

7. Identification and analysis of recombinering functions from Gram-negative and Gram-positive bacteria and their phages / S. Datta [et al.] // PNAS. – 2008. – 105, № 5. – P. 1626 – 1631.

THE DEVELOPMENT OF BIOPREPARATION BASED OF THE ENTEROCOCCAL PHAGES TO DETECT ENTEROCOCCUS FAECALIS

Kovaleva E.N., Zolotukhin S.N., Vasiliev D.A.

Keywords: *biopreparation, bacteriophage, E.faecalis, detection.*

The article deals with the technological parameters (time of the passage, the multiplicity of the infection) the biopreparation based on the isolation and study of the enterococcal bacteriophages with the purpose of the detecting bacterium E.faecalis.

УДК 615.453.6/615.014.21/581.81

РАЗРАБОТКА ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНЫХ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ

Ковязина Н.А., кандидат фармацевтических наук

Казьянин А.В., доктор медицинских наук, профессор

Николаева А.М., доктор биологических наук

Функнер Е.В., кандидат медицинских наук

Филиал ФГУП «НПО Микроген» Минздрава России «Пермское НПО «Биомед»,

г.Пермь.

тел. (342)262-32-75, a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

Ключевые слова: *бактериофаг, биодоступность, капсулы, конструирование, литическая активность, таблетки, фармакокинетика.*

Статья посвящена разработке твердых лекарственных форм бактериофагов. Выявлена высокая биодоступность оригинального состава таблеток и капсул в сравнении с жидким препаратом. В результате проведенных исследований разработан алгоритм конструирования твердых лекарственных форм бактериофагов: сумма предложенных конструктивных подходов и технологических схем позволит расширить ассортимент отечественных, высокоэффективных, экологически безопасных антибактериальных препаратов.

Введение. В условиях возрастания антибиотикорезистентности микроорганизмов бактериофаги начинают занимать все большее место в лечебной практике [2]. Совершенствование способов получения бактериофагов, особенно выпуск их поливалентных и комбинированных разновидностей, способствует существенному расширению диапазона их литической активности и стимулирует разработку разнообразных лекарственных форм. Однако, не смотря на это, традиционной формой выпуска бактериофагов остается жидкий препарат во флаконах, за исключением таблетированных фагов кишечной группы. Переход на выпуск таблетированных

и капсулированных препаратов диктуется необходимостью стабилизации литической активности фагов, а также для придания препарату лучшего товарного вида, для уменьшения объемов при транспортировке и хранении препарата.

Учитывая неуклонный рост потребности рынка в жидком бактериофаге - более чем в 10 раз возросла реализация за последние 5 лет, чрезвычайно актуально расширение ассортимента поливалентных фаговых препаратов [3].

Цель работы. Разработка твердых желудочно-резистентных лекарственных форм на основе комплексных поливалентных препаратов бактериофагов для лечения инфекционных заболеваний.

Материалы и методы исследований. В работе использованы жидкие комплексные бактериофаги: 1) Секстафаг® – смесь фаголизатов бактерий *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, (Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения ФСП ЛС-001049-140212); 2) Интести-бактериофаг – смесь фаголизатов бактерий – *S. flexneri I, II, III, IV u VI титров u S. sonnei*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. tiphimurium*, *S. infantis*, *S. choleraesuis*, *S. oranienburg*, *S. enteritidis*; *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris u mirabilis*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Интести-бактериофаг, раствор для приема внутрь и ректального введения ФСП ЛС 001999-121212). Для введения в композиции бактериофаг предварительно концентрировали в 100 раз с применением метода мембранной ультрафильтрации. Специфическую (литическую) активность бактериофагов оценивали по степени разведения исходного фага по Аппельману (отрицательная степень десятичного разведения от 10^{-2} до 10^{-5} , вызывающая полный лизис культуры) [1]. Фармакокинетику гранулированного и жидкого бактериофага изучали на белых мышах после однократного перорального введения препарата в количестве, эквивалентном 10 дозам для человека. Клинический материал (кровь, моча и кал), собранный до перорального введения препаратов и в течении 72 часов, разводили в питательном бульоне и обрабатывали хлороформом. Пробы наносили на газон тест-культуры соответствующего микроорганизма. По числу колоний фагов определяли временные промежутки обнаружения бактериофагов при их выведении. Распадаемость твердых лекарственных форм оценивали согласно ГФ XI.

