

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБНУ НИИНА им. Г.Ф. Гаузе
доктор химических наук, профессор РАН

Андрей Егорович Щекотихин

7 сентября 2021 года



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы
Антоновой Наталии Петровны на тему «Получение, стандартизация и
фармакологическое изучение субстанции эндолизина LysECD7»,
представленную к защите в диссертационный совет ДСУ 208.001.11 при
ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет) на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальностям 14.03.06 – фармакология,
клиническая фармакология, 14.04.02 – фармацевтическая химия,
фармакогнозия.

Актуальность темы исследования

Разработка новых противомикробных препаратов по-прежнему остается одной из основных задач в борьбе с инфекционными заболеваниями и важным направлением в преодолении лекарственной устойчивости патогенных микроорганизмов. В результате беспрецедентных мер государственной поддержки исследований, направленных на создание новых антибиотиков, предпринятых правительствами развитых стран, на рынке появилось несколько новых препаратов. В основном, они относятся к известным классам, хотя есть и инновационные, которые можно отнести к совершенно новым категориям антибактериальных средств. Тем не менее, это не может считаться решением проблемы, т.к. устойчивость к новым антибиотикам формируется

очень быстро. Именно поэтому, в «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года», определяющей государственную политику в этой области, подчеркивается необходимость разработки альтернативных средств лечения инфекционных заболеваний, в том числе препаратов на основе бактериофагов. Этот класс антибактериальных агентов обладает рядом преимуществ, к которым относится бактерицидный характер действия, узкая специфичность, низкая токсичность. Изучение механизмов воздействия бактериофагов на бактериальные клетки послужило источником идей в создании новых эффективных противомикробных молекул. Так, внимание исследователей в последние годы привлечено к литическим ферментам бактериофагов – эндолизинам, способным расщеплять пептидогликан клеточной стенки бактерий. Перспективность этого класса ферментов в плане разработки новых антибактериальных веществ определяется разнообразием видов их каталитической активности. В совокупности с потенциалом рекомбинантных технологий и синтетической биологии, которые позволяют направленно изменять отдельные свойства эндолизинов, появляется возможность разрабатывать эффективные, стабильные и безопасные молекулы с желаемым спектром действия для применения в терапии инфекционных заболеваний. В мире проводится около двух десятков исследований эндолизинов – кандидатов в лекарственные средства, а до этапа клинических испытаний дошло всего три препарата. Все вышеизложенное свидетельствует о том, что диссертационная работа Н.П. Антоновой посвящена чрезвычайно актуальной теме - получению, стандартизации и фармакологическому изучению субстанции эндолизина LysECD7 – представителя нового класса инновационных препаратов, активность которого направлена против грамотрицательных бактерий.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа Антоновой Н.П. выполнена в рамках научно-исследовательского проекта «Создание лекарственных средств на основе эндолизинов и исследование их специфического действия» при финансовой поддержке федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «ЦСП» Минздрава России), договор № 0373100122119000013. Тема исследования относится к разработке и доклиническому изучению инновационного класса антибактериальных препаратов.

Научная новизна исследования

Н.П. Антоновой впервые разработана технология получения рекомбинантного эндолизина LysECD7. Ей впервые удалось наработать оригинальную субстанцию эндолизина LysECD7 и разработать подходы к ее стандартизации.

Автором впервые получена субстанция эндолизина LysECD7, проявляющая *in vitro* активность в отношении широкого спектра грамотрицательных бактерий, включая клинические изоляты, обладающие лекарственной устойчивостью к антибиотикам, а также разрушающая бактериальные биопленки, образованные *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*.

Используя экспериментальные модели раневой и ожоговой инфекции, а также имплантат-ассоциированную модель биопленкообразования, автор впервые продемонстрировал высокую антибактериальную активность LysECD7 в отношении грамотрицательных бактерий *in vivo*, а также способность субстанции к стимуляции ранозаживления на фоне уменьшения воспалительных реакций поврежденных тканей животных.

Н.П. Антоновой впервые установлен механизм действия эндолизина LysECD7. Показано, что вещество оказывает на бактериальные клетки бактерицидное действие, вызывая их лизис посредством эндопептидазного воздействия на пептидогликан клеточной стенки.

Значимость результатов работы для науки и практики

Н.А. Антоновой внесен существенный вклад в понимание механизма антибактериальной активности эндолизинов. Структурные (кристаллография с последующим рентгеноструктурным анализом), а также масс-спектрометрические исследования, необходимые для анализа конкретных пептидных связей, расщепляемых эндолизином, показали, что LysECD7 гидролизует амидные связи в пептидных мостиках между слоями гликана или в поперечных сшивках, что приводит к расщеплению клеточной стенки и последующему лизису бактерий.

