

ПОДХОДЫ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭНДОЛИЗИНА LysECD7

Н.П. Антонова

аспирант, науч. сотрудник,
Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (Москва);
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова (Москва)
E-mail: northernnatalia@gmail.com

Д.В. Васина

к.б.н., лаборант-исследователь,
Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (Москва)
E-mail: d.v.vasina@gmail.com

В.Ю. Балабаньян

д.фарм.н., доцент, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва)
E-mail: bal.pharm@mail.ru

В.А. Гуцин

к.б.н., ст. науч. сотрудник,
Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (Москва);
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва)
E-mail: wowaniada@gmail.com

Актуальность. В условиях роста устойчивости бактерий к существующим лекарственным средствам (ЛС) литические ферменты бактериофагов, а именно эндолизины, привлекают особенное внимание исследователей как один из перспективных классов антибактериальных средств. Поскольку этот класс ЛС является достаточно новым, существует необходимость разработки подходов к стандартизации фармацевтических субстанций (ФС) на основе эндолизинов для дальнейшего получения новых эффективных антибактериальных препаратов.

Цель работы. Разработать подходы к стандартизации ФС на основе рекомбинантного эндолизина LysECD7, обладающего антибактериальным действием в отношении различных представителей грамотрицательных бактерий.

Материал и методы. Подлинность и чистоту ФС эндолизина оценивали по ОФС.1.2.1.0023.15 ГФ XIV с помощью денатурирующего электрофореза в 16%-ном полиакриламидном геле. Специфическую антибактериальную активность ФС определяли с помощью разработанной методики оценки бактерицидного действия по снижению количества жизнеспособных бактерий культуры тест-штамма *Acinetobacter baumannii* Ts 50-16. Стерильность ФС устанавливали по ОФС.1.2.4.0003.15 ГФ XIV методом мембранной фильтрации. Содержание бактериальных эндотоксинов выявляли по ОФС.1.2.4.0006.15 ГФ XIV с помощью хромогенного теста по конечной точке. Количественное содержание белка в ФС определяли по ОФС.1.2.3.0012.15 ГФ XIV колориметрическим методом с бичинхониновой кислотой.

Результаты. Изложены современные подходы к стандартизации фармацевтической субстанции рекомбинантного фагового литического фермента - эндолизина LysECD7. Предложены основные методики контроля качества ФС LysECD7, включающие в себя такие показатели, как «Электрофорез в полиакриламидном геле» и «Специфическая активность» для подтверждения подлинности ФС, «Стерильность», «Бактериальные эндотоксины» и «Количественное определение».

Выводы. Разработаны подходы к стандартизации ФС эндолизина LysECD7, включающие в себя такие показатели как «Подлинность», «Чистота» и «Количественное определение», которые могут обеспечить стабильные эффективность и безопасность ФС для дальнейших разработок инновационных антибактериальных ЛС.

Ключевые слова: эндолизины, LysECD7, грамотрицательные бактерии, фармацевтическая субстанция, стандартизация, анализ качества.

Для цитирования: Антонова Н.П., Васина Д.В., Балабаньян В.Ю., Гуцин В.А. Подходы к стандартизации фармацевтической субстанции на основе рекомбинантного эндолизина LysECD7. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020; 23(9): 3–8. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-09-01>

Литические ферменты бактериофагов, а именно эндолизины, которые эволюционно используются фагами для высвобождения новообразованных вирионов из клеток хозяев, в последнее десятилетие привлекают особенное внимание ис-

следователей как один из перспективных новых классов антибактериальных средств [1]. Они обладают высокой антибактериальной активностью вследствие выраженного литического действия. Учитывая подобный механизм действия, можно

полагать низкую вероятность развития к ним резистентности и активность в отношении антибиотикоустойчивых штаммов бактерий [2].

Возрастающая актуальность данного направления среди отечественных и зарубежных ученых [3-6] говорит о необходимости разработки подходов к стандартизации фармацевтической субстанции (ФС) на основе эндוליзинов для дальнейшего создания новых эффективных антибактериальных препаратов.

