



Изучение биофармацевтических свойств препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме

А.М. Николаева , Н.А. Ковязина, Е.В. Функнер, А.Н. Красильникова, К.А. Лыско

Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», ул. Братская, д. 177, г. Пермь, 614089, Российская Федерация

 Николаева Алевтина Максимовна; a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

Резюме

Актуальность. Рациональная фаготерапия – высокоэффективный способ борьбы с бактериальными инфекциями в условиях неуклонно растущей антибиотикорезистентности. Основной лекарственной формой препаратов бактериофагов является раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Однако при пероральном приеме жидких лекарственных форм фаговых препаратов происходит их значительная инактивация за счет кислой среды желудочного сока. С целью устранения негативного влияния кислой среды разработан лекарственный препарат поливалентного бактериофага в форме капсул – Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный.

Цель. Изучение специфической активности и биофармацевтических свойств лекарственного препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме.

Материалы и методы. Объект исследования – препарат поливалентного бактериофага в капсулированной форме; препарат сравнения – препарат поливалентного бактериофага в форме раствора. Специфическую активность изучали с использованием метода Аппельмана, количество фаговых частиц – методом Грация. Исследование кислотонейтрализующей способности проводили путем выдерживания препарата в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты с последующим определением специфической активности по методу Аппельмана. Антифаговый иммунный ответ на антигены бактериофага изучали на кроликах породы Шиншилла, уровень иммунного ответа детектировали с помощью разработанной иммуноферментной тест-системы. Исследование фармакокинетических параметров проводили на беспородных белых мышах при пероральном введении препарата.

Результаты. Выявлен высокий уровень литической активности исследуемого препарата, который по величине отрицательной степени десятичного разведения составлял 10^{-6} в отношении исследуемых микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. Показатель степени всасывания после перорального введения мышам препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме был в 3,1–3,7 раза выше в сравнении с препаратом поливалентного бактериофага в форме раствора. Многократное пероральное введение исследуемого препарата кроликам в терапевтических дозах не стимулировало образования антифаговых антител. Исследование стабильности препарата показало сохранение высокого уровня литической активности в течение 18 мес.

Выводы. Препарат поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме обладает высоким антибактериальным действием в отношении исследуемых микроорганизмов, характеризуется высокой степенью всасывания и длительным сохранением литической активности, а также не вызывает выработку антифаговых антител при пероральном применении, что свидетельствует об эффективности и безопасности разработанного препарата.

Ключевые слова: поливалентные бактериофаги; фаготерапия; капсулированный препарат; лекарственная форма; биофармацевтические свойства; антифаговые антитела; фармакокинетика; литическая активность; антибиотикорезистентность

Для цитирования: Николаева А.М., Ковязина Н.А., Функнер Е.В., Красильникова А.Н., Лыско К.А. Изучение биофармацевтических свойств препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3-1):379–388. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-379-388>

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Biopharmaceutical properties of polyvalent bacteriophage capsules

Alevtina M. Nikolaeva , Natalya A. Kovyazina, Elena V. Funkner, Anna N. Krasilnikova, Kseniya A. Lysko

Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, Branch in Perm "Perm SIC "Biomed", 177 Bratskaya St., Perm 614089, Russian Federation

 Alevtina M. Nikolaeva; a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

Abstract

Scientific relevance. Rational phage therapy is a highly effective way to combat bacterial infections, especially in conditions of steadily increasing antibiotic resistance. Most bacteriophage preparations are formulated as oral and topical solutions. However, oral administration of liquid phage preparations results in significant inactivation in the stomach. To shield active ingredients from the acidic environment, Sextaphag® Pyobacteriophage, polyvalent, has been formulated into capsules.

Aim. This study evaluated the polyvalent bacteriophage preparation in capsules in terms of its potency and biopharmaceutical properties.

