

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГА

Н.А. КОВЯЗИНА
А.М. НИКОЛАЕВА
Е.В. ФУНКНЕР
М.Г. ЕФИМОВА

*Пермская государственная
фармацевтическая академия*

e-mail: natanat.k@yandex.ru

В статье представлены результаты получения микрокапсул с клебсиеллезным бактериофагом. Конструирование микрокапсулированной композиции бактериофага включало поиск оптимальной технологии микрокапсулирования и оптимизацию состава. Подобран вид и режим сушки микрокапсулированного полуфабриката. Наилучшее сохранение литической активности в композиции обеспечивало вакуумное высушивание при определенном значении глубины вакуума в интервале от -0,05 МПа до -0,07 МПа. Четыре микрокапсулы, размером 1500 мкм и весом 3 мг эквивалентны по объему 20 мл жидкого коммерческого препарата «Клебсифаг». Исследования биодоступности «*in vitro*» показали, что микрокапсулированная форма обладает большей биодоступностью в сравнении с жидким бактериофагом. На основании полученных исследований разработан алгоритм конструирования микрокапсулированных препаратов.

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

Введение. Современная медицина немыслима без антибактериальных препаратов успешно применяющихся у больных с различными заболеваниями. Однако широкое использование антибиотиков в борьбе с бактериальными инфекциями привело к селекции и выраженной диссеминации антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, а также появлению различных эволюционно обусловленных приспособительных факторов, проявляющихся в различных механизмах передачи генов резистентности между бактериями в определенных условиях окружающей среды [3]. В связи с этим альтернативным методом лечения заболеваний инфекционной природы является фаготерапия. Бактериофаги – это вирусы бактерий, способные проникать в бактериальную клетку, размножаться в ней, вызывать её лизис или переход в состояние лизогении (фагоносительства). Бактериофаги обладают высокой противомикробной активностью, способностью к накоплению в организме, в большей степени в очаге поражения, узким спектром антимикробного действия, относительно длительным временем действия одной дозы и полной безвредностью для пациента [2].

Цель исследования. Разработка микрокапсулированной лекарственной формы бактериофага на модели клебсиеллезного бактериофага.

Материалы и методы. В работе использованы: жидкий коммерческий препарат – клебсиеллезный бактериофаг производства ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», представляющий собой стерильный фильтрат фаголизата бактерий *Klebsiella pneumoniae*. Для получения микрокапсул бактериофаг предварительно концентрировали в 100 раз с применением метода мембранной ультрафильтрации до минимального титра 10^{-7} . Достоинством этого метода является совмещение стадии очистки и концентрирования, что позволяет получить концентрат бактериофага с сохранением литической активности. Клебсиеллезный фаг относится к группе раневых бактериофагов и назначается при воспалениях пазух носа, среднего уха, ангине, фарингите, ларингите, трахеите, бронхите, пневмонии, плеврите, хирургических инфекциях, уретрите, цистите, пиелонефрите, гастроэнтероколите, дисбактериозе, сепсисе и пр. Специфическую (литическую) активность бактериофага оценивали по методу Аппельмана [1] в разведениях $10^2 - 10^3 - 10^4$, вызывающих полный лизис бактериальной культуры. Распадаемость микрокапсул оценивали согласно ГФ XI. Геометрические размеры микрокапсул измеряли микрометром с ценой деления 0,01 мм. Определение средней массы проводили на аналитических весах. Влагосодержание определяли гравиметрически на экспресс-влажномере ЭВЛ-500 при температуре 100-105 °С согласно ГФ XI. Определение реакции среды растворов – потенциометрически. Статистическую обработку результатов проводили по программе «STAT. EXL»

Результаты и их обсуждение. Конструирование микрокапсулированной фармацевтической композиции и формирование кишечнорастворимой системы доставки бактериофагов являются взаимосвязанными этапами создания высокоактивной лекарственной формы.