Цель исследования – разработать подходы к стандартизации ФС на основе рекомбинантного эндוליзина LysECD7, обладающего антибактериальным действием в отношении различных представителей грамотрицательных бактерий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эндолизин LysECD7 получен биотехнологически путем экспрессии рекомбинантного белка в клетках штамма-продуцента *E. coli* и очищен с помощью аффинной хроматографии. Фармацевтическая субстанция LysECD7 представляет собой раствор белка в 20 мМ Трис-НСl буфере, pH 7,5 [7].

Электрофорез в полиакриламидном геле. Вертикальный электрофорез в 16%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих условиях с использованием додецилсульфата натрия проводили согласно методике, описанной в ОФС.1.2.1.0023.15 ГФ XIV [8].

Чистоту ФС оценивали по интенсивности окраски всех присутствующих на геле полос с помощью программного обеспечения Image Lab™ Version 6.0.0 (Bio-Rad Laboratories, США).

Определение бактерицидной активности. Методика разработана сотрудниками лаборатории трансляционной биомедицины и лаборатории изучения механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи [7].

Культуру тест-штамма *Acinetobacter baumannii* Ts 50-16 (депонирован в коллекции штаммов НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) выращивают до оптической плотности OD₆₀₀=0,6, осаждают центрифугированием (10 мин, 6000 g) и ресуспендируют в фосфатно-солевом буфере (PBS) до конечной мутности суспензии, соответствующей стандарту мутности МакФарланда 0,5. Затем бактериальную культуру разбавляют в 100 раз 20 мМ Трис-НСl буфером, pH 7,5. В 96-луночном планшете готовят смеси 100 мкл суспензии бактерий со 100 мкл эндוליзина LysECD7 в концентрации 200 мкг/мл или

100 мкл 20 мМ Трис-НСl буфера (отрицательный контроль).

Полученные смеси инкубируют в термощейкере при 37 °С в течение 30 мин (200 об/мин). Затем делают 10 и 100-кратные разведения смесей в PBS и наносят на чашки Петри с твердой агаризованной средой LB в трех технических повторностях. Колонии на чашках подсчитывают после ночной инкубации при 37 °С и оценивают результат в КОЕ/мл. Рассчитывают антимикробную активность исследуемого эндוליзина по формуле

$$X = 100 - ((\text{КОЕоб} * 100) / \text{КОЕко}),$$

где X – антибактериальная активность исследуемого вещества, %; КОЕоб – количество колониеобразующих единиц в испытуемом образце, КОЕ/мл; КОЕко – количество колониеобразующих единиц в контрольном образце, КОЕ/мл.

Результаты анализа считаются значимыми, если наблюдается статистически достоверное снижение количества клеток тест-штамма в опытных образцах по сравнению с контролем по меньшей мере на 80%.

Стерильность. Стерильность ФС определяли по ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» ГФ XIV методом мембранной фильтрации.

Бактериальные эндотоксины. Содержание бактериальных эндотоксинов определяли по ОФС.1.2.4.0006.15 ГФ XIV «Бактериальные эндотоксины». Использовали хромогенный тест по конечной точке (метод E) с помощью коммерческого набора Endpoint Chromogenic (Charles River Endosafe, США) согласно инструкции производителя.

Количественное определение. Содержание целевого белка в растворе ФС эндOLIЗИНА LysECD7 выявляли по ОФС.1.2.3.0012.15 ГФ XIV «Определение белка» колориметрическим методом с бицихониновой кислотой (метод 4), используя в качестве стандартных растворов для построения калибровочной кривой образцы бычьего сывороточного альбумина (БСА).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно ФЗ № 61 «Об обращении лекарственных средств» [9], препараты рекомбинантных эндOLIЗИНОВ можно отнести к биологическим лекарственным средствам. Фармацевтическую субстанцию рекомбинантных эндOLIЗИНОВ получают с использованием биотехнологических процессов и методов. Общая фармакопейная статья ОФС.1.7.1.0011.18 ГФ XIV «Биотехнологические лекарственные препараты» наиболее полно описы-

вает как производство, так и испытания ФС и лекарственных препаратов на основе таких веществ.

Для ФС на основе рекомбинантных белков, в том числе эндолизинов, простыми и доступными методами стандартизации являются: электрофорез в полиакриламидном геле, который дает информацию о подлинности и о чистоте ФС; специфическая активность на тест-штамме, позволяющая сделать заключение об активности ФС; количественное определение действующего вещества колориметрическим методом, а также определение стерильности ФС и содержания в ней бактериальных эндотоксинов.