Результаты исследований и их обсуждение. Для получения высокоактивной твердой лекарственной формы, исходная субстанция (бактериофаг) должна быть: 1) адаптирована к современным возбудителям за счет ежегодного обновления фаговых рас и пополнения производственной коллекции свежeweделенными штаммами; 2) с литической активностью не ниже 10^{-5} и высокой степенью очистки – остаточный белок не более 800 мкг [6].

Изучение влияния факторов сушки и кислотоустойчивости на стабильность концентрата устанавливает наиболее лабильные и стабильные компоненты комплексного препарата. Показывает возможность таблетирования или капсулирования предварительно высушенного концентрата в смеси наполнителей. Проведенные нами исследования показали в комплексных препаратах Секстафаг® и Интести-бактериофаг лабильность стафилококкового и стрептококкового фага к технологическим факторам, что свидетельствовало о необходимости его предварительной стабилизации наполнителями [4,5].

Структурирование твердой фармацевтической композиции и формирование системы доставки кишечнорастворимой фармацевтической композиции бактериофагов являются взаимосвязанными этапами создания высокоактивной лекарственной формы. Получение твердых лекарственных форм бактериофагов покрытых кишечнорастворимой оболочкой (таблетки, гранулы, пеллеты, капсулы, микрокапсулы) усложняет технологический процесс производства, поэтому актуальным является создание защитных желудочно-резистентных структур

бактериофагов за счет оптимального подбора наполнителей (создание каркаса избирательной распадаемости таблетированных фагов; формирование носителей, обволакивающих фаги, что способствует сохранению активности после воздействия кислой среды желудочного сока) и капсулирование или таблетирование кишечнорастворимого гранулята. В результате изучения влияния вспомогательных веществ на стабильность бактериофагов, соотношение бактериофага и наполнителей, очередности введения компонентов наполнителя в бактериофаги вида таблетирования – подобрана оптимальная композиция состава таблеток и оптимизирована технология таблетированной массы [4]. Одна таблетка массой 0,17 г или капсула, содержащая 0,17 г гранул эквивалентна по объему 20 мл жидкого коммерческого фага. Оригинальность разработанного состава и технология желудочно-резистентных таблеток с секстафагом и сальмонеллезным бактериофагом подтверждена патентом РФ № 2410084 «Фармацевтическая композиция на основе секстафага (Пиобактериофага поливалентного) или бактериофага сальмонеллезного и способ её получения».

При подборе технологических параметров получения гранулята и изучении литической активности бактериофагов в композиции установлено, что составы без высушивания не обеспечивали стабильность компонентов бактериофагов в процессе хранения. Наилучшие технологические свойства и сохранение литической активности компонентов комплексного поливалентного бактериофага в композиционной массе обеспечивало сублимационное высушивание. Оптимизация технологических параметров таблетирования комплексных бактериофагов установила прямое влияние массы таблетки на кислотоустойчивость – таблетки массой более 150 мг обладают большей желудочной резистентностью. Двояковыпуклая форма повышает желудочную резистентность таблетированного бактериофага в отличие от плоскоцилиндрической и в сравнении с жидким препаратом. Изучение влияния давления прессования на активность фагов показало компрессионную устойчивость бактериофага [4,5].

Исследована биодоступность твердых лекарственных форм бактериофагов комплексных бактериофагов в таблетированной и капсулированной форме. Исследования «*in vitro*» показали, что в таблетированной и капсулированной форме сохранение активности комплексного бактериофага после воздействия кислой среды в 6,5 раза выше, чем в жидкой [4,5]. Таким образом, твердые лекарственные формы обладают выраженной кислотоустойчивостью в сравнении с жидким коммерческим препаратом. При исследовании фармакокинетики гранулированного с желудочно-резистентными наполнителями и жидкого коммерческого секстафага на лабораторных животных установлено, что при пероральном введении бактериофагов гранулят обеспечивает сохранение их литической активности в 3 раза больше, чем жидкий препарат [5]. Проведенные биофармацевтические исследования показали, что разработанный состав для таблетированной и капсулированной лекарственной формы комплексного бактериофага является более эффективным, чем жидкий препарат: обеспечивает стабильность компонентов секстафага в соляной кислоте желудочного сока и длительную циркуляцию бактериофагов в организме человека (продолжительность антибактериального эффекта).

