

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора фармацевтических наук Лякиной М. Н.

на диссертацию 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

Существенной проблемой здравоохранения является стремительное распространение штаммов бактерий, устойчивых к действию существующих антибактериальных средств, включая наиболее эффективные антибактериальные препараты, а отдельные патогены приобрели коллекции генов, обуславливающие множественную устойчивость, образуя пан-резистентные штаммы. Особую значимость придают инфекционным заболеваниям, вызванным грамотрицательными патогенными возбудителями, в связи с их способностью быстро приобретать различные механизмы резистентности. Лечение таких инфекций существующими антибактериальными препаратами все менее эффективно. 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 с точки зрения выше указанных обстоятельств представляют литические ферменты бактериофагов, а именно эндолизины. Это ферменты, которые используются бактериофагами для лизиса пептидогликана клеточных стенок бактерий в ходе высвобождения новообразованно-

го потомства вирионов. К преимуществам эндолизинов по сравнению с другим антимикробными агентами можно отнести быстроту их действия, низкую вероятность развития резистентности к препаратам на их основе, действие на антибиотикоустойчивые штаммы и способность разрушать бактериальные биопленки, зачастую являющиеся защитой и одновременно резервуаром для обмена генами устойчивости.

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

К настоящему времени накоплено достаточно много данных относительно исследования активности эндолизинов, действующих в отношении грамположительных бактерий, в том числе резистентных к стандартной антибиотикотерапии. 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. В то же время эндолизины, активные в отношении грамотрицательных возбудителей, находятся на стадии испытаний антибактериальной активности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Более того, в доступной литературе отсутствуют данные о получении и стандартизации субстанций эндолизинов, а также отсутствуют зарегистрированные лекарственные средства.

Научная новизна полученных результатов

Впервые разработана технология получения рекомбинантного эндолизина LysECD7, обладающего антибактериальной активностью в отношении широкого спектра грамотрицательных бактерий. Установлено, что эндолизин LysECD7 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.

Научно-практическая значимость полученных результатов

Разработана технология оригинальной субстанции эндолизина LysECD7, обладающей выраженной антибактериальной активностью в отношении местных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями (в том числе резистентными штаммами) и в отношении бактериальных биопленок, образованных на поверхности имплантируемых материалов.

Осуществлена стандартизация предлагаемой субстанции, установлен срок ее годности. На основе предложенной субстанции могут быть разработаны лекарственные препараты с высокой антибактериальной активностью, в том числе в отношении резистентных штаммов грамотрицательных микроорганизмов.

Достоверность результатов и обоснованность основных положений, выводов и рекомендаций

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

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.

Основные положения выполненной работы были доложены и обсуждены на конференциях, включая и международные. По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 4 статьи в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus/Web of Science, 1 статья в издании, рекомендованном ВАК РФ, 4 тезисов в сборниках и 5 патентов РФ.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа изложена на 130 страницах компьютерного текста и состоит из традиционных частей: Введения, Обзора литературы, Материалов и методов исследования, Resultados и их обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературы. Построение диссертации традиционное и соответствует ГОСТу. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 33 рисунками. Список литературы включает 134 зарубежных источника и 8 отечественных. Диссертация написана грамотным, литературным языком, фрагменты исследования расположены в логичном порядке и работа в целом доступна для понимания.

Во **Введении** автор обосновывает актуальность и новизну исследования, формулирует цель и ставит задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели; обозначена теоретическая и практическая значимость, представлена информация об апробации и внедрении результатов.

Первая глава диссертации традиционна представлена обзором литературы. Автор формулирует проблему антибиотикорезистентности и существующие пути ее решения. Подробно охарактеризованы эндолизины как новый класс антибактериальных веществ, особенности структуры и получения, а также вопросы стандартизации. Показана перспективы и роль в лечении инфекционных заболеваний, обусловленных резистентными бактериями.

Вторая глава посвящена материалам и методам. В ней подробно описаны методы, используемые при: создании генно-инженерной конструкции, кодирующей последовательность эндолизина, получении культур-продуцентов эндолизинов, разрушении клеточной биомассы, очистки эндолизинов, а также методов для изучения стабильности субстанции, подтверждения подлинности (по определению антибактериальной активности по отношению к грамотрицательным микроорганизмам и бактериальным биопленкам), определению цитотоксического, гемолитического действия; реактивы и оборудование, методы статистического анализа.

Третья глава содержит подробное описание полученных данных и обсуждение результатов исследования, проиллюстрированных таблицами и рисунками.

Эта часть диссертации содержит основополагающие подходы к получению фармацевтической субстанции на основе рекомбинантных эндолизинов. Разработана лабораторная технология получения субстанции эндолизина LysECD7, включающая: получение генно-инженерной конструкции, кодирующей целевую нуклеотидную последовательность; получение клеток-продуцентов *E.coli* DL21(DE3)pLysS; экспрессия целевого белка; разрушение полученной биомассы и хроматографическую очистку с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии, гель-эксклюзионной хроматографией с последующей мембранной стерилизацией конечного продукта.

