

УДК 578.81:615.015.8-08

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2022-7-3-54-63>

# СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ПОЛИРЕЗИСТЕНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ (ОБЗОР)

БАГАНДОВА К.М.\*<sup>1</sup>, ЗУЛЬКАРНЕЕВ Э.Р.<sup>2</sup>, КИСЕЛЕВА И.А.<sup>1</sup>, МИЗАЕВА Т.Э.<sup>1</sup>, ВОРОБЬЕВ А.М.<sup>1</sup>, ЕФИМОВА О.Г.<sup>1</sup>, МЕДВЕДОВСКАЯ М.П.<sup>1</sup>, ПАСИВКИНА М.А.<sup>1</sup>, АЛЕШКИН А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, г. Москва, Россия

<sup>2</sup>ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора, г. Москва, Россия

## Резюме

Антибиотикорезистентность является актуальной проблемой современной медицины в связи с распространением штаммов микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью. До сих пор продолжается поиск альтернативных способов лечения инфекционных заболеваний, вызванных бактериями. Один из таких подходов, вызывающий значительный интерес, – фаготерапия, в которой бактериофаги используются в качестве действующего вещества. Фаги являются селективными агентами, проявляющими литическую активность в отношении конкретных бактериальных штаммов, в отличие от антибиотиков, большинство из которых обладает широким спектром действия. Выделение природного фага – многоэтапный, кропотливый и трудоемкий процесс, при этом физиология полученных фагов часто плохо изучена, что может приводить к различным несоответствиям на протяжении производства и создания продукта несоответствующего качества. Разработка биотехнологических методов позволяет в настоящее время расширить возможности фаговой терапии за счёт создания биоинженерных бактериофагов. Проведенные исследования по использованию таких фагов в лечении инфекций, вызванных бактериями с множественной устойчивостью к лекарственным препаратам, показали, что фаговая терапия может быть эффективной и как альтернатива, и как дополнение при антибиотикотерапии.

Преимущество генномодифицированных фагов – это, в первую очередь, возможность получе-

ния бактериофагов с измененным, расширенным спектром литической активности. Примененные модификации позволят разработать фаги, нацеленные на гены антибиотикорезистентности, такие как эфлюксные насосы; для использования в сочетании с антибиотиками для усиления бактерицидной активности; а также фаги, обладающие низкой иммуногенностью (путем нахождения мутаций и модификаций, уменьшающих либо скорость элиминации фагов при участии ретикулоэндотелиальной системы, либо объем бактериального лизиса).

Создание различных вариантов бактериофагов с уникальными характеристиками даст возможность преодолеть имеющиеся недостатки, которыми обладают природные бактериофаги, для активного внедрения их в профилактику и терапию бактериальных заболеваний. Приведены описания проводимых в мире исследований в области разработки и получения бактериофагов с модифицированными свойствами. Показана эффективность данного подхода для лечения инфекций, вызванных полирезистентными возбудителями, а также перспективность дальнейшей работы в этом направлении.

**Ключевые слова:** бактериофаги, генетическая инженерия, антибиотикорезистентность

## Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

## Источник финансирования

Собственные средства

## Для цитирования:

Багандова К.М., Зулкарнеев Э.Р., Киселева И.А., Мизаева Т.Э., Воробьев А.М., Ефимова О.Г., Медведовская М.П., Пасивкина М.А., Алешкин А.В. Создание генетически модифицированных бактериофагов для лечения инфекций, вызванных полирезистентными бактериями (Обзор). *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2022;7(3): 54-63. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2022-7-3-54-63>

## \*Корреспонденцию адресовать:

Багандова Калимат Магомедовна, 125212, Россия, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, E-mail: kallybagandova@mail.ru

© Багандова К.М. и др.

## REVIEW ARTICLES

# GENETICALLY MODIFIED BACTERIOPHAGES CREATING FOR THE TREATMENT OF INFECTIONS CAUSED BY MULTI-DRUG RESISTANT BACTERIA (REVIEW)

KALIMAT M. BAGANDOVA<sup>1\*</sup>, ELДАР R. ZULKARNEEV<sup>2</sup>, TOITA E. MIZAEVA<sup>1</sup>, ALEXEY M. VOROBYOV<sup>1</sup>, OLGA G. EFIMOVA<sup>1</sup>, MARIA P. MEDVEDOVSKAYA<sup>1</sup>, MARIA A. PASIVKINA<sup>1</sup>, ANDREY V. ALESHKIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Anti-Plaque Center, Moscow, Russian Federation

## Abstract

Antibiotic resistance represents an urgent and unresolved issue due to a rapid spread of multi-drug-resistance organisms (MDROs). An alternative approach is the medical use of bacteriophages which have selective and lytic activity against specific bacterial strains, in contrast to broad-spectrum antibiotics. Isolation of bacteriophages is a multi-step, tedious, and labour-intensive technique, and physiology of various bacteriophages has been vaguely studied. These drawbacks hamper the flow production of bacteriophage preparations and require a stringent quality control. Here, we review the existing literature on genetically modified bacteriophages, in particular studies which examined efficacy of such bacteriophages for the treatment of multidrug-resistant infections. Genetically modified bacteriophages showed high efficiency in patients with multi-

drug-resistant infections applied either as a main treatment modality or as an adjuvant therapy added to the antibiotic treatment protocols. The key advantage of genetically modified bacteriophages is broader and higher lytic activity, as they can target antibiotic resistance genes such as efflux pumps, and low immunogenicity which delays their elimination by immune cells. We propose that genetically modified bacteriophages are able to overcome the shortcomings of natural bacteriophages and can be implemented for the prevention and treatment of bacterial infections, in particular those caused by MDROs.

**Keywords:** bacteriophages, genetic engineering, antibiotic resistance

### Conflict of Interest

None declared.

### Funding

There was no funding for this project.