Изучение влияния температуры хранения на стабильность компонентов секстафага играет немаловажную роль как для производителей медицинских иммунобиологических препаратов, так и для всех звеньев товаро-проводящей цепи (дистрибьюторы, аптеки) и потребителей. Исследования показали, что хранение таблеток в герметичных стеклянных флаконах или полимерных банках при пониженных температурах (5 ± 3)°C и ниже не сопровождалось инаktivацией бактериофагов. При повышенной температуре (35 ± 1)°C значительное снижение активности препарата отмечали только через 1,5-2 недели. Установлено, что при комнатной температуре (23 ± 3)°C допустимо хранить таблетки не более 1 месяца. При хранении разработанных таблетированных и капсулированных препаратов Секстафаг®, Интести-бактериофаг

при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ наблюдалось сохранение активности в течение 18 месяцев.

В результате проведенных исследований разработан представленный на рисунке алгоритм конструирования твердых лекарственных форм бактериофагов.

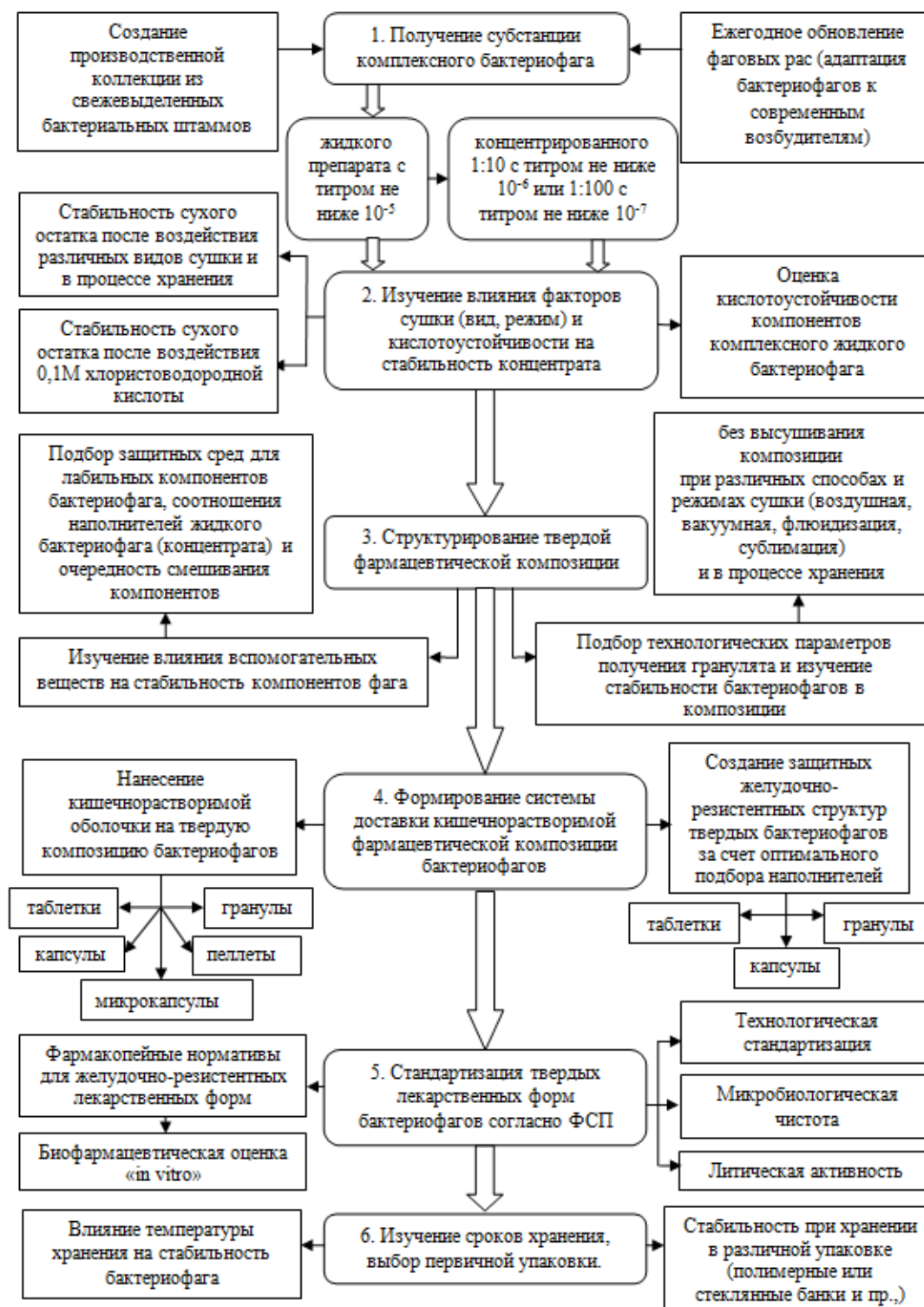


Рис. 1 - Алгоритм разработки твердых лекарственных форм комплексных поливалентных бактериофагов.

Заключение. Таким образом, разработана рациональная методология конструирования твердых лекарственных форм бактериофагов: сумма предложенных конструктивных под-

ходов, технологических схем позволяет расширить ассортимент отечественных, высокоэффективных, экологически безопасных антибактериальных препаратов.

Библиографический список

1. Адамс, М. Бактериофаги. – [Методы изучения вирусов бактерий] – М., 1961. - 527 с.
2. Ворошилова, Н.Н. Эпидемиологическая и клиническая эффективность препаратов бактериофагов при лечении и профилактике инфекционных заболеваний / Н.Н. Ворошилова, Т.Б. Казакова, Г.Г. Боговазова, Э.В. Алферова // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: Материалы конференции. – Пермь, 2008. С. 91-94.
