

ЭНДОЛИЗИНЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ПОЛИРЕЗИСТЕНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ (ОБЗОР)

А.М. Воробьев

аспирант, мл. науч. сотрудник,
лаборатория клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (Москва, Россия)
E-mail: vorobjew.alex2010@yandex.ru

М.Н. Анурова

к.фарм.н.,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

А.В. Алешкин

д.б.н., профессор РАН,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (Москва, Россия)

И.А. Киселева

к.б.н., ст. науч. сотрудник,
лаборатория клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (Москва, Россия)

К.М. Багандова

аспирант, мл. науч. сотрудник,
лаборатория клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (Москва, Россия)

Т.Э. Мизаева

аспирант, мл. науч. сотрудник,
лаборатория клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (Москва, Россия)

Д.В. Васина

к.б.н., ст. науч. сотрудник,
ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (Москва, Россия)

Н.П. Антонова

науч. сотрудник,
ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (Москва, Россия)

В.А. Гущин

к.б.н.,
ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (Москва, Россия)

Стремительный рост встречаемости полирезистентных возбудителей ставит перед научным сообществом важную задачу по поиску новых путей борьбы с такими возбудителями. Этот рост обусловлен широким применением антибиотиков основных фармакологических групп для лечения инфекционных заболеваний на фоне не угасающей эпидемии COVID-19. Одним из перспективных направлений в данной области являются бактериофаги ввиду своей эффективности в отношении резистентных возбудителей и безопасности применения. Тем не менее бактериофаги обладают рядом ограничений, затрудняющих их широкое применение. В связи с этим все более активно ведутся исследования эндолизинов – ферментов, синтезирующихся в конце литического цикла бактериофагов и разрушающих клеточную стенку бактерий. Дана характеристика эндолизинов, их классификация и описаны преимущества эндолизинов по сравнению с антибиотиками и бактериофагами. Приведены описания проводимых в мире исследований в области получения препаратов эндолизинов. Рассмотрены разработки по получению моно- и комбинированных эндолизинов для лечения ряда бактериальных инфекций. Показана эффективность данного подхода для лечения инфекций, в том числе вызванных полирезистентными возбудителями, и перспективность дальнейшей работы в этом направлении.

Ключевые слова: эндолизины, бактериофаги, антибиотикорезистентность.

Для цитирования: Воробьев А.М., Анурова М.Н., Алешкин А.В., Киселева И.А., Багандова К.М., Мизаева Т.Э., Васина Д.В., Антонова Н.П., Гущин В.А. Эндолизины и перспективы их применения для лечения инфекций, вызванных полирезистентными бактериями (обзор). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(10):13–22. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-10-02>

В настоящее время проблема антибиотикорезистентности становится угрожающей. Широкое и бесконтрольное применение антибиотиков приводит к возникновению штаммов микроорганизмов, которые могут быть устойчивы не только к одному, но и к нескольким антибиотикам. Согласно данным PubMed, в период с 2015 по 2019 гг. число публикаций, посвященных антибиотикорезистентности, возросло более чем на 30% (9900 и 13002 публикаций в год соответственно), что говорит о повышении частоты возникновения антибиотикорезистентных инфекций и об ухудшении эпидемиологической обстановки в целом во всем мире. По мнению некоторых авторов, распространение антибиотикорезистентных возбудителей уже приняло характер эпидемии и, следовательно, требует оперативных действий для борьбы с резистентными штаммами и профилактики вызываемых ими инфекций [1]. По данным ВОЗ, опубликованным 13 октября 2020 г., доля устойчивых к ципрофлоксацину бактерий вида *Klebsiella pneumoniae* в различных странах составляла от 4,1 до 79,4%; для *Escherichia coli* данный показатель находился в пределах от 8,4 до 92,9%. В 2019 г. частота инфицирования пациентов метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* составила 12,11%, а *E. coli*, устойчивой к цефалоспорином третьего поколения, – 36,0% [2].

Наибольшее распространение среди антибиотикорезистентных возбудителей имеют так называемые ESKAPE-патогены, которые состоят из представителей видов *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.* Указанные микроорганизмы зачастую являются госпитальными штаммами и вызывают вспышки инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), борьба с которыми осложняется множественной лекарственной устойчивостью, приобретенной ими вследствие длительной селекции в условиях лечебно-профилактических учреждений [1, 3].

Основным направлением борьбы с этой проблемой является разработка новых антибиотиков. Согласно данным ВОЗ, по состоянию на 1 сентября 2019 г. на стадии клинических испытаний (фазы I–III) находилось 50 новых антибиотиков и их комбинаций, активных в отношении как минимум одного из патогенов, выделенных ВОЗ, как критически важного, а на стадии доклинических испытаний – 252 антибиотика, однако, учитывая ранние стадии их разработки, допущены к применению

они будут минимум через 10 лет. Только 2 антибиотика из 50, находящихся на стадии клинических испытаний, активны в отношении полирезистентных грамотрицательных (Г⁻) бактерий [4].

Необходимо искать альтернативные способы борьбы с бактериальными инфекциями, которые будут отвечать современным требованиям к их безопасности. Одним из таких направлений является применение бактериофагов. К преимуществам бактериофагов перед антибиотиками можно отнести: активность в отношении устойчивых к антибиотикам бактерий; способность проникать в ткани организма, не нарушая баланс нормофлоры (благодаря высокой специфичности); совместимость со многими лекарственными препаратами; отсутствие иммуносупрессивного действия и наличие иммуномодулирующего эффекта [5].

Тем не менее бактериофаги обладают рядом недостатков, среди которых можно выделить узкий спектр литической активности (наиболее эффективным способом применения бактериофагов считается индивидуальный подбор вируса к конкретному возбудителю, что является достаточно дорогостоящей и трудоемкой процедурой), а также иммуногенность [6]. На фоне этих данных перспективным выглядит применение ферментов, синтезируемых бактериофагами, – эндолизинов. Эндолизины активны в отношении полирезистентных штаммов микроорганизмов и не оказывают специфического бактерицидного действия на негомолочные бактерии нормальной флоры. Препараты рекомбинантных эндолизинов работают на поверхности клетки патогена и не подвержены действию внутриклеточных механизмов защиты. Кроме того, эндолизины способны разрушать мукополисахаридный матрикс биопленок [7], с которым не справляется большинство антибиотиков [8]. Мультидоменная природа эндолизинов позволяет конструировать белки с двумя или более бактерицидными активностями, увеличивая терапевтический потенциал препаратов [9].