Materials and methods. The study compared the polyvalent bacteriophage preparation formulated as capsules with the polyvalent bacteriophage preparation formulated as a solution. The potency was evaluated by the Appelmans method, and phage particles were quantified by the Gratia method. To evaluate the acid-neutralising capacity, the authors placed test samples of the bacteriophage preparation in 0.1 M hydrochloric acid and analysed their potency by the Appelmans method. Chinchilla rabbits were used to analyse anti-phage immune responses, and their antibody levels were measured using an enzyme immunoassay test system developed by the authors. The pharmacokinetic parameters were studied in outbred white mice after oral dosing.

Results. The polyvalent bacteriophage preparation exhibited high lytic activity towards *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aegidiosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae*, which accounted for a dilution factor of 10^{-6} . Following oral administration of the polyvalent bacteriophage preparation in capsules to mice, the level of absorption was 3.1–3.7 times higher than that observed with the solution. Repeated oral administration of therapeutic doses did not induce anti-phage antibodies in rabbits. The stability study showed that the polyvalent bacteriophage preparation retained high lytic activity for 18 months.

Conclusions. According to the study results, the polyvalent bacteriophage preparation in capsules exerts significant antibacterial activity against the studied microorganisms, has a high level of absorption, retains its lytic activity for a long time, and does not induce anti-phage antibodies after oral dosing, which confirms its safety and efficacy.

Key words: polyvalent bacteriophages; phage therapy; capsules; dosage form; biopharmaceutical properties; anti-phage antibodies; pharmacokinetics; lytic activity; antibiotic resistance

For citation: Nikolaeva A.M., Kovyazina N.A., Funkner E.V., Krasilnikova A.N., Lysko K.A. Biopharmaceutical properties of polyvalent bacteriophage capsules. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1):379–388. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-379-388>

Funding. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

В последние десятилетия рост антибиотикорезистентности является одной из наиболее актуальных проблем в области общественного здравоохранения во всем мире, что требует особого внимания со стороны медицинского сообщества [1]. В условиях неуклонно растущей резистентности микроорганизмов к антибиотикам рациональная фаготерапия может стать одним из высокоэффективных способов борьбы с бактериальными инфекциями [2]. Препараты на основе бактериофагов характеризуются строгой специфичностью, отсутствием токсического и аллергического эффектов, не имеют противопоказаний к применению и могут использоваться для профилактики и лечения бактериальных инфекций у беременных, кормящих женщин и детей разного возраста. В настоящее время основной лекарственной формой выпуска препаратов бактериофагов является раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Однако при пероральном приеме жидких лекарственных форм фаговых препаратов происходит их значительная инактивация под воздействием кислой среды желудочного сока [3]. Существующая проблема недостаточной стабильности характеристик препаратов бактериофагов и снижение их титра обуславливают необходимость учитывать кислотно-щелочные условия, а также влияние иных факторов в желудочно-кишечном тракте при разработке состава пероральных форм препаратов бактериофагов [4]. С целью устранения указанных недостатков на предприятии АО «НПО «Микроген» (филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед») разработан лекарственный препарат Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный в форме капсул, обеспечивающих сохранение литической активности бактериофага [5].

Цель работы – изучение специфической активности и биофармацевтических свойств лекарственного препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме.

Материалы и методы

Материалы

Объектом исследования являлся концентрат фильтратов фаголизатов бактерий (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, энтеропатогенных *Escherichia coli*), лиофилизированный с добавлением компонентов защитной среды и вспомогательных веществ, заключенный в желатиновые капсулы по 0,22 г (одна доза), – Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный в форме капсул (АО «НПО «Микроген», Россия). В качестве вспомогательных и защитных компонентов в препарате использовали: метилцеллюлозу (матрицеобразующий компонент), лактозу (криопротектор), сорбитол (корригент вкуса и запаха, влагоудерживающий компонент), кальция карбонат (обеспечение защиты бактериофагов при сушке), натрия альгинат (обеспечение кислотоустойчивости фармацевтической композиции), пектин (дезинтегрант), магния стеарат (антифрикционное вещество).

В качестве препарата сравнения использовали Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный в виде раствора для приема внутрь, местного и наружного применения (АО «НПО «Микроген», Россия). В качестве абиотического контроля применяли питательные среды, используемые в эксперименте, в том числе с добавлением вспомогательных и защитных компонентов фармацевтической композиции.

