

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Бактериофаги

ОФС.1.7.1.0002.15

лечебно-профилактические

Вводится впервые

Настоящая фармакопейная статья распространяется на лечебно-профилактические бактериофаги, лекарственные средства, содержащие комплексы поликлональных вирулентных вирусов бактерий, которые вызывают гибель соответствующих им видов бактерий за счет внутриклеточного размножения и разрушения бактериальной клетки, сопровождающегося выходом зрелых фаговых частиц, способных к заражению новых бактериальных клеток.

Бактериофаги являются вирусами бактерий. По типу взаимодействия с бактериальной клеткой фаги подразделяются на вирулентные (вызывающие гибель бактерий) и умеренные, которые, инфицируя бактериальную клетку, встраиваются в ее генетический аппарат и репродуцируются в процессе деления клетки, не вызывая ее лизис. В медицине бактериофаги используют для лечения и профилактики гнойно-септических и кишечных инфекций, а также в диагностических целях для индикации, видового и внутривидового дифференцирования бактерий.

Лечебно-профилактические бактериофаги содержат только вирулентные фаги. Эти препараты представляют собой стерильные очищенные фильтраты фаголизатов соответствующих видов бактерий, освобожденные от эндо- и экзотоксинов, продуктов фаголизиса бактериальных клеток, а также их антигенных комплексов и белковых компонентов питательных сред.

Благодаря строгой специфичности действия лечебно-профилактические бактериофаги, в отличие от антибиотиков, не угнетают нормальную микрофлору, не подавляют иммунной защиты, не обладают токсическим действием и не вызывают аллергизации. Наличие резистентности бактерий к антибиотикам не влияет на литическую активность бактериофагов.

Лечебно-профилактические бактериофаги применяют для лечения и профилактики гнойно-воспалительных заболеваний и кишечных инфекций, коррекции дисбиотических состояний. Главным условием клинической эффективности при назначении бактериофагов является фагочувствительность бактерий-возбудителей.

Лечебно-профилактические бактериофаги по своему составу подразделяются на (таблица):

– *монокомпонентные бактериофаги* – лекарственные средства, содержащие вирулентные фаги против одного рода или вида бактерий;

– *комбинированные бактериофаги* – лекарственные средства, содержащие несколько видов монокомпонентных бактериофагов.

Активность этой группы лекарственных средств выражают в показателях титра максимального разведения, дающего полный фаголизис соответствующих препарату видов бактериальных штаммов, определяемый по методу Аппельмана. Показатели специфической активности для каждого препарата указаны в соответствующих фармакопейных статьях.

Лечебно-профилактические бактериофаги используют для перорального, наружного, местного, ректального применения, интраназального и конъюнктивального введения, введения в дренированные полости. Их выпускают в различных лекарственных формах – в растворах, в виде таблеток, суппозиториев, линиментов, мазей (табл.)

Таблица - Лечебно-профилактические бактериофаги и их целевая направленность

Наименование препарата бактериофага	Специфическая направленность
Монокомпонентные	
Стафилококковый	<i>Staphylococcus</i> spp. (<i>S. aureus</i>)
Стрептококковый	<i>Streptococcus</i> spp. (в том числе, <i>Enterococcus</i> spp.)
Псевдомонас аеругиноза (синегнойный)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Коли	<i>Escherichia coli</i>
Протейный	<i>Proteus mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i>
Дизентерийный поливалентный	<i>Shigella flexneri</i> 1,2,3,4,6 сероваров; <i>S. sonnei</i>
Брюшнотифозный	<i>Salmonella typhi</i>
Сальмонеллезный гр. ABCDE	<i>S. typhimurium</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. paratyphi B</i> , <i>S. heidelberg</i> , <i>S. newport</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. anatum</i> , <i>S. newlands</i>
Клебсиелл пневмонии	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Комбинированные	
Коли-протейный	<i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i>
Клебсиеллезный поливалентный	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i>
Пиобактериофаг поливалентный очищенный	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>
Пиобактериофаг комплексный	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>
Интести	<i>S. flexneri</i> 1, 2, 3, 4, 6 сероваров, <i>S. sonnei</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. paratyphi B</i> , <i>S. heidelberg</i> , <i>S. newport</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. anatum</i> , <i>S. newlands</i> , <i>P. mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>P. aeruginosa</i>

ПРОИЗВОДСТВО

Организация производства лечебно-профилактических бактериофагов осуществляется согласно действующим государственным санитарным правилам с учетом требований системы обеспечения качества надлежащей

практики производства. Вместе с тем имеются определенные особенности в комплектации и размещении производственных помещений.

