


Рисунок 28 – Динамика изменения размера бубона у беспородных мышей, зараженных штаммом *K. pneumoniae* Ts 141-14 при местном лечении LysECD7. Приведены средние значения измерений в группе со стандартной ошибкой среднего (SEM). Звездочкой (*) обозначено статистически значимое снижение размера раны, двухфакторный дисперсионный анализ

Для оценки бактериальной обсемененности раневой поверхности делали смывы с раны, а обсемененности паренхиматозных органов (селезенка) и кожных лоскутов – гомогенаты, которые высевали на плотную питательную среду с дальнейшим культивированием (Рисунок 29).

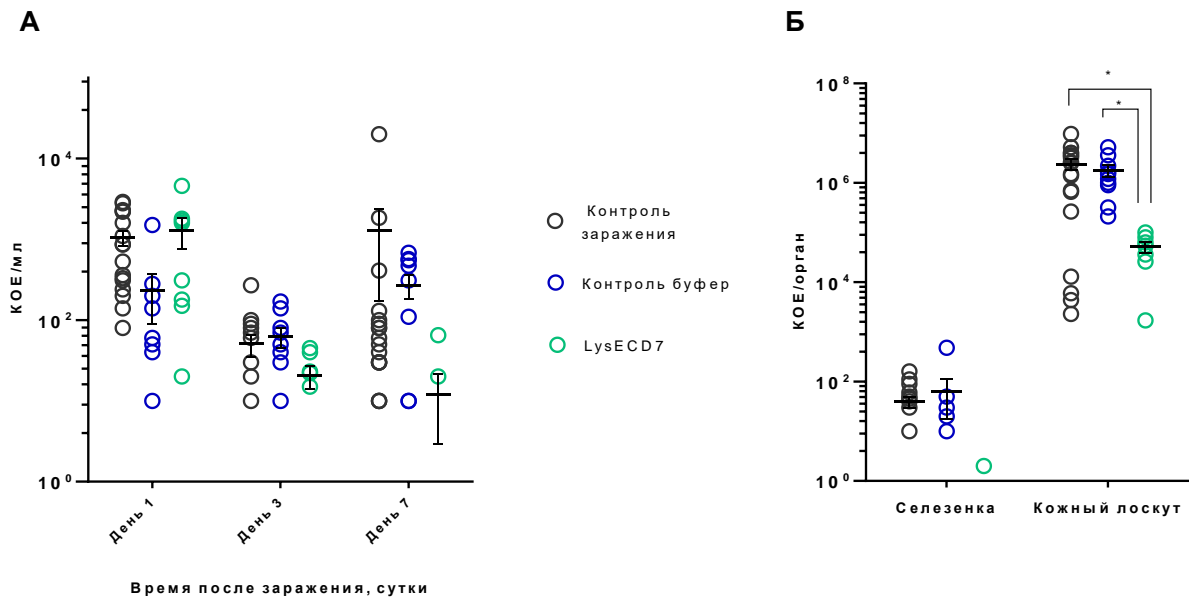


Рисунок 29 – А. Обсеменённость (КОЕ/мл) раневой поверхности беспородных мышей не 1, 3 и 7 дни после заражения. Б. Обсеменённость (КОЕ/орган) селезенки и кожного лоскута зараженных животных на 7 сутки. Приведены средние значения измерений в группе с SEM. Звездочкой (*) обозначено статистически значимое снижение КОЕ, двухфакторный дисперсионный анализ

Анализ обсемененности раневой поверхности зараженных животных на 1, 3 и 7 сутки после заражения выявил снижение количества возбудителя на поверхности раны. К 7 суткам в контрольной группе без лечения количества возбудителя на ране снизилось до $\sim 1,7 \times 10^2$ КОЕ/мл, в группе Трис буфер $\sim 2,7 \times 10^2$ КОЕ/мл. В группе, где применялся LysECD7, этот показатель снизился до $\sim 1,2 \times 10^1$ КОЕ/мл. Таким образом, в опытной группе с местным применением эндוליзина обсемененность раневой поверхности снижается, в отличие от контрольных групп. Наблюдаемая тенденция ярко выражена, хоть и статистически недостоверна (Рисунок 29А).

Оценка обсемененности селезенки и кожного лоскута зараженных животных на 7 сутки после инфицирования клетками штамма *K. pneumoniae* Ts 141-14 показала, что в контрольной группе в селезенке спустя 7 суток после заражения обнаружены клетки штамма *K. pneumoniae* в количестве $\sim 3,9 \times 10^1$ КОЕ/орган, а в кожном лоскуте $\sim 2,4 \times 10^6$ КОЕ/орган. Для группы контроля буфера в селезенке - $\sim 6,4 \times 10^1$ КОЕ/орган, в кожном лоскуте $\sim 1,9 \times 10^6$ КОЕ/орган. Для группы LysECD7 - в селезенке - $\sim 0,3 \times 10^0$ КОЕ/орган, а в кожном лоскуте $\sim 5,1 \times 10^4$ КОЕ/орган (Рисунок 29Б).

Для LysECD7 высевы гомогенатов кожного лоскута показали статистически достоверное снижение обсемененности относительно контрольной группы (контроль заражения) на $1,7 \log_{10}$ (в 47 раз). Снижение высевок селезенки было незначимо, хотя тенденция выражена. Полученные данные свидетельствуют о способности эндолизина снижать не только обсемененность раны, но и, вероятно, замедлять генерализацию инфекционного процесса даже при местном способе лечения.

Таким образом, по результатам анализа экспериментальных данных, полученных с использованием клебсиеллезной раневой модели на беспородных мышах, можно сделать следующие выводы:

1. Местное применение эндолизина LysECD7 оказывало заживляющий эффект на раны, уменьшая размер раны на 2,1 мм по сравнению с контролем заражения;
2. Обсеменённость поверхности раны к 7 суткам после заражения снижалась на $\sim 1,2 \log_{10}$ КОЕ/мл или в 14 раз по сравнению с контрольной группой заражения;
3. Обсемененность кожного лоскута и селезенки к 7 суткам после заражения снижалась на $\sim 1,7 \log_{10}$ КОЕ/мл или в 47 раз и $\sim 2,1 \log_{10}$ КОЕ/мл или в 130 раз, соответственно, по сравнению с контрольной группой заражения.

Таким образом, субстанция эндолизина LysECD7 не только способствовала ранозаживлению и эффективно снижала обсемененность раны, но и, по всей видимости, препятствовала генерализации инфекционного процесса при местном применении.

*Модель ожоговой инфекции у крыс линии «Вистар», вызванной штаммом *P. aeruginosa* Ts 38-16*

Зачастую в клинической практике лечение термических ожогов осложняется вследствие бактериальной инфекции в ожоговой ране, которая может привести к более тяжелому клиническому состоянию пациента, включая последующий сепсис. Поэтому ожоговая модель была выбрана для изучения специфического действия LysECD7.

Для исследования субстанции эндолизина LysECD7 нами была использована ожоговая модель синегнойной инфекции у крыс линии «Вистар», созданная путем термического ожога с использованием нагретой металлической медной пластины с последующим накожным заражением животных клетками штамма *P. aeruginosa* Ts 38-16 в дозе $3,5 \times 10^{10}$ КОЕ/животное, которая является не летальной, но при этом вызывает стабильный инфекционный процесс.

Лечение субстанцией эндолизина LysECD7 проводили спустя 24 ч после заражения ежедневно в течение пяти дней. Используемая концентрация эндолизина (2500 мкг/животное) была выбрана с учетом полученных ранее данных на раневой модели с экстраполяцией на

большой вес животных, а также высокой обсемененности поверхности ожога *P. aeruginosa*. Помимо опытной группы, исследование проводили для контрольных: контроль ожога без заражения, контроль заражения без лечения и контроль буфера, 20 мМ Трис, рН 7,5. Данная схема эксперимента позволяет исключить влияние как буферного раствора нанесения субстанции, так и влияние непосредственно манипуляций (прижигания пластиной) на результаты исследования. Следует отметить, что в ходе эксперимента не отмечалось значимого изменения среднего веса в группе контроля ожога без заражения, что свидетельствует об отсутствии влияния механических манипуляций с животными на исследование.

Во всех группах через сутки после создания ожога и инфицирования ран у крыс на поверхности раны образовывалась плотная корочка, которая на 3-е сутки рана покрывалась толстым, жестким струпом буровато-коричневого цвета, спаянным с подлежащими тканями. При этом, в контрольных группах струп заходил за края раны, наслаиваясь на кожу на расстоянии 1–2 мм. В группе лечения субстанцией эндолизина LysECD7 на 3 сутки от момента создания ожога отмечается образование струпа с участками размягчения, а на 7 сутки, в отличие от контрольных групп, наблюдается фаза регенерации, образования и созревания грануляционной ткани с отслоением края раневой корки, а также отмечали эпителизацию ткани и заживление ожоговой раны (Рисунок 30А).

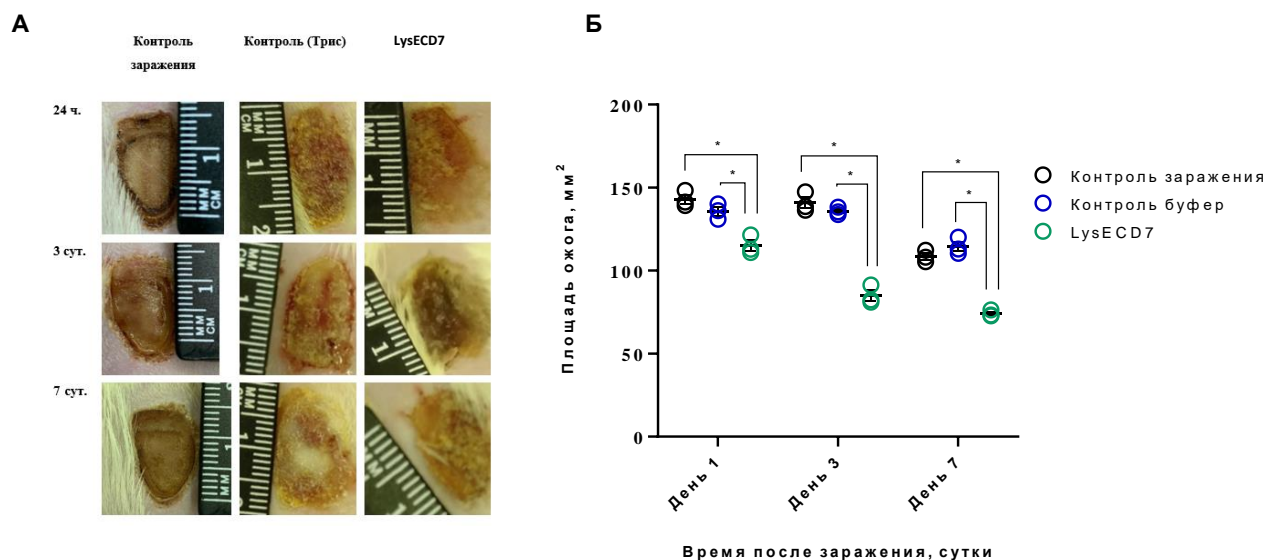


Рисунок 30 – Динамика заживления ожоговой поверхности (А) и изменение площади ожоговой поверхности (Б) у крыс линии «Вистар» после кожного заражения *P. aeruginosa* Ts 38-16 и местного применения субстанции эндолизина LysECD7. Приведены средние значения измерений

в группе с SEM. Звездочкой (*) обозначено статистически значимое снижение размера раны, двухфакторный дисперсионный анализ

В процессе наблюдения за изменением размеров ожоговой поверхности в группе LysECD7 было зафиксировано статистически достоверное уменьшение размера раны по отношению к контрольным группам (к 7 суткам эксперимента на 34,6 и 40,4 мм², соответственно), что свидетельствует о стимуляции процессов заживления ожоговых ран (Рисунок 30Б).