Методы

Специфическую активность бактериофагов оценивали по методу Аппельмана, определение фаговых частиц – по методу Грация в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV) согласно ОФС.1.7.1.0002.15¹. Для проведения исследования капсулу предварительно растворяли в 20 мл стерильного бульона, взятого для титрования, при температуре 37±1 °С. Для контроля использовали 120 штаммов ми-

¹ ОФС.1.7.1.0002.15 Бактериофаги. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

кроорганизмов из производственной коллекции (АО «НПО «Микроген», «Пермское НПО «Биомед», Россия), в том числе: *Staphylococcus aureus* – 20, *Streptococcus pneumoniae* – 20, *P. mirabilis* – 10, *P. vulgaris* – 10, *K. pneumoniae* – 20, *P. aeruginosa* – 20, *E. coli* – 20. Литическую активность по методу Аппельмана оценивали визуально по величине отрицательной степени десятичного разведения от 10^{-2} до 10^{-6} , при которой происходил полный лизис бактериальной культуры в жидкой питательной среде (бульон Хоттингера). С помощью метода Грация определяли количество активных бляшкообразующих фаговых единиц (БОЕ) на плотной питательной агаризованной среде (1,5% мясопептонный агар).

Антифаговый иммунный ответ на антигены бактериофага изучали на кроликах породы Шиншилла (АО «НПО «Микроген», «Питомник лабораторных животных», Россия). Использовались животные обоего пола с начальной массой 2000 ± 500 г (28 особей). Вводимое количество препарата соответствовало дозе, эквивалентной 10 терапевтическим дозам (ТД) для человека в перерасчете на массу тела животного (1 ТД препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме составляла 6,28 мг, жидкого препарата в форме раствора – 0,58 мл на кролика весом 2000 г). Животным 1 группы (8 кроликов) вводили перорально препарат поливалентного бактериофага в форме раствора; 2 группы (8 кроликов) – исследуемый препарат поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме (содержимое капсулы в виде суспензии). Животным 3 группы, контроль (4 кролика) вводили перорально стерильную воду в эквивалентном объеме. Препараты вводили на протяжении трех курсов (1 курс – 10 сут) с интервалами в 43–44 сут. У кроликов этих групп проводили отбор крови после окончания каждого курса перорального введения через 7, 14, 21, 28, 35 и 42 сут. Животным 4 группы (8 кроликов) вводили подкожно Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный в виде раствора ежедневно в течение 3 сут на протяжении 3 недель с интервалом между введением препарата 3–4 сут. В качестве адъювантов для данной группы применяли гель гидроксида алюминия. Забор крови

у животных 4 группы проводили через 8–12 сут после завершения иммунизации.

Уровень антифагового иммунного ответа детектировали с помощью иммуноферментного сэндвич-метода² с использованием разработанной авторами тест-системы [6] по наличию титра специфических IgG в диапазоне от 1/16 до 1/51200. Тест-система основана на взаимодействии фаговых антигенов, иммобилизованных на полистироловом планшете (Greiner Bio-One, Германия) с антителами к бактериофагам [7]. После стадии фиксации специфически реагирующих антител (к соответствующему монофагу) в течение 24 ч непрореагировавшие компоненты удаляли из реакционной системы путем трех последовательных промывок белково-солевым раствором на основе фосфатно-солевого буфера с Твин-20, pH 7,2 \pm 0,2; образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляли через 2,5 ч после термостатирования при 37 °С с помощью конъюгата антител против IgG кролика, меченного пероксидазой (a/Rabbit IgG (H+L) StrongZyme HRP Conjugate, SDT, Германия), разведенного в 70000 раз, с регистрацией по изменению окраски хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ООО «Хема», Россия). Реакцию останавливали с помощью стоп-реagenta – 5% раствора серной кислоты («Сигма-Тек», Россия). Результаты регистрировали на спектрофотометре PR 2100 (Sanofi Diagnostics Pasteur, Франция) при двух длинах волн: 450/620 нм. Уровень антифаговых антител выражали в условных единицах (УЕ, величина, обратная разведению сыворотки).