◀ English

### For citation:

Kalimat M. Bagandova, Eldar R. Zulkarneev, Irina A. Kiseleva, Toita E. Mizaeva, Alexey M. Vorobev, Olga G. Efimova, Maria P. Medvedovskaya, Maria A. Pasivkina, Andrei V. Aleshkin. Genetically modified bacteriophages creating for the treatment of infections caused by multidrug resistant bacteria (review). *Fundamental and Clinical Medicine*. (In Russ.).2022;7(3): 54-63. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2022-7-3-54-63>

### \*Corresponding author:

Kalimat M. Bagandova, 10, Admirala Makarova Street, Moscow, 121255, Russian Federation, E-mail: kallybagandova@mail.ru  
© Kalimat M. Bagandova, et al.

Существующие методы генетической инженерии, используемые в создании синтетических бактериофагов, такие как гомологичная рекомбинация; рекомбинирование (рекомбинация) бактериофагов при помощи введения фаговой ДНК путем электропорации; CRISPR-Cas связанная геномная модификация; создание и пересборка фагового генома in Vitro; полногеномный синтез и сборка с помощью подобранных нуклеотидов; создание фаговых геномов с использованием дрожжей; бесклеточные системы транскрипции – трансляции [1, 2, 3, 4, 5] позволили получить положительные результаты в

создании генетически модифицированных бактериофагов, активных в отношении *Streptococcus thermophiles* [6], *Escherichia coli* [7], *Listeria monocytogenes* [8], *Listeria ivanovii* [9], *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pseudotuberculosis* [10], *Bacillus subtilis* (Schilling et al), *Streptococcus thermophiles* [11], *Lactococcus lactis* [12], *Mycobacterium abscessus* [13]. Однако понимание механизма взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой-хозяином и различных механизмов защиты бактерий остается ключевой задачей в создании бактериофагов, способных преодолевать данный барьер.

Известными на данный момент механизмами защиты бактерий от инфицирования являются: система рестрикции-модификации, позволяющая модифицировать бактериальный геном и разрушать чужеродную ДНК; изменение рецепторов на поверхности оболочки клетки, предотвращающих адсорбцию фага; abortивная инфекция (Abi)- система, которая запускает гибель клетки или остановку метаболизма; CRISPR-Cas система, запоминающая генетический материал вируса, что предотвращает возможность инфекции в будущем; бактериофаговая элиминация, которая позволяет фагу адсорбироваться на клетке, но блокирует ДНК-репликацию.

Эволюция взаимодействия бактериофагов и бактерий развила и продолжает развивать у последних эффективные системы устойчивости, которые защищают бактерии от инфицирования фагами. Подробное изучение механизма адсорбции бактериофага, анализ имеющихся рецепторов на поверхности бактериальной клетки и создание технологий получения инженерных фагов позволит достичь эффективности в лечении пациентов с острым бактериальным инфицированием.

С помощью методов генной инженерии можно получить мутантные фаги с необходимыми характеристиками. Диапазон штаммов-хозяев у различных фагов значительно различается, и найти оптимальную комбинацию природных фагов является сложной задачей. Создание инженерных фагов для перепрограммирования спектра хозяев устраняют это ограничение [14].

Естественная эволюция позволяет изменять спектр хозяев бактериофагов, но отсутствие контроля над тем, где именно происходят мутации, может помешать пониманию структурно-функционального анализа. Поиск и выделение бактериофагов с подходящей специфичностью к хозяину остается сложной задачей. Случайная мутация и рекомбинация между фагами или «протокол Аппельмана» (Appelmans) включает циклическую смену коктейля фагов с группой чувствительных и устойчивых бактерий до тех пор, пока не появится рекомбинантный фаг, лизирующий устойчивые штаммы. Данный подход позволил получить бактериофаг, активный в отношении десяти штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, используя изначально два маточных фага, инфицирующих только один или два штамма бактерии. Данная методика включает в себя получение более 30 после-

довательных генераций, вследствие которых возникают не менее 48 случаев рекомбинации и одна точечная мутация между маточными фагами [15].

Таким образом, разработка целевых и высокопроизводительных методов для быстрого расширения определенного спектра и преодоления устойчивости бактерий может проложить путь к разработке фагов следующего поколения [16]. Несколько исследований, посвященных разным фагам, подтвердили общепринятый в настоящее время принцип, согласно которому RBP является основным фактором, определяющим специфичность хозяйского штамма фага.

Duplessis и Moineau были одними из первых исследователей, которые применили гомологичную рекомбинацию для замены *orf18* фага DT1 соответствующим участком *orf18* сифовируса MD4. В результате образовался химерный фаг с узким хозяйским спектром по отношению к *Streptococcus thermophiles*, соответствующий спектру фага MD4. Рекомбинантные сайты в пяти созданных химерных фагах были различными для каждого фага, но С-терминальный участок ORF18 был определен в качестве рецептор-связывающего и, как следствие, детерминантом хозяина [6].

В работе Kevin Yehl et al. проведен направленный мутагенез четко определенных участков в хвостовой фибрилле фага T3, которые необходимы для распознавания хозяев, таким образом увеличивая пространство последовательностей, экранированных в этих ключевых локусах. Этот подход аналогичен строению антител, разнообразие которых определяется специфичностью эпитоп-связывающих областей антигена. Подобно волокнам фагового хвоста, антитела обладают высокой селективностью к своему целевому антигену [17, 18]. Область распознавания эпитопа расположена на поверхности антител и образована легкой и тяжелой цепями и, в частности, тремя гипервариабельными участками, определяющими комплементарность антитела к антигену (complementarity-determining regions CDR). Мутации в этих областях изменяют специфичность антител [19,20]. Хвостовые волокна фага T7 также имеют CDR-подобные участки на кончике хвостового волокна, что позволяет манипулировать специфичностью фага к клеткам штамма-хозяина посредством изменений в этих небольших регионах. Был проведен направлен-