Для работы со штаммами бактерий, выделенных из разных источников (патологического материала и объектов внешней среды), и для выделения фагов из патологического материала и объектов внешней среды (почва, сточные воды и т.д.) необходимы изолированные от производства боксы для проведения микробиологических исследований.

Обязательными начальными этапами работы являются:

- выделение чистых культур перспективных штаммов бактерий (т.е. кандидатов в производственные штаммы бактерий);
- выделение вирулентных бактериофагов для пополнения коллекции «маточных» фагов.

В производственной зоне должны быть предусмотрены отдельные микробиологические боксы для работы с производственными бактериальными штаммами и маточными фагами.

При производстве фаговых препаратов проводят валидацию технологического процесса, технологического оборудования, сырья и методов контроля. Все исходные материалы и сырье, используемые при производстве, должны иметь документы, подтверждающие их качество. Вспомогательные вещества, входящие в состав лекарственных средств с лечебно-профилактическими бактериофагами, должны быть разрешены к медицинскому применению и использоваться в дозах, не вызывающих токсические, аллергические или иные нежелательные реакции у человека.

Питательные среды

Производственные питательные среды не должны содержать антибиотиков и компонентов, вызывающих аллергические или иные нежелательные реакции у человека. Питательные среды должны обладать хорошими ростовыми свойствами и быть стерильными. Сырье, реактивы и реагенты, используемые при производстве питательных сред, должны быть

пригодны для соответствующих целей и их качество должно быть подтверждено документально.

Для включения в фармакопейную статью рекомендуются следующие питательные среды: мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (1,5 – 2 %) или бульон и агар Хоттингера (1,5 – 2 %) с необходимыми добавками в зависимости от специфических потребностей бактерий-мишеней фаговых препаратов. Возможно использование других питательных сред специального назначения, например, для возбудителей особо опасных инфекций.

Требования к производственным штаммам

Производственные штаммы бактерий-продуцентов бактериофагов выделяют от больных гнойно-септическими или кишечными инфекциями и получают из бактериологических диагностических лабораторий (желательно расположенных в регионах реализации и потребления лечебно-профилактических бактериофагов). Коллекция производственных штаммов бактерий, используемых в производстве бактериофагов, должна ежегодно обновляться свежевыделенными штаммами от больных не менее чем на одну треть.

Производственные штаммы бактерий должны обладать типичными для каждого вида морфологическими, культуральными, биохимическими и антигенными свойствами, не продуцировать энтеротоксины и не содержать умеренных бактериофагов в своем геноме.

Производственные штаммы бактерий должны лизироваться маточными фагами по методу Аппельмана в титрах не менее чем на 1–2 порядка выше показателей специфической активности конечного продукта. При этом стабильность лизиса должна сохраняться после (48 ± 3) ч инкубирования при температуре 37 °С.

Производственные штаммы бактерий хранят в специальных изолированных помещениях в лиофилизированном состоянии в ампулах при температуре 2 – 8 °С в течение 10 лет и в пробирках с 0,4 – 0,7 %

агаризованной питательной средой (на основе гидролизата Хоттингера или МПБ) под стерильным вазелиновым маслом при температуре 2 – 8 °С не более 1 года при регулярном пересеве каждые 2 – 3 мес.

Контрольные штаммы бактерий. При определении специфической активности готовых препаратов бактериофагов в качестве контрольных отбирают штаммы из коллекции производственных штаммов бактерий. Они не должны использоваться при производстве данной серии препарата.