Определение показателя «Распадаемость капсул» проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV ОФС.1.4.2.0013.15³ и Фармакопеи Евразийского экономического союза ОФС 2.1.9.1⁴. Согласно требованиям ГФ РФ XIV ОФС.1.4.1.0005.18⁵ распадаемость капсул в воде очищенной должна составлять не более 30 мин.

Стабильность препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме оценивали по показателю «Специфическая активность» методом Аппельмана через каждые 6 мес. на протяжении регламентированного срока годности. Препарат хранили в полимерном герметичном флаконе с завинчи-

² ОФС.1.7.2.0033.15 Метод иммуноферментного анализа. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³ ОФС.1.4.2.0013.15 Распадаемость таблеток и капсул. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ ОФС.2.1.9.1 Распадаемость таблеток и капсул (испытание А) (201090001-2019). Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии № 100 от 11.08.2020 «О Фармакопее Евразийского экономического союза».

⁵ ОФС.1.4.1.0005.18 Капсулы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

вающейся крышкой с силикагелевой вставкой при исследуемом температурном режиме в течение 18 мес.

Определение кислотонейтрализующей способности бактериофагов в составе капсул определяли путем выдерживания препарата в течение 1 ч в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты согласно требованиями ГФ РФ XIV ОФС.1.2.3.0016.15⁶ с последующим определением специфической активности по методу Апелльмана.

Фармакокинетические параметры изучали на беспородных белых мышах (питомник животных филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) обоего пола с начальной массой 20,0±2,0 г. Исследования проводили после однократного перорального введения исследуемого препарата и препарата сравнения в количестве, эквивалентном 10 дозам для человека (в перерасчете на массу тела животного 1 ТД препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме составляла 0,0628 мг, препарата в форме раствора – 0,0058 мл на массу тела мыши весом 20 г). Образцы мочи животных отбирали до перорального введения препаратов и через каждые 2 ч в течение 8 ч. Биоматериал, собранный от 10 мышей, разводили питательным бульоном Хоттингера, инкубировали 8–20 ч и обрабатывали хлороформом (0,25 мл хлороформа добавляли к 5 мл разведенной пробы) в течение 1 ч при комнатной температуре. При подготовке образцов крови мышей (объем пробы 2 мл) проводили отделение сыворотки. В образцах мочи и крови анализировали содержание фаговых частиц методом Грация по количеству БОЕ в 1 мл биологического материала согласно обозначенным временным промежуткам. Относительную степень всасывания (f) рассчитывали по формуле (1):

$$f = \frac{AUC_{0-8} \text{ препарата поливалентного бактериофага в форме капсул}}{AUC_{0-8} \text{ препарата поливалентного бактериофага в форме раствора}}, \quad (1)$$

где AUC_{0-8} – площадь под фармакокинетической кривой начиная с нулевого значения времени (до перорального введения препарата) и до вре-

мени полного выведения фага из организма животного (через 8 ч после введения препарата). Расчет показателя AUC_{0-8} производился по методу обычных трапеций⁷.

Исследования на животных были одобрены локальным Комитетом инспекторов по контролю качества доклинических исследований Филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» (№ 2015/3 от 28.10.2015) и проведены в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, использующихся для научных целей⁸.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов описательной статистики для расчета средних величин⁹. В работе использовали пакеты статистических программ Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования специфической активности показали, что исследуемый препарат поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме обладает высоким антибактериальным действием в отношении бактерий *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* (табл. 1).

Важными показателями качества лекарственных препаратов бактериофагов являются распадаемость капсул и устойчивость бактериофагов в кислой среде. В результате проведения теста по определению показателя качества «Распадаемость капсул» исследуемого препарата в воде очищенной установлено значение 16,8±1,3 мин (норма не более 30 мин). Изучение стабильности в кислой среде показало, что кислотоустойчивость препарата поливалентного бактериофага в форме капсул выше, чем у препарата в форме раствора. Показатель литической активности препарата поливалентного бактериофага в капсулированной форме сохранялся на исходном уровне после выдерживания в кислой среде в течение 1 ч, в отличие от препарата в жидкой форме в виде раствора (табл. 2).