В качестве биополимерной матрицы носителя клебсиеллезного бактериофага использовали полисахариды природного происхождения (метилцеллюлозу, натрия альгинат, хитозан, пектин цитрусовый, пектин яблочный), которые все чаще находят применение для создания так называемых систем доставки лекарств направленного действия. Это различные микросфе-



ры и микрокапсулы на основе полисахаридных гидрогелей, которые изначально считались хорошими потенциальными носителями различных лекарств, обеспечивающие постоянный и длительный терапевтический эффект. Полисахаридные гидрогели подвержены биодegradации, малотоксичны, не являются антигенами [7]. Образование микрокапсул основывалось на способности высокомолекулярных биополимерных соединений образовывать соли с сшивающим агентом [5]. Желудочную резистентность придает композиция кальциевой соли альгиновой кислоты, на которой мы остановили свои исследования [6].

Получение микрокапсул осуществляли несколькими способами. При перемешивании в дисперсионную среду вазелинового масла струйно добавляли раствор клебсиеллезного бактериофага в виде биополимерного гидрогеля на основе натрия альгината, который диспергировался на капельки различной величины. К эмульсии добавляли сшивающий агент (порошок кальция хлорида), в результате происходило отверждение оболочки микрокапсул. Полученные микрокапсулы имели неправильную форму, 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 снижению литической активности бактериофага. Другим вариантом микрокапсулирования явилось добавление к эмульсии (раствор бактериофага в виде биополимерного гидрогеля / дисперсионная среда вазелинового масла) водного раствора сшивающего агента, в результате происходило отверждение оболочки микрокапсул. При отстаивании эмульсия расслаивалась на верхний слой – вазелиновое масло и нижний – водный раствор с микрокапсулами. Последние отделяли от дисперсионной среды, промывали раствором сшивающего агента и высушивали. Размер полученных микрокапсул варьировал от 66 мкм до 1250 мкм. Данный способ имеет ряд недостатков: трудоемкость процесса, полученные микрокапсулы неоднородны по размеру, технологические свойства (сыпучесть, плотность) не соответствуют нормативной документации, наблюдается снижение активности клебсиеллезного бактериофага. С целью оптимизации технологии клебсиеллезный бактериофаг в виде биополимерного гидрогеля капельно вводили в диспергируемый водный раствор кальция хлорида, что показало возможность получать микрокапсулы с хорошими органолептическими и технологическими показателями и с сохранением активности фага.

Проведен подбор концентрации биополимерной матрицы-носителя клебсиеллезного бактериофага с концентрацией от 0,25% до 3,0%. При введении в водный раствор кальция хлорида геля натрия альгината 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 1,0% до 2,0%.

Технологические характеристики полученных микрокапсул представлены в табл. 1. Микрокапсулы, полученные на 2% геле натрия альгината имели наименьший процент отклонения по массе, чем капсулы составов на 1,0% и 1,5% геле, что говорит об однородности дозирования бактериофага.

Таблица 1

Влияние концентрации биополимерного геля на геометрические характеристики микрокапсул

Концентрация матрицы (%)	Микрокапсулы до высушивания		Микрокапсулы после высушивания	
	Описание	Размер, мкм	Размер, мкм	Масса, мг
1,0	Правильной сферической формы, при слеживании друг с другом теряют форму	3490,71 ± 278,17 ± 7,97%	896,86 ± 77,96 ± 8,69%	1,2227 ± 0,44741 ± 36,59%
1,5	Правильной сферической формы, упругие при сжатии	4563,57 ± 215,17 ± 4,71%	1233,57 ± 84,47 ± 6,85%	1,9233 ± 0,46512 ± 24,18%
2,0	Правильной сферической формы, упругие при сжатии	4912,86 ± 174,20 ± 3,55%	1408,57 ± 133,55 ± 9,48%	3,3887 ± 0,3181 ± 9,39%

При высушивании размер микрокапсул уменьшается в 3,5-4,0 раза. Микрокапсулы имели шарообразную неправильную форму. Четыре микрокапсулы полученные на основе концентрированного клебсиеллезного бактериофага, размером от 800 мкм до 1500 мкм в зависимости от концентрации биополимерной матрицы, эквивалентны по объему 20 мл жидкого коммерческого препарата «Клебсифаг».