ный мутагенез участков хвостового волокна, которые определяют возможный диапазон хозяев (HRDR host-range-determining regions) фага T3. HRDR участки образованы петлями BC, DE, FG и HI, длина которых варьируется от 4 до 9 аминокислотных остатков. Мутации в этих участках практически не сказываются на структуре белка, но существенно влияют на взаимодействие бактерий. В проводимом исследовании ген фибриллы клонировали в плазмиду и амплифицировали с применением вырожденных праймеров, чтобы создать мутантные версии гена. Была использована подготовленная библиотека плазмид для трансформации бактерий, которые затем инфицировали фагом T3. В результате данной работы были получены библиотеки фагов с рандомизированными мутациями в петлях за счет рекомбинации с плазмидой. Последующий скрининг библиотек фаговых тел на бактериальных мутантах  $\Delta waaG$  и  $\Delta waaC$ , которые обладают резистентностью к T3, показал, что мутагенез отдельных петель расширяет спектр фагов-хозяев. Каждая библиотека, в которой была изменена петля HI, вырабатывала фаговые антитела против каждой мутантной культуры  $\Delta waaG$  и  $\Delta waaC$ . Тем не менее, фаговые тела для мутагенизированных петель DE и FG в редких случаях демонстрировали активность по отношению  $\Delta waaG$  и  $\Delta waaC$ . Примерно половина библиотек, нацеленных на всю или отдельные части BC петли, вырабатывали фаговые тела, активные в отношении  $\Delta waaG$  или  $\Delta waaC$ . Эффективность инженерных бактериофагов была подтверждена на мышиной модели раневой инфекции [16].

Matthew Dunne с соавторами провели работу по адаптации фага к листерии через вариации RBP. Структурно-направленная разработка химерного RBP позволяет получить фаг с предсказуемым диапазоном хозяев. Авторы данной работы идентифицировали RBP Gp15 фага PSA *Listeria monocytogenes* и сконструировали фаговую библиотеку, содержащую различные по последовательности RBP, из которых выделили мутанты и интегрировали в синтетический поливалентный фаг с расширенным диапазоном хозяев. Штаммы листерии избегают фагового инфицирования, модифицируя тейховые кислоты клеточной стенки гликозилированием соответствующих участков вместо использования внутриклеточных механизмов [21]. Были получены гликозилированные мутанты, дефектные по глюкозе (WSLC1042 gltB),

галактозе (WSLC1042 gttA), и мутант с недостатком обоих компонентов (WSLC1042\_a511-BIM) (Sumrall, 2019). Было обнаружено, что RBP связывание строго зависит от наличия галактозы, таким образом, определили галактозилированный участок GlcNAc, являющийся рецептором для RBP фага, а также способствующий адсорбции и образованию бляшек. Созданная таким образом синтетическая фаговая библиотека включала рандомизированные по последовательности RBP, которые были выделены из каждого мутанта культуры - хозяина и затем интегрированы в синтетический поливалентный фаг с расширенным диапазоном хозяев. Структурно-ориентированная модификация позволяет обмениваться гетерологичными доменами головки, шеи или плеч RBP с образованием химерных фагов с ожидаемым расширенным диапазоном хозяев. Данное исследование позволило создать методику, которая может способствовать развитию биопрепаратов на основе стандартизированных вирусных каркасов с настраиваемой специфичностью к клеткам хозяина [8].

Наиболее усовершенствованным подходом разработки RBP является высокопроизводительная платформа фагового генома, основанная на клонировании с заполнением бреши (gap-repair cloning) в дрожжах, представленной в своем исследовании Ando с соавторами [10]. Ампликоны ПЦР, покрывающие геном фага и имеющие перекрывающиеся концы, совместно электропорированы в клетки дрожжей с линеаризованным вектором YAC (yeast artificial chromosome). Высокоэффективная система гомологичной рекомбинации в дрожжах сшивает все фрагменты вместе путем клонирования с восстановлением бреши. ДНК изолированного YAC-фага, несущая интактный геном, впоследствии используется для трансформации высококомпетентных клеток *E. Coli* для перезагрузки в частицы инфекционного фага. Такой подход позволяет осуществлять точный обмен генетическими фрагментами на основе коллекции ампликонов, используемых для трансформации. Данная платформа с использованием клеток дрожжей позволяет достичь определенного диапазона хозяев путем замены участков и целых хвостовых волокон в вирусную матрицу (скаффолд). Таким образом, фаги могут быть получены для точного редактирования микробной популяции. Исследование проводили на T7-подобных фагах (включающих *E.coli*

фаги T7, T3 и *Klebsiella pneumoniae* фаг K11), так как эти фаги в значительной степени независимы от метаболизма хозяина, что позволяет перезагрузить некодирующие фаги с помощью клеточного аппарата *E.coli*. Разнообразные вариации синтетических фагов, имеющие T3 и T7 матрицу с геном gp17 хвостового волокна, который был заменен на соответствующий ген другого фага, показал предполагаемый обмен хозяйским диапазоном. При изучении химерных хвостовых волокон, содержащих N-концевой якорный домен, для присоединения к капсиду и C-терминальный рецептор-связывающий участок T3 и T7, наблюдалась строгая зависимость диапазона хозяев от различных C-концевых доменов, в то время как высоко консервативный N-концевой участок T3 и T7 являлся взаимозаменяемым. Более того, синтетический фаг T3, содержащий матрицу T3 с хвостовым волокном фага R, штамм-хозяин которого *Yersinia pseudotuberculosis*, был сконструирован путем введения трех мутаций в гене gp17 фага. Полученный фаг обладал активностью по отношению к определенному спектру хозяев, сходным с таковым у фага R. Авторам также удалось создать модифицированные фаги путем обмена хвостовых волокон между более отдаленными фагами. Был получен функциональный синтетический фаг T7 с волокном хвоста фага T11, активный в отношении *K.pneumoniae*, но не на *E.coli*. Более того, был получен фаг K11 с T7 хвостовым волокном путем замены всех трех хвостовых генов 11, 12 и 17 на соответствующие гены другого фага, нацеленного на *E.coli*, но не на *K.pneumoniae*. Таким образом, используя сборочную платформу, основанную на дрожжах, все генетические модификации, которые расположены в разных участках генома, выполняются в одной реакции. Тем не менее, стоит отметить, что обмен белками хвостового волокна, используя данную платформу, можно производить только между фагами с известным и хорошо охарактеризованным геномом [10].