Исследование показателей фармакокинетики выявило, что при пероральном введении препаратов поливалентного бактериофага происходит

⁶ ОФС.1.2.3.0016.15 Определение кислотонейтрализующей способности. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁷ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М: Гриф и К; 2013.

⁸ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

⁹ ОФС.1.1.0014.15 Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 1. Показатели активности препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме
Table 1. Lytic activity values of the polyvalent bacteriophage preparation in capsules

Микроорганизм <i>Microorganism</i>	Показатель активности по методу <i>Lytic activity values by method</i>	
	метод Аппельмана* <i>Appelmans method *</i>	метод Грациа, БОЕ/мл <i>Gratia method, PFU/mL</i>
<i>E. coli</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$6,1 \times 10^4 - 8,4 \times 10^5$
<i>P. aeruginosa</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$1,2 \times 10^4 - 5,1 \times 10^5$
<i>K. pneumoniae</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$1,1 \times 10^5 - 3,5 \times 10^5$
<i>S. aureus</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$2,1 \times 10^4 - 3,8 \times 10^5$
<i>Proteus (P. mirabilis, P. vulgaris)</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$5,3 \times 10^4 - 7,0 \times 10^5$
<i>S. pneumoniae</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$1,8 \times 10^5 - 4,5 \times 10^5$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. БОЕ – бляшкообразующие единицы; * – оценка литической активности по методу Аппельмана по значению отрицательной степени десятичного разведения.

Note. PFU, plaque-forming units; *, lytic activity assessment by the Appelmans method using dilution factors.

Таблица 2. Изучение кислотоустойчивости препарата поливалентного бактериофага в капсулированной и жидкой лекарственных формах по показателю специфической активности

Table 2. Acid tolerance of the polyvalent bacteriophage preparation in capsule and solution forms in terms of potency

Микроорганизм <i>Microorganism</i>	Специфическая активность* <i>Potency*</i>			
	Капсулированная лекарственная форма <i>Capsules</i>		Жидкая лекарственная форма (раствор) <i>Liquid dosage form (solution)</i>	
	Исходная (до воздействия кислой среды) <i>Baseline (before acidic treatment)</i>	После воздействия кислой среды <i>After acidic treatment</i>	Исходная (до воздействия кислой среды) <i>Baseline (before acidic treatment)</i>	После воздействия кислой среды <i>After acidic treatment</i>
<i>E. coli</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,17 \pm 0,37}$	$10^{-5,27 \pm 0,49}$	$10^{-1,33 \pm 0,47}$
<i>P. aeruginosa</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,50 \pm 0,50}$	$10^{-5,61 \pm 0,45}$	$10^{-1,17 \pm 0,69}$
<i>K. pneumoniae</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-5,00 \pm 0,00}$	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-2,17 \pm 0,69}$
<i>S. aureus</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,00 \pm 0,58}$	$10^{-4,93 \pm 0,49}$	$10^{-0,83 \pm 0,69}$
<i>Proteus (P. mirabilis, P. vulgaris)</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,37 \pm 0,69}$	$10^{-5,41 \pm 0,45}$	$10^{-0,50 \pm 0,50}$
<i>S. pneumoniae</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,17 \pm 0,69}$	$10^{-5,00 \pm 0,00}$	$10^{-1,17 \pm 0,69}$
Среднее значение <i>Mean</i>	$10^{-6,00 \pm 0,00}$	$10^{-4,37 \pm 0,33}$	$10^{-5,34 \pm 0,21}$	$10^{-1,20 \pm 0,51}$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. * – оценка литической активности по методу Аппельмана по значению отрицательной степени десятичного разведения.

Note. *, lytic activity assessment by the Appelmans method using dilution factors.