Следующим этапом явился подбор фармацевтической композиции, максимально стабилизирующей бактериофаг. Известно, что бактериофаги инактивируются под влиянием различных технологических факторов (рН среды, температура, параметры обезвоживания, контакт с

различными вспомогательными веществами и др.), поэтому важным был подбор оптимальной композиции для микрокапсулирования с высоким показателем сохранения активности.

Для достижения данной задачи в экспериментальных условиях были воспроизведены серии микрокапсулированных композиций. Выбор вспомогательных веществ для композиции составов микрокапсул проводили с учетом физиологических особенностей взаимодействия фага с клеткой, природы вещества, технологических особенностей микрокапсулируемой массы и показателя сохранения литической активности. В композиции микрокапсулируемых составов в различных соотношениях входили: кальция карбонат, кальция глюконат, лактоза, сорбит, натрия альгинат, пектины цитрусовый и яблочный.




Из проведенных ранее исследований выявлено, что бактериофаги лабильны и требуют предварительной стабилизации [4]. Наилучшую стабильность бактериофагов наблюдали в присутствии сахаров – сорбита, лактозы, маннита и высокомолекулярного соединения – метилцеллюлозы. В качестве стабилизаторов бактериофага в состав композиции добавляли метилцеллюлозу, сорбит и лактозу. Лактоза плохо растворима в жидком бактериофаге, гель для микрокапсулирования представлял собой суспензию, что негативно сказывалось на органолептических и технологических свойствах микрокапсул. Стабилизация метилцеллюлозой клебсиеллезного бактериофага, а после добавление к гелевой композиции натрия альгината приводило к изменению формы. Микрокапсулы приобретали неправильную, вытянутую форму. Добавление сорбита в качестве стабилизатора клебсиеллезного бактериофага, не влияло на изменение органолептических и технологических показателей. Сохранение активности фага в полученных композициях варьировало $10^{-2,75}$ – $10^{-3,5}$.

Следующим этапом экспериментальных исследований являлось изучение вида и режима сушки микрокапсул и влияние их на технологические характеристики и стабильность бактериофага. В экспериментальных условиях воспроизведены серии микрокапсулированных композиций с клебсиеллезным бактериофагом. Сушку сформировавшихся микрокапсул данных серий проводили двумя способами: воздушным и вакуумным. Воздушную сушку – при температуре 26 – 28 °С. Вакуумную – при температуре (32-35) °С, глубине вакуума “от -0,02 до -0,1 МПа” (по вакуумметру).

Данные по сохранению литической активности бактериофага приведены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние режима сушки на литическую активность микрокапсул Клебсифаг

Сушка	Глубина вакуума	Описание		Стабильность клебсифага, титр
Воздушная	-	Правильной, круглой формы		$10^{-2,25 \pm 0,59}$
Вакуумная	-0,1 МПа	Плоские		$10^{-3,625 \pm 0,43}$
	от -0,02 МПа к -0,04 МПа к -0,06 МПа к -0,08 МПа к -0,1 МПа	Правильной, круглой формы		$10^{-2,875 \pm 0,54}$
	-0,05 МПа; -0,06 МПа; -0,07 МПа.	Правильной, круглой формы		$10^{-3,5 \pm 0,45}$

При воздушной сушке микрокапсулы обладали оптимальными технологическими и органолептическими свойствам, но показали низкую стабильность в сравнении с вакуумной сушкой. Литическая активность падала в 1,8 раза в сравнении с активностью клебсифага в капсулах до высушивания и составляла $10^{-2,25 \pm 0,59}$. При получении серий микрокапсул с клебсиеллезным бактериофагом с вакуумным высушиванием выявлено, что многократное вакуумное подсушивание (сброс вакуума и открывание дверцы сушильного шкафа) ведет к снижению литической активности бактериофагов. Параметры вакуумного высушивания (глубина вакуума), также