Поскольку бактерии в природе обитают главным образом в мультивидовых сообществах [23], бактериофаги могут сталкиваться с гетерогенными популяциями, клетки которых как устойчивы (R), так и чувствительны (S) к фагам. В исследовании Elhanan Tzipilevich с соавторами демонстрируется, что клетки резистентной (R) *Bacillus subtilis*, лишённые рецептора к фагу SPP1, могут лизироваться при совместном культивировании с клетками, чувствительными

(S) к фагу. Частичный лизис был вызван фаговыми литическими ферментами, высвободившимися из соседних инфицированных клеток. Было обнаружено, что в R-клетки, лишённые SPP1 рецептора, могут проникать фаги при совместном культивировании с S-клетками. Данный процесс также наблюдался для литических фагов phi29 и SPO1. Инвазия фагов в R-клетки была опосредована, по крайней мере, частично, молекулами прикрепления фагов, доставленными из S в R-клетки, временно превращая R в "S"-клетки. Этот феномен был назван «приобретение чувствительности» (ASEN – acquisition of sensitivity). Обмен фаговыми рецепторами может происходить межвидовым образом, облегчая тем самым прикрепление фагов к клеткам бактерий, не являющимся их хозяевами [24].

Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент генной инженерии, используемый биологами с определенной целью: для внесения одноцепочечных или двухцепочечных разрывов ДНК в интересующие участки генома. Clustered Regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas или «сгруппированные короткие палиндромные повторы, разделенные промежутками, и ассоциированная с ними система» [25] была открыта в конце прошлого века как система адаптивного приобретенного иммунитета бактерий и архей, направленная на уничтожение проникшей в клетку чужеродной ДНК, например, фагов или плазмид [26, 27].

CRISPR/Cas система впервые была применена для редактирования фагового генома в 2014 году для отбора мутанта T7 с делецией гена 1.7 [28]. В этой работе CRISPR/Cas система была использована в качестве скрининга для удаления фагов дикого типа (WT) из рекомбинантов. Разработанная плаزمид, нацеленная на ген 1.7, разрывала геном WT и удаляла дикий тип фагов T7. В противоположность этому, мутантные фаги с отсутствующим геном 1.7 являлись резистентными к Cas9 комплексу и функционировали нормально [28]. Позднее была определена (идентифицирована) CRISPR/Cas система I типа бактерии *Vibrio cholera* и использована для конструирования литического фага культуры [28]. В этой системе как донорная ДНК, так и компоненты системы CRISPR-Cas были собраны в одну плазмиду. Данная плаزمид приводила к разрыву генома фага CRISPR/Cas системой, который был восстановлен гомологичной рекомбинацией с помощью ДНК донора,

что позволило получить рекомбинантные фаги с делецией или вставкой (Box, 2016). Несмотря на то, что впервые CRISPR-Cas система II типа для перепрограммирования фага была описана для клеток *Streptococcus thermophiles* [30], CRISPR/Cas *Streptococcus pyogenes* используется намного чаще для конструирования генома фага [31, 32, 33, 34]). Нуклеаза SpCas9, в отличие от нуклеаз других CRISPR-семейств, не требует дополнительных белков-кофакторов для связывания и разрезания ДНК. В естественных условиях для активации Cas9-нуклеазы необходимы две РНК: CRISPR-ассоциированная РНК (сrRNA), происходящая из геномного локуса, хранящего фрагменты вирусных последовательностей; а также транс-активирующая РНК (tracrRNA), которая действует как каркас, связывающий сrRNA с Cas9 и облегчает процессинг зрелых сrРНК из пре-сrРНК. Однако для целей генной инженерии две РНК объединены в составе одной химерной молекулы sgRNA (single guide RNA). Плазмида для редактирования должна содержать рекомбинантный участок (матрицу) с желаемой мутацией, которая предотвращает влияние системы CRISPR-Cas, а также гомологичные участки конструируемого фагового генома [35, 36]. Martel и Moineau использовали эндогенную систему CRISPR/Cas II типа у *Streptococcus thermophiles* и получили точечные мутации, делеции и обмен генами в фаге 2972 *S.thermophiles*. С этой целью они использовали плазмиду с системой CRISPR с нуклеазной активностью по отношению к геному фагов дикого типа [30].

Описан ряд исследований, в которых удалось успешно перенести систему CRISPR/Cas *Streptococcus pyogenes* в *Lactococcus lactis* [31], *E.coli* [32], *Klebsiella pneumoniae* [34], и *Bacillus subtilis* [33] и использовать их как гетерологичную систему для модификации фагов соответствующих штаммов-хозяев. Помимо использования ранее охарактеризованных систем II А типа, Hupfeld с соавторами была найдена новая CRISPR/Cas система *Listeria ivanovii* (подвид *londoniensis* WSLC 30167), которая затем была адаптирована и использована в генной инженерии крупных, неинтегрирующих фагов в *L. Monocytogenes*. Была создана (сконструирована) LivCRISPR-1 программируемая, специфичная в последовательности нуклеазная система, которая может быть передана другим видам рода *Listeria*. LivCRISPR-1 генома *L. Ivanovii* подвида *londoniensis* относится ко II А

типу. Комплекс LivCRISPR-1 Cas9 и сrRNA были встроены в *Listeria monocytogenes*. Полученные мутанты с делецией гена LivCRISPR-1 cas были восприимчивы к фагу B054, при этом они оставались нечувствительными к фагам B025, B035 и B056, которые связываются с клетками WSLC 30167 [9]. Таким образом, программируемость CRISPR/Cas облегчает создание организмов с направленными генными мутациями, встройками генов и крупными хромосомными перестройками.