Полученная субстанция эндолизина LysECD7 была изучена на антибактериальную активность в экспериментах *in vitro*. Установлено, что эндолизин LysECD7 проявляет активность в отношении грамотрицательных бак-

терий в концентрации от 0,5 мкг/мл, а также разрушает бактериальные биопленки, образованные *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. На основе изучения спектра антибактериального действия установлена активность в отношении целого ряда грамотрицательных патогенов, включая клинические изоляты: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *E. coli*, *S. enterica* и *C. jejuni*.

Антибактериальная активность субстанции эндолизина LysECD7 была изучена *in vivo* при местном применении на модели раневой инфекции мышей, вызванной *K. pneumoniae*, и на модели ожоговой инфекции у крыс, вызванной *P. aeruginosa*, а также при внутрибрюшинном введении на модели имплантат-ассоциированного биопленкообразования, вызванного *K. pneumoniae*.

В этой же главе приведены результаты исследования механизма бактерицидного действия посредством лизиса бактериальных клеток, обусловленного как пермеабилizующей активностью, так и разрушением пептидогликана вследствие эндопептидазного действия эндолизина.

Полученная субстанция была охарактеризована по показателям "Описание", "Подлинность", "Примеси", "Стерильность", "Бактериальные эндотоксины", "Количественное определение" по определению содержания белка согласно ОФС "Определение белка" (метод 4) и антибактериальной активности. Приведена информация о том, что была изучена и стабильность.

Заключение и Выводы диссертации обобщают полученные данные и свидетельствуют о том, что все поставленные в исследовании задачи выполнены и цель достигнута.

Автореферат полностью отражает содержание и соответствует структуре диссертационной работы.

Замечания и вопросы к работе

Текст содержит незначительные стилистические неточности, которые не снижают общего положительного впечатления от работы.

При рассмотрении работы возникли некоторые вопросы и замечания, которые носят уточняющий характер:

1. полученная фармацевтическая субстанция рекомбинантного эндолизина должна быть охарактеризована по важнейшим показателям качества в процессе хранения, т.к. изучение стабильности один из важнейших этапов в разработке фармацевтической субстанции. Обычно для это используют показатели качества, являющиеся критичными. Как указано на с. 70 диссертации, хранение при температуре 2-8 °С в течение 1 месяца обеспечивало неизменность параметров для раствора субстанции на приемлемом уровне, более длительное хранение (3 месяца) показало, что 1 месяц является предельным сроком годности. Обычно такие выводы иллюстрируют соответствующими таблицами по стабильности, при этом указывают не только условия хранения, но и вид первичной упаковки и ее материал.

Далее, фраза "лиофилизация раствора субстанции эндолизина LysECD7 приводит к увеличению стабильности и срока хранения в тех же условиях до 1 года" свидетельствует о том, что такие исследования были выполнены, но данные по стабильности в виде таблицы также отсутствуют.

2. В приведенной на с. 71 Спецификации имеются разночтения: по показателю "Подлинность" в столбце "Методы" указано "специфическая антибактериальная активность", в столбце "Нормы" - "значение бактерицидной активности"; по показателю "Примеси" в столбце "Нормы" имеется явная техническая ошибка (взамен указанной нормы "Не менее 95 %" должно быть указано "Не более 5 %" (что будет соответствовать информации на с. 72 "...чистота субстанции составляет более 95 %").

3. Относительно показателя "Количественное определение" (определение содержания белка) необходимо отметить следующее: в диссертации

должна была быть приведена методика, т.к. только ссылка на ОФС "Определение белка" не совсем корректна в связи с тем, что в данной ОФС нет конкретных условий проведения испытания; следовало бы описать в тексте диссертации все параметры, влияющие на результат проведения испытания, обосновать выбор оптимальных, а затем дополнить соответствующий подраздел диссертации материалами по валидации разработанной аналитической методики.

В Приложении к диссертации следовало представить хотя бы титульный лист лабораторного регламента.

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, состоящей в разработке принципиально нового класса антибактериальных препаратов на основе эндолизинов, в частности субстанции эндолизина LysECD7, для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, в том числе обладающих устойчивостью к стандартной антибиотикотерапии.

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 Наталья Петровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальностям 14.03.06 – фарма-

кология, клиническая фармакология; 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент:

Зам. директора Института фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России
доктор фармацевтических наук
(15.00.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия, 15.00.01 – Технология лекарств и организация фармацевтического дела)

Лякина Марина Николаевна

Подпись доктора фармацевтических наук
Лякиной Марины Николаевны удостоверяю:

Ученый секретарь
Федерального государственного
бюджетного учреждения «Научный центр
экспертизы средств медицинского
применения» Минздрава России,
кандидат медицинских наук



Климов В.И.

«01» сентября 2021 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8 стр. 2

Тел.: 8 (495) 625-43-48, e-mail: gf@expmed.ru