

ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ МИКРОКАПСУЛИРОВАННОГО БАКТЕРИОФАГА

Ковязина Н.А., Николаева А.М.

*Пермская государственная фармацевтическая академия
кафедра промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии
г.Пермь*

Ключевые слова: бактериофаг, конструирование, литическая активность, микрокапсулирование.

Резюме: В статье представлены результаты получения микрокапсул с клебсиеллезным бактериофагом. Конструирование микрокапсулированной композиции бактериофага включало поиск оптимальной технологии микрокапсулирования и оптимизацию состава.

Resume: Results of receiving microcapsules are presented in article with *Klebsiella* bacteriophage. Designing of the microencapsulated composition of a bacteriophage included search of optimum technology of microencapsulation and structure optimization.

Актуальность. Традиционными препаратами этиотропной терапии бактериальных инфекций являются антибиотики химической природы, однако широкое их использование привело к селекции и выраженной диссеминации антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [3]. В связи с этим альтернативным методом лечения заболеваний инфекционной природы является фаготерапия [2]. На современном фармацевтическом рынке лекарственные формы бактериофагов представлены в основном жидкими препаратами и таблетками покрытыми оболочкой, поэтому разработка инновационной лекарственной формы микрокапсул, которые могут применяться в качестве самостоятельной лекарственной формы или для получения медул, таблетированных препаратов и пр., представляет большое значение для специалистов различных областей медицины и фармации.

Цель: Получение микрокапсулированной лекарственной формы бактериофага на модели клебсиеллезного бактериофага.

Задачи: 1. Подобрать способ микрокапсулирования; 2. Получить микрокапсулы с бактериофагом; 3. Провести стандартизацию микрокапсул.

Материалы и методы. В работе использован жидкий коммерческий препарат – клебсиеллезный бактериофаг производства ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», представляющий собой стерильный фильтрат фаголизата бактерий *Klebsiella pneumoniaei*. Для получения микрокапсул бактериофаг предварительно концентрировали в 100 раз с применением метода мембранной ультрафильтрации до минимального титра 10^{-7} . Специфическую (литическую) активность бактериофага оценивали по методу Аппельмана [1] в разведениях $10^2 - 10^3 - 10^4$, вызывающих полный лизис бактериальной культуры. Геометрические размеры микрокапсул измеряли микрометром с ценой деления 0,01

мм. Определение средней массы проводили на аналитических весах. Влагосодержание определяли гравиметрически.

Результаты и обсуждение. Поиск оптимальной технологии микрокапсулирования бактериофага, включал ряд последовательных этапов. На первом этапе были предприняты исследования по разработке состава. При изготовлении микрокапсулированных композиций активное вещество вводят либо в сухой, либо в жидкой форме [5]. Мы отдали предпочтение последней, поскольку по литературным данным активность жидких фагов сохраняется в 2 раза дольше, чем сухих [6], а исключение стадии лиофилизации удешевляет производство препарата. Проведенные исследования по высушиванию бактериофагов также показали значительную их инактивацию в процессе сушки и хранения [4]. Первую серию получали путем диспергирования биополимерного гидрогеля полисахаридной природы клебсиеллезного бактериофага в дисперсионной среде вазелинового масла. К эмульсии добавляли сшивающий агент в виде порошка кальция хлорида, в результате происходило отверждение оболочки микрокапсул. Промывали гексаном и сушили под вакуумом. Полученные микрокапсулы имели неправильную форму, неоднородны и с низким технологическим выходом. Размер варьировал от 26 мкм до 300 мкм. Испытывали трудности при отделении микрокапсул от дисперсионной среды вазелинового масла, так как промывание органическим растворителем приводило к разрушению микрокапсул и снижению литической активности бактериофага. Другим вариантом явилось добавление к эмульсии (раствор бактериофага в виде биополимерного гидрогеля полисахаридной природы в дисперсионной среде вазелинового масла) водного раствора сшивающего агента кальция хлорида, в результате происходило отверждение оболочки микрокапсул. Последние отделяли от дисперсионной среды, промывали раствором сшивающего агента и высушивали. Полученные микрокапсулы неоднородны по размеру (размер микрокапсул варьировал от 66 мкм до 1250 мкм), технологические свойства (сыпучесть, плотность) не соответствуют требованиям нормативной документации, наблюдалось снижение активности бактериофага. С целью оптимизации технологии клебсиеллезный бактериофаг в виде биополимерного гидрогеля полисахаридной природы капельно вводили при диспергировании в водный раствор сшивающего агента, что показало возможность получать микрокапсулы с хорошими органолептическими и технологическими показателями и с сохранением активности фагов.

На следующем этапе проведен подбор концентрации биополимерной матрицы-носителя клебсиеллезного бактериофага с концентрацией от 0,25% до 3,0%. При введении в водный раствор кальция хлорида геля полимера в концентрации 0,5% и менее, образования капсул не наблюдали. При концентрации матрицы-носителя 2,5% и выше, отмечали трудность дозирования из-за высокой вязкости геля. В результате капсулы имели неправильную форму и высокий показатель отклонения однородности дозирования. Оптимальными технологическими характеристиками

обладают капсулы, полученные на полимерном носителе с концентрацией от 1,5% до 2,0%.