Таблица 3. Фармакокинетические параметры препарата поливалентного бактериофага в капсулированной и жидкой лекарственных формах при однократном пероральном введении мышам

Table 3. Pharmacokinetic parameters of the polyvalent bacteriophage preparation in capsule and solution forms in mice after a single oral dose

Лекарственная форма препарата <i>Dosage form</i>	C_{\max} , БОЕ/мл $\times 10^1$ C_{\max} , PFU/mL $\times 10^1$	T_{\max} , ч T_{\max} , h	T_0 , ч T_0 , h	AUC_{0-8}	f
Анализируемый биоматериал – сыворотка крови <i>Biological fluid for analysis: serum</i>					
Капсулированная лекарственная форма <i>Capsules</i>	4,0	2	8	188,50	3,1
Жидкая лекарственная форма (раствор) <i>Liquid dosage form (solution)</i>	2,2	1	4	61,60	
Анализируемый биоматериал – моча <i>Biological fluid for analysis: urine</i>					
Капсулированная лекарственная форма <i>Capsules</i>	6,1	4	8	247,75	3,7
Жидкая лекарственная форма (раствор) <i>Liquid dosage form (solution)</i>	2,0	4	8	66,25	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. C_{\max} – максимальная концентрация бактериофагов в биоматериале животного; БОЕ – количество бляшкообразующих единиц в 1 мл биоматериала животного (сыворотка крови, моча); T_{\max} – время достижения максимальной концентрации бактериофагов в биоматериале животного; T_0 – время полного выведения фага из организма животного; AUC_{0-8} – площадь под фармакокинетической кривой начиная с нулевого значения времени до времени отбора образца биоматериала через 8 ч после введения препарата; f – степень всасывания.

Note. C_{\max} , maximum phage concentration in the animal biological fluid sample; PFU, number of plaque-forming units in 1 mL of the animal biological fluid (serum, urine); T_{\max} , time to maximum bacteriophage concentration in the sample; T_0 , time to complete bacteriophage elimination; AUC_{0-8} , area under the pharmacokinetic curve from baseline to 8 h after administration; f , degree of absorption.

всасывание фагов в кровь, их биораспределение в организме и выведение с мочой. По результатам анализа биообразцов (образцы сыворотки крови и мочи) после однократного перорального введения препаратов мышам установлено, что степень всасывания препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме в 3,1–3,7 раза выше по сравнению с препаратом поливалентного бактериофага в жидкой форме (табл. 3).

В ходе исследования стабильности препарата поливалентного бактериофага в форме капсул проводили изучение специфической активности препарата и определяли его литическую активность на протяжении регламентированного срока годности. Установлено, что исследуемый препарат сохраняет высокий уровень показателя специфической активности при хранении при температуре от 2 до 8 °C в течение 18 мес. (табл. 4).

В научной литературе появились данные исследований, свидетельствующие об образовании специфических противофаговых антител в результате многократного перорального применения препаратов бактериофагов, вследствие чего происходит снижение эффективности фаготерапии [8]. В качестве одного из со-

временных методов выявления специфических антител применяют иммуноферментный анализ, однако в настоящее время коммерческие тест-системы, предназначенные для определения антифагового ответа, отсутствуют. В связи с этим авторами статьи были проведены исследования по разработке тест-системы с целью определения иммунного ответа на введение фаговых препаратов.

Анализ результатов проведенного исследования по изучению уровня антифаговых антител после многократного введения препаратов кроликам показал, что в образцах сыворотки крови животных, получавших препарат поливалентного бактериофага в капсулированной и жидкой лекарственных формах, антител к бактериофагам не обнаружено, в то время как в сыворотке кроликов после цикловой иммунизации путем подкожного введения препарата поливалентного бактериофага (в жидкой лекарственной форме) с применением адьюванта уровень антител к отдельным бактериофагам составил 25600–51200 УЕ (к бактериофагу против *Staphylococcus* spp. – 25600, против *Pseudomonas aeruginosa* – 51200, против *Klebsiella* spp. – 3200, к бактериофагам против бактерий *Escherichia coli*, *Proteus* spp. и *Streptococcus* spp. – 1600).