Методика рекомбинирования бактериофагов при помощи введения фаговой ДНК путем электропорации используется для простого и эффективного конструирования целевых мутантов. Суть методики заключается в совместной электропорации рекомбинируемых субстратов, т. е. ДНК фага и двухцепочечной ДНК (дцДНК), в электрокомпетентные бактериальные клетки, несущие плазмиды с генами белков, обеспечивающих высокий уровень гомологичной рекомбинации, таких как RecE/RecT-подобные белки [37]. Данная стратегия позволяет добиться немаркированных делеций как существенных (основных), так и несущественных генов, делеций внутри рамки считывания, точечных мутаций и нонсенс (бессмысленных) - мутаций, добавление меток и определенной (точной) вставки чужеродного гена [38]. Субстратная дцДНК несет фрагмент ДНК, который необходимо вставить, и гомологичные участки к локусам выше и ниже участка генома фага, который необходимо изменить [38, 39]. После электропорации бактериальные клетки выделяют, смешивают с клетками дикого типа и высевают на чашках Петри. Затем чашки просматриваются на наличие негативных колоний фага, определяемых по лизису бактерий. Образовавшиеся бляшки содержат смесь фагов как дикого, так и мутантного типа. Отдельные колонии анализируют на наличие искомой мутации фагового генома при помощи ПЦР. При использовании этой методики удается получить большую долю (10–15%) успешно модифицированных бактериофагов, что позволяет отбирать необходимые мутантные фаги небольшим числом ПЦР без проведения дальнейшего отбора [38]. Эта технология требует наличия высококомпетентных бактериальных клеток. Впервые этот метод был разработан для микобактериофагов и позднее был адаптирован для большинства различных фагов для внесения делеций, замен и вставок [38, 40].

Используя данную стратегию, Rebekah M. Dedrick с соавторами разработали литическое производное фага Zoel с отсутствующим репрессором гена, который проявил эффективность в отношении штамма *Mycobacterium abscessus* [41]. Пятнадцатилетний пациент с трансплантацией легкого, зараженный устойчивым к антибиотикам *M. Abscessus*, получал коктейль фагов, включающий в себя бактериофаг с удаленным репрессором. Результатом терапии стало скорое восстановление состояния пациента. Тем не менее, не исключается вероятность того, что пациент пошел бы на поправку и без терапии фаговым коктейлем. Однако было отмечено, что пациенты с подобной клинической картиной зачастую имеют высокую заболеваемость и смертность и улучшение состояния не связано с прекращением или началом приема других препаратов, тем самым подтверждая доказательство репликации фага *in vivo* [13].

## Заключение

В настоящее время активное использование различных методик генетической инженерии,

позволяющих получить модифицированные бактериофаги с измененным, расширенным спектром литической активности позволило создать фаги к таким бактериальным штаммам, как *Streptococcus thermophiles*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus thermophiles*, *Lactococcus lactis*, *Mycobacterium abscessus*.

Тем не менее, нет отработанных методик получения рекомбинантных бактериофагов, активных в отношении *Acinetobacter* и *Pseudomonas*, которые являются главными нозокомиальными (внутрибольничными) патогенами во всем мире и обладают резистентностью к ряду антибактериальных химиопрепаратов. Возможность создания фагов не только с измененным, но и с расширенным спектром позволит разработать бактериофаги, которые будут проявлять литическую активность в отношении бактерий одного вида и порядка, что может стать основной альтернативой в лечении бактериальных инфекций антибиотиками.

## Литература:

- Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Dupontet X, Fischetti VA, Marraffini LA. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol.* 2014;32(11):1146-1150. <http://doi.org/10.1038/nbt.3043>
- Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.* 2010;28(12):591-595. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.08.001>
- Kter EM, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, Abedon ST. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11(1):69-86. <http://doi.org/10.2174/138920110790725401>
- Kutter EM., Kuhl SJ, Abedon ST. Re-establishing a place for phage therapy in western medicine. *Future Microbiol.* 2015;10(5):685-688. <http://doi.org/10.2217/fmb.15.28>
- Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(12):4629-4634. <http://doi.org/10.1073/pnas.0800442106>
- Duplessis M, Moineau S. Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Mol Microbiol.* 2001;41(2):325-336. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02521.x>
- Yehl K, Lemire S, Yang AC, Ando H, Mimeo M, Torres MT, de la Fuente-Nunez C, Lu TK. Engineering Phage Host-Range and Suppressing Bacterial Resistance through Phage Tail Fiber Mutagenesis. *Cell.* 2019;179(2):459-469.e9. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.015>
- Dunne M, Rupf B, Tala M, Qabrati X, Ernst P, Shen Y, Sumrall E, Heeb L, Plückthun A, Loessner MJ, Kilcher S. Reprogramming Bacteriophage Host Range through Structure-Guided Design of Chimeric Receptor Binding Proteins. *Cell Rep.* 2019;29(5):1336-1350. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.062>
- Hupfeld M, Trasanidou D, Ramazzini L, Klumpp J, Loessner MJ, Kilcher S. A functional type II-A CRISPR-Cas system from *Listeria* enables efficient genome editing of large non-integrating bacteriophage. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(13):6920-6933. <http://doi.org/10.1093/nar/gky544>
- Ando H, Lemire S, Pires DP, Lu TK. Engineering Modular Viral Scaffolds for Targeted Bacterial Population Editing. *Cell Syst.* 2015;1(3):187-196. <http://doi.org/10.1016/j.cels.2015.08.013>
- Martel B, Moineau S. CRISPR-Cas: an efficient tool for genome engineering of virulent bacteriophages. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(14):9504-9513. <http://doi.org/10.1093/nar/gku628>
- Lemay ML, Tremblay DM, Moineau S. Genome Engineering of Virulent Lactococcal Phages Using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol.* 2017;6(7):1351-1358. <http://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00388>
- Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, Gilmour KC, Soothill J, Jacobs-Sera D, Schooley RT, Hatfull GF, Spencer H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med.* 2019;25(5):730-733. <http://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>
- Huss P, Raman S. Engineered bacteriophages as programmable biocontrol agents. *Curr Opin Biotechnol.* 2020;61:116-121. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.11.013>
- Burrows BH, Molineux IJ, Fralick JA. Directed in Vitro Evolution of Therapeutic Bacteriophages: The Appelmans Protocol. *Viruses.* 2019;11(3):241. <http://doi.org/10.3390/v11030241>
- Yehl K, Lemire S, Yang AC, Ando H, Mimeo M, Torres MT, de la Fuente-Nunez C, Lu TK. Engineering Phage Host-Range and Suppressing Bacterial Resistance through Phage Tail Fiber Mutagenesis. *Cell.* 2019;179(2):459-469.e9. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.015>
- Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(5):345-352. <http://doi.org/10.1038/nri2747>
- Foltz IN, Karow M, Wasserman SM. Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know. *Circulation.* 2013;127(22):2222-2230. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002033>
- Ducancel F, Muller BH. Molecular engineering of antibodies for therapeutic and diagnostic purposes. *MAbs.* 2012;4(4):445-457. <http://doi.org/10.4161/mabs.20776>
- Igawa T, Tsunoda H, Kuramochi T, Sampei Z, Ishii S, Hattori K. Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies. *MAbs.* 2011;3(3):243-252. <http://doi.org/10.4161/mabs.3.3.15234>
- Eugster MR, Morax LS, Hüls VJ, Huwiler SG, Leclercq A, Lecuit M,