Изучение влияния вида сушки на стабильность клебсиеллезного бактериофага показало, что при воздушной сушке микрокапсулы обладали оптимальными технологическими и органолептическими свойствам, но показали низкую стабильность в сравнении с вакуумной сушкой. Литическая активность падала в 1,7 раза в сравнении с активностью клебсифага в капсулах до высушивания. Многократное вакуумное подсушивание (сброс вакуума и открывание дверцы сушильного шкафа) также ведет к снижению литической активности бактериофагов. При высушивании сформировавшихся микрокапсул под вакуумом “-0,1 МПа” (глубокий вакуум) – микрокапсулы расслаивались, приобретали плоскую форму, но сохраняли литическую активность клебсифага. Оптимальными органолептическими и технологическими показателями обладали микрокапсулы, высушенные по режиму постепенного создания глубины вакуума “от -0,02 МПа к -0,04 МПа к -0,06 МПа к -0,08 МПа к -0,1 МПа”), но при этом выявлено снижение активности бактериофага. Наилучшими технологическими параметрами вакуумной сушки микрокапсул с клебсифагом являлись: однократное высушивание и определенное значение средней глубины вакуума от -0,05 МПа до -0,07 МПа (Табл. 1)

Таблица 1. Влияние режима сушки на литическую активность микрокапсул Клебсифаг

Сушка	Глубина вакуума	Описание	Литическая активность клебсифага, %
До высушивания	-		100
Воздушная	-	Правильной, округлой формы	58
Вакуумная	-0,1 МПа	Плоские	82
	от -0,02МПа к - 0,04МПа к -0,06 МПа к -0,08МПа к -0,1 МПа	Правильной, округлой формы	61
	-0,05 МПа	Правильной, округлой формы	84
	-0,07 МПа	Правильной, округлой формы	88

Технология получения микрокапсул с бактериофагом состояла из операций: набухание стерильного полимера в концентрированном клебсиеллезном бактериофаге до гомогенной массы; капельное введение полученного полуфабриката в дисперсионную среду отверждающего агента 5 % раствора кальция хлорида с образованием капсул; отделение капсул; сушка однократным циклом под вакуумом при глубине вакуума -0,05 МПа. Микрокапсулы упаковывали в стеклянные флаконы под обкатку.

Стандартизацию микрокапсул Клебсифаг проводили по показателям: внешний вид, влагосодержание, средняя масса и отклонение от средней массы, геометрические размеры (диаметр), литическая активность (Табл. 2).

Таблица 2. Стандартизация микрокапсул с клебсиеллезным бактериофагом

Показатели качества	Ед. изм.	Результаты
Внешний вид		Правильной сферической формы, бежевого цвета
Влагосодержание	%	1,8
Средняя масса и отклонение от средней массы	$X \pm \Delta X$, мг	$3,39 \pm 0,32$ ($\pm 9,39$ %)
Геометрические размеры (диаметр)	$X \pm \Delta X$, мм	$1,41 \pm 0,13$ ($\pm 9,48$ %)
Литическая активность	$X \pm \Delta X$, титр	$10^{-3,7 \pm 0,35}$

По внешнему виду микрокапсулы представляли собой частицы сферической формы (Рис.), бежевого цвета или с зеленоватым оттенком, без запаха и со специфическим вкусом. Потеря в массе при высушивании составила 1,8 %. Измерена средняя масса и отклонение от средней массы микрокапсул. Результаты исследования показали, что микрокапсула, соответствующая 20 мл жидкого коммерческого препарата клебсиеллезного бактериофага имеет массу ($3,39 \pm 0,32$)мг, толщину ($1,41 \pm 0,13$) мм. Отклонения геометрических размеров составляли не более 10%. Литическая активность $10^{-3,7 \pm 0,35}$.



Рис. 1 Микрокапсулы с клебсиеллезным бактериофагом

Одна микрокапсула, размером 1,4 мм и весом 3 мг приготовленная на концентрированном клебсиеллезном бактериофаге, эквивалентна по объему 20 мл жидкого коммерческого препарата «Клебсифаг».

Через 12 месяцев после хранения микрокапсул Клебсифаг в герметично закрытом флаконе при температуре от +6 °С до +8°С органолептические (внешний вид), технологические и биологические свойства оставались на исходном уровне.

Выводы. Разработана инновационная лекарственная форма – микрокапсулы с клебсиеллезным бактериофагом, которая может применяться в качестве самостоятельной антибактериальной лекарственной формы или для получения комплексных препаратов в виде медул, таблеток и прочее.

Литература

1. Адамс, М. Бактериофаги. – [Методы изучения вирусов бактерий] – М., 1961. - 527 с.
2. Ворошилова Н.Н., Казакова Т.Б., Боговазова Г.Г., Алферова Э.В. Эпидемиологическая и клиническая эффективность препаратов бактериофагов при лечении и профилактике инфекционных

заболеваний // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: Материалы конференции. – Пермь, 2008. С. 91-94.

3. Гуров А. В. Влияние антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов на формирование острых и хронических форм инфекций ЛОР-органов : диссертация ... канд. мед. наук.- Москва, 2004.- 139 с.: ил.

4. Ковязина Н.А., Решетников В.И., Функнер Е.В., Ефимова М.Г. Разработка состава и технологии желудочно-резистентных таблеток «Секстафаг» // Фармация, № 7, 2008. - С.36-39.

5. Солодовник, В.Д. Микрокапсулирование. – М.: Химия, 1980. – 216 с., ил.

6. Чернов, Н.В. Изыскание эффективного метода сушки дизентерийного бактериофага / Н.В. Чернов // Бактерийные и вирусные препараты: труды Уфимского НИИВС им. И.И. Мечникова. – Уфа: Баш. кн. изд-во, 1968. Вып. 9. – С. 218-221.