На примере эндолизина LysECD7 подтвержден терапевтический потенциал данной группы антибактериальных средств для лечения раневых и ожоговых инфекций и перспективность дальнейших исследований в этой области.

Эксперименты, посвященные оценке нейтрализующего действия специфических антител, показали полное блокирование антимикробной активности эндолизина LysECD7. Тем не менее, автор диссертационного исследования, анализируя полученные результаты, не исключает возможности разработки эндолизинов для парентерального введения.

Практическое значение диссертационной работы Н.П. Антоновой состоит в том, что ею разработана лабораторная технология получения субстанции эндолизина, обеспечивающая воспроизводимый результат при получении различных партий. Оценены параметры стабильности субстанции в растворе, условия хранения, при которых она сохраняет свои физико-химические и антибактериальные свойства. Полученные данные позволили разработать лабораторный регламент на получение субстанции, включающий проект нормативной документации. 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 доклинических исследований субстанции эндолизина LysECD7 и лекарственных средств на ее основе.

Личный вклад автора

Н.П. Антоновой собрана и проанализирована современная литература по проблеме, проведен широкий спектр экспериментальных работ, осуществлен анализ их результатов и подготовлены публикации. Изучение спектра активности эндолизина LysECD7 *in vitro* и антибактериальной эффективности *in vivo* на моделях раневой, ожоговой и имплант-ассоциированной инфекции проводилось в сотрудничестве со специалистами из других организаций (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России).

Рекомендации по использованию результатов работы и выводов диссертации

Разработанная лабораторная технология получения субстанции эндолизина LysECD7 может быть использована для создания лекарственного средства для лечения и профилактики инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями.

На основе проведенной биотехнологической и фармацевтической разработки могут быть получены модификации эндолизина LysECD7 как для местного, так и для парентерального применения.

Методики контроля качества субстанции эндолизина, разработанные и апробированные в данной диссертационной работе, могут быть использованы для контроля качества других препаратов этого инновационного класса антимикробных средств.

Рекомендуется:

- продолжить изучение возможностей использования эндолизина LysECD7 и его производных для лечения различных видов инфекционных заболеваний на экспериментальных моделях.
- на различных моделях инфекционных заболеваний экспериментально оценить эффективность комбинированного применения эндолизина LysECD7 и антибиотиков;
- продолжить изучение механизма действия эндолизина.

Полнота изложения результатов диссертации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 4 статьи в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Одна статья опубликована в журнале, включенном в перечень изданий, рекомендованных ВАК Министерства высшего образования и науки РФ. В статьях полностью отражены полученные результаты.

Получено 5 патентов РФ. Результаты работы были представлены на 5 российских и международных конференциях и опубликованы в виде тезисов в сборниках материалов конференций.

Общая характеристика работы

Работа изложена на 130 страницах текста и оформлена в соответствии с принятыми нормативными требованиями. Она написана в традиционном стиле и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, обсуждение результатов исследования, заключение, выводы и список использованной литературы, включающий 142 источника. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 10 таблицами.

Во введении дана оценка современного состояния изучаемой проблемы, обоснована актуальность избранной темы исследований, четко сформулирована цель и основные задачи работы, приведены свидетельства научной новизны и практического значения полученных результатов.

В обзоре литературы автор дает краткую характеристику проблемы устойчивости бактерий к антимикробным средствам и рассматривает возможные направления поиска новых антибактериальных средств, особо останавливаясь на перспективах эндолизина в борьбе с инфекционными заболеваниями и технологической специфике их получения. Обзор написан хорошим литературным языком и достаточно полно отражает данные литературы, касающиеся фармацевтических аспектов получения субстанций рекомбинантных эндолизина и их стандартизации.

Работа отличается высоким методическим уровнем и разнообразием использованных методик. В ходе исследования применялись современные биотехнологические методы получения рекомбинантных белков в клетках-продуцентах *E. coli* и последующей очистки с помощью аффинной и эксклюзионной хроматографии. Для отработки методик стандартизации субстанции эндолизина были использованы физико-химические и микробиологические методы. Антибактериальная активность субстанции оценивалась в микробиологических тестах *in vitro*, эффективность эндолизина как лекарственного средства – на моделях раневой, ожоговой и имплант-ассоциированной инфекций в экспериментах на животных. Механизм действия был изучен с помощью физико-химических (электрофоретических, микроскопических, флуоресцентных) и микробиологических методов. Все это позволяет охарактеризовать арсенал использованных автором методик как адекватный поставленным задачам.