Маточные бактериофаги. Для получения фаговых препаратов используются только вирулентные бактериофаги. Их выделяют из природных источников – клинического материала, сточных вод, почвы, пассируя на штаммах гомологичных видов бактерий – свежевыделенных и производственных. Подбирают высоко активные расы (штаммы) фагов к слаболизирующим и фагорезистентным штаммам бактерий. Пополнение производственных фаговых рас различными штаммами из природных источников позволяет преодолевать первичную фагоустойчивость возбудителей.

Маточные бактериофаги должны включать только вирулентные фаги с широким диапазоном действия по отношению к штаммам гомологичного вида бактерий, обладать высокой активностью, стабильностью лизиса, специфической направленностью антимикробного действия и высокой «урожайностью». Характеристика кандидатных фаговых рас (штаммов) при отборе может быть дополнена электронно-микроскопическим изучением их морфологии и другими современными молекулярно-биологическими методами (например, методом секвенирования – определения последовательности фаговой ДНК). Хранение производственной коллекции бактериофагов осуществляется на гомологичных бактериальных штаммах при температуре от 2 до 8 °С в течение 5 лет с ежегодным пересевом.

Работа с производственными штаммами бактерий и бактериофагов, а именно регулярное пополнение производственных бактериальных штаммов за счет клинических изолятов и подбор к ним фаговых рас из природных

источников, обеспечивает возможность адаптации лечебно-профилактических бактериофагов к циркулирующим возбудителям бактериальных инфекций. Таким образом, возможен выпуск производственных серий бактериофагов целевого назначения. Например, при вспышке или в очаге инфекции, обусловленной фагоустойчивым возбудителем, передача на производство эпидемически значимого бактериального штамма позволит адаптировать препарат из бактериофагов к конкретным эпидемиологическим условиям.

Диапазон действия лечебно-профилактических бактериофагов, их активность в отношении современных возбудителей бактериальных инфекций во многом зависят от организации сбора клинических штаммов.

Краткое описание технологического процесса

Производственный процесс включает следующие основные этапы: работа с возбудителями гнойно-септических и кишечных бактериальных инфекций, подбор к ним активных фаговых рас, работа с коллекцией производственных бактериальных штаммов, регулярно пополняемых свежевыделенными бактериями.

Культивирование бактериофагов проводят в реакторах (ферментерах) путем посева производственных штаммов бактерий и маточных фагов, содержащих несколько высокоактивных фаговых рас. После завершения процесса фаголизиса для очистки фаголизатов от фрагментов бактериальных клеток, их метаболитов, в том числе энтеротоксинов и белковых компонентов питательной среды, культуральную суспензию пропускают через микрофльтрационные установки. Полученный фаголизат подвергают ультрафильтрации и концентрированию с последующей стерилизующей фильтрацией. Далее из полученного стерильного концентрата фаголизатов готовят жидкий препарат путем разведения 0,9 % раствором натрия хлорида со стабилизаторами или получают лиофилизированную биомассу, предназначенную для получения таблеток (лиофилизируя концентрат фаголизатов при соответствующих условиях).

В процессе производства бактериофагов оценивают качество исходных, промежуточных и окончательных продуктов на следующих основных этапах и тестах.

1. Подготовка производственных штаммов бактерий – контроль посевных культур бактериальных штаммов-продуцентов:

- а) на чистоту;
- б) типичность биологических свойств;
- в) на отсутствие лизогении.

2. Подготовка маточных бактериофагов – контроль маточных бактериофагов:

- а) на содержание фаговых частиц в 1 мл, определяемое методом агаровых слоев по Грациа;
- б) на специфическую активность, определяемую титрованием в жидкой питательной среде по методу Аппельмана на посевных бактериальных штаммах;
- в) на стабильность лизиса (сохранность полученных результатов лизиса по методу Аппельмана) в течение 48 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- г) на стерильность.

В завершающей стадии культивирования в реакторах наступление полного фаголизиса определяют визуально по отсутствию видимого бактериального роста.

По мере завершения очистки фаголизатов методом ультрафильтрации, концентрирования и стерилизующей фильтрации проводится определение следующих показателей: рН, стерильность, специфическая активность по методу Аппельмана, аномальная токсичность.

