

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук, доцент

Балабаньян Вадим Юрьевич

кандидат биологических наук

Гущин Владимир Алексеевич

Официальные оппоненты:

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по научной работе научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством

Лякина Марина Николаевна – доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт Фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств, заместитель директора

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «28» сентября 2021 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.11 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8 стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Дроздов Владимир Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Tascionelli 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.

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).

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».

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Получение субстанции рекомбинантного эндолизина *LysECD7*. Эндолизин *LysECD7* представляет собой фермент литического бактериофага семейства *Myoviridae* *ECD7*, поражающего клетки *Escherichia* (NCBI: txid1981499), изолированного из культуры шигатоксин-продуцирующего штамма *E. coli* O104:H4 (Frank et al., 2011).

Для получения рекомбинантного фермента в полногеномной последовательности бактериофага *ECD7* была выявлена его кодирующая нуклеотидная последовательность, которая

в дальнейшем была получена синтетическим путем и помещена в экспрессионную кассету pET42b (+). Методом высокоэффективной трансформации получен экспрессионный штамм на основе *E. coli* BL21(DE3)pLysS, обеспечивающий стабильную экспрессию целевого белка с высоким выходом и подходящий для экспрессии токсичных для продуцента белков. Из бактериальной культуры штамма-продуцента был получен клеточный лизат, содержащий растворимую форму эндолизина LysECD7.

Очистку целевого белка проводили в два этапа с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии и последующей гель-фильтрации. Электрофореграмма полученных фракций белка показала, что такая схема обеспечивает необходимую чистоту целевого продукта. Полученный стерильный раствор эндолизина в 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5 и представлял собой исследуемую субстанцию LysECD7.

Разработанная технология обеспечивает воспроизводимый результат при получении различных опытных партий исследуемой субстанции с выходом белка 15-20 мг/г клеток.

2. Разработка подходов к стандартизации и методов контроля качества субстанции эндолизина LysECD7. Согласно предложенным в Государственной Фармакопее (ГФ) XIV издания испытаниям для биологических и, в частности, биотехнологических фармацевтических субстанций (ФС), был предложен проект спецификации на субстанцию LysECD7, включающий в себя такие показатели как Описание, Подлинность, Примеси, Стерильность, Бактериальные эндотоксины, Количественное определение, Упаковка, Маркировка, Хранение, Срок годности.

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.

С использованием вертикального денатурирующего гель-электрофореза была подтверждена подлинность субстанции по молекулярному весу мономера LysECD7 (16,1 кДа), а также с помощью анализа интенсивности окраски полос на геле показано, что при получении субстанции LysECD7 по разработанной технологии чистота составляет более 95%.

Для оценки специфической антибактериальной активности субстанции LysECD7 был предложен метод оценки бактерицидного действия по снижению колониеобразующих единиц (КОЕ) модельного штамма *A. baumannii* Ts 50-16, представляющего собой клинический изолят,

выделенный из мокроты пациента и идентифицированный по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам. Активность оценивали при инкубации суспензии экспоненциально растущих клеток тест-штамма *A. baumannii* (10^5 - 10^6 КОЕ) и 100 мкг/мл субстанции 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.

Стерильность полученной субстанции была показана с помощью метода мембранной фильтрации по отсутствию микробного роста в питательной среде.

Содержание бактериальных эндотоксинов оценивалось с помощью хромогенного ЛАЛ-теста по конечной точке и составило $\leq 0,5$ ЕЭ/мг субстанции для опытных партий, что соответствует допустимым по ОФС нормам, исходя из предполагаемых терапевтических дозировок для введения человеку.

Определение концентрации эндолизина колориметрическим методом с бицинхониновой кислотой показало, что этот метод позволяет количественно определить содержание активного вещества в субстанции и является приемлемым для стандартизации субстанции LysECD7 по показателю «Количественное определение».

Исследование стабильности субстанции эндолизина LysECD7 при хранении раствора при $+2^{\circ}\text{C} \dots +8^{\circ}\text{C}$ 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 то же время, лиофилизованная субстанция сохраняет свои свойства при тех же условиях хранения в течение 1 года.

Полученные данные позволяют провести дальнейшую разработку нормативной документации на субстанцию и лекарственных средств на ее основе.

3. Изучение антибактериальной активности эндолизина LysECD7 в экспериментах *in vitro*. Изучение антибактериального эффекта LysECD7 проводили на модельном штамме *A. baumannii* Ts 50-16 по снижению КОЕ после инкубации суспензии бактерий и раствора эндолизина. Было показано, что эндолизин проявляет выраженную дозозависимую бактерицидную активность в отношении экспоненциально растущих клеток бактерий в концентрациях от 0,5 мкг/мл, снижая количество КОЕ/мл до двух порядков. С увеличением концентрации наблюдалось снижение бактерий на 10^5 КОЕ/мл (Рисунок 1).

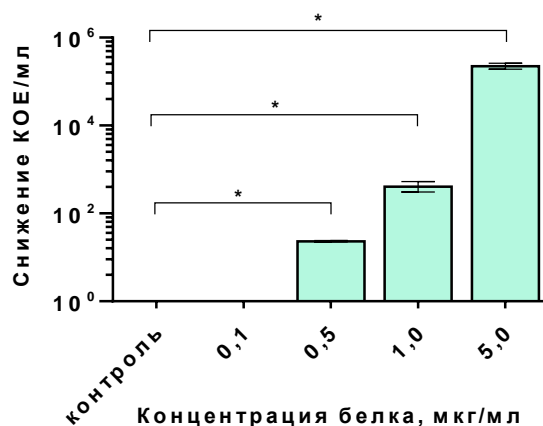


Рисунок 1 – Бактерицидная активность различных концентраций LysECD7 в отношении бактерий *Acinetobacter baumannii* Ts 50-16 по сравнению с контролем без добавления белка. Для всех экспериментов показаны средние значения со стандартной ошибкой среднего (SEM) после трех независимых экспериментов. * - значимый бактерицидный эффект ($p < 0,05$), критерий Манна-Уитни

Сканирующая электронная микроскопия показала полное или частичное разрушение бактериальных клеток под действием LysECD7 (Рисунок 2).