влияет на технологические свойства микрокапсул. При высушивании сформировавшихся микрокапсул под вакуумом “-0,1 МПа” (глубокий вакуум) – микрокапсулы расслаивались, приобретали плоскую форму, но сохраняли литическую активность клебсифага на уровне $10^{-3,625 \pm 0,43}$. Оптимальными органолептическими и технологическими показателями обладали микрокапсулы, высушенные по режиму при постепенном создании 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, которая составила $10^{-2,875 \pm 0,54}$. Наилучшими технологическими параметрами вакуумной сушки микрокапсул с клебсифагом являлись: однократное высушивание и определенное значение средней глубины вакуума. Литическая активность данных микрокапсулированных композиций на уровне $10^{-3,5 \pm 0,45}$.

Таким образом, оптимальным режимом сушки микрокапсул с бактериофагом является однократное вакуумное высушивание с определенным значением средней глубины вакуума.

Технология получения микрокапсул с клебсиеллезным бактериофагом включает: получение 2 % раствора полимера натрия альгината на основе жидкого бактериофага; капельное смешивание гомогенного раствора с дисперсионной средой отверждающего агента 5 % раствора кальция хлорида с образованием капсул; фильтрование капсул; сушка однократным циклом под вакуумом при глубине вакуума – 0,05 МПа. Микрокапсулы фасовали в стеклянные флаконы под обкатку. Одна микрокапсула, размером 1500 мкм и весом 3 мг приготовленная на концентрированном клебсиеллезном бактериофаге, эквивалентна по объему 20 мл жидкого коммерческого препарата «Клебсифаг». Стандартизация полученных микрокапсул приведена в табл. 3.

Таблица 3

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	$X \pm \Delta X$, г	$3,3887 \pm 0,3181 (\pm 9,39 \%)$
Геометрические размеры (диаметр)	$X \pm \Delta X$, мм	$1408,57 \pm 133,55 (\pm 9,48 \%)$
Литическая активность	титр	$10^{-3,7 \pm 0,35}$

Оценку качества микрокапсул проводили по показателям: внешний вид, масса, газмер (диаметр), влагосодержание, литическая активность. По внешнему виду микрокапсулы в течение исследуемого периода времени представляли собой капсулы сферической формы, бежевого цвета или с зеленоватым оттенком, без запаха и со специфическим привкусом. Измерена средняя масса и отклонение от средней массы микрокапсул. Результаты исследования показали, что 4 микрокапсулы, соответствующие 20 мл жидкого коммерческого препарата Клебсифаг имеют массу ($3,3887 \pm 0,3181$) мг, толщину ($1408,57 \pm 133,55$) мм. Потеря в массе при высушивании составила 1,8%. Через 6 месяцев после хранения микрокапсул Клебсифаг в герметично закрытом флаконе при температуре от +6°C до +8°C органолептические и технологические свойства оставались на исходном уровне. Изучена стабильность микрокапсулированного клебсифага фармацевтической композиции в течение 6 месяцев при температуре от +6°C до +8°C. Активность клебсиеллезного фага в полученных микрокапсулах изначально составляла $10^{-3,7 \pm 0,35}$. Последующий ежемесячный контроль активности был на идентичном уровне. Разработанные микрокапсулы Клебсифаг стабильны в течение 6 месяцев хранения (срок наблюдения) при температуре +4 – +8°C.

Оценку фармакологической биодоступности разработанных микрокапсул с клебсиеллезным бактериофагом проводили «*in vitro*» проводили в мерном стакане с магнитной мешалкой для жидкого клебсиеллезного бактериофага и в лабораторном индентификаторе процесса распадаемости для микрокапсулированного препарата. На рисунке 1 представлено сохранение литической активности в обоих объектах после воздействия 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты (титр 10^{-2} – 10^{-3}). Активность оценивали в % (титр 10^2 – 10^3).