При производстве комбинированных препаратов готовые монофаги соединяют в реакторах при соблюдении асептических условий.

Для получения жидкого препарата после финальной стадии бактериофаг разливают по флаконам и укупоривают.

Для получения препаратов в таблетках:

а) в концентрированный бактериофаг добавляют стабилизаторы и лиофилизируют. Сухую массу бактериофага контролируют в тестах на специфическую активность и микробиологическую чистоту;

б) после добавления наполнителей проводится таблетирование. В качестве вспомогательных веществ используют пектин, кальция глюконат, глюкозу, тальк, кальция стеарат. Таблетки проверяют на ломкость, отсутствие дефектов (сколов, расслоений), определяют среднюю массу таблеток;

в) после завершения фасовки таблеток готовый продукт контролируют по всем показателям: описание (внешний вид таблеток), подлинность и специфическая активность, средняя масса таблетки, распадаемость, потеря в массе при высушивании, микробиологическая чистота, аномальная токсичность.

К специфическим методам исследования, используемым для характеристики лечебно-профилактических бактериофагов, относятся методы Аппельмана и Грациа.

Определение специфической активности бактериофагов и стабильности лизиса по методу Аппельмана

Специфическую активность бактериофагов и стабильность лизиса по методу Аппельмана определяют с использованием гомологичных тест-штаммов бактерий (контрольных штаммов). Показатели специфической активности указывают в фармакопейной статье. Контрольные штаммы отбирают из коллекции производственных штаммов бактерий. Они не должны использоваться при производстве данной серии препарата. Состав питательного бульона указывают в фармакопейной статье на определенный фаговый препарат.

Методика анализа

Испытания проводят с соблюдением правил асептики. В пробирках, содержащих по 4,5 мл питательного бульона (МПБ, бульона Хоттингера), готовят ряд последовательных десятикратных разведений бактериофага от

10^{-1} до 10^{-6} – 10^{-9} (в зависимости от показателей специфической активности, заложенных в фармакопейную статью на конкретный фаговый препарат) с обязательной сменой пипеток при каждом разведении. Для приготовления первого разведения добавляют 0,5 мл образца препарата к 4,5 мл бульона. В качестве контроля используют пробирку с 4,5 мл бульона без фага. После этого во все пробирки с полученными разведениями бактериофага пипеткой вносят по 0,03 мл взвеси суточной агаровой культуры бактерий, содержащей 10^9 микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности (10 МЕ). Результаты учитывают через (18 ± 1) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С. Возможно изменение длительности инкубации в зависимости от видовых особенностей роста бактериальной мишени фагового препарата, о чем указывают в фармакопейной статье. Результат определяют по отсутствию видимого роста бактерий в присутствии бактериофага. Активность бактериофага обозначают отрицательной степенью десяти, где степень указывает последнее разведение бактериофага, в котором рост контрольного штамма визуально не наблюдается. Для определения стабильности лизиса срок инкубации продлевают до 2 сут.

Определение фаговых частиц в 1 мл по методу Грациа (на плотных питательных средах двухслойным методом)

Мясопептонный 1,5 % агар разливают в чашки Петри по (20 ± 2) мл (первый слой). Перед использованием чашки с агаром подсушивают в перевернутом виде с прикрытой крышкой при температуре (37 ± 1) °С в течение 30–60 мин. Для титрации используют посевные штаммы бактерий. Готовят десятикратные последовательные разведения маточного фага в МПБ по методу Апфельмана от 10^{-1} до 10^{-8} (10^{-9} или выше, в зависимости от специфической направленности бактериофага). Затем смешивают 1 мл разведенного фага из пробирок с разведениями 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} разведений с 5 мл расплавленного и остуженного до температуры 45 °С 0,7 % мясопептонного агара. Затем добавляют $(0,2 \pm 0,05)$ мл 18-часовой бульонной

культуры посевного штамма, подготовленного из суточной культуры, выращенной на плотной питательной среде, в соответствии с требованиями к производственным бактериальным штаммам. Содержимое пробирок быстро перемешивают вращением пробирок между ладонями, чтобы не произошло застывания агара, и выливают вторым слоем на поверхность 1,5 % агара в чашках Петри. После застывания верхнего слоя агара чашки инкубируют в течение 18 ч при температуре (37 ± 1) °С. Для определения концентрации фаговых частиц в маточном фаге подсчитывают количество негативных колоний (прозрачные пятна на матовом фоне глубинного роста бактерий) в каждой чашке, умножают на коэффициент разведения фага в пробирке с соответствующим разведением. Затем вычисляют среднее значение 3 определений.