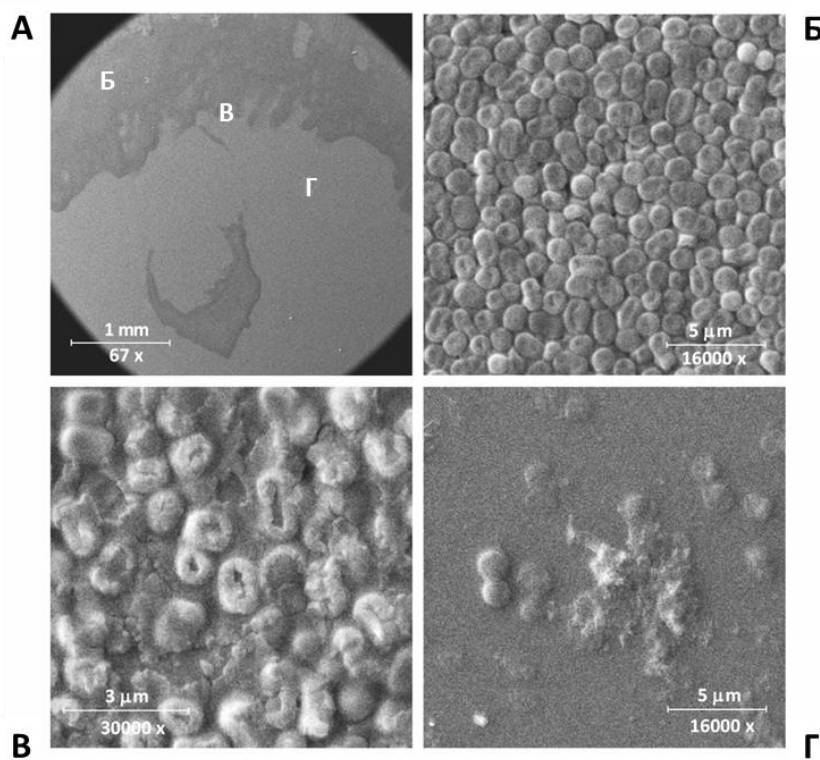


Рисунок 2 – Микрофотографии отпечатка зоны лизиса бактериальной культуры *A. baumannii* Ts 50-16 под действием LysECD7 на твердой питательной среде. А. Общий вид отпечатка. Б. Зона без лизиса клеток (контрольная зона). В. Край зоны лизиса. Г. Зона глубокого лизиса

Также была изучена способность LysECD7 действовать *in vitro* в отношении сформированных бактериальных биопленок *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* (Рисунок 3).

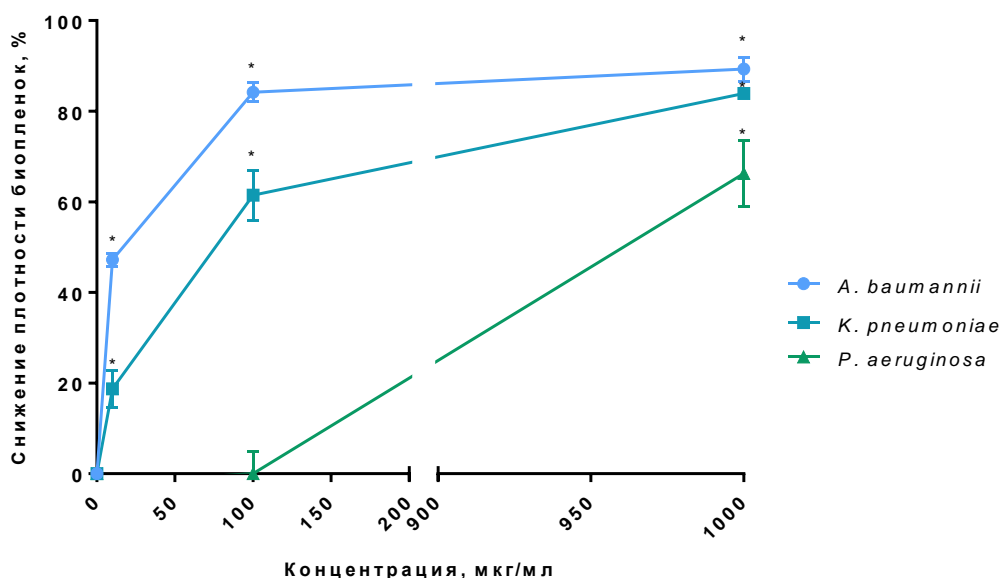


Рисунок 3 – Активность LysECD7, выраженная в снижении оптической плотности биопленок в %, в различных концентрациях в отношении сформированных биопленок *A. baumannii* Ts 50-16, *K. pneumoniae* Ts 104-14 и *P. aeruginosa* Ts 38-16 после инкубации с ферментом в течение 2 часов. Для всех экспериментов показаны средние значения с SEM после трех независимых экспериментов. * - значимый бактерицидный эффект относительно контроля ($p < 0,05$), однофакторный дисперсионный анализ

Было показано, что LysECD7 разрушает сформированные биопленки всех трех видов бактерий, при этом наиболее значительная элиминация биопленок (до 90%) достигается при концентрации 1 мг/мл.

Действие эндолизина на бактериальные биопленки того же штамма *A. baumannii* было подтверждено с помощью микроскопии (Рисунок 4). Микрофотографии биопленок после обработки раствором LysECD7 показали не только нарушение структуры биопленки, но и полное разрушение целостности бактериальных клеток, входящих в ее состав.