Собственные результаты исследования изложены в двух разделах. В первом разделе, посвященном разработке подходов к получению субстанции рекомбинантного эндолизина LysECD7 и ее стандартизации, приведены данные об этапах получения рекомбинантного фермента, начиная от выявления его кодирующей нуклеотидной последовательности в полногеномной последовательности бактериофага ECD7, до получения экспрессионного штамма на основе *E. coli*, обеспечивающего стабильную экспрессию целевого белка с высоким выходом. Разработанная автором

двухэтапная система очистки обеспечила необходимую чистоту целевого продукта. Созданный проект спецификации и предложенные методы контроля качества полученного вещества, составили основу нормативной документации на субстанцию. Всю совокупность представленных данных можно рассматривать как доказательство технологической возможности получения субстанции рекомбинантного эндолизина LysECD7, ранее не описанного в литературе.

Вторая часть собственных исследований посвящена получению экспериментальных доказательств потенциала субстанции эндолизина LysECD7 как антибактериального средства, а также уточнению некоторых аспектов его механизма действия. Было установлено *in vitro* выраженное ингибирующее действие фермента на рост 120 штаммов грамотрицательных микроорганизмов и отсутствие бактерицидного эффекта в отношении грамположительных бактерий. Это подтвердило, что автор достиг искомого результата – получил активную молекулу с желаемым спектром действия. Терапевтические возможности эндолизина LysECD7 были выявлены в экспериментах на мышах и крысах с использованием моделей раневой и ожоговой инфекции, которые показали, что эндолизин LysECD7 обладает способностью при местном применении ускорять заживление раневой поверхности, эффективно снижать обсемененность раны, а также препятствовать генерализации инфекционного процесса. На модели имплант-ассоциированной инфекции было изучено воздействие эндолизина LysECD7 на биопленки при внутрибрюшинном введении и доказана перспективность его применения для элиминации бактериальных биопленок, сформированных внутри организма.

Особо следует отметить вклад автора в раскрытие особенностей механизма действия эндолизинов, активных в отношении грамотрицательных бактерий, детального понимания которого до настоящего времени не существует. Определяя методом денатурирующего электрофореза взаимодействие LysECD7 с пептидогликаном грамотрицательной бактерии,

Н.П. Антонова установила, что бактерицидная активность LysECD7 обусловлена как лизисом бактериальных клеток вследствие пермеабилizующей активности фермента, так и разрушением пептидогликана, предположительно, за счет эндопептидазного действия эндолизина.

Изложение результатов диссертационной работы сопровождается их обсуждением. Автор анализирует полученные данные, проводит сравнение с данными литературы и аргументировано интерпретирует результаты исследования.

В заключительной части диссертации обобщены и проанализированы все полученные автором данные, свидетельствующие о высокой информативности проведенных исследований. В целом, поставленные диссертантом задачи решены. Выводы, сделанные диссертантом, полностью вытекают из задач и полученных результатов, обоснованы и убедительны.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертация написана литературным языком, хотя и содержит некоторые стилистические погрешности. Все положения сформулированы четко, результаты грамотно статистически обработаны, представлены ясно и убедительно. Работа может быть квалифицирована, как законченное исследование, выполненное с помощью адекватных методов. Существенных замечаний и недостатков нет.

Заключение

Диссертация Антоновой Наталии Петровны на тему «Получение, стандартизация и фармакологическое изучение субстанции эндолизина LysECD7» является законченным научно-квалификационным трудом, содержащим решение важной научной задачи современной фармацевтической химии и фармакологии - разработки технологии создания субстанции

оригинального эндолизина LysECD7 и получении экспериментальных доказательств перспективности ее использования в качестве лекарственного средства для терапии инфекций, вызванных грамотрицательными микроорганизмами.

По объему проведенных экспериментальных исследований, новизне, научно-практической значимости работа Антоновой Н.П. соответствует требованиям п. 16 «Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)», утвержденным приказом ректора от 31.01.2020 г. №0094/Р, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Антонова Н.П., заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальностям 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология, 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Отзыв на диссертацию Антоновой Н.П. обсужден и утвержден на заседании Ученого Совета ФГБНУ «НИИНА». Присутствовало на заседании 16 из 19 чел. Результаты голосования: «за» - 16 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел. Протокол №6 от 7 сентября 2021 г.

Председатель заседания:

Заместитель Директора по научной работе

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт

по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

доктор биологических наук

(14.00.14 – Онкология,

14.00.25 – Фармакология)

Переверзева Элеонора Рафаиловна

Подпись доктора биологических наук Переверзевой Элеоноры Рафаиловны
удостоверяю

Ученый секретарь Института

ФГБНУ "Научно-исследовательский институт

по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе"

Министерства науки и высшего образования

Российской Федерации

кандидат химических наук



Кисиль О. В.

«7» сентября 2021 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.

Гаузе" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

119021, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

Тел.: 8(499)246-9980, e-mail: instna@sovintel.ru