Данная методика используется при отборе перспективных фаговых рас в коллекцию маточных бактериофагов. От вида бактериофагов зависит порядок применяемых в опыте разведений.

рН. Показатель рН фаголизата должен составлять от 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Стерильность. Очищенный и концентрированный фильтрат фаголизатов должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Аномальная токсичность. Введение мышам очищенного фильтрата фаголизатов не должно вызывать гибель животных. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Тест-доза препарата бактериофага в объеме 1 мл вводится животным подкожно.

ИСПЫТАНИЯ

Проводят необходимые испытания, предусмотренные для лечебно-профилактических бактериофагов в соответствующей лекарственной форме.

Описание. Приводится описание физических свойств соответствующей лекарственной формы лекарственного средства. Испытание проводят визуально.

Подлинность препарата подтверждается его специфической активностью.

pH (для растворов) – от 6,6 до 7,8. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

Извлекаемый объем (для растворов) – не должен быть менее номинального. Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем для лекарственных форм для парентерального применения».

Средняя масса и отклонения от средней массы (для таблеток). Приводятся требования к средней массе и максимально допустимые отклонения от средней массы в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Время распадаемости (для таблеток) не должно превышать 30 мин, если в фармакопейной статье на определенный фаговый препарат нет других указаний. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Бактериофаги, выпускаемые в виде кишечнорастворимых таблеток, не должны распадаться в течение 1 ч в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты и после промывания водой должны распадаться в растворе натрия гидрокарбоната (pH от 7,5 до 8,0) в течение 30 мин.

Потеря в массе при высушивании (для таблеток) должна быть не более 4,0 %, если нет других указаний в фармакопейной статье. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или ОФС «Определение воды».

Стерильность (для растворов). Препарат должен быть стерильным (категория 5БП согласно ОФС «Микробиологическая чистота»). Испытание стерильности проводят методом прямого посева или мембранной фильтрации в соответствии с ОФС «Стерильность».

Микробиологическая чистота (для таблеток) должна соответствовать категории 5.2Б согласно ОФС «Микробиологическая чистота»:

– общее число непатогенных аэробных бактерий – не более 10^2 КОЕ в единице препарата (1 г);

– отсутствие дрожжевых и плесневых грибов в единице препарата (1 г);

– отсутствие энтеробактерий в единице препарата (1 г);

– отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в единице препарата (1 г);

– отсутствие *Staphylococcus aureus* в единице препарата (1 г).

Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Аномальная токсичность. Введение мышам подкожно 1 мл препарата бактериофага не должно вызывать гибель животных. Определение проводят в соответствии с ОФС «Аномальная токсичность». Пробоподготовку препаратов указывают в фармакопейной статье на препарат.

Специфическая активность. Активность бактериофага обозначают отрицательной степенью десяти, где степень указывает последнее разведение бактериофага, в котором рост контрольных штаммов бактерий визуально не наблюдается. Нормативные требования, в том числе количество используемых контрольных штаммов (не менее 10 штаммов для монопрепаратов), указывают в фармакопейной статье на препарат. Определение проводят титрованием в жидкой питательной среде по методу Апфельмана. Методику и подготовку проб указывают в фармакопейной статье на конкретный фаговый препарат.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты». В маркировке лекарственной формы «раствор» должна быть предусмотрена предупредительная надпись «При помутнении не применять».

Транспортирование. При температуре от 2 до 8 °С, допускается при температуре от 9 до 25 °С в пределах 1 мес.

Хранение. В сухом, защищенном от света и недоступном для детей месте, при температуре от 2 до 8 °С.