Анализ бактериальной обсемененности ожоговой поверхности на 1 сутки после заражения выявил достоверное снижение КОЕ на 2,1 log₁₀ у животных опытной группы, однако к 3 суткам этот эффект становился статистически незначимым при сохранении общей тенденции. Такая динамика может быть связана с развитием инфекционного процесса, при котором крысы достаточно эффективно справляются с заражением самостоятельно. Тем не менее, на 7 сутки было зафиксировано снижение количества возбудителя до ~ 3,5×10³ КОЕ/мл в группе контроля заражения и до ~ 3,1×10³ КОЕ/мл в группе контроля буфера. В опытной группе при накожном лечении раствором LysECD7 этот показатель снизился до ~ 3,0×10¹ КОЕ/мл (Рисунок 31А).

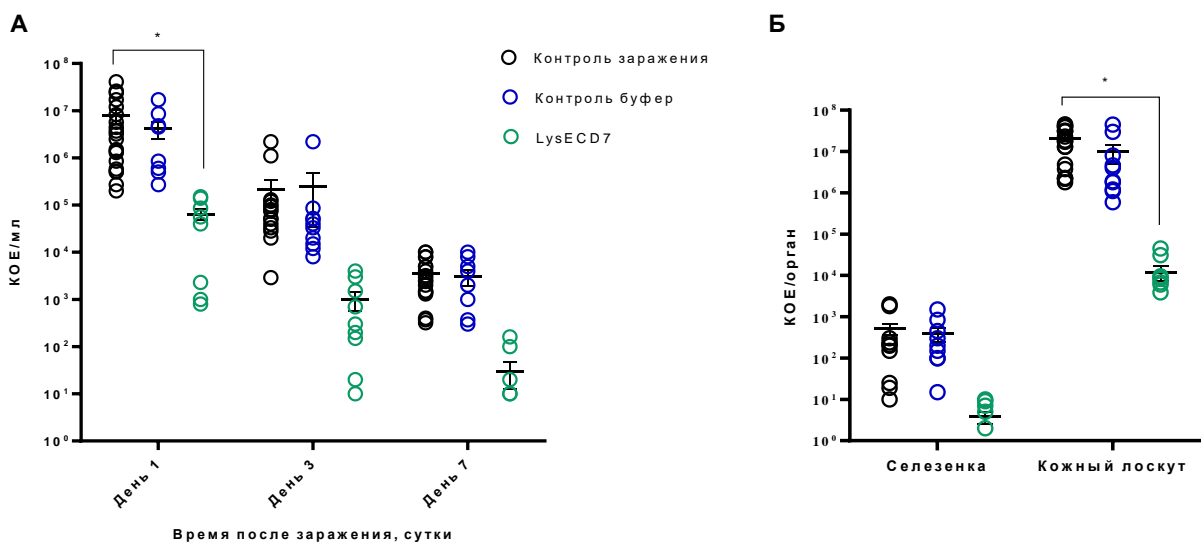


Рисунок 31 – А. Обсеменённость (КОЕ/мл) ожоговой поверхности крыс линии «Вистар» на 1, 3 и 7 дни после заражения. Б. Обсеменённость (КОЕ/орган) селезенки и кожного лоскута зараженных животных на 7 сутки. Приведены средние значения измерений в группе с SEM. Звездочкой (*) обозначено статистически значимое снижение КОЕ ($p < 0,05$), многофакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с поправкой на множественную проверку гипотез методом Сидака

Изучение обсемененности гомогенатов кожного лоскута зараженных животных на 7 сутки после инфицирования ожоговой поверхности при накожном лечении раны показало, что в группе контроля заражения в селезенке обнаружены клетки штамма *P. aeruginosa* Ts 38-16 в количестве $\sim 5,2 \times 10^2$ КОЕ/орган, а в кожном лоскуте $\sim 2,1 \times 10^7$ КОЕ/орган. Для группы контроля буфера в селезенке - $\sim 3,9 \times 10^2$ КОЕ/орган, а в кожном лоскуте $\sim 9,8 \times 10^6$ КОЕ/орган. В опытной группе лечения LysECD7 - в селезенке - $\sim 3,8 \times 10^0$ КОЕ/орган, а в кожном лоскуте $\sim 1,2 \times 10^4$ КОЕ/орган (Рисунок 31Б). Таким образом, в кожном лоскуте наблюдается достоверное снижение микробной обсемененности на $2,9 \log_{10}$ по сравнению с контролем заражения.

В случае высевов гомогенатов селезенки не было показано достоверных различий исследуемой опытной группы и контрольных групп, однако отмечается тенденция к снижению КОЕ при применении эндолизина LysECD7.

Таким образом, при выбранной схеме лечения исследуемым эндолизином было показано, что:

1. Применение эндолизина LysECD7 оказывало заживляющий эффект, уменьшая размер ожоговой поверхности на $34,6 \text{ мм}^2$ по сравнению с контролем заражения;
2. Обсемененность поверхности раны к 7 суткам после заражения снижалась при накожном лечении эндолизином LysECD7 \sim на $3,1 \log_{10}$ КОЕ/мл или в 1166 раз по сравнению с контрольной группой заражения;
3. Обсемененность селезенки и кожного лоскута к 7 суткам после заражения снижалась на $\sim 2,1 \log_{10}$ КОЕ/мл или в 136 раз и на $\sim 3,2 \log_{10}$ КОЕ/мл или в 1750 раз, соответственно, по сравнению с контрольной группой заражения.

Таким образом, субстанция эндолизина LysECD7 не только оказывала ранозаживляющее действие и эффективно снижала обсемененность ожоговой поверхности, но и, по всей видимости, препятствовала генерализации инфекционного процесса при местном применении.

Модель имплант-ассоциированной инфекции, вызванной K. pneumoniae Ts 141-14

Одной проблем в имплантологии является формирование биопленок на поверхности материала имплантата, от которых очень сложно избавиться. Поскольку было показано, что эндолизины и, в частности, LysECD7, способен действовать как на сформированные биопленки, была поставлена модель имплантат-ассоциированной инфекции с использованием биопленкообразующего штамма (клинического изолята) *K. pneumoniae* Ts 141-14, которая является приближением инфекций, развивающихся при трансплантации, а также после хирургических операций с использованием инородных имплантатов.

В ходе предварительного эксперимента трем беспородным крысам в брюшную полость имплантировали диффузионную камеру, наполненную 200 мкл бактериальной культуры *K. pneumoniae* Ts 141-14 с концентрацией бактерий $\sim 5 \times 10^8$ КОЕ/мл. В таких условиях на 4 день бактерии образуют плотные слизистые биопленки, а в окружающих тканях организма возникают очаги воспаления. В более поздние сроки выражено ухудшается общее клиническое состояние животного и появляется плотная биопленка на внутренней поверхности свободной части мембран, поэтому в соответствии с полученными результатами предварительного эксперимента оптимальным сроком введения субстанции эндолизина для оценки их противобиопленочного действия на модели имплант-ассоциированной инфекции являются четвертые сутки после имплантации камеры.

В основном эксперименте участвовало 27 беспородных крыс, которых поделили на 3 группы. Согласно схеме эксперимента в брюшную полость животным имплантировали диффузионные камеры, заполненные бактериальной взвесью *K. pneumoniae*. На 4 день эксперимента, когда внутри камер уже сформировались бактериальные биопленки, группы животных внутрибрюшинно получали лечение раствором эндолизина в количестве 50 мкг/животное, амикацина в количестве 7,5 мг/кг массы тела согласно инструкции по применению или буферным раствором (20 мМ Трис-НСl рН 7,5) в качестве отрицательного контроля. Препараты вводили ежедневно в течение 7 дней. Доза введения эндолизина была выбрана с учетом данных, полученных в экспериментах с биопленками *in vitro*. В качестве положительного контроля был выбран амикацин, так как используемый биопленкообразующий штамм *K. pneumoniae* Ts 141-14 обладает множественной устойчивостью к антибиотикам и чувствителен только к амикацину.

Результаты исследования эффективности действия эндолизина LysECD7 в сравнении с раствором амикацина и контрольным буфером на преформированную *in vivo* биопленку *K. pneumoniae* показали, что в контрольной группе присутствует сильная воспалительная реакция, выраженная в инфильтрации окружающих камеру тканей и наличии экссудата периимплантной зоны в брюшной полости, в то время как в группе, получавшей лечение эндолизином, была отмечена лишь незначительная воспалительная инфильтрация окружающих камеру тканей. Следует отметить, что в отличие от группы, получавшей лечение эндолизином, в группе, получавшей амикацин, на восьмой день развивалась сильная воспалительная инфильтрация с наличием экссудата в брюшной полости (Рисунок 32).

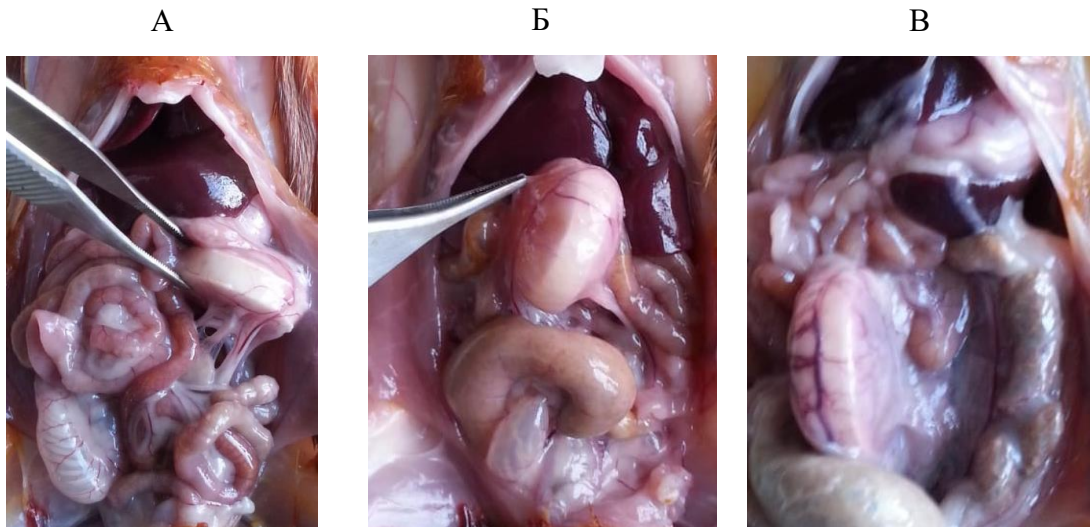


Рисунок 32 – Результаты вскрытия животных на 8 сутки после начала лечения (А) раствором LysECD7, (Б) амикацином, (В) буферным раствором. Адаптировано из [142]

В ходе эксперимента изучали обсемененность внутренних поверхностей диффузионных камер, извлеченных из брюшной полости животных, для оценки антибактериального эффекта изучаемого эндолизина при попадании внутрь камеры (Рисунок 33).