- Loessner MJ. Bacteriophage predation promotes serovar diversification in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 2015;97(1):33-46. <http://doi.org/10.1111/mmi.13009>
22. Sumrall ET, Shen Y, Keller AP, Rismondo J, Pavlou M, Eugster MR, Boulos S, Disson O, Thouvenot P, Kilcher S, Wollscheid B, Cabanes D, Lecuit M, Gründling A, Loessner MJ. Phage resistance at the cost of virulence: *Listeria monocytogenes* serovar 4b requires galactosylated teichoic acids for InIB-mediated invasion. *PLoS Pathog.* 2019;15(10):e1008032. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008032>
  23. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):471-480. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2381>
  24. Tzipilevich E, Habusha M, Ben-Yehuda S. Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors. *Cell.* 2017;168(1-2):186-199.e12. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.003>
  25. Смирнов А.В., Юнусова А.М., Лукьянчикова В.А., Батулин Н.Р. Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2016;20(4):493-510. <http://doi.org/10.18699/VJ16.175>
  26. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709-1712. <http://doi.org/10.1126/science.1138140>
  27. Shen J, Zhou J, Chen GQ, Xiu ZL. Efficient Genome Engineering of a Virulent *Klebsiella* Bacteriophage Using CRISPR-Cas9. *J Virol.* 2018;92(17):e00534-18. <http://doi.org/10.1128/JVI.00534-18>
  28. Kiro R, Shitrit D, Qimron U. Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biol.* 2014;11(1):42-44. <http://doi.org/10.4161/rna.27766>
  29. Box AM, McGuffie MJ, O'Hara BJ, Seed KD. Functional Analysis of Bacteriophage Immunity through a Type I-E CRISPR-Cas System in *Vibrio cholerae* and Its Application in Bacteriophage Genome Engineering. *J Bacteriol.* 2015;198(3):578-590. <http://doi.org/10.1128/JB.00747-15>
  30. Martel B, Moineau S. CRISPR-Cas: an efficient tool for genome engineering of virulent bacteriophages. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(14):9504-9513. <http://doi.org/10.1093/nar/gku628>
  31. Lemay ML, Tremblay DM, Moineau S. Genome Engineering of Virulent Lactococcal Phages Using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol.* 2017;6(7):1351-1358. <http://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00388>
  32. Tao P, Wu X, Tang WC, Zhu J, Rao V. Engineering of Bacteriophage T4 Genome Using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol.* 2017;6(10):1952-1961. <http://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00179>
  33. Schilling T, Dietrich S, Hoppert M, Hertel R. A CRISPR-Cas9-Based Toolkit for Fast and Precise In Vivo Genetic Engineering of *Bacillus subtilis* Phages. *Viruses.* 2018;10(5):241. <http://doi.org/10.3390/v10050241>
  34. Shen J, Zhou J, Chen GQ, Xiu ZL. Efficient Genome Engineering of a Virulent *Klebsiella* Bacteriophage Using CRISPR-Cas9. *J Virol.* 2018;92(17):e00534-18. <http://doi.org/10.1128/JVI.00534-18>
  35. Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, Fischetti VA, Marraffini LA. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol.* 2014;32(11):1146-1150. <http://doi.org/10.1038/nbt.3043>
  36. Kiro R, Shitrit D, Qimron U. Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biol.* 2014;11(1):42-44. <http://doi.org/10.4161/rna.27766>
  37. Marinelli LJ, Hatfull GF, Piuri M. Recombineering: A powerful tool for modification of bacteriophage genomes. *Bacteriophage.* 2012;2(1):5-14. <http://doi.org/10.4161/bact.18778>
  38. Marinelli LJ, Piuri M, Swigonová Z, Balachandran A, Oldfield LM, van Kessel JC, Hatfull GF. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS One.* 2008;3(12):e3957. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003957>
  39. Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, Court DL. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat Protoc.* 2009;4(2):206-223. <http://doi.org/10.1038/nprot.2008.227>
  40. Thomason LC, Oppenheim AB, Court DL. Modifying bacteriophage lambda with recombineering. *Methods Mol Biol.* 2009;501:239-251. [http://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_21](http://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_21)
  41. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, Gilmour KC, Soothill J, Jacobs-Sera D, Schooley RT, Hatfull GF, Spencer H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med.* 2019;25(5):730-733. <http://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>