СТРОЕНИЕ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЭНДОЛИЗИНОВ

Эндолизины являются ферментами, которые синтезируются в конце литического цикла бактериофага и способствуют высвобождению фагового потомства путем разрушения клеточной стенки бактерии изнутри, что вызывает ее осмотический лизис. Все эндолизины относятся к классу гидролаз пептидогликана (пептидогликангидролазы) и

подразделяются в зависимости от участка пептидогликана, в отношении которого они активны: мурамидазы (лизоцим-подобные ферменты, литические трансгликозилазы), N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы; N-ацетилмурамоил-L-аланин-амидазы; пептидазы [10].

На рис. 1 представлено графическое изображение участков пептидогликана, разрушаемых эндолизинами различных групп.

Различия в структуре эндолизинов обусловлены строением клеточной стенки бактерии, которую они должны разрушать.

Эндолизины, синтезируемые бактериофагами, активными в отношении грамположительных бактерий (Gr⁺ эндолизины), имеют модульную структуру и часто состоят из двух доменов, имеющих различные функции. На N-конце находится ферментативно-активный домен (enzymatically active domain, EAD), а на C-конце – домен связывания с клеточной стенкой (cell wall binding domain, CBD) [11, 12]. Однако некоторые эндолизины могут обладать и несколькими EAD с различной ферментативной активностью или несколькими CBD с различной аффинностью (табл. 1).

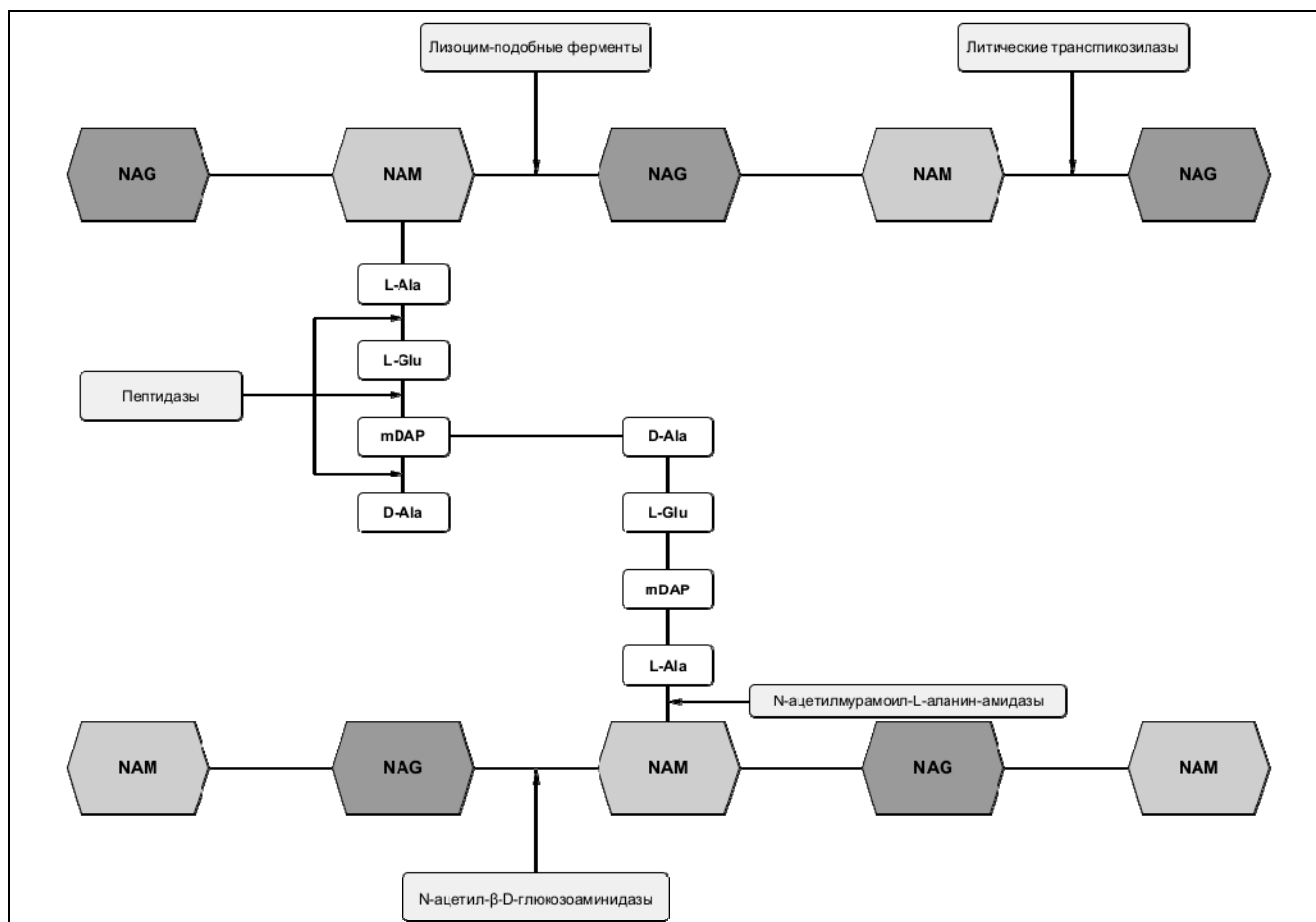


Рис. 1. Мишени эндолизинов. NAM–N-ацетилмурамовая кислота; NAG– N-ацетилглюкозамин [10]

Таблица 1. Различия в строении некоторых Gr⁺ эндолизинов

Эндолизин	Строение эндолизина (N-конец → С-конец)	Фаг активен в отношении	Источник
PlyPSA	Амидаза – CBD	<i>Listeria monocytogenes</i>	[12]
Ply500	Пептидаза – CBD	<i>Listeria monocytogenes</i>	[11]
LysIME-EF1	Пептидаза – CBD – CBD – CBD	<i>Enterococcus faecalis</i>	[13]
LysBC17	Пептидаза – CBD – CBD	<i>Bacillus cereus</i>	[14]
LysPBC5	Трансгликозилаза – CBD – CBD	<i>Bacillus cereus</i>	[15]
LysK	Пептидаза – Амидаза – CBD	<i>Staphylococcus aureus</i>	[16]
B30	Пептидаза – Мурамидаза – CBD	<i>Streptococcus agalactiae</i>	[17]
λSA2	Пептидаза – CBD – CBD – Глюкозаминидаза	<i>Streptococcus agalactiae</i>	[18]

Так, CBD отвечает за распознавание субстрата и соединяется со специфичными лигандами на клеточной стенке, обеспечивая специфичность действия фермента. Кроме того, CBD некоторых эндолизинов остается связанным с субстратом даже после лизиса клетки, что, вероятно, предотвращает действие эндолизина на не инфицированные фагом бактерии [19].

На данный момент существует множество данных об аффинности CBD различных эндолизинов. Так, домен LysM (Lysin Motif) [10] является наиболее типичным доменом для пептидогликангидролазы и связывается с остатками N-ацетилглюкозамина [10]; известны также несколько доменов эндолизина Cpl-1 и других пневмококковых эндолизинов, связывающихся с содержащими холин тейхоевыми кислотами в клеточной стенке [20, 21] и домен эндолизина Cpl-7, связывающийся с клеточной стенкой пневмококков в холиннезависимой манере [10].

Аффинность CBD часто распространяется на весь род бактерий, что подтверждается исследованиями с CBD, помеченными GFP (Green fluorescent protein – зеленый флуоресцирующий протеин) [22]. Данная особенность обуславливает более широкий спектр активности эндолизинов по сравнению с синтезирующими их бактериофагами [10].

Теория о более широком спектре действия и более высокой эффективности эндолизинов по сравнению с бактериофагами подтверждается многочисленными исследованиями, которые можно разделить на исследования индивидуальных белков и их комбинаций.

ПРИМЕНЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ЭНДОЛИЗИНОВ

В 2019 г. Fraga A.G. с соавт. опубликованы результаты исследования бактерицидной активности эндолизина LysB бактериофага D29, штаммом-хозяином которого является *Mycobacterium tuberculosis*, *in vitro* и *in vivo*. Исследование проводили на *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG, *M. ulcerans* и *M. tuberculosis* [23]. Помимо высокой активности в отношении *M. tuberculosis* (минимальная ингибирующая концентрация (МИК) составила 0,20 мкг/мл), эндолизин показал высокую активность в отношении двух других исследуемых бактерий (МИК 1,5 мкг/мл для *M. smegmatis*, 0,079 мкг/мл для *M. ulcerans* и 0,19 мкг/мл для *M. bovis* BCG) [23]. Для исследований *in vivo* авторами была выбрана модель язвы Бурули у мышей, возбудителем которой является *M. ulcerans*, продуцирующая ми-

колактон. Проведенный эксперимент показал, что терапия с применением эндолизина позволила предотвратить рост количества бактерий в очаге инфекции. Концентрация бактерий в контрольной группе, получавшей плацебо, превышало таковую в опытной группе более чем в 10 раз на 16-й день после заражения. Кроме того, терапия эндолизинном привела к росту содержания γ -интерферона и фактора некроза опухоли в клетках лимфатических узлов на 16-й день после заражения по сравнению с контрольной группой, что, по мнению авторов, способствовало снижению уровня миколоактона и развитию защитного иммунитета у лабораторных животных, чего обычно не происходит при традиционной терапии [23].

Аналогичная картина наблюдается у эндолизинов бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Bacillus*. Так, эндолизины AP50-31 и LysB4 показали высокую активность внутри рода *Bacillus*, в то время как бактериофаги, из генома которых они выделены, были активны только в отношении *B. anthracis* и *B. cereus* соответственно [24, 25]. Исследование проводили на 8 видах бактерий: *B. cereus*, *B. circulans*, *B. laevolacticus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* и на четырех штаммах *B. thuringiensis*. Активность эндолизинов оценивали турбидиметрией путем определения времени, необходимого белку для снижения OD₆₀₀ (оптическая плотность при длине волны 600 нм) бактериальной культуры в 2 раза (TOD₅₀). Исследуемые эндолизины показали различную активность. У LysB4 TOD₅₀ варьировалось от 0,5 мин для *B. subtilis* до 4,2 мин для *B. thuringiensis*, в то время как AP50-31 показывал TOD₅₀ от 2,2 мин для *B. thuringiensis* до 19,4 мин для *B. licheniformis*. Оба эндолизина были активны в отношении *B. anthracis* (максимальное TOD₅₀ 16,3 мин у эндолизина AP50-31 и 10,2 мин – у LysB4) [24]. Помимо определения бактерицидной активности *in vitro*, была проведена оценка эффективности применения LysB4 при инфекции, вызванной спорами *B. anthracis* у лабораторных мышей. Эндолизин вводили интраназально через 6, 24 и 48 ч после инфицирования [24]. Применение LysB4 в концентрации 10 мкг/животное позволило замедлить гибель животных и существенно повысить выживаемость (50% при выживаемости в контрольной группе, получавшей плацебо, 0% на 5-й день после инфицирования). Применение LysB4 в концентрации 100 мкг/животное позволило достичь уровня выживаемости 100% [24].

Несмотря на позитивные данные о спектре бактерицидной активности эндолизинов и их эффективности при применении у животных, в приведенных работах нет прямого сравнения эндолизинов с бактериофагами, являющимися их источниками, что не позволяет сделать объективные выводы об их преимуществах. В 2019 г. Jun-Hyeok Yu с соавт. опубликованы результаты исследования, наиболее наглядно показывающего различия в спектрах активности эндолизинов и бактериофагов. В ходе исследования было проведено определение спектра бактерицидной активности эндолизина LysSAP8 и его сравнение с бактериофагом SAP8, из которого он был получен [26]. Исследование проводили на 116 бактериальных штаммах, 75 из которых относились виду *S. aureus*, включая MRSA. Остальные штаммы (41) относились к видам *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. warneri* и *S. xyloso*, а также к представителям родов *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella* и *Vibrio* [26]. Бактериофаг SAP8 был активен только в отношении 15 штаммов *S. aureus*, кроме того, он не заражал метицилин-резистентные штаммы. При этом к эндолизу данному бактериофага (LysSAP8) оказались чувствительны 73 из 75 штаммов *S. aureus*, включая MRSA, а также другие исследуемые представители рода *Staphylococcus*, указанные выше, за исключением четырех штаммов (1 штамм *S. condiment*, 1 штамм *S. warneri* и 2 штамма *S. epidermidis*) [26].

Помимо внутривидовой бактерицидной активности, рассмотренной выше, эндолизины способны поражать бактерии и других родов. Так, LysSS – эндолизин бактериофага SS3e, штаммом-хозяином которого является *S. enterica*, в исследованиях *in vitro* показал активность в отношении *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp.*, а также *S. aureus* (MRSA). Стоит отметить, что сам бактериофаг также обладает широким спектром литической активности, однако, в отличие от рекомбинантного эндолизина, не способен лизировать *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* [27]. В исследовании использовались только полирезистентные штаммы. Минимальная ингибирующая концентрация варьировалась от 0,063–0,25 мг/мл для 16 штаммов *A. baumannii* до 0,75 мг/мл для *E. coli*, *Salmonella spp.* и *S. aureus*. Наименее чувствительными к исследуемому эндолизу оказались штаммы *Enterococcus faecalis* (МИК > 2 мг/мл) [28].

Исследователями был проведен эксперимент по оценке эффективности эндолизина *in vivo*. Для этого лабораторных мышей заражали путем интратрибушинного введения суспензии *A. baumannii* ATCC 17978 и последующим (через 30 мин после инфицирования) введением раствора LysSS в концентрациях 125 и 500 мкг/животное [28]. Группа животных, получавших лечение эндолизином в концентрации 125 мкг/животное, показала наивысшую выживаемость (40% на 4-й день от начала инфекции) по сравнению с контрольной группой и группой, получавшей лечение эндолизином в концентрации 500 мкг/животное, в которой смертность достигла 100% уже через 1 день после начала лечения. Данное исследование показало отсутствие токсического эффекта при применении эндолизина в концентрациях до 500 мкг/животное [28]. По мнению авторов, высокая смертность животных в группе, получавшей лечение эндолизином в концентрации 500 мкг/животное, была вызвана острым септическим шоком, причиной которого стал быстрый лизис *A. baumannii*, что говорит о необходимости тщательного подбора дозировки эндолизинов при терапии системных инфекций [28].

Аналогичные тенденции наблюдаются и в исследованиях других авторов. В 2019 г. Magdalena Plotka и соавт. опубликовали результаты определения бактерицидной активности эндолизина Ts2631 против грамтрицательных полирезистентных бактерий [29].

В исследовании использовали различные штаммы *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *C. braakii*, *K. pneumoniae* и *E. cloacae*, обладающие резистентностью сразу к нескольким антибиотикам, например, в случае с *K. pneumoniae* KPD 298 к ампициллину, амоксициллину в комбинации с клавулановой кислотой, пиперациллину в комбинации с тазобактамом, цефалотину, цефуроксиму натрия и т.д. [29]. Рекомбинантный эндолизин показал высокую активность в отношении всех исследуемых бактерий, в то время как бактериофаг vB_Tsc2631, из которого был выделен эндолизин, активен только в отношении *Thermus scotoductus*, что говорит о более широком спектре активности эндолизина по сравнению с бактериофагом-хозяином, так же как и в предыдущем примере [29].

Схожие результаты получены для эндолизина TSPphg, выделенного из бактериофага TSP4, активного в отношении бактерий рода *Thermus* [30]. В отличие от предыдущего исследования, в дан-

ной работе определяли активность эндолизина в отношении не только грамотрицательных, но и в отношении полирезистентных грамположительных бактерий, включая *S. aureus*, *S. epidermidis* и *Micrococcus luteus* [30].

Эндолизин показал высокую активность в отношении всех исследуемых микроорганизмов, что свидетельствует о способности некоторых эндолизинов уничтожать бактерии с различной структурой клеточной стенки [30]. Помимо высокой активности в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, эндолизин показал способность улучшать заживление ран, инфицированных *S. aureus* на инфекционной модели раневой инфекции у лабораторных мышей. Для проведения исследования на раневую поверхность наносили 20 мкл бактериальной суспензии с содержанием клеток 1×10^5 КОЕ и через 24 ч после инфицирования начинали лечение. Лечение заключалось в ежедневном нанесении на раневую поверхность 100 мкл эндолизина в концентрации 50 мкг/мл. В качестве групп сравнения использовали группу, получавшую 100 мкл PBS (контрольная группа), группу, получавшую 100 мкл канамицина в концентрации 50 мкг/мл и интактную группу без инфицирования. Эффективность оценивали путем определения степени заживления, выраженной в процентах, а также определением титра бактерий на раневой поверхности [30].

Применение эндолизина и канамицина значительно ускорило заживление раны. Так, на 7-й день после инфицирования степень заживления ран составила 89% для группы, получавшей лечение эндолизином, и 90% – для группы, получавшей лечение канамицином, при этом в интактной и контрольной группах степень заживления составляла 66 и 60% соответственно. Титр бактерий на раневой поверхности в группах, получавших лечение, упал со стартового значения до приблизительно 55 КОЕ/мл, что говорит об эффективном уничтожении бактерий эндолизином и канамицином [30].

По мнению авторов, полученные результаты свидетельствуют об эффективности рекомбинантного эндолизина TSPphg в удалении *S. aureus* с раневых поверхностей и его способности ускорять заживление ран [30].

Исследования, аналогичные указанным выше, были проведены и в России. В ходе экспериментов были определены спектры бактерицидной активности 5 рекомбинантных эндолизинов (LysECD7,

LysAm24, LysAp22, LysSi3 и LysSt11), исследования проводились на 120 полирезистентных штаммах *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Campylobacter jejuni* [31].

Наиболее широкий спектр бактерицидной активности показали эндолизины LysECD7, LysAm24 и LysAp22, проявляя активность в отношении 70,7; 65,0 и 58,6% исследуемых микроорганизмов соответственно. Единственным видом бактерий, проявлявшим слабую чувствительность к LysECD7 и LysAm24, оказался *C. jejuni* (25 и 20% чувствительных штаммов соответственно). В свою очередь, LysAp22 практически не проявлял активность в отношении *P. aeruginosa* (10% чувствительных штаммов), но был активен в отношении *C. jejuni* (35% чувствительных штаммов). Остальные эндолизины обладали менее широким спектром бактерицидной активности (49,3% исследованных микроорганизмов, чувствительных к LysSi3, и 39,3% – к LysSt11).

Стоит отметить, что LysECD7, помимо широкого спектра бактерицидной активности, показал эффективность в уничтожении биопленок *in vitro* и *in vivo* [32]. В качестве возбудителя, формирующего биопленку, использовали полирезистентный штамм *K. pneumoniae* Ts141-14, оценивали влияние эндолизина на формирующуюся и уже сформированную биопленку, сравнивая его эффект с амикацином.

Проведенное исследование показало, что применение эндолизина в концентрациях 1000 и 3000 мкг/мл предотвращает формирование биопленки на 74 и 79% по сравнению с контролем соответственно, амикацин в близких концентрациях обладал схожим эффектом. При этом действие эндолизина на сформированную биопленку было более выражено, по сравнению с амикацином. Так, эндолизин в концентрациях 1000 и 3000 мкг/мл снизил плотность биопленки на 60 и 68% соответственно по сравнению с контролем, в то время как амикацин в близких концентрациях снижал плотность биопленки на 37 и 50% [32].

Таким образом, LysECD7 более эффективен в отношении формирующихся пленок, но в отношении уже сформированных пленок показывает более высокую эффективность по сравнению с амикацином, что делает его перспективным кандидатом для терапии биопленок при местном и системном применении [32].

ПРИМЕНЕНИЕ КОМБИНИРОВАННЫХ ЭНДОЛИЗИНОВ

Учитывая различия в строении, организации, механизмах и спектрах действия различных эндолизинов, логично выглядит их применение в комбинации друг с другом для обеспечения разнонаправленного действия на бактериальные клетки и расширения спектра бактерицидной активности. Однако примеров такого применения на данный момент довольно мало, что можно объяснить относительно новизной данной темы и, как следствие, малым количеством проведенных исследований.

Тем не менее исследования в данном направлении ведутся. В 2019 г. Raymond Schuch и соавторы опубликовали результаты работы, в ходе которой они определили спектр бактерицидной активности эндолизина PlyB, выделенного из бактериофага νB_BanS_Vcp1 [33], а также тип его взаимодействия с эндолизином PlyG, выделенным из γ -бактериофага *B. cereus* [34]. Предположение о возможной синергии двух ферментов возникло ввиду различного механизма действия [33]. Для оценки взаимодействия двух эндолизинов определяли индекс фракционной ингибирующей концентрации на двух штаммах *B. anthracis* и двух штаммах *B. cereus*. Значение данного индекса колебалось от 0,185 до 0,250, что соответствует сильной синергии. Для подтверждения результатов опыта *in vitro* были проведены эксперименты *in vivo* на модели летальной инфекции *B. anthracis* Δ Sterney лабораторных мышей. Через 1 ч после заражения летальной дозой бактерий животным однократно внутрибрюшинно вводили PlyB, PlyG или их смесь. Выживаемость в опытных группах сравнивали с контрольной, которая получала физиологический раствор [33].

Оба эндолизина при индивидуальном применении обеспечили 100%-ную выживаемость на 7-й день в концентрации 5 мг/кг животного, в то время как выживаемость в контрольной группе в этой временной точке составляла 0–14%. При этом применение комбинации эндолизинов позволило достичь такого же результата уже при концентрации каждого белка 1,25 мг/кг животного (суммарная концентрация – 2,5 мг/кг), таким образом, суммарная концентрация белка была в 2 раза ниже, чем в других группах. Применение комбинации эндолизинов в концентрации 0,312 мг/кг (суммарная концентрация – 0,625 мг/кг) позволило достичь выживаемости 71%, когда индивидуаль-

ные белки в концентрации 0,625 мг/кг обеспечили 28%-ную выживаемости [33].

Основываясь на полученных данных, авторы говорят о возможности применения в терапии бактериальных инфекций комбинаций рекомбинантных эндолизинов для значительного усиления бактерицидной активности [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение эндолизинов в терапии бактериальных инфекций, в том числе вызванных полирезистентными возбудителями, является перспективным направлением дальнейших исследований ввиду широкого спектра действия, активности в отношении полирезистентных возбудителей, способности к уничтожению биопленок и доказанной эффективности применения *in vivo*, особенно на фоне возрастающей проблемы антибиотикорезистентности и ограничений в применении бактериофагов.

Преимущества данных ферментов позволяют говорить о возможности создания эффективных препаратов как индивидуальных белков, так и их комбинаций для терапии инфекций, вызванных полирезистентными возбудителями. Работы в данном направлении ведутся учеными разных стран, включая и Российскую Федерацию, что подтверждает заинтересованность научного сообщества в данной теме и свидетельствует о возникновении нового подхода к терапии бактериальных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габриэлян Н.И., Шарапенко С.О., Кисиль О.В. Кормилицина В.Г. Дрabbкина И.В., Сафонова Т.Б., Петрухина М.И., Саутгареев Р.Ш., Захаревич В.М. Вопросы эпидемиологии в проблеме антибиотикорезистентности клинических патогенов. Медицинский алфавит. 2020; (34): 6–8. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-34-6-8>.
2. Устойчивость к противомикробным препаратам [Электронный ресурс]. ВОЗ. 2020. 13 октября. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (Дата обращения: 11.02.2021).
3. La Fauci V., Costa G.B., Arena A., et al. Trend of MDR-microorganisms isolated from the biological samples of patients with HAI and from the surfaces around that patient. New Microbiol. 2018; 41(1): 42–46.
4. Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections [Электронный ресурс]. World Health Organization. Geneva, 2020. Режим доступа: <https://www.who.int/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections>.
5. Иванова И.А., Труфанова А.А., Филиппенко А.В. и др. Бактериофаги и иммунная система макроорганизма. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019; 6: 79–84; doi: 10.36233/0372-9311-2019-6-79-85.

6. Бочкарева С.С., Алешкин А.В., Еришова О.Н. и др. Иммунологические аспекты фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в отделении нейрореанимации. Журнал микробиологии. 2017; 4: 42–48.
7. Olsen N.M.C., Thiran E., Hasler T., et al. Synergistic removal of static and dynamic *Staphylococcus aureus* biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase. *Viruses*. 2018; 10(8): pii: E438; doi: 10.3390/v10080438.
8. Тец В.В., Тец Г.В. Микробные биопленки и проблемы антибиотикотерапии. Практическая пульмонология. 2013; 4: 60–64.
9. Kovalskaya N.Y., Herndon E.E., Foster-Frey J.A., et al. Antimicrobial activity of bacteriophage derived triple fusion protein against *Staphylococcus aureus* [J]. *AIMS Microbiology*. 2019; 5(2): 158–175; doi:10.3934/microbiol.2019.2.158.
10. Schmelcher Mathias, Donovan David M., and Loessner Martin J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 2012 October; 7(10): 1147–1171. doi: 10.2217/fmb.12.97.
11. Loessner M.J., Wendlinger G., Scherer S. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol. Microbiol.* 1995; 16(6): 1231–1241.
12. Zimmer M., Sattelberger E., Inman R.B., Calendar R., Loessner M.J. Genome and proteome of *Listeria monocytogenes* phage PSA: an unusual case for programmed + 1 translational frameshifting in structural protein synthesis. *Mol. Microbiol.* 2003; 50(1): 303–317.
13. Zhou B., Zhen X., Zhou H., Zhao F., Fan C., Perčulija V., et al. Structural and functional insights into a novel two-component endolysin encoded by a single gene in *Enterococcus faecalis* phage. *PLoS Pathog.* 2020; 16(3): e1008394. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008394>.
14. Swift Steven M., Etobayeva Irina V., et al. Characterization of LysBC17, a Lytic Endopeptidase from *Bacillus cereus*. *Antibiotics*. 2019; 8(3): 155; doi: 10.3390/antibiotics8030155
15. Ko On Lee, Minsuk Kong, et al. Structural Basis for Cell-Wall Recognition by Bacteriophage PBC5 Endolysin. *Structure*. 2019; 27(9): 1355–1365. doi: 10.1016/j.str.2019.07.001.
16. O'Flaherty S., Coffey, et al. The Recombinant Phage Lysin LysK Has a Broad Spectrum of Lytic Activity against Clinically Relevant *Staphylococci*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 2005; 187(20): 7161–7164; doi: 10.1128/jb.187.20.7161-7164.2005.
17. Pritchard D.G. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology*. 2004; 150(7): 2079–2087; doi: 10.1099/mic.0.27063-0.
18. Pritchard D.G., Dong S., Kirk M.C., Cartee R.T., Baker J.R. LambdaSa1 and lambdaSa2 prophage lysins of *Streptococcus agalactiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(22): 7150–7154.
19. Loessner M.J., Kramer K., Ebel F., Scherer S. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.* 2002 Apr; 44(2): 335–49; doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02889.x.
20. Hermoso J.A., Garcia J.L., Garcia P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10(5): 461–472.
21. Lopez R., Garcia E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004; 28(5): 553–580.
22. Gu J., Lu R., Liu X., et al. LysGH15B, the SH3b domain of staphylococcal phage endolysin LysGH15, retains high affinity to staphylococci. *Curr. Microbiol.* 2011; 63(6): 538–542.
23. Fraga A.G., Trigo G., Murthy R.K., Akhtar S., Hebbur M., et al. Antimicrobial activity of Mycobacteriophage D29 Lysin B during *Mycobacterium ulcerans* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019; 13(8): e0007113. doi: 10.1371/journal.pntd.0007113.
24. Park S., Jun S.Y., Kim C.H., et al. Characterisation of the antibacterial properties of the recombinant phage endolysins AP50-31 and LysB4 as potent bactericidal agents against *Bacillus anthracis*. *Sci. Rep.* 2018; 8(18); doi: 10.1038/s41598-017-18535-z.
25. Sozhamannan S., McKinsty M., Lentz S.M., et al. Molecular characterization of a variant of *Bacillus anthracis*-specific phage AP50 with improved bacteriolytic activity. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(21): 6792–6796; doi: 10.1128/AEM.01124-08.
26. Yu J.H., Lim J.A., Chang H.J., Park J.H. Characteristics and Lytic Activity of Phage-Derived Peptidoglycan Hydrolase, LysSAP8, as a Potent Alternative Biocontrol Agent for *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2019; 29: 1916–1924; doi: 10.4014/jmb.1908.08021.
27. Kim S., Kim S.H., Rahman M., et al. Characterization of a *Salmonella* Enteritidis bacteriophage showing broad lytic activity against Gram-negative enteric bacteria. *J. Microbiol.* 2018; 56: 917–925; doi: 10.1007/s12275-018-8310-1.
28. Shukho Kim, Da-Won Lee, Jong-Sook Jin, Jungmin Kim. Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020; 22: 32–39; doi: 10.1016/j.jgar.2020.01.005.
29. Plotka M., Kapusta M., Dorawa S., Kaczorowska A.-K., Kaczorowski T. Ts2631 Endolysin from the Extremophilic *Thermus scotoductus* Bacteriophage vB_Tsc2631 as an Antimicrobial Agent against Gram-Negative Multidrug-Resistant Bacteria. *Viruses*. 2019; 11: 657; doi: 10.3390/v11070657.
30. Wang F., Ji X., et al. TSPpH Lysin from the Extremophilic *Thermus* Bacteriophage TSP4 as a Potential Antimicrobial Agent against Both Gram-Negative and Gram-Positive Pathogenic Bacteria. *Viruses*. 2020. 12(2): 192; doi: 10.3390/v12020192.
31. Воробьев А.М., Анурова М.Н., Алешкин А.В. и др. Определение спектра бактерицидной активности рекомбинантных эндוליзинов бактериофагов ECD7, Am24, Ap22, Si3 и St11. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020; 170(11): 597–601; doi: 10.47056/0365-9615-2020-170-11-597-601.
32. Fursov M.V., Abdrakhmanova R.O., Antonova N.P., et al. Antibiofilm Activity of a Broad-Range Recombinant Endolysin LysECD7: In Vitro and In Vivo Study. *Viruses*. 2020; 12(5): 545. <https://doi.org/10.3390/v12050545>.
33. Schuch Raymond, Pelzek J. Adam, Nelson C. Daniel, Fischetti A. Vincent. The PlyB Endolysin of Bacteriophage vB_BanS_Bcp1 Exhibits Broad-Spectrum Bactericidal Activity against *Bacillus cereus* Sensu Lato Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2019; 85(9): e00003-19; doi: 10.1128/AEM.00003-19.
34. Schuch R., Nelson D., Fischetti V. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*. 2002; 418: 884–889; doi: 10.1038/nature01026.