Электрофорез ФС LysECD7 в денатурирующих условиях в 16%-ном ПААГ показал наличие полосы белка с молекулярным весом приблизительно 16 кДа, что соответствует теоретическому весу мономера LysECD7 16,1 кДа (рис. 1).

Электрофорез в полиакриламидном геле дает представление и о чистоте ФС, и поэтому является наиболее универсальным методом контроля качества. Родственными примесями могут являться димеры и агрегаты белка, а также модифицированные формы (окисленные, укороченные и др.). В качестве примесей, связанных с процессом производства, могут быть остаточные белки клеток-продуцентов.

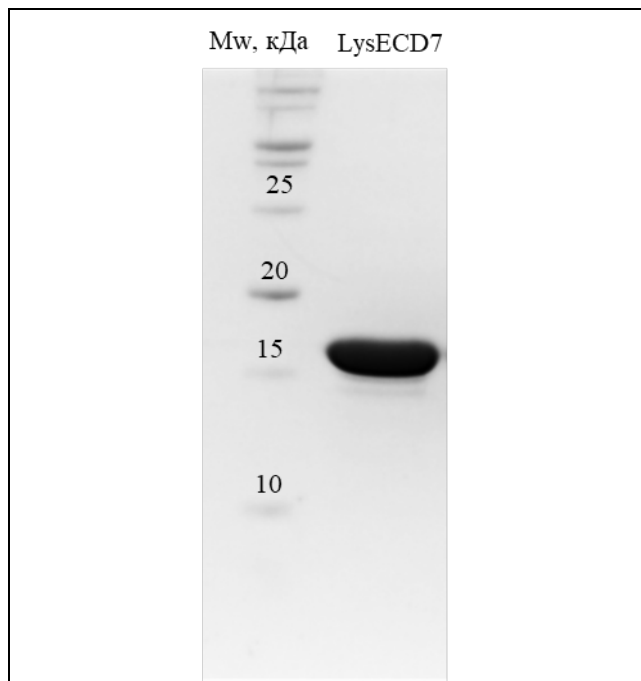


Рис. 1. Электрофореграмма рекомбинантного эндолизина LysECD7 в условиях денатурирующего электрофореза в 16%-ном ПААГ (маркер PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific, Литва)

С помощью программного обеспечения Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories, США) показано, что чистота исследуемой ФС эндолизина LysECD7 составляет более 95% по интенсивности основной полосы на геле относительно общей интенсивности всех полос.

Специфическим показателем подлинности эндолизинов является определение антибактериальной активности. Традиционный метод диффузии в агар (ОФС.1.2.4.0010.18 ГФ XIV) и, в частности, диско-диффузионный метод, основанный на определении зон угнетения роста тест-штаммов микроорганизмов на поверхности агара, дает лишь косвенное представление об активности, так как позволяют определить только степень чувствительности микроорганизма к исследуемому веществу.

Экспериментальные методики изучения активности эндолизинов [2] включают в себя турбидиметрический метод, зимографию, изучение минимальных ингибирующих концентраций путем серийных разведений в питательной среде, метод диффузии в агар, а также метод подсчета жизнеспособных колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий после инкубации с эндолизином, то есть бактерицидного действия. Наиболее информативными методами, позволяющими нормировать количество бактериальных клеток, концентрацию белка, условия и время инкубации смесей, являются турбидиметрический метод и метод оценки бактерицидного действия по снижению КОЕ. Именно они могут быть использованы для определения подлинности ФС эндолизинов.

Для определения бактерицидного действия ФС эндолизина LysECD7 использован метод оценки снижения КОЕ бактерий. Активность оценивали при инкубации суспензии экспоненциально растущих клеток тест-штамма *Acinetobacter baumannii* (10^5 – 10^6 КОЕ) и 100 мкг/мл LysECD7 в течение 30 мин. При последующем высеве смеси на чашки Петри с твердой питательной средой и инкубации в термостате было показано отсутствие роста бактерий, что говорит о 100%-ной бактерицидной активности субстанции (рис. 2).