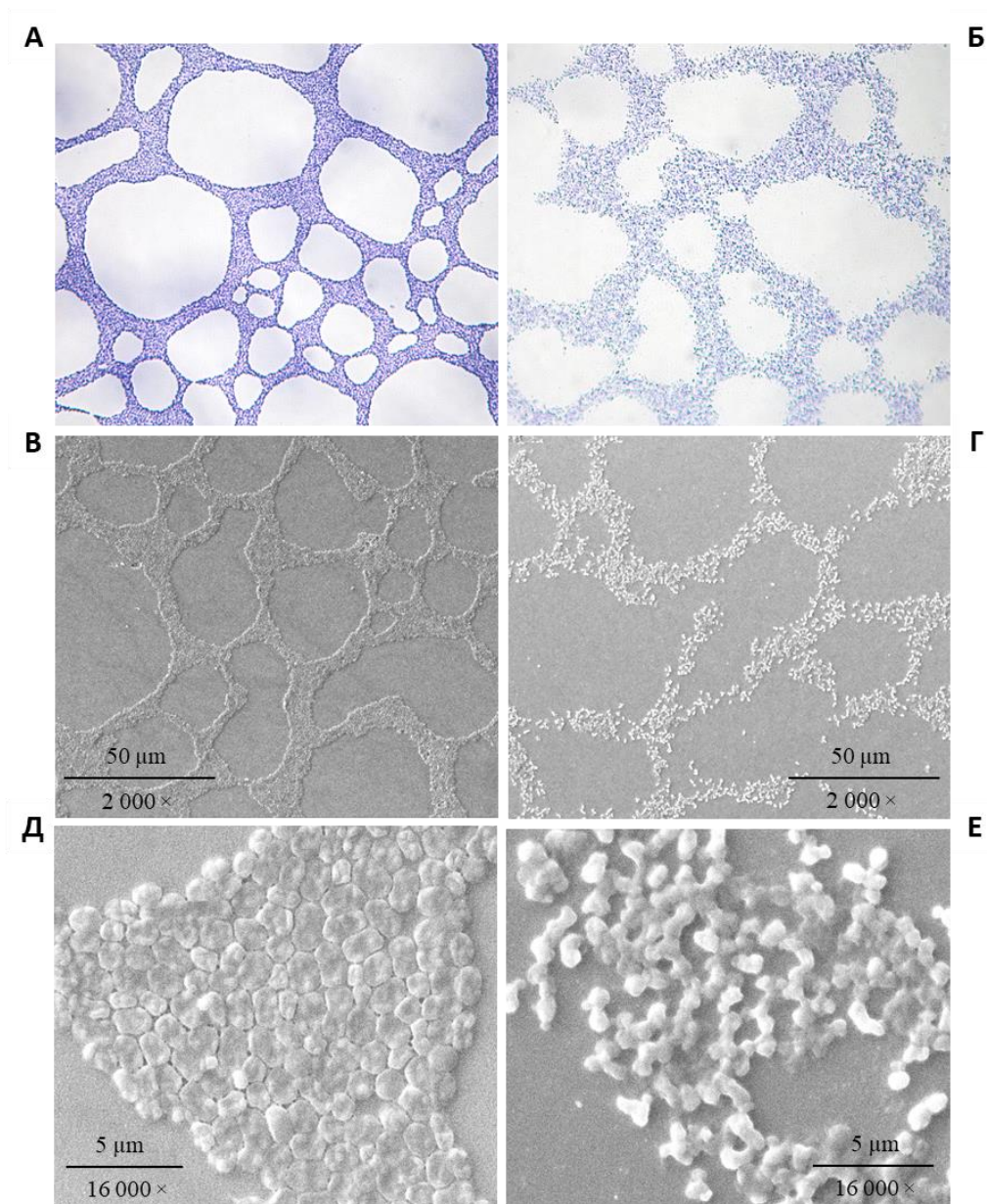


Рисунок 4 – Микрофотографии сформированных на поверхности покровных стекол бактериальных биопленок *A. baumannii* Ts 50-16 после инкубации в течение 2 часов со 100 мкг/мл LysECD7 либо контрольным буфером 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5. А, Б. Световая микроскопия (общее увеличение 400 ×) биопленок, обработанных буферным раствором (А) или раствором LysECD7 и окрашенных кристаллическим фиолетовым красителем (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)

Таким образом, для исследуемого эндолизина LysECD7 был показан выраженный антибактериальный эффект в экспериментах *in vitro*.

При изучении спектра действия эндолизина LysECD7 было показано, что эндолизин способен действовать на широкий спектр грамотрицательных микроорганизмов, в том числе возбудителей внутрибольничных инфекционных заболеваний – клинических изолятов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *E. coli*, *S. enterica* и *C. jejuni*. В концентрации 100 мкг/мл фермент действовал на 111 из 120 штаммов грамотрицательных бактерий с медианным значением активности 98-100% для *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *E. coli* и *S. enterica* и 43% для *C. jejuni* (Рисунок 5).

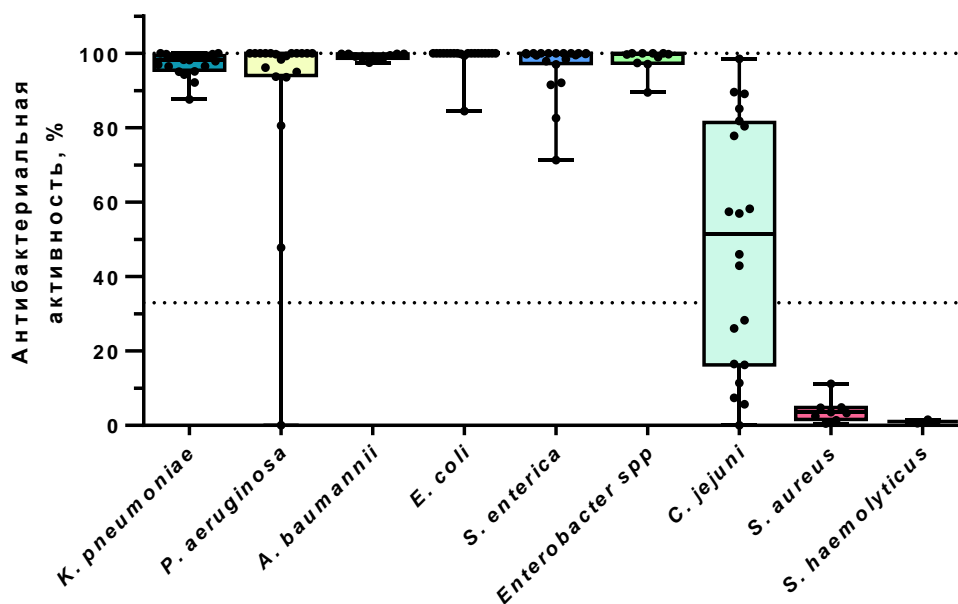


Рисунок 5 – Результаты оценки действия 100 мкг/мл LysECD7 на штаммы грамотрицательных и грамположительных бактерий. Результаты представлены диаграммами размаха: линии - медианы; ящики – интерквартильный диапазон; усы - мин-макс. Линия отсечения - активность в 33%, обозначена пунктирной линией