Поступила 26 июля 2021 г.

ENDOLYSINS AND PROSPECTS OF THEIR USE FOR THE TREATMENT OF INFECTIONS CAUSED BY POLYRESISTENT BACTERIA (REVIEW)

© Authors, 2021

A.M. Vorobev

Post-graduate Student, Junior Research Scientist, Laboratory of Clinical Microbiology and Bacteriophage Biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)
E-mail: vorobjew.alex2010@yandex.ru

M.N. Anurova

Ph.D. (Pharm.), Sechenov First State Medical University (Moscow, Russia)

A.V. Aleshkin

Dr.Sc. (Biol.), Professor of the Russian Academy of Sciences, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

I.A. Kiseleva

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

K.M. Bagandova

Post-graduate Student, Junior Research Scientist, Laboratory of Clinical Microbiology and Bacteriophage Biotechnology G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

T.E. Mizaeva

Post-graduate Student, Junior Research Scientist, Laboratory of Clinical Microbiology and Bacteriophage Biotechnology G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

D.V. Vasina

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist, Gamaleya State Research Center for Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

N.P. Antonova

Research Scientist, Gamaleya State Research Center for Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

V.A. Gushchin

Ph.D. (Biol.), Gamaleya State Research Center for Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

The rapid increase in the incidence of multidrug-resistant pathogens poses an important task for the scientific community to find new ways to combat such pathogens. This increase is due to the widespread use of antibiotics of the main pharmacological groups for the treatment of infectious diseases against the backdrop of the ongoing COVID-19 epidemic. One of the promising directions in this area is bacteriophages due to their effectiveness against resistant pathogens and safety of use. Nevertheless, bacteriophages have a number of limitations that hinder their widespread use. In this regard, studies of endolysins – enzymes synthesized at the end of the lytic cycle of bacteriophages and destroying the bacterial cell wall – are being increasingly actively pursued. This article describes the characteristics of endolysins, their classification and advantages in comparison with antibiotics and bacteriophages. The descriptions of research carried out in the world in the field of obtaining endolysin preparations are given. Developments for the production of mono- and combined endolysins for the treatment of a number of bacterial infections are described. The effectiveness of this approach for the treatment of infections, including those caused by multidrug-resistant pathogens, and the prospects for further work in this direction are shown.

Key words: *endolysins, bacteriophages, antibiotic resistance.*

For citation: Vorobev A.M., Anurova M.N., Aleshkin A.V., Kiseleva I.A., Bagandova K.M., Mizaeva T.E., Vasina D.V., Antonova N.P., Gushchin V.A. Endolysins and prospects of their use for the treatment of infections caused by polyresistant bacteria (review). *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2021;24(10):13–22. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-10-02>

REFERENCES

- Gabričeljan N.I., Sharapchenko S.O., Kisil' O.V. Kormilicina V.G. Drabkina I.V., Safonova T.B., Petruhina M.I., Caitgareev R.Sh., Zaharevich V.M. Voprosy jepidemiologii v probleme antibiotikorezistentnosti kliničeskikh patogenov. *Medicinskij alfavit.* 2020; (34): 6–8. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-34-6-8>.
- Ustojčivost' k protivomikrobnym preparatam [Jelekt–ronnyj resurs]. VOZ.2020. 13 oktjabrja. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance> (Data obratšenija: 11.02.2021).
- La Fauci V., Costa G.B., Arena A., et al. Trend of MDR-microorganisms isolated from the biological samples of patients with HAI and from the surfaces around that patient. *New Microbiol.* 2018; 41(1): 42–46.
- Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections [Elektronnyj resurs]. World Health Organization. Geneva, 2020. Režim