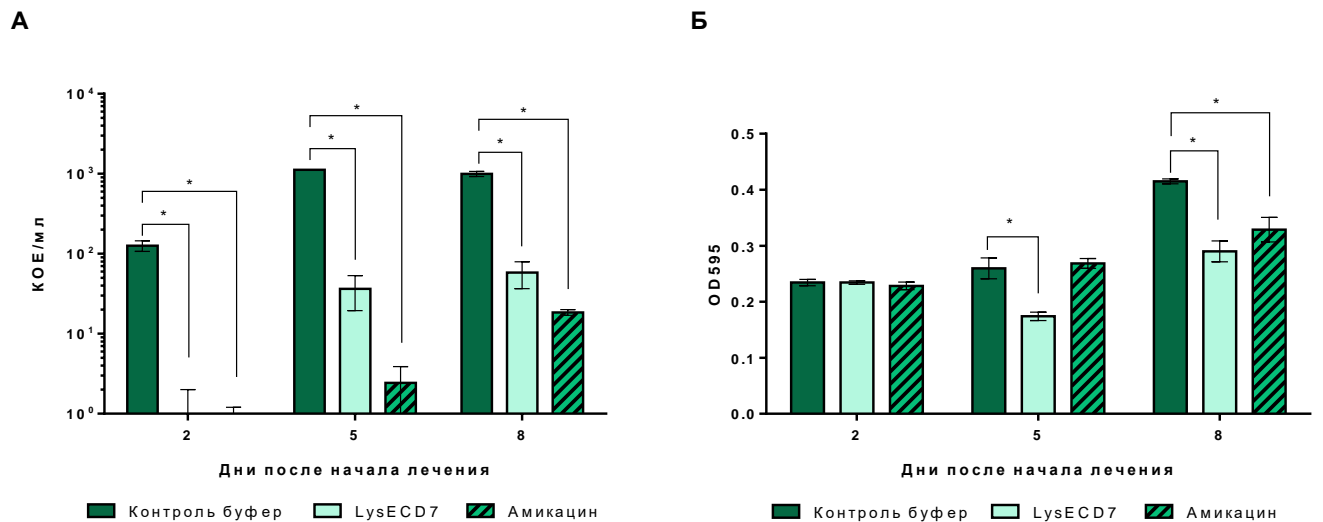


Рисунок 33 – Оценка влияния субстанции эндолизина LysECD7 на преформированные имплант-ассоциированных биопленки, образованные *K. pneumoniae*. А. Обсемененность каркаса диффузионных камер, КОЕ/мл. Б. Динамика изменения плотности (OD_{595}) биопленок внутри диффузионных камер после окраски кристаллическим фиолетовым. Приведены средние значения измерений в группах с SEM. Звездочкой (*) обозначены статистически значимые

отличия ($p < 0,05$), многофакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA). Адаптировано из [142]

На второй день с момента начала лечения в группе, получавшей лечение эндолизином, количество бактерий по сравнению с контролем было снижено на $\sim 1,2 \times 10^2$ КОЕ/мл, на пятый день на $\sim 1,1 \times 10^3$ КОЕ/мл, на восьмой день на $\sim 9,4 \times 10^2$ КОЕ/мл. При лечении амикацином количество бактерий снижалось на $\sim 1,2 \times 10^2$ КОЕ/мл, $\sim 1,2 \times 10^3$ КОЕ/мл и $\sim 9,8 \times 10^2$ КОЕ/мл на второй, пятый и восьмой дни, соответственно. Таким образом, оба варианта лечения оказали статистически значимый антибактериальный эффект, причем амикацин оказывал более выраженное действие, которое, однако, сокращалось к 8 дню исследования (Рисунок 33А).

Плотность биопленок была оценена в результате окраски диффузионных камер раствором кристаллического фиолетового. Было отмечено, что в группе, получавшей лечение эндолизином, оптическая плотность значимо снижается на 5 и 8 дни после начала лечения (в 1,5 и 1,43 раза, соответственно), в то время как в случае амикацина оптическая плотность значимо снижается только на 8 сутки (в 1,26 раз) (Рисунок 33Б).

Таким образом, в ходе лечения исследуемым эндолизином было показано, что:

1. Применение субстанции эндолизина LysECD7 оказывало более выраженный противовоспалительный эффект по сравнению с контрольными группами;
2. Обсемененность каркаса диффузионной камеры снижалась на $\sim 2,1 \log_{10}$ КОЕ/мл, $\sim 1,5 \log_{10}$ КОЕ/мл и $\sim 1,2 \log_{10}$ КОЕ/мл по сравнению с контролем буфера на 2, 5 и 8 дни после заражения, соответственно;
3. Оптическая плотность биопленки на внутренней поверхности каркаса диффузионной камеры снижалась в 1,5 раза и 1,43 раза по сравнению с контролем буфера на 5 и 8 дни после заражения, соответственно.

Таким образом, применение субстанции эндолизина LysECD7 для лечения имплант-ассоциированной инфекции привело к снижению КОЕ бактерий в группах, получавших лечение эндолизином LysECD7, наличия менее плотной биопленки, а также менее выраженном воспалительном процессе в окружающих имплант тканях по сравнению с контролем буфера и контролем амикацина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растущая устойчивость грамотрицательных бактерий к антибиотикам представляет собой угрозу здравоохранению, особенно во внутрибольничной среде, где нозокомиальные инфекции значительно осложняют течения различных заболеваний и ухудшают прогноз выздоровления пациентов. Разработка новых антибактериальных средств на основе литических ферментов бактериофагов, а именно эндолизинов, является перспективным направлением.

В ходе исследования была разработана технология получения субстанции рекомбинантного эндолизина LysECD7, включающая получение генно-инженерной конструкции, кодирующей целевую нуклеотидную последовательность, микробиологический синтез рекомбинантного белка и хроматографическую очистку. Результатом стал разработанный лабораторный регламент производства эндолизинов, который позволяет получать опытные партии субстанции эндолизина для проведения последующих испытаний по исследованию их специфического действия *in vitro* и *in vivo*.

Был разработан проект спецификации на субстанцию эндолизина LysECD7, включающий следующие показатели: Описание, Подлинность, Примеси, Стерильность, Бактериальные эндотоксины, Количественное определение, Упаковка, Хранение, Маркировка, Срок годности. Также были разработаны и апробированы методики контроля качества субстанции эндолизина LysECD7, включающие в себя такие методики как «Электрофорез в полиакриламидном геле», «Специфическая активность», «Стерильность», «Бактериальные эндотоксины» и «Количественное определение».

Для полученной субстанции эндолизина LysECD7 была проведена оценка фармакологической активности *in vitro* и *in vivo*. Были охарактеризованы условия активности фермента и его спектр действия в отношении различных видов бактерий. Было показано, что в него входят грамотрицательные патогены, такие как *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *E. coli*, *S. enterica* и *C. jejuni* (111 из 120 изученных штаммов), но не грамположительные бактерии *S. aureus*, *S. haemolyticus*. Кроме того, для LysECD7 показано, что он активен в отношении сформированных бактериальных биопленок *in vitro*, способен действовать в отношении бактерий в различных фазах роста, а также характеризуются приемлемой степенью устойчивости к различным условиям сред.

Изучение нежелательных эффектов, которые может вызывать эндолизин LysECD7 *in vitro* показало, что белок не оказывает влияния на жизнеспособность эукариотических клеток НЕК293, не оказывает гемолитического эффекта, а также не воздействует на представителей нормальной микрофлоры – бифидо- и лактобактерий, что говорит о потенциальной безопасности применения

препарата на основе LysECD7. Также было показано нейтрализующее действие специфических антител на активность LysECD7, что может стать проблемой при повторном системном применении такого препарата, однако этот аспект требует детального изучения *in vivo*.

Изучение аспектов механизма действия LysECD7 показало, что эндолизин обладает бактерицидным действием благодаря двум взаимодополняющим механизмам: пермеабилizующей активности фермента, а также каталитической эндопептидазной активности – расщепления пептидных связей пептидогликана, что приводит к лизису бактериальных клеток.

По полученным *in vitro* результатам был сделан вывод о перспективности дальнейшей разработки лекарственных препаратов на основе субстанции LysECD7 для лечения местных инфекционных заболеваний, в связи с чем была изучена эффективность LysECD7 на клебсиеллезной раневой и синегнойной ожоговой инфекциях при местном применении. Было показано, что LysECD7 обладает выраженным эффектом в обоих случаях, способствуя ранозаживлению, снижая обсемененность раневых поверхностей, а также препятствуя генерализации инфекционного процесса.

Еще одним перспективным направлением является оценка эффективности действия эндолизина LysECD7 на имплантат-ассоциированной модели биопленкообразования *in vivo*, так как в экспериментах *in vitro* фермент показал значительное снижение или полную элиминацию сформированных биопленок различных видов грамотрицательных бактерий (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*). Внутрибрюшинное применение эндолизина LysECD7 при лечении преформированных *in vivo* биопленок *K. pneumoniae* в условиях диффузионной камеры, имплантированной в организм животных, снижало бактериальные высевы и плотность биопленок, а также препятствовало воспалительному процессу в окружающих имплантат тканях по сравнению с контрольными животными.

Таким образом, исследуемую субстанцию эндолизина LysECD7 можно считать перспективной для создания антибактериальных лекарственных средств для лечения и профилактики различных видов инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, чувствительными к его действию, как при накожном, так и при парентеральном применении: инфекции кожных структур и мягких тканей (в том числе раневые и ожоговые), имплант-ассоциированные инфекции и другие.

ВЫВОДЫ

1. Разработана лабораторная технология получения субстанции эндолизина LysECD7, включающая получение генно-инженерной конструкции, кодирующей целевую нуклеотидную последовательность, микробиологический синтез рекомбинантного белка и хроматографическую очистку.

2. Разработан проект спецификации на оригинальную субстанцию эндолизина LysECD7.

3. Разработаны и апробированы методики контроля качества субстанции эндолизина LysECD7. Предложена методика определения специфической антибактериальной активности, основанная на оценке бактерицидного действия по снижению колониеобразующих единиц модельного штамма *A. baumannii*.

4. Изучена антибактериальная активность субстанции эндолизина LysECD7 в экспериментах *in vitro*. Установлено, что эндолизин LysECD7 проявляет активность в отношении грамотрицательных бактерий в концентрации от 0,5 мкг/мл, а также разрушает бактериальные биопленки, образованные *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*.

6. Изучен спектр антибактериального действия субстанции эндолизина LysECD7. Установлена активность в отношении широкого спектра грамотрицательных патогенов, включая клинические изоляты *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *E. coli*, *S. enterica* и *C. jejuni*.