В отношении изученных представителей грамположительных бактерий (*S. aureus*, *S. haemolyticus*) бактерицидного эффекта не было выявлено. Таким образом, спектр действия LysECD7 ограничивается только грамотрицательными бактериями, что может быть объяснено различиями в строении клеточных стенок грамотрицательных и грамположительных бактерий.

4. Изучение аспектов механизма действия эндолизина LysECD7. *In silico* анализ аминокислотной последовательности LysECD7 показал, что фермент является цинк-зависимой D-Ala-D-Ala эндопептидазой (семейство M15), и, предположительно, гидролизует амидные связи в пептидных мостиках между слоями гликана или в поперечных сшивках, что приводит к расщеплению клеточной стенки и последующему лизису бактерий. При нарушении целостности

клеточной стенки и лизисе клеток под действием LysECD7, происходит выход содержимого клеток в окружающее пространство, о чем свидетельствует увеличение флуоресценции непроницающего красителя – бромистого этидия (EtBr), взаимодействующего с нуклеиновыми кислотами (Рисунок 6).

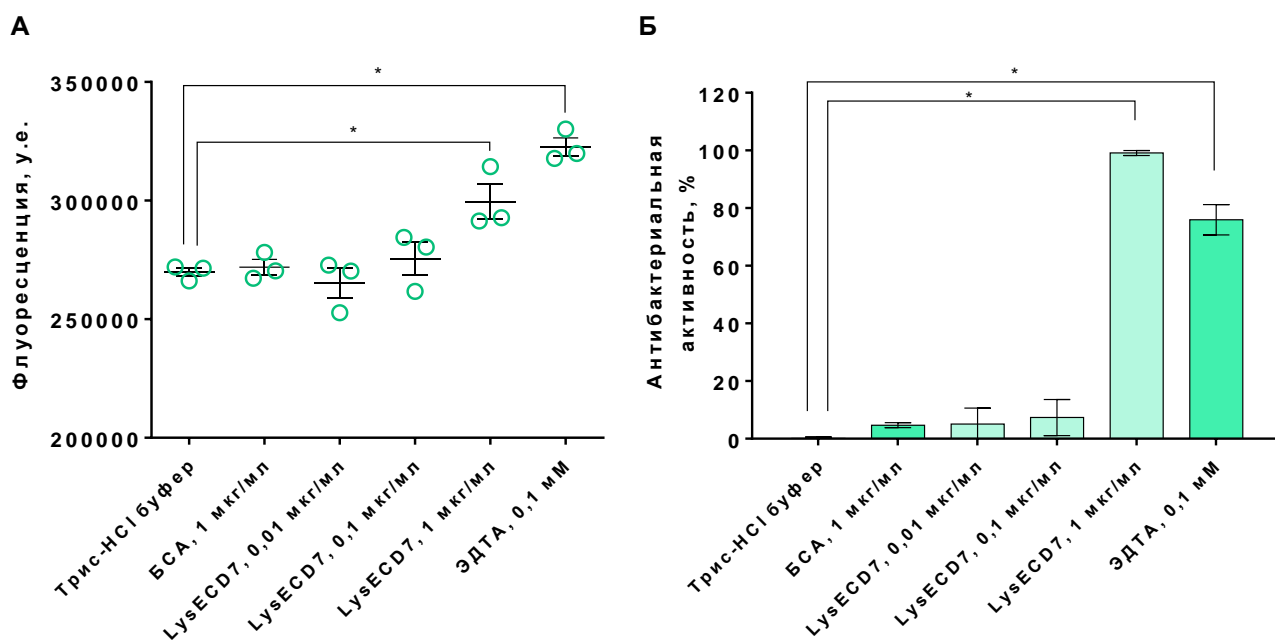


Рисунок 6 – Изучение бактерицидной активности LysECD7. А. Изменение флуоресценции EtBr после добавления к бактериальной суспензии *A. baumannii* Ts 50-16, инкубированной с LysECD7 в различных концентрациях, 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, бычьим сывороточным альбумином (1 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, БСА, отрицательный контроль) или ЭДТА (0,1 мМ, положительный контроль). 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. * - значимый эффект, $p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ

Это свидетельствует о пермебилизирующей активности фермента (увеличение проницаемости мембран) и подтверждает его бактерицидный тип действия на клетки.

Взаимодействие LysECD7 со своей мишенью – пептидогликаном, было показано с помощью денатурирующего электрофореза. Инкубация пептидогликана *E. coli* с ферментом приводила к изменению белкового профиля на электрофореграмме (появление высокомолекулярных соединений и белков с молекулярным весом ниже исходного), что свидетельствует о каталитической активности эндолизина. Более того, антибактериальная активность LysECD7 в отношении *A. baumannii* в присутствии пептидогликана значительно

падала при увеличении концентрации последнего, а при достижении соотношения 1:100 не отличалась от контроля без добавления белка. 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 активности лизина в отношении живых бактерий.

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

5. Изучение антибактериального действия эндолизина LysECD7 на экспериментальных моделях инфекции. Для оценки специфического действия исследуемой субстанции *in vivo* было исследовано три инфекционные модели животных.

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

В ходе исследования в результате внутрикожного заражения клетками клинического изолята *K. pneumoniae* Ts 141-14 в дозе 2×10^8 КОЕ/животное был создан инфекционный абсцесс, который, самостоятельно вскрываясь через сутки после заражения, образует инфицированную раневую поверхность.