- доступна: <https://www.who.int/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections>.
5. Ivanova I.A., Trufanova A.A., Filippenko A.V. i dr. Bakteriofagi i immunnaja sistema makroorganizma. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2019; 6: 79–84; doi: 10.36233/0372-9311-2019-6-79-85.
 6. Bochkareva S.S., Aleshkin A.V., Ershova O.N. i dr. Immunologicheskie aspekty fagoterapii infekcij, svjazannyh s okazaniem medicinskoj pomoshhi, v otdelenii nejreroanimacii. Zhurnal mikrobiologii. 2017; 4: 42–48.
 7. Olsen N.M.C., Thiran E., Hasler T., et al. Synergistic removal of static and dynamic *Staphylococcus aureus* biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase. *Viruses*. 2018; 10(8): pii: E438. doi: 10.3390/v10080438.
 8. Tec V.V., Tec G.V. Mikrobnye bioplenki i problemy antibiotikoterapii. Prakticheskaja pul'monologija. 2013; 4: 60–64.
 9. Kovalskaya N.Y., Herndon E.E., Foster-Frey J.A., et al. Antimicrobial activity of bacteriophage derived triple fusion protein against *Staphylococcus aureus* [J]. *AIMS Microbiology*. 2019; 5(2): 158–175; doi:10.3934/microbiol.2019.2.158.
 10. Schmelcher Mathias, Donovan David M., and Loessner Martin J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 2012 October; 7(10): 1147–1171; doi: 10.2217/fmb.12.97.
 11. Loessner M.J., Wendlinger G., Scherer S. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol. Microbiol.* 1995; 16(6): 1231–1241.
 12. Zimmer M., Sattelberger E., Inman R.B., Calendar R., Loessner M.J. Genome and proteome of *Listeria monocytogenes* phage PSA: an unusual case for programmed + 1 translational frameshifting in structural protein synthesis. *Mol. Microbiol.* 2003; 50(1): 303–317.
 13. Zhou B., Zhen X., Zhou H., Zhao F., Fan C., Perčulija V., et al. Structural and functional insights into a novel two-component endolysin encoded by a single gene in *Enterococcus faecalis* phage. *PLoSPathog.* 2020; 16(3): e1008394. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008394>.
 14. Swift Steven M., Etobayeva Irina V., et al. Characterization of LysBC17, a Lytic Endopeptidase from *Bacillus cereus*. *Antibiotics*. 2019; 8(3): 155; doi: 10.3390/antibiotics8030155.
 15. Ko On Lee, Minsuk Kong, et al. Structural Basis for Cell-Wall Recognition by Bacteriophage PBC5 Endolysin. *Structure*. 2019; 27(9): 1355–1365; doi: 10.1016/j.str.2019.07.001.
 16. O'Flaherty S., Coffey, et al. The Recombinant Phage Lysin LysK Has a Broad Spectrum of Lytic Activity against Clinically Relevant *Staphylococci*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 2005; 187(20): 7161–7164; doi: 10.1128/jb.187.20.7161-7164.2005.
 17. Pritchard D.G. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology*. 2004; 150(7): 2079–2087; doi: 10.1099/mic.0.27063-0.
 18. Pritchard D.G., Dong S., Kirk M.C., Cartee R.T., Baker J.R. LambdaSa1 and lambdaSa2 prophage lysins of *Streptococcus agalactiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(22): 7150–7154.
 19. Loessner M.J., Kramer K., Ebel F., Scherer S. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.* 2002 Apr; 44(2): 335–49; doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02889.x.
 20. Hermoso J.A., Garcia J.L., Garcia P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10(5): 461–472.
 21. Lopez R., Garcia E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004; 28(5): 553–580.
 22. Gu J., Lu R., Liu X., et al. LysGH15B, the SH3b domain of staphylococcal phage endolysinLysGH15, retains high affinity to staphylococci. *Curr. Microbiol.* 2011; 63(6): 538–542.
 23. Fraga A.G., Trigo G., Murthy R.K., Akhtar S., Hebbur M., et al. Antimicrobial activity of Mycobacteriophage D29 Lysin B during *Mycobacterium ulcerans* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019; 13(8): e0007113; doi: 10.1371/journal.pntd.0007113.
 24. Park S., Jun S.Y., Kim C.H., et al. Characterisation of the antibacterial properties of the recombinant phage endolysins AP50-31 and LysB4 as potent bactericidal agents against *Bacillus anthracis*. *Sci. Rep.* 2018; 8(18); doi: 10.1038/s41598-017-18535-z.
 25. Sozhamannan S., McKinstry M., Lentz S.M., et al. Molecular characterization of a variant of *Bacillus anthracis*-specific phage AP50 with improved bacteriolytic activity. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(21): 6792–6796; doi: 10.1128/AEM.01124-08.
 26. Yu J.H., Lim J.A., Chang H.J., Park J.H. Characteristics and Lytic Activity of Phage-Derived Peptidoglycan Hydrolase, LysSAP8, as a Potent Alternative Biocontrol Agent for *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2019; 29: 1916–1924. doi: 10.4014/jmb.1908.08021.
 27. Kim S., Kim S.H., Rahman M., et al. Characterization of a *Salmonella* Enteritidis bacteriophage showing broad lytic activity against Gram-negative enteric bacteria. *J. Microbiol.* 2018; 56: 917–925; doi: 10.1007/s12275-018-8310-1.
 28. Shukho Kim, Da-Won Lee, Jong-Sook Jin, Jungmin Kim. Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020; 22: 32–39; doi: 10.1016/j.jgar.2020.01.005.
 29. Plotka M., Kapusta M., Dorawa S., Kaczorowska A.-K., Kaczorowski T. Ts2631 Endolysin from the Extremophilic *Thermus scotoductus* Bacteriophage vB_Tsc2631 as an Antimicrobial Agent against Gram-Negative Multidrug-Resistant Bacteria. *Viruses*. 2019; 11: 657; doi: 10.3390/v11070657.
 30. Wang F., Ji X., et al. TSPphg Lysin from the Extremophilic *Thermus* Bacteriophage TSP4 as a Potential Antimicrobial Agent against Both Gram-Negative and Gram-Positive Pathogenic Bacteria. *Viruses*. 2020. 12(2): 192; doi: 10.3390/v12020192.
 31. Vorob'ev A.M., Anurova M.N., Aleshkin A.V. i dr. Opredelenie spektra baktericidnoj aktivnosti rekombinant–nyh jendolizinov bakteriofagov ECD7, Am24, Ap22, Si3 i St11. B'ulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny. 2020; 170(11): 597–601. doi: 10.47056/0365-9615-2020-170-11-597-601. Fursov M.V., Abdrakhmanova R.O., Antonova N.P., et al. Antibiofilm Activity of a Broad-Range Recombinant Endolysin LysECD7: In Vitro and In Vivo Study. *Viruses*. 2020; 12(5): 545. <https://doi.org/10.3390/v12050545>.
 32. Schuch Raymond, Pelzek J. Adam, Nelson C. Daniel, Fischettia A. Vincent. The PlyB Endolysin of Bacteriophage vB_BanS_Bcp1 Exhibits Broad-Spectrum Bactericidal Activity against *Bacillus cereus* Sensu Lato Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2019; 85(9): e00003-19; doi: 10.1128/AEM.00003-19.
 33. Schuch R., Nelson D., Fischetti V. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*. 2002; 418: 884–889. doi: 10.1038/nature01026.