Таблица 4. Результаты исследований стабильности препарата поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме по показателю специфической активности**Table 4.** Stability testing results for polyvalent bacteriophage capsules in terms of potency

Срок хранения <i>Storage period</i>	Специфическая активность, %* <i>Potency, %*</i>		
	Температура хранения, °C <i>Storage temperature, °C</i>		
	35–37 °C	23–25 °C	2–8 °C
0 сут <i>0 days</i>	100	100	100
1 нед. <i>1 week</i>	98	100	100
2 нед. <i>2 weeks</i>	95	100	100
1 мес. <i>1 month</i>	88	98	100
3 мес. <i>3 months</i>	84	92	99
6 мес. <i>6 months</i>	78	87	90
9 мес. <i>9 months</i>	41	50	73
12 мес. <i>12 months</i>	17	26	65
18 мес. <i>18 months</i>	0	24	64

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. * – показатель специфической активности вычисляли в процентах от исходного уровня значения литической активности (10^{-6} – 100%).

Note. *, calculated as a percentage of the initial lytic activity (10^{-6} was considered 100%).

Заключение

Продемонстрирован высокий уровень литической активности поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме, который по величине отрицательной степени десятичного разведения составлял 10^{-6} в отношении исследуемых микроорганизмов (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*). Показана более высокая кислотоустойчивость исследуемого препарата относительно препарата сравнения. Показатель степени всасывания препарата поливалентного бактериофага в форме капсул был в 3,1–3,7 раза выше в сравнении с препаратом поливалентного бактериофага в форме раствора. Многократ-

ное пероральное введение исследуемого препарата в терапевтических дозах не стимулировало образования антифаговых антител. Показано сохранение стабильности препарата в течение 18 мес.

Таким образом, проведенные биофармацевтические исследования показали, что разработанный препарат поливалентного бактериофага в капсулированной лекарственной форме обладает высокой специфической активностью, кислотоустойчивостью, стабильностью при хранении, а также не вызывает выработку антифаговых антител, что соответствует требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. и Фармакопеи Евразийского экономического союза.

Литература/References

1. Кузьменков АЮ, Виноградова АГ. Мониторинг антибиотикорезистентности: обзор информационных ресурсов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020;19(2):163–70.

Kuzmenkov AYU, Vinogradova AG. Antimicrobial resistance monitoring: a review of information resources. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020;19(2):163–70 (In Russ.).

- <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-163-170>
2. Ефименко ТА, Терехова ЛП, Ефременкова ОВ. Современное состояние проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий. Антибиотики и химиотерапия. 2019;64(5–6):64–8.
Efimenko TA, Terekhova LP, Efremenkova OV. Current state the problem of antibiotic resistance of pathogens. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2019;64(5–6):64–8 (In Russ.).
<https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-100033>
 3. Ковязина НА, Функнер ЕВ, Николаева АМ, Орлова ЕВ, Ефимова МГ, Шитова ОИ. Технологические аспекты разработки капсул с бактериофагами. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия, биология, фармация*. 2015;(1):132–6.
Kovyazina NA, Funkner EV, Nikolaeva AM, Orlova EV, Efimova MG, Shitova OI. Technological aspects of development of capsules with bacteriophages. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry, Biology, Pharmacy*. 2015;(1):132–6 (In Russ.).
EDN: [TTUGTB](#)
 4. Baqer AA, Fang K, Mohd-Assaad N, Adnan SNA, Md Nor NS. *In vitro* activity, stability and molecular characterization of eight potent bacteriophages infecting carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Viruses*. 2023;15(1):117.
<https://doi.org/10.3390/v15010117>
 5. Ковязина НА, Функнер ЕВ, Николаева АМ, Орлова ЕВ, Ефимова МГ, Шитова ОИ. Антибактериальная фармацевтическая композиция для перорального применения, содержащая бактериофаги. Патент Российской Федерации № 2660355; 2018.
Kovyazina NA, Funkner EV, Nikolaeva AM, Orlova EV, Efimova MG, Shitova OI. Antibacterial pharmaceutical composition for oral use containing bacteriophages. Patent of the Russian Federation No. 2660355; 2018 (In Russ.).
 6. Красильникова АН, Сперанская ВН, Ковязина НА, Селезнева НР. К вопросу об образовании антител к бактериофагам. В кн.: Николаева А.М., ред. *Перспективы развития производства и применения иммунобиологических препаратов в XXI веке*. Пермь; 2018. С. 185–9.
Krasilnikova AN, Speranskaya VN, Kovyazina NA, Selezneva NR. On the issue of the formation of antibodies to bacteriophages. In: Nikolaeva AM, ed. *Prospects for the development of production and use of immunobiologicals in the 21st century*. Perm; 2018. P. 185–9 (In Russ.).
EDN: [YPANBC](#)
 7. Николаева АМ, Казьянин АВ, Вязникова ТВ, Борисова ВН, Буданов МВ, Яковлева ИМ, Мельников ВА. Тест-система для определения антител к НВс-антигену и блокатор в тест-системе. Патент Российской Федерации № 2206095; 2001.
Nikolaeva AM, Kaz'yanin AV, Vyaznikova TV, Borisova VN, Budanov MV, Yakovleva IM, Mel'nikov VA. Test system for detecting antibodies to HBs antigen and test system blocker. Patent of the Russian Federation No. 2206095; 2001 (In Russ.).
EDN: [XVIFGH](#)
 8. Алешкин АВ, Светоч ЭА, Воложанцев НВ, Киселева ИА, Рубальский ЕО, Ершова ОН, Новикова ЛИ. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия Российской Федерации. *Бактериология*. 2016;(1):22–31.
Aleshkin AV, Svetoch EA, Volozhantsev NV, Kiseleva IA, Rubalsky EO, Ershova ON, Novikova LI. Innovative directions for using bacteriophages in the sphere of sanitary and epidemiological welfare of the Russian Federation. *Bacteriology*. 2016;(1):22–31 (In Russ.).
<https://doi.org/10.20953/2500-1027-2016-1-22-31>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.М. Николаева** – автор идеи, обоснование концепции исследования; обобщение и интерпретация результатов исследования; формулировка выводов; утверждение окончательного варианта рукописи; **Н.А. Ковязина** – проведение инструментальных исследований, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; обобщение и интерпретация результатов исследования; **Е.В. Функнер** – обобщение и интерпретация результатов исследования; формулировка выводов; **А.Н. Красильникова** – проведение инструментальных исследований, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных, редактирование и переработка текста рукописи; **К.А. Лыско** – редактирование и переработка текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Исследования на животных были одобрены локальным Комитетом инспекторов по контролю качества доклинических исследований Филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» (№ 2015/3 от 28.10.2015).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.M. Nikolaeva** devised the study idea, substantiated the study concept, generalised and interpreted the study results, formulated the conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication. **N.A. Kovyazina** conducted tests; collected, analysed, and collated experimental data; generalised and interpreted the study results. **E.V. Funkner** generalised and interpreted the study results, formulated the conclusions. **A.N. Krasilnikova** conducted tests; collected, analysed, and collated experimental data; edited and revised the manuscript. **K.A. Lysko** edited and revised the manuscript.

Ethics approval. Animal studies were approved by the local Committee of Inspectors for Quality Control of Preclinical Studies at Biomed, the Perm branch of Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines (Approval No. 2015/3 of 28.10.2015).

Об авторах / Authors

Николаева Алевтина Максимовна, д-р биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>

a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

Ковязина Наталья Анатольевна, канд. фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6660-1165>

natanat.pgfa@gmail.com

Функнер Елена Викторовна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9580-2166>

funknere@mail.com

Красильникова Анна Наилевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3507-5005>

annankrasilnikova@yandex.ru

Лыско Ксения Андреевна, канд. техн. наук

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4276-4744>

k.a.lysko@microgen.ru

Поступила 22.06.2023

После доработки 17.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Alevtina M. Nikolaeva, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>

a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

Natalya A. Kovyazina, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6660-1165>

natanat.pgfa@gmail.com

Elena V. Funkner, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9580-2166>

funknere@mail.com

Anna N. Krasilnikova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3507-5005>

annankrasilnikova@yandex.ru

Kseniya A. Lysko, Cand. Sci. (Techn.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4276-4744>

k.a.lysko@microgen.ru

Received 22 June 2023

Revised 17 August 2023

Accepted 13 September 2023