Всего в исследование было включено 3 группы: контроль заражения (n=20), контроль лечения буфером (n=10) и местное лечение эндолизином, 500 мкг/животное (n=10). Лечение эндолизином LysECD7 проводили путем нанесения раствора на поверхность раны спустя 24 ч после заражения, когда формировалась открытая раневая поверхность, ежедневно в течение пяти дней.

Изучение патоморфологических изменений раневой поверхности показало, что к 7 суткам в опытной группе, в отличие от контрольных, была отмечена эпителизация ткани и заживление раны. Оценка линейных размеров раневой поверхности, показала снижение размера или полное исчезновение раны в опытной группе на 7 день, размер раны был достоверно уменьшен на 2,1 мм и 2,2 мм по сравнению с контролем заражения и контролем буфера, соответственно. Таким образом, местное применение эндолизина LysECD7 оказывало заживляющий эффект на раны.

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 (Рисунок 7).

Анализ обсемененности раневой поверхности зараженных животных на 1, 3 и 7 сутки после заражения выявил снижение количества возбудителя на поверхности раны (Рисунок 7А). К 7 суткам в контрольных группах количества возбудителя на ране составило, в среднем, $\sim 1,7 \times 10^2$ КОЕ/мл в контроле заражения, в группе буфер контроль $\sim 2,7 \times 10^2$ КОЕ/мл. В группе, где применялся LysECD7, этот показатель снизился до $\sim 1,2 \times 10^1$ КОЕ/мл. Таким образом, в опытной группе обсемененность раневой поверхности ниже, чем в контрольных группах (на 1,2 log₁₀ КОЕ/мл по сравнению с контролем заражения).

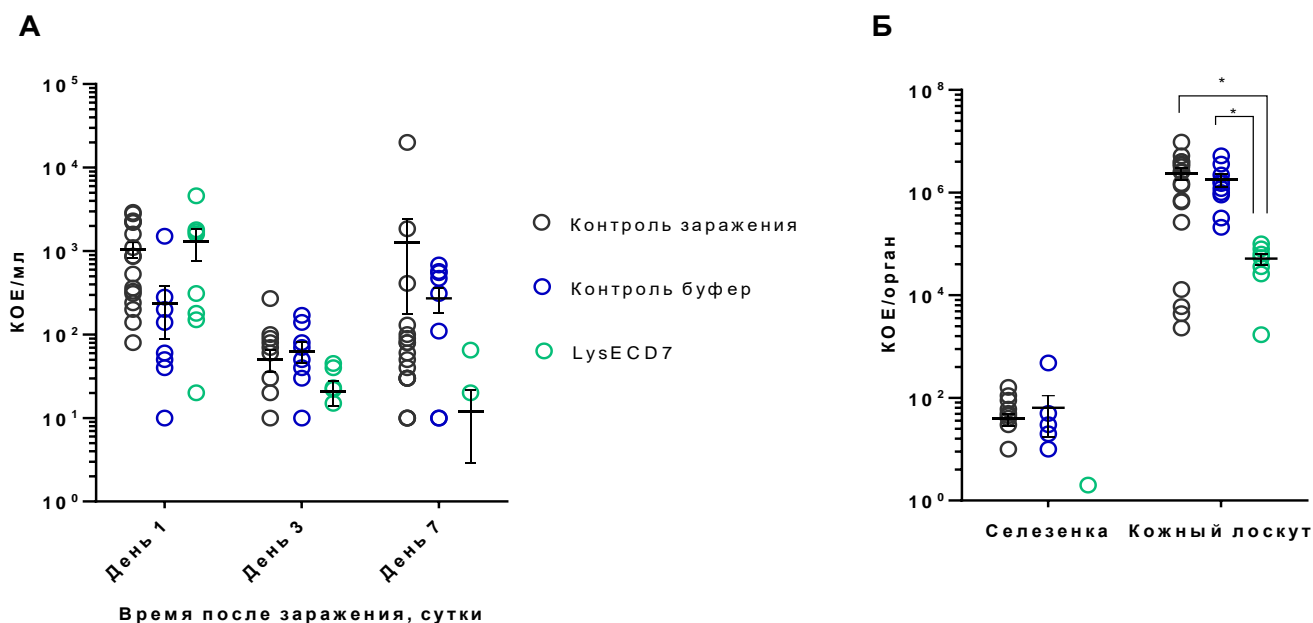


Рисунок 7 – А. Обсеменённость (КОЕ/мл) раневой поверхности беспородных мышей на 1, 3 и 7 дни после заражения. Б. Обсеменённость (КОЕ/орган) селезенки и кожного лоскута зараженных животных на 7 сутки. Приведены средние значения измерений в группе с SEM. * - статистически значимое снижение КОЕ ($p < 0,05$), многофакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA)

Оценка обсемененности селезенки и кожного лоскута зараженных животных на 7 сутки после инфицирования показала, что в контрольной группе в селезенке обнаружены клетки штамма *K. pneumoniae* в количестве $\sim 3,9 \times 10^1$ КОЕ/орган, а в каждом лоскуте $\sim 2,4 \times 10^6$ КОЕ/орган (Рисунок 7Б). Для группы контроля буфера в селезенке $\sim 6,4 \times 10^1$ КОЕ/орган, в каждом лоскуте $\sim 1,9 \times 10^6$ КОЕ/орган. Для группы LysECD7 - в селезенке $\sim 0,3 \times 10^0$ КОЕ/орган, а в каждом лоскуте $\sim 5,1 \times 10^4$ КОЕ/орган. Таким образом, для LysECD7 высевы гомогенатов кожного лоскута показали статистически достоверное снижение обсемененности относительно контрольной группы (контроль заражения) на 1,7 log₁₀ КОЕ/мл. Снижение высевок селезенки составило 2,1 log₁₀ КОЕ/мл.

Полученные данные свидетельствуют о способности эндолизина LysECD7 не только способствовать ранозаживлению и эффективно снижать обсемененность раны, но и, по всей видимости, препятствовать генерализации инфекционного процесса при местном применении.