## References:

1. Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, Fischetti VA, Marraffini LA. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol.* 2014;32(11):1146-1150. <http://doi.org/10.1038/nbt.3043>
2. Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.* 2010;28(12):591-595. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.08.001>
3. Kter EM, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, Abedon ST. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11(1):69-86. <http://doi.org/10.2174/138920110790725401>
4. Kutter EM., Kuhl SJ, Abedon ST. Re-establishing a place for phage therapy in western medicine. *Future Microbiol.* 2015;10(5):685-688. <http://doi.org/10.2217/fmb.15.28>
5. Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(12):4629-4634. <http://doi.org/10.1073/pnas.0800442106>
6. Duplessis M, Moineau S. Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Mol Microbiol.* 2001;41(2):325-336. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02521.x>
7. Yehl K, Lemire S, Yang AC, Ando H, Mimeo M, Torres MT, de la Fuente-Nunez C, Lu TK. Engineering Phage Host-Range and Suppressing Bacterial Resistance through Phage Tail Fiber Mutagenesis. *Cell.* 2019;179(2):459-469.e9. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.015>
8. Dunne M, Rumpf B, Tala M, Qabrati X, Ernst P, Shen Y, Sumrall E, Heeb L, Plückthun A, Loessner MJ, Kilcher S. Reprogramming Bacteriophage Host Range through Structure-Guided Design of Chimeric Receptor Binding Proteins. *Cell Rep.* 2019;29(5):1336-1350.e4. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.062>
9. Hupfeld M, Trasanidou D, Ramazzini L, Klumpp J, Loessner MJ, Kilcher S. A functional type II-A CRISPR-Cas system from *Listeria* enables efficient genome editing of large non-integrating bacteriophage. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(13):6920-6933. <http://doi.org/10.1093/nar/gky544>
10. Ando H, Lemire S, Pires DP, Lu TK. Engineering Modular Viral Scaffolds for Targeted Bacterial Population Editing. *Cell Syst.* 2015;1(3):187-196. <http://doi.org/10.1016/j.cels.2015.08.013>
11. Martel B, Moineau S. CRISPR-Cas: an efficient tool for genome engineering of virulent bacteriophages. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(14):9504-9513. <http://doi.org/10.1093/nar/gku628>
12. Lemay ML, Tremblay DM, Moineau S. Genome Engineering of Virulent Lactococcal Phages Using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol.* 2017;6(7):1351-1358. <http://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00388>
13. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, Gilmour KC, Soothill J, Jacobs-Sera D, Schooley RT, Hatfull GF, Spencer H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med.* 2019;25(5):730-733. <http://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>
14. Huss P, Raman S. Engineered bacteriophages as programmable biocontrol agents. *Curr Opin Biotechnol.* 2020;61:116-121. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.11.013>
15. Burrowes BH, Molineux IJ, Fralick JA. Directed In Vitro Evolution of Therapeutic Bacteriophages: The Appellmans Protocol. *Viruses.* 2019;11(3):241. <http://doi.org/10.3390/v11030241>
16. Yehl K, Lemire S, Yang AC, Ando H, Mimeo M, Torres MT, de la Fuente-Nunez C, Lu TK. Engineering Phage Host-Range and Suppressing Bacterial Resistance through Phage Tail Fiber Mutagenesis. *Cell.* 2019;179(2):459-469.e9. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.015>
17. Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol.*



- 2010;10(5):345-352. <http://doi.org/10.1038/nri2747>
18. Foltz IN, Karow M, Wasserman SM. Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know. *Circulation*. 2013;127(22):2222-2230. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002033>
  19. Ducancel F, Muller BH. Molecular engineering of antibodies for therapeutic and diagnostic purposes. *MAbs*. 2012;4(4):445-457. <http://doi.org/10.4161/mabs.20776>
  20. Igawa T, Tsunoda H, Kuramochi T, Sampei Z, Ishii S, Hattori K. Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies. *MAbs*. 2011;3(3):243-252. <http://doi.org/10.4161/mabs.3.3.15234>
  21. Eugster MR, Morax LS, Hüls VJ, Huwiler SG, Leclercq A, Lecuit M, Loessner MJ. Bacteriophage predation promotes serovar diversification in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*. 2015;97(1):33-46. <http://doi.org/10.1111/mmi.13009>
  22. Sumrall ET, Shen Y, Keller AP, Rismondo J, Pavlou M, Eugster MR, Boulous S, Disson O, Thouvenot P, Kilcher S, Wollscheid B, Cabanes D, Lecuit M, Gründling A, Loessner MJ. Phage resistance at the cost of virulence: *Listeria monocytogenes* serovar 4b requires galactosylated teichoic acids for InIB-mediated invasion. *PLoS Pathog*. 2019;15(10):e1008032. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008032>
  23. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):471-480. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2381>
  24. Tzipilevich E, Habusha M, Ben-Yehuda S. Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors. *Cell*. 2017;168(1-2):186-199.e12. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.003>
  25. Smirnov AV, Yunusova AM, Lukyanchikova VA, Battulin NR. CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(4):493-510. 2016;20(4):493-510. (In Russ). <http://doi.org/10.18699/VJ16.175>
  26. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709-1712. <http://doi.org/10.1126/science.1138140>
  27. Shen J, Zhou J, Chen GQ, Xiu ZL. Efficient Genome Engineering of a Virulent *Klebsiella* Bacteriophage Using CRISPR-Cas9. *J Virol*. 2018;92(17):e00534-18. <http://doi.org/10.1128/JVI.00534-18>
  28. Kiro R, Shitrit D, Qimron U. Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biol*. 2014;11(1):42-44. <http://doi.org/10.4161/rna.27766>
  29. Box AM, McGuffie MJ, O'Hara BJ, Seed KD. Functional Analysis of Bacteriophage Immunity through a Type I-E CRISPR-Cas System in *Vibrio cholerae* and Its Application in Bacteriophage Genome Engineering. *J Bacteriol*. 2015;198(3):578-590. <http://doi.org/10.1128/JB.00747-15>
  30. Martel B, Moineau S. CRISPR-Cas: an efficient tool for genome engineering of virulent bacteriophages. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(14):9504-9513. <http://doi.org/10.1093/nar/gku628>
  31. Lemay ML, Tremblay DM, Moineau S. Genome Engineering of Virulent Lactococcal Phages Using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol*. 2017;6(7):1351-1358. <http://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00388>
  32. Tao P, Wu X, Tang WC, Zhu J, Rao V. Engineering of Bacteriophage T4 Genome Using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol*. 2017;6(10):1952-1961. <http://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00179>
  33. Schilling T, Dietrich S, Hoppert M, Hertel R. A CRISPR-Cas9-Based Toolkit for Fast and Precise In Vivo Genetic Engineering of *Bacillus subtilis* Phages. *Viruses*. 2018;10(5):241. <http://doi.org/10.3390/v10050241>
  34. Shen J, Zhou J, Chen GQ, Xiu ZL. Efficient Genome Engineering of a Virulent *Klebsiella* Bacteriophage Using CRISPR-Cas9. *J Virol*. 2018;92(17):e00534-18. <http://doi.org/10.1128/JVI.00534-18>
  35. Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, Fischetti VA, Marraffini LA. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol*. 2014;32(11):1146-1150. <http://doi.org/10.1038/nbt.3043>
  36. Kiro R, Shitrit D, Qimron U. Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biol*. 2014;11(1):42-44. <http://doi.org/10.4161/rna.27766>
  37. Marinelli LJ, Hatfull GF, Piuri M. Recombineering: A powerful tool for modification of bacteriophage genomes. *Bacteriophage*. 2012;2(1):5-14. <http://doi.org/10.4161/bact.18778>
  38. Marinelli LJ, Piuri M, Swigonová Z, Balachandran A, Oldfield LM, van Kessel JC, Hatfull GF. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS One*. 2008;3(12):e3957. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003957>
  39. Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, Court DL. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat Protoc*. 2009;4(2):206-223. <http://doi.org/10.1038/nprot.2008.227>
  40. Thomason LC, Oppenheim AB, Court DL. Modifying bacteriophage lambda with recombineering. *Methods Mol Biol*. 2009;501:239-251. [http://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_21](http://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_21)
  41. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, Gilmour KC, Soothill J, Jacobs-Sera D, Schooley RT, Hatfull GF, Spencer H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med*. 2019;25(5):730-733. <http://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>