Для биотехнологических ФС необходимо введение показателя стерильности после стерилизующей фильтрации. Испытания проводятся в соответствии с ОФС.1.2.4.0003.15 ГФ XIV «Стерильность». При этом следует учитывать, что эндолизины сами по себе обладают антимикробной активностью.

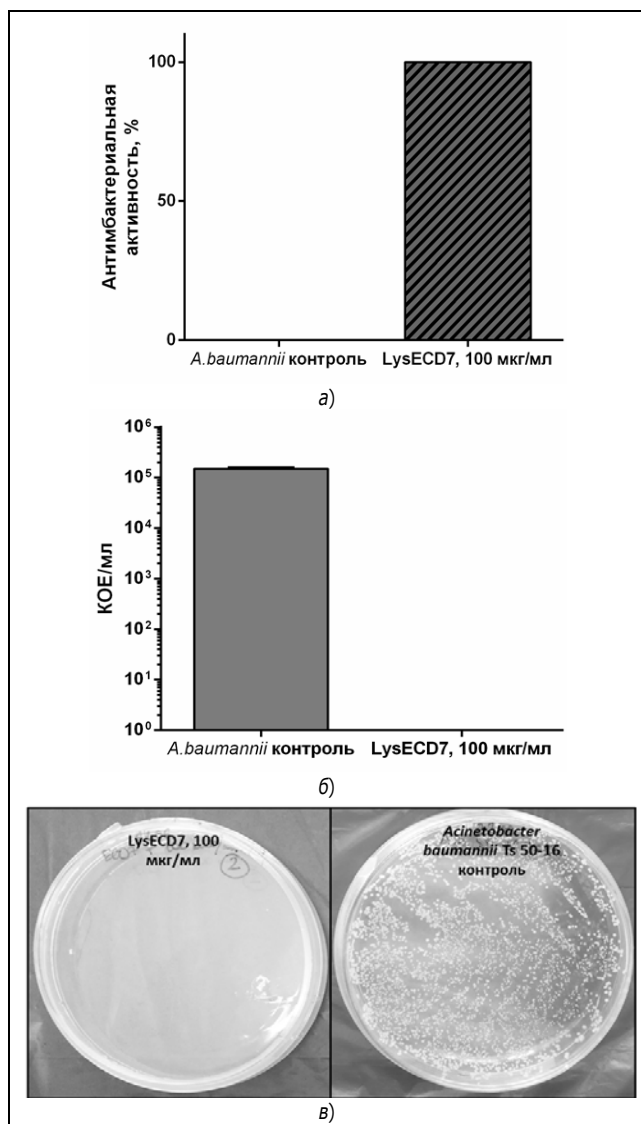


Рис. 2. Антибактериальная активность ФС эндолизина LysECD7 (100 мкг/мл) в отношении модельного тест-штамма *Acinetobacter baumannii* Ts 50-16, выраженная в % (а) или в КОЕ/мл (б); чашки Петри с нанесенной смесью эндолизина и бактериальных клеток по сравнению с отрицательным контролем в 20 мМ Трис-НСI буфере, рН 7,5 (в)

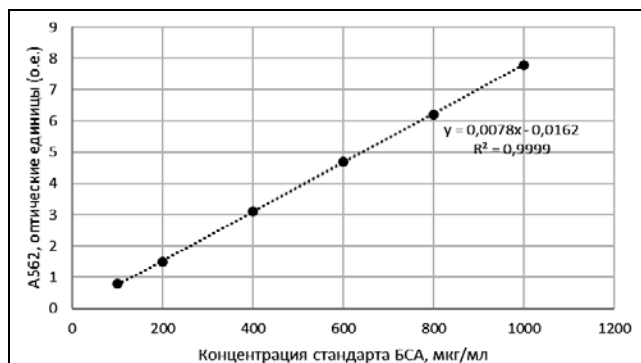


Рис. 3. Калибровочный график зависимости оптической плотности окрашенного раствора от концентрации белка

В связи с этим для анализа выбран метод мембранной фильтрации с последующим промыванием фильтров для устранения antimicrobial activity of FC. Было показано отсутствие микробного роста на питательной среде.