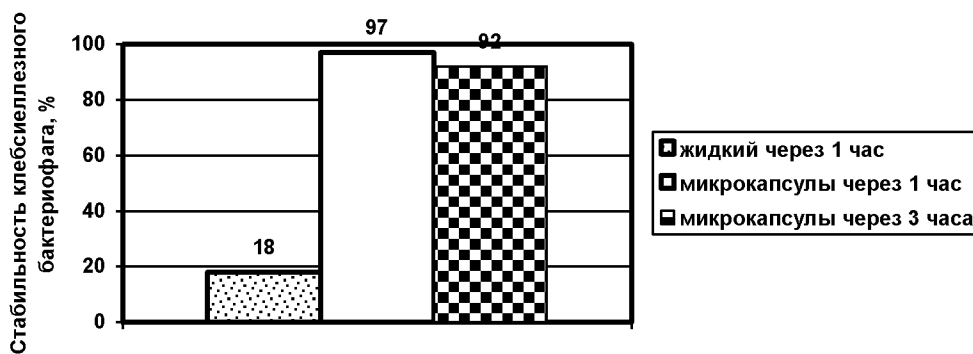


Рис. 1. Сохранение специфической активности клебсиеллезного бактериофага после воздействия раствора 0,1 М хлористоводородной кислоты

Исследования показали, что в микрокапсулированной форме сохранение активности клебсиеллезного бактериофага после воздействия кислой среды в 5,5 раза выше, чем в жидкой. Таким образом, разработанные микрокапсулы Клебсифаг обладают большей биодоступностью в сравнении с жидким бактериофагом.

Микрокапсулы, как система доставки кишечнорастворимой композиции является также перспективным направлением и одновременно сложным из-за лабильности бактериофагов. На основании проведенных исследований разработан алгоритм конструирования микрокапсулированных препаратов (рис. 2).



Рис. 2. Алгоритм конструирования микрокапсулированных бактериофагов

Конструктивные подходы получения микрокапсулированных бактериофагов состоят из: получения субстанции комплексного бактериофага (концентрата); структурирования стабильной микрокапсулированной фармацевтической композиции с фармакологическим эффектом



локализации и пролонгации; стандартизации капсулированных бактериофагов согласно нормативной документации.

Выводы. Разработана инновационная кишечнорастворимая 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. Манаенков, О.В. Получение полислойных капсул на основе хитозана и солей альгиновой кислоты для инкапсулирования фосфолипидных мицелл / О.В. Манаенков, А.И. Сидоров, В.П. Молчанов // «Вестник МИТХТ», 2010, т. 5, №2. – С. 76-81
6. Патент № 2410084 Ковязина Н.А., Решетников В.И., Функнер Е.В., Ефимова М.Г., Шитова О.И. / «Фармацевтическая композиция на основе секстафага (Пиобактериофага поливалентного) или бактериофага сальмонеллезного и способ её получения» // Опубликовано 27.01.2011. – С.6.
7. Солодовник, В.Д. Микрокапсулирование. – М.: Химия, 1980. – 216 с., ил.

STUDYING OF POSSIBILITY OF MICROENCAPSULATION OF THE BACTERIOPHAGE

**N.A. KOVYAZINA
A. M. NIKOLAIEVA
E.V. FUNKNER
M.G. YEFIMOVAP**

Perm State Pharmaceutical Academy

e-mail: natanat.k@yandex.ru

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. The look and mode of drying of the microencapsulated semi-finished product is picked up. The best preservation of lytic activity in composition provided vacuum drying at a certain value of depth of vacuum from -0,05 MPas to -0,07 MPas. Four microcapsules, 1500 microns in size and weighing 3 mg are equivalent on the volume of 20 ml of the liquid commercial preparation "Klebsiphage". Researches of bioavailability of "in vitro" showed that the microencapsulated form possesses bigger bioavailability in comparison with a liquid bacteriophage. On the basis of the received researches the algorithm of designing of the microencapsulated preparations is developed.

Key words: bacteriophage, bioavailability, designing, lytic activity, microencapsulation.