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

Ожоговая модель инфекции у крыс линии «Вистар» была создана 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.

В исследование было включено 3 группы: лечение эндолизином LysECD7, 2,5 мг/животное (n=10), контроль буфера, 20 мМ Трис, рН 7,5 (n=10) и контроль заражения без лечения (n=20). Лечение начинали спустя 24 ч после заражения ежедневно в течение пяти дней.

В группе лечения эндолизином LysECD7 на 7 сутки, в отличие от контрольных групп, наблюдалась фаза регенерации, образования и созревания грануляционной ткани с отслоением края раневой корки, а также отмечали эпителизацию ткани и заживление ожоговой раны. Более того, размеры ожоговой поверхности в группе LysECD7 были достоверно меньше, чем в контрольных группах заражения и буфера (на 34,5 и 40,4 мм², соответственно), что свидетельствует о стимуляции процессов заживления ожоговых ран.

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, что может быть связано с течением самого инфекционного процесса, при котором крысы достаточно эффективно справляются с заражением самостоятельно (Рисунок 8А). Тем не менее, на 7 сутки было зафиксировано снижение количества возбудителя до $\sim 3,5 \times 10^3$ КОЕ/мл в группе контроля заражения и до $\sim 3,1 \times 10^3$ КОЕ/мл в группе контроля буфера. В опытной группе при накожном лечении раствором LysECD7 этот показатель снизился до $\sim 3,0 \times 10^1$ КОЕ/мл, т.е. на \sim на 3,1 log₁₀ КОЕ/мл по сравнению с контролем заражения.

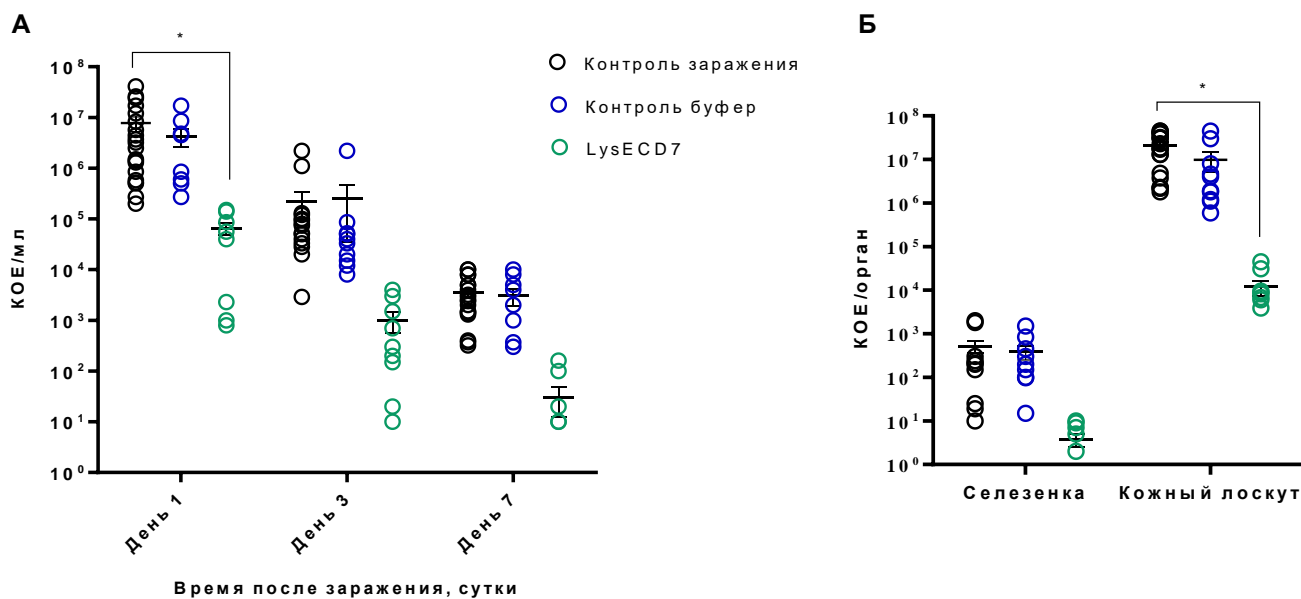


Рисунок 8 – А. Обсеменённость (КОЕ/мл) ожоговой поверхности крыс линии «Вистар» на 1, 3 и 7 дни после заражения. Б. Обсеменённость (КОЕ/орган) селезенки и кожного лоскута зараженных животных на 7 сутки. Приведены средние значения измерений в группе с SEM. * - статистически значимое снижение КОЕ ($p < 0,05$), многофакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA)

Изучение обсемененности гомогенатов кожного лоскута зараженных животных на 7 сутки показало, что в группе контроля заражения в селезенке обнаружены клетки *P. aeruginosa* в количестве $\sim 5,2 \times 10^2$ КОЕ/орган, а в каждом 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 каждом 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 каждом лоскуте $\sim 1,2 \times 10^4$ КОЕ/орган (Рисунок 8Б). Таким образом, в каждом лоскуте наблюдается достоверное снижение микробной обсемененности на $3,2 \log_{10}$ по сравнению с контролем заражения. В случае высева гомогенатов селезенки не было показано достоверных различий исследуемой опытной группы и контрольных групп, однако снижение КОЕ при применении эндолизина LysECD7 по сравнению с контролем заражения составило $\sim 2,1 \log_{10}$ КОЕ/мл.

Таким образом, субстанция эндолизина LysECD7 оказывала ранозаживляющее действие и эффективно снижала обсемененность ожоговой поверхности, а также препятствовала генерализации инфекционного процесса при местном применении, как и в случае раневой инфекции мышей.