## Сведения об авторах

**Багандова Калимат Магомедовна**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора» (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10).

**Вклад в статью:** написание статьи.

**ORCID:** 0000-0001-5166-9677

**Зулькарнеев Эльдар Ринатович**, кандидат биологических наук, ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора (119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 4).

**Вклад в статью:** разработка концепции.

**ORCID:** 0000-0002-5920-8098

**Мизаева Тоита Эдалбековна**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора» (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10).

**Вклад в статью:** поиск источников литературы.

**ORCID:** 0000-0002-0046-9226

## Authors

**Dr. Kalimat M. Bagandova**, MD, PhD student, Junior Research Fellow, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology (10, Admirala Makarova Street, Moscow, 125212, Russian Federation)

**Contribution:** wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0001-5166-9677

**Dr. Eldar R. Zulkarneev**, PhD, Senior Research Fellow, Anti-Plague Center of the Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare (Building 4, 10, Pogodinskaya Street, Moscow, 119121, Russian Federation)

**Contribution:** conceived and designed the study.

**ORCID:** 0000-0002-5920-8098

**Dr. Toita E. Mizaeva**, MD, PhD student, Junior Research Fellow, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology (10, Admirala Makarova Street, Moscow, 125212, Russian Federation)

**Contribution:** performed literature search and analysis.

**ORCID:** 0000-0002-0046-9226

**Воробьев Алексей Максимович**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора» (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10).

**Вклад в статью:** поиск источников литературы.

**ORCID:** 0000-0003-4724-2464

**Ефимова Ольга Георгиевна**, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора» (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10).

**Вклад в статью:** формулирование выводов.

**ORCID:** 0000-0002-0288-2188

**Медведевская Мария Павловна**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора» (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10).

**Вклад в статью:** поиск источников литературы.

**ORCID:** 0000-0002-4321-7563

**Пасивкина Мария Антоновна**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора» (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10).

**Вклад в статью:** поиск источников литературы.

**ORCID:** 0000-0001-6223-1347

**Алешкин Андрей Владимирович**, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор РАН, руководитель лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора» (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10).

**Вклад в статью:** утверждение окончательного варианта статьи.

**ORCID:** 0000-0001-6223-1347

Статья поступила: 18.08.2022 г.

Принята в печать: 31.08.2022 г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

**Dr. Alexey M. Vorobyev**, MD, PhD student, Junior Research Fellow, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology (10, Admirala Makarova Street, Moscow, 125212, Russian Federation)

**Contribution:** performed literature search and analysis.

**ORCID:** 0000-0003-4724-2464

**Dr. Olga G. Efimova**, MD, PhD, Leading Research Fellow, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology (10, Admirala Makarova Street, Moscow, 125212, Russian Federation).

**Contribution:** literature analysis\$ text editing..

**ORCID:** 0000-0002-0288-2188

**Dr. Maria P. Medvedovskaya**, MD, PhD student, Junior Research Fellow, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology (10, Admirala Makarova Street, Moscow, 125212, Russian Federation).

**Contribution:** performed literature search and analysis.

**ORCID:** 0000-0002-4321-7563

**Dr. Maria A. Pasivkina**, MD, PhD student, Junior Research Fellow, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology (10, Admirala Makarova Street, Moscow, 125212, Russian Federation).

**Contribution:** performed literature search and analysis.

**ORCID:** 0000-0001-6223-1347

**Prof. Andrey V. Aleshkin**, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences; DSc, Professor, Head of the Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology (10, Admirala Makarova Street, Moscow, 125212, Russian Federation).

**Contribution:** editing and approval the manuscript.

**ORCID:** 0000-0001-6223-1347

Received: 18.08.2022

Accepted: 31.08.2022

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.