3. Казьянин, А.В. Бактериофаги: опыт производства и применения / А.В. Казьянин, Е.В. Орлова, М.Г. Ефимова и др., // Фармация, № 3, 2010. – С.36-37.
4. Ковязина, Н.А. Разработка состава и технологии желудочно-резистентных таблеток «Секстафаг» / Н.А. Ковязина, В.И. Решетников, Е.В. Функнер, М.Г. Ефимова // Фармация, № 7, 2008. - С.36-39.
5. Ковязина, Н.А. Характеристика свойств таблетированной лекарственной формы поливалентных бактериофагов / Н.А. Ковязина, Е.В. Функнер, О.И. Шитова и др., // Биопрепараты, № 2, 2010. - С.18-21.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). Часть 2 – Москва.: Гриф и К. 2012.-536с.

DEVELOPMENT OF SOLID DOSAGE FORMS ON THE BASE OF COMPLEX POLYVALENT BACTERIOPHAGE PREPARATIONS

Kovyazina N.A., Kazyanin A.V., Nikolaeva A.M., Funkner E.V.

Key words: *bacteriophage, bioavailability, capsules, design, lytic activity, tablets, pharmacokinetics.*

The article is devoted to the development of solid dosage forms of bacteriophages. High bioavailability of the original composition of the tablets and capsules as compared with the liquid drug has been revealed. As a result of the researches conducted the algorithm design of solid dosage forms of bacteriophages has been developed: in the sum the proposed constructive approaches and the technological schemes enable us to extend the range of domestic, high-performance, environmentally safe antibacterial drugs.

УДК 578.232.4

ПСЕВДОЛИЗОГЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ ВИРУЛЕНТНОГО БАКТЕРИОФАГА G7C И ШАММА-ХОЗЯИНА E. COLI 4S

^{1,2}Летарова М.А., ¹Стрелкова Д.А., ²Бакумова А.Д., ¹Куликов Е.Е., ¹Голомидова А.К., ¹Прохоров Н.С., ³Кутузова Н.М. ^{1,2}Летаров А.В.

1 – ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН», 117312, г. Москва, Проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2, +7(499) 135-21-39

2 – ГБОУ «Школа-Интернат Интеллектуал», 121357, г. Москва, ул. Кременчугская, д. 13. +7(499) 445-52-10