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

Имплантат-ассоциированная инфекция у крыс была вызвана пленкообразующим клиническим изолятом *K. pneumoniae* Ts 141-14. В эксперимент вошло 3 группы животных, которым в брюшную полость имплантировали диффузионные камеры, заполненные бактериальной взвесью *K. pneumoniae* с концентрацией бактерий $\sim 5 \times 10^8$ КОЕ/мл. На 4 день эксперимента, когда внутри камер уже сформировались плотные слизистые бактериальные биопленки, группы животных внутрибрюшинно получали лечение раствором эндолизина, 50 мкг/животное (n=9), амикацина, 7,5 мг/кг (n=9) или буферным раствором, 20 мМ Трис-НСl pH 7,5 (n=9) в качестве отрицательного контроля. Препараты вводили ежедневно в течение 7 дней, выводя из эксперимента по 3 животных на 2, 5 и 8 дни после начала лечения.

Результаты вскрытия животных показали, что на 8 день в контрольной группе, а также в группе антибиотика в брюшных полостях присутствует сильная воспалительная реакция (инфильтрация окружающих камеру тканей и наличие экссудата периимплантной зоны в брюшной полости), в то время как в опытной группе была отмечена лишь незначительная воспалительная инфильтрация окружающих камеру тканей.

Изучение обсемененности внутренних поверхностей диффузионных камер показало, что на 2 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 (2,1 log10), на 5 день на $\sim 1,1 \times 10^3$ КОЕ/мл (1,5 log10), на 8 день на $\sim 9,4 \times 10^2$ КОЕ/мл (1,2 log10). 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 2, 5 и 8 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 9А).

Также в ходе исследования оценивали плотность биопленок в результате окраски диффузионных камер раствором кристаллического фиолетового красителя. 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 9Б).

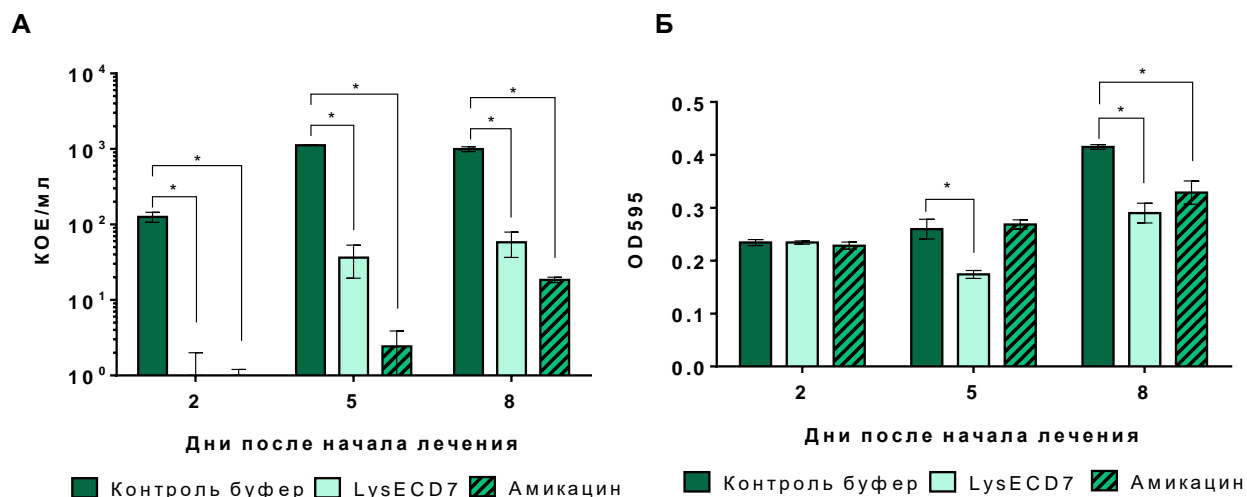


Рисунок 9 – Оценка влияния эндолизина LysECD7 на преформированные имплант-ассоциированных биопленки, образованные *K. pneumoniae*. А. Обсемененность каркаса диффузионных камер, КОЕ/мл. Б. Динамика изменения плотности (OD₅₉₅) биопленок внутри диффузионных камер после окраски кристаллическим фиолетовым. Приведены средние значения измерений в группах с SEM. * - обозначены статистически значимые отличия ($p < 0,05$), многофакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA)

Таким образом, применение эндолизина LysECD7 для лечения имплант-ассоциированной инфекции привело к снижению КОЕ бактерий в группах, получавших лечение эндолизином LysECD7, наличию менее плотной биопленки, а также менее выраженному воспалительному процессу в окружающих имплант тканях по сравнению с контролем буфера и контролем амикацина. В соответствии с полученными результатами, применение LysECD7 представляется перспективным для элиминации бактериальных биопленок, сформированных внутри организма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования была получена субстанция рекомбинантного эндолизина LysECD7, разработан проект спецификации на субстанцию LysECD7 и методы контроля качества.

Эндолизин LysECD7 проявляет активность в широком диапазоне концентраций, а спектр его действия включает в себя грамотрицательные бактерии, в том числе обладающие лекарственной устойчивостью к стандартной антибактериальной терапии. Механизм действия LysECD7 связан с лизисом бактериальных клеток, обусловленным пермеабиллизацией мембран клеточной стенки и разрушением бактериального пептидогликана.

На моделях инфекций лабораторных животных местное и внутривнутрибрюшинное применение субстанции эндолизина LysECD7 приводит к значительному снижению бактериальных высевов из пораженных тканей и органов, а также улучшению течения инфекционных заболеваний.

Полученные в ходе выполнения работы результаты свидетельствуют о фармакологической перспективности исследуемой субстанции и позволяют инициировать дальнейшие доклинические исследования лекарственных средств на основе субстанции эндолизина LysECD7.

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 $2,1-3,2 \log_{10}$ 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 $1,2-2,1 \log_{10}$ 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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Исследуемую субстанцию эндолизина LysECD7 можно считать перспективной для создания антибактериальных лекарственных средств для лечения и профилактики различных видов инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, как при местном, так и парентеральном введении. В настоящий момент проводятся доклинические исследования нескольких препаратов для местного применения на основе модификации LysECD7.