7. Изучена антибактериальная активность субстанции эндолизина LysECD7 при местном применении на модели раневой инфекции мышей, вызванной *K. pneumoniae*. Показано, что LysECD7 обладает выраженным антибактериальным эффектом, снижая обсемененность раневых поверхностей на 1,6-2,0 log₁₀ КОЕ/мл, способствуя ранозаживлению и препятствуя генерализации инфекционного процесса.

8. Изучена антибактериальная активность субстанции эндолизина LysECD7 при местном применении на модели ожоговой инфекции у крыс, вызванной *P. aeruginosa*. Показано, что LysECD7 обладает выраженным антибактериальным эффектом, снижая обсемененность ожоговых поверхностей на 2,1-3,2 log₁₀ КОЕ/мл, способствуя ранозаживлению и препятствуя генерализации инфекционного процесса.

9. Изучена антибактериальная активность субстанции эндолизина LysECD7 при внутрибрюшинном введении на модели имплантат-ассоциированного биопленкообразования, вызванного *K. pneumoniae*. Установлено снижение бактериальных высевов на 1,2-2,1 log₁₀ КОЕ/мл, снижение плотности биопленок в 1,4-1,5 раз и отсутствие воспалительного процесса в окружающих имплантат тканях по сравнению с контрольными группами животных.

10. Выявлено, что эндолизин LysECD7 обладает бактерицидным действием, вызывая лизис бактериальных клеток, обусловленный как пермебилизирующей активностью, так и разрушением пептидогликана вследствие эндопептидазного действия эндолизина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AA/МБАА	– акриламид/бис-метилен-акриламид
BLAST	– Basic Local Alignment Search Tool, средство поиска основного локального выравнивания
DO	– показатель насыщения кислородом
ESCAPE	– группа патогенов, включающая в себя <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , представителей семейства Enterobacteriaceae
EtBr	– бромистый этидий
FDA	– Food and Drug Administration, управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
GlcNAc	– N-ацетилглюкозамин
LB	– питательная среда Lysogeny broth
LysECD7	– эндолизин бактериофага ECD7
MRSA	– метициллин-устойчивые штаммы <i>Staphylococcus aureus</i>
МТТ-тест	– тест оценки метаболической активности клеток
MurNAc	– N-ацетилмурамовая кислота
OD ₆₀₀	– оптическая плотность при 600 нм
PBS	– фосфатно-солевой буферный раствор
pH	– водородный показатель
SEM	– стандартная ошибка среднего
а.о.	– аминокислотный остаток
Ат	– антитело
БСА	– бычий сывороточный альбумин
БЭ	– бактериальные эндотоксины
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
г/-	– грамотрицательные бактерии
г/+	– грамположительные бактерии
ГЛФ	– готовая лекарственная форма
ГФХ	– гель-фильтрация, гель-эксклюзионная хроматография
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	– додецилсульфат натрия

ед.	– оптические единицы
ЕЭ	– единицы эндотоксинов
ИПТГ	– изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
КОЕ	– колониобразующая единица
ЛАЛ-тест	– <i>Limulus amoebocyte lysate test</i> , тест определения эндотоксинов
ЛПС	– липополисахарид
МИК	– минимальная ингибирующая концентрация
МХАХ	– металл-хелатная аффинная хроматография
ОБИККС	– острые бактериальные инфекции кожи и кожных структур
ОФС	– общая фармакопейная статья
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПГ	– пептидогликан
ПСА	– персульфат аммония
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СКС-домен	– связывающий клеточную стенку домен
Стац	– стационарная фаза роста
ТЕМЕД	– N,N,N',N'-Тетраметилэтилендиамин
ФС	– фармацевтическая субстанция
ФСП	– фармакопейная статья предприятия
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
Эксп	– экспоненциальная фаза роста

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aslam B. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis / Aslam B., Wang W., Arshad M.I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M.H., Nisar M.A., Alvi R.F., Aslam M.A., Qamar M.U., Salamat M.K.F., Baloch Z. // *Infect. Drug Resist.* – 2018. – Vol. 11. – P. 1645–1658.
2. Prestinaci F. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon / Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A. // *Pathog. Glob. Health.* – 2015. – Vol. 109, № 7. – P. 309–318.
3. Peterson E. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens / Peterson E., Kaur P. // *Frontiers in Microbiology* – 2018. – Vol. 9. – e2928.
4. Zhou G. The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents / Zhou G., Shi Q.S., Huang X.M., Xie X.B. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16, № 9. – P. 21711–21733.
5. Holmes A.H. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance / Holmes A.H., Moore L.S., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P.J., Piddock L.J. // *Lancet.* – 2016. – Vol. 387, № 10014. – P. 176–187.
6. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. – Geneva: WHO, 2015. – 28p.
7. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. – Geneva: WHO, 2017. – 7p.
8. Pani A. Off-label use of ceftaroline fosamil: A systematic review / Pani A., Colombo F., Agnelli F., Frantellizzi V., Baratta F., Pastori D., Scaglione F. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2019. – Vol. 54, № 5. – P. 562–571.
9. Flamm R.K. Ceftobiprole Activity against Bacteria from Skin and Skin Structure Infections in the United States from 2016 through 2018 / Flamm R.K., Duncan L.R., Hamed K.A., Smart J.I., Mendes R.E., Pfaller M.A. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2020. – Vol. 64, №6. – e02566-19.
10. Amin A.N. Healthcare-associated infections, infection control and the potential of new antibiotics in development in the USA / Amin A.N., Deruelle D. // *Future Microbiol.* – 2015. – Vol. 10, № 6. – P. 1049–1062.
11. Cubist Pharmaceuticals [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.cubist.com.
12. Draenert R. Novel antibiotics: Are we still in the pre–post-antibiotic era? / Draenert R., Seybold U., Grützner E., Bogner J.R. // *Infection.* – 2015. – Vol. 43, № 2. – P. 145–151.
13. Zhanel G.G. Tedizolid: A novel oxazolidinone with potent activity against multidrug-resistant gram-positive pathogens / Zhanel G.G., Love R., Adam H., Golden A., Zelenitsky S., Schweizer

F., Gorityala B., Lagacé-Wiens P.R., Rubinstein E., Walkty A., Gin A.S., Gilmour M., Hoban D.J., Lynch J.P. 3rd, Karlowsky J.A. // *Drugs*. – 2015. – Vol. 75, № 3. – P. 253–270.

14. Duval R.E. Fight against antimicrobial resistance: We always need new antibacterials but for right bacteria / Duval R.E., Grare M., Demoré B. // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, № 17. – e3152.

15. Zhanel G.G. New Lipoglycopeptides: A Comparative Review of Dalbavancin, Oritavancin and Telavancin / Zhanel G.G., Calic D., Schweizer F., Zelenitsky S., Adam H., Lagacé-Wiens P.R.S., Rubinstein E., Gin A.S., Hoban D.J., Karlowsky J.A. // *Drugs*. – Vol. 70, № 7. – P. 859-886.

16. Sharma R. Ceftazidime-Avibactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination for the Treatment of Resistant Gram-negative Organisms / Sharma R., Eun Park T., Moy S. // *Clin. Ther.* – 2016. – Vol. 38, № 3. – P. 431–444.

17. Novelli A. Meropenem/vaborbactam: a next generation β -lactam β -lactamase inhibitor combination / Novelli A., Giacomo P. Del, Rossolini G.M., Tumbarello M. // *Expert Review of Anti-infective Therapy* – 2020. – Vol.18, №7. – P. 643-655.

18. Tulkens P.M. Profile of a novel anionic fluoroquinolone - Delafloxacin / Tulkens P.M., Bambeke F. Van, Zinner S.H. // *Clinical Infectious Diseases* – 2019. – Vol. 68. – P. S213–S222.

19. Zhanel G.G. Omadacycline: A Novel Oral and Intravenous Aminomethylcycline Antibiotic Agent / Zhanel G.G., Esquivel J., Zelenitsky S., Lawrence C.K., Adam H.J., Golden A., Hink R., Berry L., Schweizer F., Zhanel M.A., Bay D., Lagacé-Wiens P.R.S., Walkty A.J., Lynch J.P. 3rd, Karlowsky J.A. // *Drugs*. – 2020. – Vol. 80, № 3. – P. 285–313.

20. Alosaimy S. Evaluation of Eravacycline: A Novel Fluorocycline / Alosaimy S., Abdul-Mutakabbir J.C., Kebriaei R., Jorgensen S.C.J., Rybak M.J. // *Pharmacotherapy*. – 2020. – T Vol. 40, № 3. – P. 221–238.

21. Andrei S. FDA approved antibacterial drugs: 2018-2019 / Andrei S., Droc G., Stefan G. // *Discoveries* – 2019. – Vol. 7, № 4. – e102.

22. Bilinskaya A. Plazomicin: an intravenous aminoglycoside antibacterial for the treatment of complicated urinary tract infections / Bilinskaya A., Linder K.E., Kuti J.L. // *Expert Review of Anti-infective Therapy* – 2020. – Vol. 18, № 8. – P. 705-720.

23. Hoy S.M. Rifamycin SV MMX®: A Review in the Treatment of Traveller's Diarrhoea / Hoy S.M. // *Clinical Drug Investigation* – 2019. – Vol. 39, № 7. – P. 691–697.

24. Watkins R.R. Lefamulin: A Novel Semisynthetic Pleuromutilin Antibiotic for Community-Acquired Bacterial Pneumonia / Watkins R.R., File T.M. // *Concept and Communication* – 2019. – № 23. – P. 301–316.

25. Zhanel G.G. Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli / Zhanel G.G., Golden A.R., Zelenitsky S.,

Wiebe K., Lawrence C.K., Adam H.J., Idowu T., Domalaon R., Schweizer F., Zhanel M.A., Lagacé-Wiens P.R.S., Walkty A.J., Noreddin A., Lynch J.P., Karlowsky J.A. // *Drugs* – 2019. – Vol. 79, № 3. – P. 271–289.

26. Drulis-Kawa Z. Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications / Drulis-Kawa Z., Majkowska-Skrobek G., Maciejewska B., Delattre A.-S., Lavigne R. // *Current Protein and Peptide Science* – 2013. – Vol. 13, № 8. – P. 699–722.

27. Myelnikov D. An Alternative Cure: The Adoption and Survival of Bacteriophage Therapy in the USSR, 1922-1955 / Myelnikov D. // *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* – 2018. – Vol. 73, № 4. – P. 385–411.

28. Nilsson A.S. Phage therapy-constraints and possibilities / Nilsson A.S. // *Uppsala Journal of Medical Sciences* – 2014. – Vol. 119, № 2. – P. 192–198.

29. Loc-Carrillo C. Pros and cons of phage therapy / Loc-Carrillo C., Abedon S.T. // *Bacteriophage* – 2011. – Vol. 1, № 2. – P. 111–114.

30. Gordillo Altamirano F.L. Phage therapy in the postantibiotic era / Gordillo Altamirano F.L., Barr J.J. // *Clinical Microbiology Reviews* – 2019. – Vol. 32, № 2. – P. 1–25.

31. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru>.

32. Pastagia M. Lysins: The arrival of pathogen-directed anti-infectives / Pastagia M., Schuch R., Fischetti V.A., Huang D.B. // *J. Med. Microbiol.* – 2013. – Vol. 62, № 10. – P. 1506–1516.

33. Rodríguez-Rubio L. Phage lytic proteins: Biotechnological applications beyond clinical antimicrobials / Rodríguez-Rubio L., Gutiérrez D., Donovan D.M., Martínez B., Rodríguez A., García P. // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 36, № 3. – P. 542–552.

34. Schmelcher M. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials / Schmelcher M., Donovan D.M., Loessner M.J. // *Future Microbiol.* – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. 1147–1171.

35. Nelson D.C. Endolysins as Antimicrobials / Nelson D.C., Schmelcher M., Rodriguez-Rubio L., Klumpp J., Pritchard D.G., Dong S., Donovan D.M. // *Advances in Virus Research.* – 2012. – Vol. 83. – P. 299–365.

36. Briers Y. Breaking barriers: Expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria / Briers Y., Lavigne R. // *Future Microbiol.* – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. 377–390.

37. Ghose C. Gram-negative bacterial lysins / Ghose C., Euler C.W. // *Antibiotics.* – 2020. – Vol. 9, № 2. – e74.

38. Broendum S.S. Catalytic diversity and cell wall binding repeats in the phage-encoded endolysins / Broendum S.S., Buckle A.M., McGowan S. // *Molecular Microbiology* – 2018. – Vol. 110, № 6. – P. 879–896.
39. Love M.J. On the catalytic mechanism of bacteriophage endolysins: Opportunities for engineering / Love M.J., Abeysekera G.S., Muscroft-Taylor A.C., Billington C., Dobson R.C.J. // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* – 2020. – Vol. 1868, № 1. – P. 140302.
40. Gerstmans H. Synthetic biology of modular endolysins / Gerstmans H., Criel B., Briers Y. // *Biotechnol. Adv.* – 2018. – Vol. 36, № 3. – P. 624–640.
41. Loeffler J.M. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase / Loeffler J.M., Nelson D., Fischetti V.A. // *Science* – 2001. – Vol. 294, № 5549. – P. 2170–2172.
42. Zhang L. LysGH15 kills *Staphylococcus aureus* without being affected by the humoral immune response or inducing inflammation / Zhang L., Li D., Li X., Hu L., Cheng M., Xia F., Gong P., Wang B., Ge J., Zhang H., Cai R., Wang Y., Sun C., Feng X., Lei L., Han W., Gu J. // *Scientific Reports* – 2016. – Vol. 6. – P. 1–9.
43. Briers Y. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa* / Briers Y., Walmagh M., Grymonprez B., Biebl M., Pirnay J.P., Defraigne V., Michiels J., Cenens W., Aertsen A., Miller S., Lavigne R. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2014. – Vol. 58, № 7. – P. 3774–3784.
44. Defraigne V. Efficacy of artilysin art-175 against resistant and persistent *acinetobacter baumannii* / Defraigne V., Schuermans J., Grymonprez B., Govers S.K., Aertsen A., Fauvart M., Michiels J., Lavigne R., Briers Y. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2016. – Vol. 58, № 7. – P. 3774–3784.
45. Fenton M. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials / Fenton M., Ross P., McAuliffe O., O'Mahony J., Coffey A. // *Bioengineered bugs*. – 2010. – Vol. 1, №1. – P. 1–16.
46. Witzenrath M. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia / Witzenrath M., Schmeck B., Doehn J.M., Tschernig T., Zahlten J., Loeffler J.M., Zemlin M., Müller H., Gutbier B., Schütte H., Hippenstiel S., Fischetti V.A., Suttrop N., Rosseau S. // *Critical Care Medicine* – 2009. – Vol. 37, № 2. – P. 642–649.
47. Fischetti V.A. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens / Fischetti V.A. // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 300, № 6. – P. 357–362.
48. O'Flaherty S. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* /

O'Flaherty S., Coffey A., Meaney W., Fitzgerald G.F., Ross R.P. // *Journal of Bacteriology* – 2005. – Vol. 187, № 20. – P. 7161–7164.

49. Gilmer D.B. Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by streptococcus pyogenes and methicillin-resistant staphylococcus aureus / Gilmer D.B., Schmitz J.E., Euler C.W., Fischetti V.A. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2013. – Vol. 57, № 6. – P. 2743–2750.

50. Schirmeier E. Inhibitory and bactericidal effect of Artilysin® Art-175 against colistin-resistant mcr-1-positive *Escherichia coli* isolates / Schirmeier E., Zimmermann P., Hofmann V., Biebl M., Gerstmans H., Maervoet V.E.T., Briers Y. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2018. – Vol. 51, № 3. – P. 528–529.

51. Lood R. Novel phage Lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter Baumannii* in a mouse bacteremia model / Lood R., Winer B.Y., Pelzek A.J., Diez-Martinez R., Thandar M., Euler C.W., Schuch R., Fischetti V.A. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2015. – Vol. 59, № 4. – P. 1983–1991.

52. Guo M. A novel antimicrobial endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa* / Guo M., Feng C., Ren J., Zhuang X., Zhang Y., Zhu Y., Dong K., He P., Guo X., Qin J. // *Frontiers in Microbiology* – 2017. – Vol. 8. – e273.

53. Gutiérrez D. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5 / Gutiérrez D., Ruas-Madiedo P., Martínez B., Rodríguez A., García P. // *PLoS ONE* – 2014. – Vol. 9, № 9. – e107307.

54. Schuch R. Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant staphylococcus aureus-induced murine bacteremia / Schuch R., Lee H.M., Schneider B.C., Sauve K.L., Law C., Khan B.K., Rotolo J.A., Horiuchi Y., Couto D.E., Raz A., Fischetti V.A., Huang D.B., Nowinski R.C., Wittekind M. // *Journal of Infectious Diseases* – 2014. – Vol. 209, № 9. – P. 1469–1478.

55. Love M.J. Potential for bacteriophage endolysins to supplement or replace antibiotics in food production and clinical care / Love M.J., Bhandari D., Dobson R.C.J., Billington C. // *Antibiotics.* – 2018. – Vol. 7, № 1. – P. 1–25.

56. Abdelkader K. The preclinical and clinical progress of bacteriophages and their lytic enzymes: The parts are easier than the whole / Abdelkader K., Gerstmans H., Saafan A., Dishisha T., Briers Y. // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11, № 2. – e96.

57. Heinz K. Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications / Heinz K., Kandler O. // *Bacteriological reviews.* – 1972. – Vol. 36, № 4. – P. 407–477.

58. Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited / Nikaido H. // *Microbiology and Molecular Biology Reviews* – 2003. – Vol. 67, № 4. – P. 593–656.
59. Vaara M. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane / Vaara M. // *Microbiological Reviews* – 1992. – Vol. 56, № 3. – P. 395–411.
60. Briers Y. Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa* / Briers Y., Walmagh M., Lavigne R. // *Journal of Applied Microbiology* – 2011. – Vol. 110, № 3. – P. 778–785.
61. Oliveira H. A thermostable salmonella phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids / Oliveira H., Thiagarajan V., Walmagh M., Sillankorva S., Lavigne R., Neves-Petersen M.T., Kluskens L.D., Azeredo J. // *PLoS ONE* – 2014. – Vol. 9, № 10. – e108376.
62. Oliveira H. Structural and enzymatic characterization of ABgp46, a novel phage endolysin with broad anti-gram-negative bacterial activity / Oliveira H., Boas D.V., Mesnage S., Kluskens L.D., Lavigne R., Sillankorva S., Secundo F., Azeredo J. // *Frontiers in Microbiology* – 2016. – Vol. 9, № 10. – e108376.
63. Orito Y. *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin can enhance permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane and induce cell lysis / Orito Y., Morita M., Hori K., Unno H., Tanji Y. // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2004. – Vol. 65, № 1. – P. 105–109.
64. Thandar M. Novel engineered peptides of a phage lysin as effective antimicrobials against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* / Thandar M., Lood R., Winer B.Y., Deutsch D.R., Euler C.W., Fischetti V.A. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2016. – Vol. 60, № 5. – P. 2971–2979.
65. Lai M.J. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage Φ AB2 endolysin (LysAB2) against both Gram-positive and Gram-negative bacteria / Lai M.J., Lin N.T., Hu A., Soo P.C., Chen L.K., Chen L.H., Chang K.C. // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2011. – Vol. 90, № 2. – P. 529–539.
66. Peng S.Y. Highly potent antimicrobial modified peptides derived from the *Acinetobacter baumannii* phage endolysin LysAB2 / Peng S.Y., You R.I., Lai M.J., Lin N.T., Chen L.K., Chang K.C. // *Scientific Reports* – 2017. – Vol. 7, № 1. – e11477.
67. Larpin Y. In vitro characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets Gram-negative bacteria / Larpin Y., Oechslin F., Moreillon P., Resch G., Entenza J.M., Mancini S. // *PLoS ONE* – 2018. – Vol. 13, № 2. – e0192507.

68. Dong H. Antibacterial activity of *Stenotrophomonas maltophilia* endolysin P28 against both gram-positive and gram-negative bacteria / Dong H., Zhu C., Chen J., Ye X., Huang Y.P. // *Frontiers in Microbiology* – 2015. – Vol. 6. – e1699.
69. Huang G. Antibacterial properties of phage Abp1 endolysin (PlyAB1) / Huang G., Shen X., Gong Y., Dong Z., Zhao X., Shen W., Wang J., Hu F., Peng Y. // *BMC Infectious Diseases* – 2014. – Vol. 14, № 1. – e681.
70. Wu M. A novel phage PD-6A3, and its endolysin Ply6A3, with extended lytic activity against *Acinetobacter baumannii* / Wu M., Hu K., Xie Y., Liu Y., Mu D., Guo H., Zhang Z., Zhang Y., Chang D., Shi Y. // *Frontiers in Microbiology* – 2019. – Vol. 10. – e3302.
71. Walmagh M. Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages / Walmagh M., Boczkowska B., Grymonprez B., Briers Y., Drulis-Kawa Z., Lavigne R. // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2013. – Vol. 97, № 10. – P. 4369–4375.
72. Briers Y. Engineered endolysin-based “Artilysins” to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens / Briers Y., Walmagh M., Puyenbroeck V. Van, Cornelissen A., Cenens W., Aertsen A., Oliveira H., Azeredo J., Verween G., Pirnay J.P., Miller S., Volckaert G., Lavigne R. // *mBio* – 2014. – Vol. 5, № 4. – e01379-14.
73. Yang H. Antibacterial activity of a novel peptide-modified lysin against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* / Yang H., Wang M., Yu J., Wei H. // *Frontiers in Microbiology* – 2015. – Vol. 6. – e1471.
74. Gerstmans H. From endolysins to Artilysin®s: Novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria / Gerstmans H., Rodríguez-Rubio L., Lavigne R., Briers Y. // *Biochemical Society Transactions* – 2016. – Vol. 44. – P. 123–128.
75. Yan G. The N-terminal and central domain of colicin A enables phage lysin to lyse *Escherichia coli* extracellularly / Yan G., Liu J., Ma Q., Zhu R., Guo Z., Gao C., Wang S., Yu L., Gu J., Hu D., Han W., Du R., Yang J., Lei L. // *Antonie van Leeuwenhoek* – 2017. – Vol. 110, № 12. – P. 1627–1635.
76. Rodríguez-Rubio L. “Artilysation” of endolysin λ Sa2lys strongly improves its enzymatic and antibacterial activity against streptococci / Rodríguez-Rubio L., Chang W.L., Gutiérrez D., Lavigne R., Martínez B., Rodríguez A., Govers S.K., Aertsen A., Hirl C., Biebl M., Briers Y., García P. // *Scientific Reports* – 2016. – Vol. 6. – e35382.
77. São-José C. Engineering of phage-derived lytic enzymes: Improving their potential as antimicrobials / São-José C. // *Antibiotics*. – 2018. – Vol. 7, № 2. – e29.

78. Zampara A. Innolysins: A novel approach to engineer endolysins to kill Gram-negative bacteria / Zampara A., Holst Sørensen M.C., Grimon D., Antenucci F., Briers Y., Brøndsted A.L. // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, №1. – e12087.
79. Oliveira H. Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: Challenges and future prospects for in vivo therapy / Oliveira H., São-José C., Azeredo J. // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10, № 6. – e292.
80. Chopra S. Potential of combination therapy of endolysin MR-10 and minocycline in treating MRSA induced systemic and localized burn wound infections in mice / Chopra S., Harjai K., Chhibber S. // *International Journal of Medical Microbiology* – 2016. – Vol. 306, № 8. – P. 707–716.
81. Yang H. A novel chimeric lysin with robust antibacterial activity against planktonic and biofilm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Yang H., Zhang H., Wang J., Yu J., Wei H. // *Scientific Reports* – 2017. – Vol. 7. – e40182.
82. Raz A. Isolation of Phage Lysins That Effectively Kill *Pseudomonas aeruginosa* in Mouse Models of Lung and Skin Infection / Raz A., Serrano A., Hernandez A., Euler C.W., Fischetti V.A. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2019. – Vol. 63, № 7. – e00024-19.
83. Bae J.Y. Efficacy of Intranasal Administration of the Recombinant Endolysin SAL200 in a Lethal Murine *Staphylococcus aureus* Pneumonia Model / Bae J.Y., Jun K. II, Kang C.K., Song K.H., Choe P.G., Bang J.H., Kim E.S., Park S.W., Kim H. Bin, Kim N.J., Park W.B., Oh M. don // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2019. – Vol. 63, № 4. – e02009-18.
84. Wang Z.F. A phage lysin fused to a cell-penetrating peptide kills intracellular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in keratinocytes and has potential as a treatment for skin infections in mice / Wang Z.F., Kong L.C., Liu Y., Fu Q., Cui Z.L., Wang J., Ma J.J., Wang H.A., Yan Y.X., Sun J.H. // *Applied and Environmental Microbiology* – 2018. – Vol. 84, № 12. – e00380-18.
85. Cheng M. An ointment consisting of the phage lysin LysGH15 and apigenin for decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from skin wounds / Cheng M., Zhan L., Zhang H., Li X., Wang Y., Xia F., Wang B., Cai R., Guo Z., Zhang Y., Ji Y., Sun C., Feng X., Lei L., Yang Y., Han W., Gu J. // *Viruses* – 2018. – Vol. 10, № 5. – e244.
86. Pastagia M. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *staphylococcus aureus* strains / Pastagia M., Euler C., Chahales P., Fuentes-Duculan J., Krueger J.G., Fischetti V.A. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2011. – Vol. 55, № 2. – P. 738–744.
87. Jun S.Y. Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1 / Jun S.Y., Jung G.M., Yoon S.J., Oh M.D., Choi Y.J., Lee W.J., Kong J.C., Seol J.G., Kang S.H. // *International Journal of Antimicrobial Agents* – 2013. – Vol. 41, № 2. – P. 156–161.

88. Jun S.Y. Preclinical safety evaluation of intravenously administered SAL200 containing the recombinant phage endolysin SAL-1 as a pharmaceutical ingredient / Jun S.Y., Jung G.M., Yoon S.J., Choi Y.J., Koh W.S., Moon K.S., Kang S.H. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2014. – Vol. 58, № 4. – P. 2084–2088.

89. Jun S.Y. Pharmacokinetics and Tolerance of the Phage endolysin-based candidate drug SAL200 after a single intravenous administration among healthy volunteers / Jun S.Y., Jang I.J., Yoon S., Jang K., Yu K.S., Cho J.Y., Seong M.W., Jung G.M., Yoon S.J., Kang S.H. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 2017. – Vol. 61, № 6. – e02629-16.

90. Fowler V.G. Exebacase for patients with Staphylococcus aureus bloodstream infection and endocarditis / Fowler V.G., Das A.F., Lipka-Diamond J., Schuch R., Pomerantz R., Jáuregui-Peredo L., Bressler A., Evans D., Moran G.J., Rupp M.E., Wise R., Corey G.R., Zervos M., Douglas P.S., Cassino C. // *Journal of Clinical Investigation* – 2020. – Vol. 130, № 7. – P. 3750-3760.

91. Totté J.E.E. Successful Treatment of Chronic Staphylococcus aureus-Related Dermatoses with the Topical Endolysin Staphfect SA.100: A Report of 3 Cases / Totté J.E.E., van Doorn M.B., Pasmans S.G.M.A. // *Case Reports in Dermatology* – 2017. – Vol. 9, № 2. – P. 19–25.

92. Altschup S.F. Basic Local Alignment Search Tool / S. F. Altschup, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman // *J. Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 215. – P. 403–410.

93. Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements / Kaur J., Kumar A., Kaur J. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 106. – P. 803–822.

94. Block H. Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). A Review // *Methods in Enzymology.* – 2009. – Vol. 463. – P. 439–473.

95. Spriestersbach A. Purification of His-Tagged Proteins // *Methods in Enzymology.* – 2015. – Vol. 559. – P. 1–15.

96. Briers Y. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of Pseudomonas aeruginosa bacteriophages ϕ KZ and EL / Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C.W., Hertveldt K., Lavigne R. // *Molecular Microbiology* – 2007. – Vol. 65, № 5. – P. 1334–1344.

97. Arnau J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins / Arnau J., Lauritzen C., Petersen G.E., Pedersen J. // *Protein Expr. Purif.* – 2006. – Vol. 48, № 1. – P. 1–13.

98. Fong B.A. The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes / Fong B.A., Wu W.Y., Wood D.W. // *Trends Biotechnol.* – 2010. – Vol. 28, № 5. – P. 272–279.

99. Waugh D.S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags // *Protein Expr. Purif.* – 2011. – Vol. 80, № 2. – P. 283–293.

100. Wood D.W. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2014. – Vol. 26, № 1. – P. 54–61.
101. Singh P.K. Simultaneous refolding and purification of a recombinant lipase with an intein tag by affinity precipitation with chitosan / Singh P.K., Gupta M.N. // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* – 2008. – Vol. 1784, № 11. – P. 1825–1829.
102. Yin J. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes / Yin J., Li G., Ren X., Herrler G. // *J. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 127, № 3. – P. 335–347.
103. Wagner S. Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli* / Wagner S., Baarst L., Ytterberg A.J., Klussmerer A., Wagner C.S., Nord O., Nygren P.Å., Wijks K.J. Van, De Gier J.W. // *Molecular and Cellular Proteomics* – 2007. – Vol. 6, № 9. – P. 1527–1550.
104. Liang C. Development of a novel uric-acid-responsive regulatory system in *Escherichia coli* / Liang C., Xiong D., Zhang Y., Mu S., Tang S.Y. // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2015. – Vol. 99, № 5. – P. 2267–2275.
105. Chart H. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5a and EQ1 / Chart H., Smith H.R., La Ragione R.M., Woodward M.J. // *Journal of applied microbiology.* – 2015. – Vol. 89, № 6. – P. 1048–1058.
106. Plotka M. Biochemical characterization and validation of a catalytic site of a highly thermostable Ts2631 endolysin from the *Thermus scotoductus* phage vB-Tsc2631 / Plotka M., Kaczorowska A.K., Morzywolek A., Makowska J., Kozłowski L.P., Thorisdottir A., Skírnisdottir S., Hjörleifsdottir S., Fridjonsson O.H., Hreggvidsson G.O., Kristjansson J.K., Dabrowski S., Bujnicki J.M., Kaczorowski T. // *PLoS ONE* – 2015. – Vol. 10, № 9. – e0137374.
107. Sykilinda N.N. Structure of an *Acinetobacter* broad-range prophage endolysin reveals a C-terminal α -helix with the proposed role in activity against live bacterial cells / Sykilinda N.N., Nikolaeva A.Y., Shneider M.M., Mishkin D. V., Patutin A.A., Popov V.O., Boyko K.M., Klyachko N.L., Miroshnikov K.A. // *Viruses* – 2018. – Vol. 10, № 6. – e309.
108. Panwar P. Expression and purification of *Haemophilus influenzae* rhomboid intramembrane protease GlpG for structural studies / Panwar P., Lemieux M.J. // *Current Protocols in Protein Science* – 2014. – № 76. – 29.9.1-29.9.25.
109. Rodríguez-Rubio L. Lytic Activity of LysH5 endolysin secreted by *Lactococcus lactis* using the secretion signal sequence of bacteriocin Lcn972 / Rodríguez-Rubio L., Gutiérrez D., Martínez B., Rodríguez A., García P. // *Applied and Environmental Microbiology* – 2012. – Vol. 78, № 9. – P. 3469–3472.

110. Chung C.T. One-Step Preparation of Competent Escherichia coli: Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same Solution / Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1989. – Vol. 86, № 7. – P. 2172–2175.
111. Sørensen H.P. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli / Sørensen H.P., Mortensen K.K. // Journal of Biotechnology – 2005. – Vol. 115, № 2. – P. 113–128.
112. Zerbs S. Small-scale expression of proteins in E. coli / Zerbs S., Giuliani S., Collart F. // Methods in Enzymology. – 2014. – Vol. 536. – P. 117–131.
113. Pina A.S. Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins / Pina A.S., Lowe C.R., Roque A.C.A. // Biotechnol. Adv. – 2014. – Vol. 32, № 2. – P. 366–381.
114. Park S. Characterisation of the antibacterial properties of the recombinant phage endolysins AP50-31 and LysB4 as potent bactericidal agents against Bacillus anthracis / Park S., Jun S.Y., Kim C.H., Jung G.M., Son J.S., Jeong S.T., Yoon S.J., Lee S.Y., Kang S.H. // Scientific Reports – 2018. – Vol. 8, № 1. – e18.
115. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. – М.: Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2018.
116. Barinova K. Binding of alpha-synuclein to partially oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induces subsequent inactivation of the enzyme / Barinova K., Khomyakova E., Semenyuk P., Schmalhausen E., Muronetz V. // Archives of Biochemistry and Biophysics – 2018. – Vol. 642. – P. 10–22.
117. O’Toole G.A. Microtiter dish Biofilm formation assay / O’Toole G.A. // Journal of Visualized Experiments – 2010. – № 47. – e2437.
118. Stepanovic S. The Authors Printed in Denmark / Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., DI Bonaventura G., Djukic S., Ruzicka F., Bonaventura D.G. // All rights reserved Journal Compilation C – 2007. – Vol. 115, № 8. – P. 891–900.
119. Danilova T.A. Optical and Electron Microscopic Study of the Morphology and Ultrastructure of Biofilms Formed by Streptococcus pyogenes / Danilova T.A., Smirnova T.A., Danilina G.A., Adzhieva A.A., Andreevskaya S.G., Shevlyagina N.V., Zhukhovitsky V.G. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine – 2018. – Vol. 165, № 1. – P. 110–114.
120. Chen H.L. Identification of a Novel Antimicrobial Peptide from Human Hepatitis B Virus Core Protein Arginine-Rich Domain (ARD) / Chen H.L., Su P.Y., Chang Y.S., Wu S.Y., Liao Y. Di, Yu H.M., Lauderdale T.L., Chang K., Shih C. // PLoS Pathogens – 2013. – Vol. 9, № 6. – e1003425.

121. Loeffler J.M. Phage Lytic Enzyme Cpl-1 as a Novel Antimicrobial for Pneumococcal Bacteremia / Loeffler J.M., Djurkovic S., Fischetti V.A. // *Infection and Immunity* – 2003. – Vol. 71, № 11. – P. 6199–6204.

122. Rashel M. Efficient Elimination of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* by Cloned Lysin Derived from Bacteriophage ϕ MR11 / Rashel M., Uchiyama J., Ujihara T., Uehara Y., Kuramoto S., Sugihara S., Yagyu K., Muraoka A., Sugai M., Hiramatsu K., Honke K., Matsuzaki S. // *The Journal of Infectious Diseases* – 2007. – Vol. 196, № 8. – P. 1237–1247.

123. Miki T. Outer Membrane Permeabilization Is an Essential Step in the Killing of Gram-Negative Bacteria by the Lectin RegIII β / Miki T., Hardt W.D. // *PLoS ONE* – 2013. – Vol. 8, № 7. – e69901.

124. Li G. In vivo and in vitro protein–peptidoglycan interactions / Li G., Peter Howard S. // *Methods in Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 1615. – P. 143–149.

125. Hoyle B.D. Metal binding by the peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K-12 / Hoyle B.D., Beveridge T.J. // *J. Microbiol.* 1984. – Vol. 30, №2. – P. 204–211.

126. Grabowska M. High resolution structure of an M23 peptidase with a substrate analogue / Grabowska M., Jagielska E., Czapinska H., Bochtler M., Sabala I. // *Scientific Reports* – 2015. – Vol. 5. – P.1–8.

127. Frank C. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany / Frank C., Werber D., Cramer J.P., Askar M., Faber M., An Der Heiden M., Bernard H., Fruth A., Prager R., Spode A., Wadl M., Zoufaly A., Jordan S., Kemper M.J., Follin P., Müller L., King L.A., Rosner B., Buchholz U., Stark K., Krause G. // *New England Journal of Medicine* – 2011. – Vol. 365, № 19. – P. 1771–1780.

128. Aleshkin A.V. et al. Bacteriophages as probiotics: Phage-based probiotic dietary supplement in prophylaxis against foodborne infections / Aleshkin A.V., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Kiseleva I., Rubalsky E.O., Borzilov A., Zatevalov A.M., Vasilev D., Zolotukhin S., Zeigarnik M., Galimzyanov Kh.M., Rubalsky O.V. // *Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 14. – P. 31–40.

129. Антонова Н.П. Физико-химические свойства и противомикробная активность рекомбинантного фаголизина бактериофага kpp10, действующего на *Pseudomonas aeruginosa* / Антонова Н.П., Балабаньян В.Ю., Ткачук А.П., Макаров В.В., Гушчин В.А. // *Вестник Российского государственного медицинского университета* – 2018. – № 1. – С.22–29.

130. Antonova N.P. Broad bactericidal activity of the myoviridae bacteriophage Lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against Gram-Negative ESKAPE Pathogens / Antonova N.P., Vasina D.V., Lendel A.M., Usachev E.V., Makarov V.V., Gintsburg A.L., Tkachuk A.P., Gushchin V.A. // *Viruses* – 2019. – Vol. 11, № 3. – P. e284.

131. Федеральный закон от 12.04.2010 №61-ФЗ (ред. от 03.07.2016) «Об обращении лекарственных средств».

132. Антонова Н.П. Подходы к стандартизации фармацевтической субстанции на основе рекомбинантного эндолизина LysECD7 / Антонова Н.П., Васина Д.В., Балабаньян В.Ю., Гушин В.А. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т. 23, № 9. – С. 3–8.

133. Fountoulakis M. Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins / M. Fountoulakis, J.-F. Juranville, M. Manneberg // Journal of Biochemical and Biophysical Methods. – 1992. – Vol. 24. – P.265–274.

134. Antonova N.P. Modulation of endolysin LysECD7 bactericidal activity by different peptide tag fusion / Antonova N.P., Vasina D. V., Rubalsky E.O., Fursov M. V., Savinova A.S., Grigoriev I. V., Usachev E. V., Shevlyagina N. V., Zhukhovitsky V.G., Balabanyan V.U., Potapov V.D., Aleshkin A. V., Makarov V. V., Yudin S.M., Gintsburg A.L., Tkachuk A.P., Gushchin V.A. // Biomolecules – 2020. – Vol. 10, № 3. – P. 1–18.

135. Yang Y. Antibacterial activity of a lytic enzyme encoded by *Pseudomonas aeruginosa* double stranded RNA Bacteriophage phiYY / Yang Y., Le S., Shen W., Chen Q., Huang Y., Lu S., Tan Y., Li M., Hu F., Li Y. // Frontiers in Microbiology – 2018. – № 9. – 1778.

136. Won G. Improved lysis efficiency and immunogenicity of *Salmonella* ghosts mediated by co-expression of λ phage holin-endolysin and ψ x174 gene e / Won G., Hajam I.A., Lee J.H. // Scientific Reports – 2017. – Vol. 7. – e45139.

137. Консорциум бифидобактерий и лактобацилл, используемый для приготовления бактериальных препаратов для лечения дисбиотических состояний желудочно-кишечного тракта детей в возрасте до 3-х лет : Патент Российской Федерации № 2491331 / Амерханова А.М., Алёшкин А.В., Жиленкова О.Г. – 2012119456/10; заявл. 14.05.2012; опубл. 27.08.2013, Бюл. №24.

138. Консорциум бифидобактерий и лактобацилл, используемый для приготовления бактериальных препаратов для лечения дисбиотических состояний желудочно-кишечного людей старше 14 лет // Патент Российской Федерации № 2491336 / Амерханова А.М., Алёшкин А.В., Жиленкова О.Г. – № 2012119470/10; заявл. 14.05.2012; опубл. 27.08.2013, Бюл. №24.

139. Консорциум бифидобактерий и лактобацилл, используемый для приготовления бактериальных препаратов для лечения дисбиотических состояний желудочно-кишечного тракта детей в возрасте от 3 до 14 лет // Патент Российской Федерации № 2491335 / Амерханова А.М., Алёшкин А.В., Жиленкова О.Г. – № 2012119467/10; заявл. 14.05.2012; опубл. 27.08.2013, Бюл. №24.

140. Owen R.A. Structure and activity of ChiX: A peptidoglycan hydrolase required for chitinase secretion by *Serratia marcescens* / Owen R.A., Fyfe P.K., Lodge A., Biboy J., Vollmer W., Hunter W.N., Sargent F. // *Biochemical Journal* – 2018. – Vol. 475, № 2. – P. 415–428.

141. Korndörfer I.P. Structural analysis of the L-alanoyl-D-glutamate endopeptidase domain of *Listeria bacteriophage endolysin Ply500* reveals a new member of the LAS peptidase family / Korndörfer I.P., Kanitz A., Danzer J., Zimmer M., Loessner M.J., Skerra A. // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* – 2008. – Vol. 64, № 6. – P. 644–650.

142. Fursov M. V Antibiofilm Activity of a Broad-Range Recombinant Endolysin LysECD7: In Vitro and In Vivo Study / Fursov M. V, Abdrakhmanova R.O., Antonova N.P., Vasina D. V, Kolchanova A.D., Bashkina O.A., Rubalsky O. V, Samotrueva M.A., Potapov V.D., Makarov V. V, Yudin S.M., Gintsburg A.L., Tkachuk A.P., Gushchin V.A., Rubalskii E.O., Gamaleya N.F. // *Viruses* – 2020. – Vol. 12, № 5. – P. E545.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (ТАБЛИЦЫ)

Таблица 1 – Основные антибиотики, разрешенные к применению FDA за последние 10 лет – С. 12.

Таблица 2 – Последовательности праймеров, используемых для получения экспрессионного вектора – С. 38.

Таблица 3 – Использованные в исследовании спектра действия LysECD7 бактериальные штаммы и клинические изоляты, источники их получения и методы идентификации – С. 45.

Таблица 4 – Схема эксперимента по оценке действия LysECD7 на клебсиеллезной раневой инфекции мышей – С. 55.

Таблица 5 – Схема эксперимента по оценке действия ФС эндолизина LysECD7 в отношении синегнойной раневой (ожоговой) инфекции у крыс линии «Вистар» – С. 56.

Таблица 6 – Схема основного эксперимента по оценке действия ФС эндолизина LysECD7 в отношении клебсиеллезной имплант-ассоциированной инфекции у беспородных крыс – С. 58.

Таблица 7 – Основные характеристики эндолизина LysECD7 – С. 61.

Таблица 8 – Проект спецификации на субстанцию эндолизина LysECD7 – С. 71.

Таблица 9 – Антибактериальная активность LysECD7 в отношении исследуемых штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий – С. 84.

Таблица 10 – Штаммы представителей нормальной микрофлоры человека, использованные для оценки антибактериальной активности LysECD7 – С. 86.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (РИСУНКИ)

Рисунок 1 – Схематичное изображение действия эндолизинов. А. Роль эндолизинов в жизненном цикле бактериофагов. Б. Литическая активность эндолизинов на примере клеточной стенки грамположительной бактерии. – С. 16.

Рисунок 2 – Структуры эндолизинов, действующих на грамположительные (г/+) и грамотрицательные (г/-) бактерии. – С. 17.

Рисунок 3 – Схематичное изображение пептидогликана и различных связей, расщепляемых эндолизинами. MurNAc - N-ацетилмурамовая кислота, GlcNAc - N-ацетилглюкозамин, X – аминокислоты, различающиеся у различных видов бактерий. – С. 18.

Рисунок 4 – Возможные стратегии инженерного подхода в создании эффективных, безопасных и стабильных молекул эндолизинов. – С. 19.

Рисунок 5 – Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий. – С. 22.

Рисунок 6 – Механизм действия эндолизина с внутренней пермеабилizующей активностью. – С. 24.

Рисунок 7 – Основные этапы получения рекомбинантных эндолизинов. – С. 30.

Рисунок 8 – Методы оценки антибактериальной активности эндолизинов. А. Турбидиметрический метод, оценка снижения мутности раствора по сравнению с контролем без добавления эндолизина. Б. Метод оценки бактерицидного действия, подсчет жизнеспособных КОЕ бактерий после инкубации с эндолизином или с контрольным образцом. – С. 36.