Содержание бактериальных эндотоксинов (БЭ) оценивалось с помощью одной из модификаций ЛАЛ-теста по ОФС.1.2.4.0006.15 ГФ XIV «Бактериальные эндотоксины» – 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. Экспериментальное значение БЭ опытной партии фармацевтической субстанции эндолизина LysECD7 составило 0,5 ЕЭ/мг ФС, что укладывается в пределы допустимых значений исходя из предполагаемых терапевтических дозировок для введения человеку.

Количественное определение проводилось согласно ОФС.1.2.3.0012.15 ГФ XIV «Определение белка». Был выбран высокочувствительный колориметрический метод с бицинониновой кислотой (метод 4), основанный на восстановительных свойствах белка. Образование окрашенного комплекса Cu^{+} с бицинониновой кислотой детектируется спектрофотометрически при длине волны 562 нм. Концентрация белка определяется на основании калибровочной кривой, построенной на основе растворов бычьего сывороточной альбумина (БСА) с известными концентрациями (рис. 3).

Согласно полученному уравнению градуировочного графика, концентрацию белка можно рассчитать по формуле

$$C(\text{мкг / мл}) = \frac{A_{562} + 0,0162}{0,0078}$$

Показано, что оптическая плотность опытного образца раствора эндолизина LysECD7 составляет 7,5, что соответствует концентрации 1 мг/мл. Таким образом, этот метод позволяет количественно определить содержание активного вещества в ФС и является приемлемым для стандартизации ФС LysECD7 по показателю «Количественное определение».

ВЫВОДЫ

Изложены современные подходы к стандартизации фармацевтической субстанции на основе рекомбинантного литического фермента бактериофага – эндолизина LysECD7. Предложены основ-

ные методики контроля качества ФС LysECD7 по показателям «Подлинность», «Чистота» и «Количественное определение» с целью дальнейшей разработки лекарственных препаратов на его основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oliveira H., São-José C., Azeredo J. Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: challenges and future prospects for in vivo therapy. *Viruses*. 2018; 10(6): 292.
2. Schmelcher M., Donovan D.M., Loessner M.J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 2012; 7(10): 1147–71.
3. Назаров П.А. Альтернативы антибиотикам: литические ферменты бактериофагов и фаговая терапия. *Вестник РГМУ*. 2018; 1: 5–15.
4. Антонова Н.П., Балабаньян В.Ю., Ткачук А.П., Макаров В.В., Гушчин В.А. Физико-химические свойства и противомикробная активность рекомбинантного фаголизина бактериофага kpp10, действующего на *Pseudomonas aeruginosa*. *Вестник РГМУ*. 2018; 1: 22–9.
5. Lood R., Winer B.Y., Pelzek A.J. et al. Novel phage Lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(4): 1983–91.
6. Larpin Y., Oechslein F., Moreillon P. et al. In vitro characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets Gram-negative bacteria. *PLoS ONE*. 2018; 13(2): e0192507.
7. Antonova N.P., Vasina D.V., Lendel A.M. et al. Broad bactericidal activity of the Myoviridae bacteriophage lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against Gram-negative ESCAPE pathogens. *Viruses*. 2019; 11(3): e284.
8. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. М. 2018.
9. Федеральный закон от 12.04.2010 №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

Поступила 17 апреля 2020 г.

DEVELOPMENT OF STANDARDIZATION APPROACHES FOR RECOMBINANT ENDOLYSIN LYSECD7-BASED PHARMACEUTICAL SUBSTANCE

© Authors, 2020

N.P. Antonova

Post-graduate Student, Research Scientist,
N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation;
Lomonosov Moscow State University (Moscow)
E-mail: northernnatalia@gmail.com

D.V. Vasina

Ph.D. (Biol.), Research Laboratory Assistant,
N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow)
E-mail: d.v.vasina@gmail.com

V.U. Balabanyan

Dr.Sc. (Pharm.), Associate Professor, Lomonosov Moscow State University (Moscow)
E-mail: bal.pharm@mail.ru

V.A. Gushchin

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist,
N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation;
Lomonosov Moscow State University (Moscow)
E-mail: wowaniada@gmail.com

Relevance. Lytic bacteriophages endolysins represent one of the most promising classes of antibacterial agents in the post-antibiotic era. Since this class of antibacterials is quite new there is an urgent need for development of approaches to the endolysins pharmaceutical substances standardization.