Рекомендуется дальнейшее расширенное изучение специфической активности LysECD7 и его производных на моделях респираторных инфекций (пневмонии) и системных инфекций (бактериемия и сепсис) для применения в качестве самостоятельной или дополняющей антибактериальной терапии, а также более углубленное изучение механизма действия эндолизина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Antonova, N.P.** Physical and chemical properties of recombinant KPP10 phage lysins and their antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* / N.P. Antonova, V.Y. Balabanyan, A.P. Tkachuk, V.V. Makarov, V.A. Guschin // **Bulletin of RSMU**. – 2018. – № 1. – P. 21–27. IF = 1,439. [**Web of Science, Scopus, PubMed**].

2. **Антонова, Н.П.** Получение и изучение антимикробной активности рекомбинантного лизина фага KPP10, действующего на *Pseudomonas aeruginosa* / Н.П. Антонова // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2018». – М.: МАКС Пресс, 2018.

3. **Antonova, N.P.** Antimicrobial activity of bacteriophage encoded endolysins against gram-negative bacteria / N.P. Antonova, E.V. Usachev, V.V. Makarov, E.O. Rubalsky, I.A. Kiseleva, E.R.

Zulkarneev, A.V. Porova, A.P. Tkachuk, V.A. Gushchin // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы 4-ой научно-практической конференции с международным участием: к 70-летию профессора В.А. Алёшкина, Нижний Новгород, 24–26 сентября. – М.: Медицинское Маркетинговое Агентство, 2018. – С. 9.

4. **Антонова, Н.П.** Получение и изучение бактерицидной активности эндолизинов LysAm24, LysECD7 и LysSi3 против грамтрицательных патогенов / Н.П. Антонова // *Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2019»*. – М.: МАКС Пресс, 2019.

5. Литический фермент бактериофага и антибактериальная композиция на его основе: **пат. № 2703043** Российская Федерация / **Антонова Н.П.**, Макаров В.В., Ткачук А.П., Гинцбург А.Л., Гуцин В.А. – №2018133312; заявл. 20.09.2018; опубли. 15.10.2019.

6. **Antonova, N.P.** Broad bactericidal activity of the Myoviridae bacteriophage lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against gram-negative ESCAPE pathogens / N.P. Antonova, D.V. Vasina, A.M. Lendel, E.V. Usachev, V.V. Makarov, A.L. Gintsburg, A.P. Tkachuk, V.A. Gushchin // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11, № 3. – P. e284. IF = 3,816. [**Web of Science, Scopus, PubMed**].

7. Лендел, А.М. Эндолизины бактериофагов грамтрицательных бактерий LysAm24, LysAp22, LysECD7, LysSi3 и LysSt11 проявляют выраженную бактерицидную активность в отношении биопленок *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae* / А.М. Лендел, **Н.П. Антонова**, И.Г. Григорьев, Д.В. Васина, В.А. Гуцин // *Студенческий Биохимический Форум – 2020: II межвузовская студенческая конференция: Материалы конференции*. – М.: ФГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова (биологический факультет), 2020. – С. 66.

8. **Antonova, N.P.** Modulation of endolysin LysECD7 bactericidal activity by different peptide tag fusion / N.P. Antonova, D.V. Vasina, E.O. Rubalsky, M.V. Fursov, A.S. Savinova, I.V. Grigoriev, E.V. Usachev, N.V. Shevlyagina, V.G. Zhukhovitsky, V.U. Balabanyan, V.D. Potapov, A.V. Aleshkin, V.V. Makarov, S.M. Yudin, A.L. Gintsburg, A.P. Tkachuk, V.A. Gushchin // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, № 3. – P. 1–18. IF = 4,694. [**Web of Science, Scopus, PubMed**].

9. Fursov, M. V. Antibiofilm activity of a broad-range recombinant endolysin LysECD7: In vitro and in vivo study / M.V. Fursov, R.O. Abdrakhmanova, **N.P. Antonova**, D.V. Vasina, A.D. Kolchanova, O.A. Bashkina, O.V. Rubalsky, M.A. Samotrueva, V.D. Potapov, V.V. Makarov, S.M. Yudin, A.L. Gintsburg, A.P. Tkachuk, V.A. Gushchin, E.O. Rubalskii // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 5. – P. E545. IF = 3,816. [**Web of Science, Scopus, PubMed**].

10. Антибактериальная композиция (варианты) и применение белка в качестве антимикробного средства, направленного против бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* и *Staphylococcus haemolyticus* (варианты): **пат. №**

2730613 Российская Федерация / **Антонова Н.П.**, Васина Д.В., Гинцбург А.Л., Ткачук А.П., Гущин В.А. – № 2019114135; заявл. 08.05.2019; опубл. 24.08.2020. Бюл. № 24.

11. Антибактериальная композиция (варианты) и применение белка в качестве антимикробного средства, направленного против бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* и *Staphylococcus haemolyticus* (варианты): **пат. № 2730614** Российская Федерация / **Антонова Н.П.**, Васина Д.В., Гинцбург А.Л., Ткачук А.П., Гущин В.А. – № 2019114136; заявл. 08.05.2019; опубл. 24.08.2020. Бюл. № 24.

12. Антибактериальная композиция (варианты) и применение белка в качестве антимикробного средства, направленного против грамотрицательных бактерий: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* и *Salmonella typhi* (варианты): **пат. № 2730615** Российская Федерация / **Антонова Н.П.**, Васина Д.В., Гинцбург А.Л., Ткачук А.П., Гущин В.А. – № 2019114137; заявл. 08.05.2019; опубл. 24.08.2020. Бюл. № 24.

13. Антибактериальная композиция (варианты) и применение белка в качестве антимикробного средства, направленного против бактерий *Acinetobacter baumannii*, (варианты): **пат. № 2730616** Российская Федерация / **Антонова Н.П.**, Васина Д.В., Гинцбург А.Л., Ткачук А.П., Гущин В.А. – № 2019114138; заявл. 08.05.2019; опубл. 24.08.2020. Бюл. № 24.

14. **Антонова Н.П.** Подходы к стандартизации фармацевтической субстанции на основе рекомбинантного эндолизина LysECD7 / Н.П. Антонова, Д.В. Васина, В.Ю. Балабаньян, В.А. Гущин // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2020. – Т. 23, № 9. – С. 3–8. IF = 0,259.