Рисунок 9 – Кривая роста клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS, несущего экспрессионный вектор pET42b (+), кодирующий последовательность рекомбинантного эндолизина LysECD7 – С. 63.

Рисунок 10 – А. Электрофореграмма образцов клеток-продуцентов двух клонов, экспрессирующих рекомбинантный LysECD7. Б. Электрофореграмма растворимой (супернатант) и нерастворимой (осадок) фракций LysECD7 после пробного лизиса индуцированных клеток *E. coli* (Mw-маркер молекулярных весов) – С. 63.

Рисунок 11 – А. Хроматограмма, полученная в ходе первого этапа очистки. Б. Хроматограмма, полученная в ходе второго этапа очистки. В. Электрофореграмма полученного эндолизина LysECD7 – С. 67.

Рисунок 12 – Схема технологии получения субстанции эндолизина LysECD7 – С. 68.

Рисунок 13 – Оценка стабильности субстанции LysECD7 в растворе. А. Динамическое лазерное светорассеяние в растворе белка. Б. Зависимость интенсивности светорассеяния от температуры. В. Зависимость гидродинамического диаметра частиц в растворе от температуры – С. 69.

Рисунок 14 – Антибактериальная активность субстанции эндолизина LysECD7 (100 мкг/мл) в отношении модельного тест-штамма *A. baumannii* Ts 50-16, выраженная в % (А) или в КОЕ/мл (Б). Чашки Петри с нанесенной смесью эндолизина и бактериальных клеток по сравнению с отрицательным контролем в 20 мМ Трис-НСl буферном растворе, pH 7,5 (В) – С. 73.

Рисунок 15 – Калибровочный график зависимости оптической плотности окрашенного раствора от концентрации белка – С. 75.

Рисунок 16 – Антибактериальная активность эндолизина LysECD7 в отношении клинического изолята *Acinetobacter baumannii* Ts 50-16. А. Бактерицидная активность различных концентраций LysECD7 в отношении бактерий в экспоненциальной фазе роста, выражена в виде снижения КОЕ/мл по сравнению с контролем без добавления белка. Б. Активность LysECD7 в отношении бактерий в экспоненциальной (Эксп) и стационарной (Стац) фазах роста без и с

добавлением 0,5 мМ ЭДТА, выражена в % относительно контроля без добавления белка. Для всех экспериментов показаны средние значения со стандартной ошибкой среднего после трех независимых экспериментов. Звездочка (*) обозначает значимый бактерицидный эффект, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни – С. 76.

Рисунок 17 – Микрофотографии отпечатка зоны лизиса бактериальной культуры *A. baumannii* Ts 50-16 под действием LysECD7 на твердой питательной среде. А. Общий вид отпечатка. Б. Зона без лизиса клеток (контрольная зона). В. Край зоны лизиса. Г. Зона глубокого лизиса – С. 78.

Рисунок 18 – Активность LysECD7 в различных концентрациях в отношении сформированных биопленок *A. baumannii* Ts 50-16, *K. pneumoniae* Ts 104-14 и *P. aeruginosa* Ts 38-16 после инкубации с ферментом в течение 2 часов, выражена в снижении оптической плотности биопленок OD600. Для всех экспериментов показаны средние значения с SEM после трех независимых экспериментов. Звездочка (*) обозначает значимый бактерицидный эффект относительно контроля ($p < 0,05$), однофакторный дисперсионный анализ – С. 79.

Рисунок 19 – Микрофотографии сформированных на поверхности покровных стекол бактериальных биопленок *A. baumannii* Ts 50-16 после инкубации в течение 2 часов со 100 мкг/мл LysECD7 либо контрольным буфером 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5. А, Б. Световая микроскопия (общее увеличение 400×) биопленок, обработанных буферным раствором (А) или раствором LysECD7 (Б). В, Г, Д, Е. Сканирующая электронная микроскопия (увеличение 2 000× и 16 000×) сформированных биопленок в контроле (В, Д) или под действием эндолизина (Д, Е) – С. 80.

Рисунок 20 – Влияние различных условий среды на антибактериальную активность LysECD7 в отношении клинического изолята *A. baumannii* Ts 50-16. А. Бактерицидная активность LysECD7 в концентрации 1 мкг/мл при различных рН. Б. Бактерицидная активность 10 мкг/мл LysECD7 в присутствии различных концентраций солей. В. Бактерицидная активность различных концентраций LysECD7 в присутствии сыворотки крови. Приведена антибактериальная активность фермента (%) по сравнению с контролем без добавления белка, ns - нет статистически достоверного отличия от контрольной культуры ($p > 0,05$, критерий Манна-Уитни), все остальные значения статистически достоверно отличаются от контроля. Для всех экспериментов показаны средние значения со стандартной ошибкой среднего после трех независимых экспериментов – С. 81.

Рисунок 21 – Результаты оценки действия 100 мкг/мл LysECD7 на штаммы грамотрицательных и грамположительных бактерий. Результаты представлены диаграммами размаха: линии - медианы; ящики – интерквартильный диапазон; усы - мин-макс. Линия отсечения - активность в 33%, обозначена пунктирной линией – С. 83.

Рисунок 22 – Жизнеспособность эукариотических клеток НЕК 293 после инкубации с различными концентрациями LysECD7 – С. 85.

Рисунок 23 – Антибактериальная активность LysECD7 в отношении штамма *A. baumannii* Ts 50-16 в присутствии (А) гипериммунной кроличьей сыворотки, (Б) очищенных специфических антител, концентрация белка 50 мкг/мл. Для всех экспериментов показаны средние значения со стандартной ошибкой среднего после трех независимых экспериментов. Звездочка (*) обозначает значимый бактерицидный эффект, $p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ – С. 87.

Рисунок 24 – Предполагаемый механизм эндопептидазной активности LysECD7, который включает в себя реакцию нуклеофильного замещения активированной молекулой воды при атоме углерода карбонильной группы амидной связи. Активация воды может происходить благодаря депротонированию аминокислотным остатком аспартата или глутамата в присутствии иона Zn^{2+} . – С. 89.

Рисунок 25 – Изучение бактерицидной активности LysECD7. А. Изменение флуоресценции бромистого этидия после добавления к бактериальной суспензии *A. baumannii* Ts 50-16, инкубированной с LysECD7 в различных концентрациях, контрольным 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, бычьим сывороточным альбумином (БСА) или ЭДТА. Б. Антибактериальная активность LysECD7 в различных концентрациях в сравнении с контрольными образцами в отношении *A. baumannii* Ts 50-16. Для всех экспериментов приведены средние значения с SEM после трех независимых измерений. Звездочка (*) обозначает значимый эффект, $p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ – С. 89.

Рисунок 26 – Бактерицидная активность LysECD7 в отношении *A. baumannii* Ts 50-16 в концентрации 1 мкг/мл при различных рН без и с добавлением 0,5 мМ ЭДТА. Приведена антибактериальная активность фермента (%) по сравнению с контролем без добавления белка, ns - нет статистически достоверного отличия от контрольной культуры ($p > 0,05$, критерий Манна-Уитни), все остальные значения статистически достоверно отличаются от контроля. Для всех экспериментов показаны средние значения со стандартной ошибкой среднего после трех независимых экспериментов – С. 91.

Рисунок 27 – Анализ прямого связывания LysECD7 с компонентами клеточной стенки. А. Электрофореграмма LysECD7 после инкубации с различными концентрациями ЛПС *P. aeruginosa*. Б. Антибактериальная активность 5 мкг/мл LysECD7 после инкубации с ЛПС. В. Электрофореграмма LysECD7 после инкубации с различными концентрациями ПГ *E. coli*. В. Антибактериальная активность 10 мкг/мл LysECD7 после инкубации с ПГ. Для всех экспериментов показаны средние значения со стандартной ошибкой среднего после трех

независимых экспериментов. Звездочка (*) обозначает значимый бактерицидный эффект по отношению к контролю, $p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ – С. 92.

Рисунок 28 – Динамика изменения размера бубона у беспородных мышей, зараженных штаммом *K. pneumoniae* Ts 141-14 при местном лечении LysECD7. Приведены средние значения измерений в группе со стандартной ошибкой среднего (SEM). Звездочкой (*) обозначено статистически значимое снижение размера раны, двухфакторный дисперсионный анализ – С. 96.

Рисунок 29 – А. Обсеменённость (КОЕ/мл) раневой поверхности беспородных мышей на 1, 3 и 7 дни после заражения. Б. Обсеменённость (КОЕ/орган) селезенки и кожного лоскута зараженных животных на 7 сутки. Приведены средние значения измерений в группе со стандартной ошибкой среднего (SEM). Звездочкой (*) обозначено статистически значимое снижение КОЕ, двухфакторный дисперсионный анализ – С. 97.

Рисунок 30 – Динамика заживления ожоговой поверхности (А) и изменение площади ожоговой поверхности (Б) у крыс линии «Вистар» после кожного заражения *P. aeruginosa* Ts 38-16 и местного применения субстанции эндолизина LysECD7. Приведены средние значения измерений в группе со стандартной ошибкой среднего (SEM). Звездочкой (*) обозначено статистически значимое снижение размера раны, двухфакторный дисперсионный анализ – С. 99.

Рисунок 31 – А. Обсеменённость (КОЕ/мл) ожоговой поверхности крыс линии «Вистар» на 1, 3 и 7 дни после заражения. Б. Обсеменённость (КОЕ/орган) селезенки и кожного лоскута зараженных животных на 7 сутки. Приведены средние значения измерений в группе со стандартной ошибкой среднего (SEM). Звездочкой (*) обозначено статистически значимое снижение КОЕ ($p < 0,05$), многофакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с поправкой на множественную проверку гипотез методом Сидака – С. 100.

Рисунок 32 – Результаты вскрытия животных на 8 сутки после начала лечения (А) раствором LysECD7, (Б) амикацином, (В) буферным раствором – С. 103.

Рисунок 33 – Оценка влияния субстанции эндолизина LysECD7 на преформированные имплант-ассоциированных биопленки, образованные *K. pneumoniae*. А. Обсеменённость каркаса диффузионных камер, КОЕ/мл. Б. Динамика изменения плотности (OD_{595}) биопленок внутри диффузионных камер после окраски кристаллическим фиолетовым. Приведены средние значения измерений в группах со стандартной ошибкой среднего (SEM). Звездочкой (*) обозначены статистически значимые отличия ($p < 0,05$), многофакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) – С. 103.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность и глубокую признательность своим научным руководителям Гущину Владимиру Алексеевичу и Балабаньяну Вадиму Юрьевичу за руководство над диссертацией, неоценимую помощь и поддержку в выполнении исследований.

Автор выражает искреннюю благодарность всему коллективу лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов, лаборатории трансляционной биомедицины и лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России. Особую благодарность автор выражает к.б.н. Васиной Дарье Владимировне за полученные знания и опыт, а также помощь в проведении исследования.

Автор выражает благодарность коллективу ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского за вклад в развитие исследуемой тематики и тесное сотрудничество в проведении экспериментальных работ.

Постановка инфекционных животных моделей проводилась в сотрудничестве с ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора и ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России. Автор выражает отдельную благодарность всем сотрудникам коллаборации, оказавшим неоценимую помощь в проведении экспериментов с участием лабораторных животных.