Objective of the study was to develop the approaches to the recombinant endolysin LysECD7 pharmaceutical substance standardization.

Materials and methods. The identity and purity of the endolysin pharmaceutical substance was assessed by SDS-PAGE in 16% polyacrylamide gel. The specific antibacterial activity of the LysECD7 pharmaceutical substance was determined using a novel microbiological method counting the CFU reduction of the *Acinetobacter baumannii* Ts 50-16 test strain after the endolysin exposure. The sterility of the LysECD7 pharmaceutical substance was determined by the membrane filtration method. The bacterial endotoxins level was determined by a chromogenic endpoint test. The quantity of the protein in the pharmaceutical substance was determined by the colorimetric method with bicinchoninic acid.

Results. During the work the approaches to the standardization of the endolysin LysECD7 pharmaceutical substance were developed including the basic quality attributes such as "Electrophoresis in polyacrylamide gel" and "Specific activity" to confirm the identity, "Sterility", "Bacterial endotoxins" and "Quantification".

Conclusions. Approaches to the standardization of the LysECD7 endolysin pharmaceutical substance were developed including such quality attributes as "Identity", "Purity" and "Quantification", which allow to reach the stable efficiency and safety of the pharmaceutical substance aiming to develop innovative effective antibacterial drugs.

Key words: *Endolysins, LysECD7, Gram-negative bacteria, pharmaceutical substance, standardization, quality control.*

For citation: Antonova N.P., Vasina D.V., Balabanyan V.U., Gushchin V.A. Development of standardization approaches for recombinant endolysin LYSECD7-based pharmaceutical substance. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(9):3-8. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-09-01>

REFERENCES

1. Oliveira H., São-José C., Azeredo J. Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: challenges and future prospects for in vivo therapy. *Viruses*. 2018; 10(6): 292.
2. Schmelcher M., Donovan D.M., Loessner M.J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 2012; 7(10): 1147–71.
3. Nazarov P.A. Al'ternativy antibiotikam: liticheskie fermenty bakteriofagov i fagovaya terapiya. *Vestnik RGMU*. 2018; 1: 5–15.
4. Antonova N.P., Balaban'yan V.Yu., Tkachuk A.P., Makarov V.V., Gushchin V.A. Fiziko-himicheskie svoystva i protivomikrobnaya aktivnost' rekombinantnogo fagolizina bakteriofaga kpp10, dejstvuyushchego na *Pseudomonas aeruginosa*. *Vestnik RGMU*. 2018; 1: 22–9.
5. Lood R., Winer B.Y., Pelzek A.J. et al. Novel phage Lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(4): 1983–91.
6. Larpin Y., Oechslein F., Moreillon P. et al. In vitro characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets Gram-negative bacteria. *PLoS ONE*. 2018; 13(2): e0192507.
7. Antonova N.P., Vasina D.V., Lendel A.M. et al. Broad bactericidal activity of the Myoviridae bacteriophage lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against Gram-negative ESCAPE pathogens. *Viruses*. 2019; 11(3): e284.
8. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossijskoj Federacii XIV izdaniya. M. 2018.
9. Federal'nyj zakon ot 12.04.2010 №61-FZ «Ob obrashchenii lekarstvennyh sredstv».

Читайте в следующих номерах

**Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Ерохина П.Д.
Черных И.В., Якушева Е.Н.**

**ДОЗОЗАВИСИМОЕ ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА
НА УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NRF2 *IN VITRO***

Косман В.М., Карлина М.В.

**ОСТАТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА
В БИОБРАЗЦАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ (КРОЛИКОВ)
ПОСЛЕ ПОДГОТОВКИ ПРОБ К АНАЛИЗУ МЕТОДОМ ВЭЖХ-УФ**

**Сомонова О.В., Елизарова А.Л., Давыдова Т.В., Сытов А.В., Борисенко Н.Н.,
Корнюшенко У.А., Головня Е.Г., Нестерова Ю.А., Добровольская М.М.**

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АЛЬБУМИНА
И НАРУШЕНИЯ ГЕМОСТАЗА У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ
С ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ**