

УДК 578.4; 579.678; 579.62

UDC 578.4; 579.678; 579.62

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ
ФАГОВЫХ КОКТЕЙЛЕЙ НА ОСНОВЕ БАК-
ТЕРИОФАГОВ Т4-ТИПА: ПРЕИМУЩЕСТВА
И НЕДОСТАТКИ¹**

**DESIGN OF THERAPEUTIC PHAGE COCK-
TAILS BASED ON T4-TYPE BACTERIO-
PHAGES: ADVANTAGES AND DISADVAN-
TAGES**

Никулин Никита Алексеевич

nikitakulin@gmail.com

*Институт биохимии и физиологии микроорганиз-
мов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пуццино, Россия
Вятский Государственный Университет, Киров,
Россия*

Nikulin Nikita Alekseevich

nikitakulin@gmail.com

*Institute of Biochemistry and Physiology of Microor-
ganisms of Russian Academy of Sciences, Russia
Vyatka State University, Kirov, Russia*

Кононенко Сергей Иванович

д. с.-х. н., профессор

SPIN-код: 8188-4599

AuthorID: 349808

Scopus ID:57194626841

kononenko-62@mail.ru

*Краснодарский научный центр по зоотехнии и ве-
теринарии, г. Краснодар, Россия*

Kononenko Sergei Ivanovich

Dr.Sci.Agr., Professor

SPIN-code: 8188-4599

AuthorID: 349808

Scopus ID:57194626841

kononenko-62@mail.ru

*Krasnodar Research Centre for Animal Husbandry
and Veterinary Medicine, Krasnodar, Russia*

Кошчаев Андрей Георгиевич

д. биол. н., профессор

Scopus ID:57189599222

kagbio@mail.ru

*Кубанский государственный аграрный универси-
тет им И.Т. Трубилина, г.Краснодар, Россия*

Koshchaev Andrey Georgievich

Dr.Sci.Biol., Professor

Scopus ID:57189599222

kagbio@mail.ru

*Kuban State Agrarian University named after I.T.
Trubilin, Krasnodar, Russia*

Зимин Андрей Антонович

к. б. н.

Scopus ID:7004426845

dr.zimin8@yandex.ru

*Институт биохимии и физиологии микроорганиз-
мов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пуццино, Россия
Пуцинский естественно-научный институт, г.
Пуццино, Россия*

Zimin Andrei Antonovich

Cand.Biol.Sci.

Scopus ID:7004426845

dr.zimin8@yandex.ru

*Institute of Biochemistry and Physiology of Microor-
ganisms of Russian Academy of Sciences, Pushchino,
Russia
Pushchino State Institute of Natural Sciences, Push-
chino, Russia*

В данном обзоре рассмотрены этапы конструиро-
вания терапевтических фаговых коктейлей бакте-
риофагов Т4-типа на основе работ группы иссле-
дователей из Nestlé S.A. (Vevey, Vaud, Switzerland)
под руководством Гаральда Брюссова (Dr Harald
Brüssow) – апологета фаговой терапии. Выделены
основные стадии данного процесса: анализ суще-
ствующих коктейлей, подбор фагов для препарата;
создание коллекции; исследования выращивания
бактерии-хозяина, размножения вирусов; очистка
препарата; проверка контаминации; консервация,
стабилизация и хранение; доклинические и клини-
ческие испытания. Гаральдом Брюссовым с колле-
гами на этапе анализа существующих фаговых

In the review, the stages of designing therapeutic cock-
tails of T4 type bacteriophages based on works by
Harald Brüssow from Nestlé S.A. (Switzerland) are
considered. The main stages of this process are identi-
fied: analysis of existing cocktails, selection of phages;
creating a collection; cultivation of the host bacterium,
multiplication of viruses; purification of the prepara-
tion; contamination testing; preservation, stabilization
and storage; preclinical and clinical trials. H. Brüssow
first studied the Russian drug " Coli-Protelus bacterio-
phage " of "Microgen" with the help of metagenomic
analysis, electron microscopy and conducted its clini-
cal studies. Prof. Brüssow considered the advantages
of T4 bacteriophages for the treatment of Escherichia

¹ Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ по проекту

коктейлей изучен российский препарат “Бактериофаг Коли-протейный” фирмы “Микроген” такими методами как метагеномный анализ, трансмиссионная электронная микроскопия. Ими также проведены клинические исследования данного фагового коктейля. На этапе подбора фагов для препарата профессором Брюсовым рассмотрены преимущества бактериофагов Т4-типа для лечения инфекций, вызванных кишечной палочкой. На этапе исследований выращивания бактерии-хозяина, размножения вирусов Гаральдом Брюсовым с коллегами исследованы методы культивирования в больших колбах Эрленмейера, в инженерном биореакторе, в одноразовых мешочных культиваторах. В качестве способов очистки ими были изучены хроматография, центрифугирование и фильтрация, осаждение полиэтиленгликолем. Для быстрой проверки контаминации фаговых коктейлей предложен метод масс-спектрометрии. На этапе стабилизации препаратов Гаральдом Брюсовым были рассмотрены основные стратегии, такие как лиофилизация, распылительная сушка, образование микрокристаллов и микросфер и др. Также профессором с коллегами рассмотрены результаты проведенных клинических исследований фаговых коктейлей. Нами были указаны проблемы отбора штаммов бактериофагов Т4-типа с точки зрения современных знаний. Таким образом, Гаральдом Брюсовым с коллегами проведена огромная работа по изучению конструирования фаговых коктейлей на основе бактериофагов Т4-типа, а также выявлены проблемы современного состояния фаговой терапии

Ключевые слова: БАКТЕРИОФАГИ, E. COLI, КОЛИБАКТЕРИОЗ, ФАГОТЕРАПИЯ

coli infections. Researchers studied methods of cultivation in Erlenmeyer flasks, in a bioreactor, in disposable sack cultivators for the propagation of viruses. For its purification the chromatography, centrifugation, filtration and polyethylene glycol precipitation were studied. To quickly check the contamination of phage cocktails, a mass spectrometry method is proposed. Researchers considered basic strategies, such as lyophilization, spray drying, the formation of microcrystals and microspheres to stabilize the preparations. They also reviewed the results of clinical trials of phage cocktails. We have listed the problems of selecting T4 bacteriophages from the point of view of modern knowledge. H. Brüßow and his colleagues carried out an interesting work on the construction of phage cocktails based on T4 type bacteriophages, and also revealed the problems of the current state of phage therapy

Keywords: BACTERIOPHAGES, E. COLI, COLIBACILLOSIS, PHAGE THERAPY

Doi: 10.21515/1990-4665-133-063

Введение. С момента открытия бактериофагов в начале XIX века они внесли значительный вклад в исследование генетики и экологии бактерий. Бактериофаги широко используются в различных методах медицинской практики, молекулярной биологии и генной инженерии. Данные вирусы являются естественными враги бактерий, которые зарекомендовали себя как лучшие антибактериальные биологические агенты из-за их способности лизировать бактериальные клетки хозяина, тем самым помогая в предотвращении и контроле заболеваний. Наборы бактериофагов – это популярный инструмент для дифференциации бактериальных изолятов, а также для выявления и характеристики штаммов, связанных с вспышками

инфекций, вызванных бактериями родов *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia* и *Listeria*. Фаги были выделены из образцов пищевых продуктов животного происхождения на животноводческих фермах. Бактериофаговая терапия также помогает бороться с различными бактериальными инфекциями домашней птицы. Безопасность вирусов бактерий при их применении в терапии привела к популяризации этого направления в медицине и ветеринарии.

За последние десятилетия этот интерес существенно вырос. Это обусловлено значительными трудностями при лечении заболеваний человека и сельскохозяйственных животных, вызванными мультирезистентными к антибиотикам штаммами патогенных бактерий. Устойчивость к антибиотикам – серьезная проблема в современной медицине и ветеринарии, но она не подразумевает резистентность к лизису фагами. Литические бактериофаги способны убивать бактерии, устойчивые к антибиотикам, в конце цикла фаговой инфекции. Фаговая терапия потенциально является серьезной альтернативой терапии антибиотиками. Однако существуют трудности антибактериальной фаговой терапии, связанные с расширением знаний о природе фага и влиянии на хозяина. Необходимо подробное исследование методов отбора штаммов бактериофагов для терапии, разработка биотехнологических приемов производства фаговых препаратов.

Отсутствие таких исследований в предыдущие годы было одной из причин отказа от фаготерапии, несмотря на то, что она давно известна. Перспективные результаты последних исследований заставили нас с нетерпением ждать бактериофаговой терапии, которая может применяться в более широких масштабах и впоследствии применять ее на практике.

Группа исследователей из корпорации Nestle Inc. под руководством проф. Г. Брюссова, более 15 лет активно проводит исследования в области фаговой терапии с использованием бактериофагов T4-типа. Эти исследователи опубликовали в международных научных журналах несколько де-

сятков очень интересных статей на темы бактериофагии и фаговой терапии. До сих пор этот опыт исследователей из швейцарской корпорации никак не обсуждается в России, хотя Россия одна из немногих стран мира, где в любой аптеке можно купить препарат для антибактериальной терапии на основе фагов. Авторы данного обзора попытались заполнить эту брешь и провести исследование работ данной группы коллег, специалистов в области бактериофагии из Nestle Inc.

1. Доктор Гаральд Брюссов

Свою докторскую степень по вирусологии Гаральд Брюссов получил в Институте Биохимии Макса Планка. Тогда он присоединился к Nestlé Research Center в Луизиане, где он работал в группе отдела исследований по вопросам питания и здравоохранения. Его основные интересы были направлены на исследование биологических подходов лечения детских заболеваний. Он исследовал использование антител из молока коров для создания пассивного иммунитета, направленного против ротавирусов и использование лактобацильных антибиотиков против бактериальной диареи. Параллельно с этим, Брюссов провел серо-эпидемиологические исследования национального состояния здоровья в Эквадоре, где он изучал влияние недостаточности питания на иммунный ответ против инфекционных заболеваний у детей раннего возраста. Впоследствии он стал интересоваться бактериофагами, он рассматривал вопросы, связанные с их геномом, профилактикой заражения фагами при промышленной ферментации пищевых продуктов, использованием их в качестве противомикробного средства против бактериальных инфекций. Гаральд Брюссов является автором более 130 научных публикаций, книг, членом редакционной коллегии журналов “The Journal of Bacteriology”, “Applied and Environmental Microbiology” и “Microbial Biotechnology” [1].

Гаральдом Брюссовым была проведена огромная работа в изучении возможного использования T4-подобных фагов в фаговой терапии: начи-

ная с лабораторных исследований самих фагов, рассмотрения существующих фаговых коктейлей, заканчивая лабораторными биотехнологическими исследованиями, вопросами промышленного производства и клиническими испытаниями.

2. Исследование фаговых коктейлей

В 2012 году Гаральд Брюссов обратил внимание на то, что на данный момент Запад недостаточно готов к производству коммерческих препаратов для фаговой терапии. Также он отметил, что с другой стороны в России данный метод является медицинской реальностью, имеются несколько фирм, которые занимаются производством фаговых коктейлей, особенно он отметил фирму “Микроген” из России. У них имеется широкий ассортимент препаратов, которые используются для борьбы с различными бактериальными инфекциями. Однако проблема заключается в том, что Микроген не публикует исследования их препаратов или информацию о клинической эффективности. Таким образом, становится трудно оценить значение этих фаговых коктейлей для заявленного применения [2]. По этой причине Nestle´ Research Center взял фаговый препарат против *Escherichia coli* фирмы “Микрогена” для исследования.

Брюссов вместе с коллегами изучали препарат “Бактериофаг Коли-протейный” фирмы “Микроген” РФ.

2.1. Исследование препарата “Бактериофаг Коли-протейный” с помощью ТЭМ

Для начала ими проводилась электронная микроскопия. Коммерческий коктейль концентрировали при помощи центрифугирования на средней и высокой скорости. Полученный препарат фагов с примесями бактериальных мембран микроскопировали. Было обнаружено два основных морфотипа бактериофагов: *Podoviruses*, представленные T7-подобными фагами, *Mioviruses*, представленные T4-подобными.

2.2. Метагеномные исследование препарата “Бактериофаг Коли-протейный” с помощью ТЭМ

Далее проводился метагеномный анализ. Сначала из Коли-протейного препарата выделяли неочищенный вирусный осадок дифференциальным центрифугированием, затем ДНКазы удаляли неинкапсулированную в вирион ДНК, после получали экстракт при помощи фенола и хлороформа и проводили секвенирование технологией Illumina [3].

Полученные парноконцевые риды размером 100 п.н. очищали от низкокачественных и неоднозначных последовательностей для создания наборов чтения. Далее удалялись повторы со 100% идентичностью, полученные неповторяющиеся парноконцевые риды использовались для референсного картирования. Далее удалялись повторы с 95% идентичностью для ускорения анализа в BLASTX (переводит последовательность нуклеотидов в аминокислотную и производит поиск схожих последовательностей) [4]. Полученные в BLASTX файлы импортировали в программу MEGAN, которая присваивает попадания для таксонов с использованием алгоритма LCA (Lowest Common Ancestor), для того, чтобы визуализировать таксономическое дерево ридов. Чтения были классифицированы как *Myoviridae* (34%), *Podoviridae* (24%), *Siphoviridae* (6%), неопознанные фаги (1%), "бактериальная" ДНК (10%), в то время как 23% не показали попаданий [5].

Для референсного картирования использовались репрезентативные геномы фагов из каждой таксономической группы, идентифицированной в MEGAN, которые были выбраны на основе дот-плот выравнивания и затем картированы при помощи неповторяющихся ридов программой SeqMan NGen. Некартированные чтения были скомпилированы и собраны *de novo* при помощи той же программы, но с другими параметрами. Они были исследованы на ближайшие гомологи при помощи BLASTN [4], используя базу данных фагов EMBL, контиги больше 10 kb были рассмотрены вруч-

ную. Были идентифицированы 17 различных групп бактериофагов. Эти анализы позволили определить, что наиболее обильным компонентом коктейля являются T7-подобные фаги, затем T4-подобные. Девять дополнительных групп также внесли важный вклад в коктейль: N4-подобные, rvb-подобные, phAPES8-подобные, MmP1-подобные, vB_EcoP_G7C-подобные, K1-5-подобные, CUS-3-подобные, phiV10-подобные, RTP-подобные фаги.

Найденные при помощи MEGAN "бактериальные" совпадения оказались мнимыми профагами, подвижными элементами ДНК *Shigella*, *Proteus*, *Escherichia coli*, интегрированными в бактериальную хромосому.

2.3. Клинические исследования препарата "Бактериофаг Коли-протейный"

После метагеномного анализа препарата были проведены исследования на добровольцах. Было задействовано 5 взрослых людей, 5 детей от 5 до 10 лет, и пять менее 5 лет, все из Бангладеша. Субъекты получали фаги в высокой концентрации, в десять раз меньшую дозу, плацебо. Каждый доброволец получал все три препарата в случайном порядке, что позволяло проводить эксперимент по обнаружению побочных эффектов на малой группе. Ни один из побочных эффектов, выявленных в процессе эксперимента, не был связан с приемом препарата. Сыпь и аллергия не наблюдались, ни один фаг не был обнаружен в крови, не обнаружено увеличение в сыворотке крови антител к фагам. Также был проведен детальный анализ микробиоты кала четырех взрослых добровольцев при помощи ПЦР и электрофореза в денатурирующем градиентном геле до и после внесения препарата. Наблюдались количественные изменения фекального состава, однако не было выявлено никакой корреляции. Действительно существенная разница регистрировалась за два дня: перед и после приема препарата, но такой же эффект был замечен и при приеме плацебо.

Таким образом, Брюсовым с коллегами было определена возможность использования электронной микроскопии для изучения фаговых коктейлей, однако в данном случае будут видны лишь вирусы с большой концентрацией. Для более детального анализа вместе с этим методом необходимо использовать метагеномные исследования.

Также, ими был отмечена специфика российской фаговой терапии. Для создания коктейлей используются постоянно обновляемые штаммы, при этом старые удаляются, чтобы адаптировать препарат к изменению эпидемиологической ситуации. Данный факт может объяснить полученные негативные результаты действия фагового препарата в Бангладеше. Однако это может в последующих исследованиях стать проблемой, ведь достаточно сложно подобрать универсальное средство, которое бы подходило для эпидемиологической ситуации разных регионов. Также Гаральд Брюсов с коллегами говорят о том, что современные знания относительно взаимодействия фага и бактерии в кишечнике достаточно фрагментированы [6]. Лишь совместное изучение различных стратегий создания фаговых коктейлей (западных и российских) в клинических испытаниях позволит увидеть сложные взаимодействия в системе клетка-вирус [7].

3. Создание и производство препаратов на основе T4-подобных фагов

Для создания и производства препаратов для фаговой терапии необходимо осуществить большое количество исследований: начиная с исследования специфики штаммов, лабораторных исследований, заканчивая лабораторными биотехнологическими исследованиями и клиническими испытаниями.

3.1. Специфика T4-подобных фагов

Положительные стороны. Выбор в качестве объекта фагов T4-типа обусловлен рядом соображений. Во-первых, *Escherichia coli* является возбудителем таких заболеваний как детская диарея, диарея путешественников, инфекции мочевыводящих путей, менингита, дизентерии. Часто

штаммы являются устойчивыми к действию антибиотиков или же нужной вакцины не бывает в наличии.

Кроме того, научная основа для использования данных бактериофагов очень хорошо подготовлена: *Escherichia coli* и ее фаг Т4 принадлежат к наиболее охарактеризованным биологическим моделям, например, диарея, вызываемая кишечной палочкой, является одним из самых определенных инфекционных заболеваний в молекулярном и эпидемиологическом плане.

Т4-подобные фаги имеют множество свойств, которые позволяют использовать их в фаговой терапии. Они специфически адсорбируются на клетках кишечной палочки и реплицируются внутри нее, производят потомство, которое, после того как будет индуцирован фаговый лизис, выпускаются из клетки и могут инфицировать здоровые бактерии, тем самым усиливая бактериофаг. Вирусы Т4-типа не имеют лизогенного состояния и не трансдуцируют таким путем бактериальную ДНК. Биоинформационными методами показано отсутствие у них нежелательных генов. Также они показывают высокий титр в ферментерах [8].

Бактериофаги, как правило являются видоспецифичными или даже штаммоспецифичными, что дает им огромное преимущество перед антибиотиками, которые поражают не только целевой патоген, но и комменсальную микрофлору [9].

Кроме положительных сторон для фаговой терапии, стоит отметить отрицательные.

Отрицательные стороны. Благодаря наличию относительно большого числа аннотированных геномов Т4-родственных бактериофагов, появилась возможность изучать данные вирусы с точки зрения пан-генома – глобального репертуара генов родственных организмов [10]. Данный способ был охарактеризован Теттелиным на бактериях [11].

Существует несколько вариантов выделения частей геномов по отношению к пан-геному, в основном можно отметить два элемента: кор-

геном – консервативная часть генома, присутствующая у подавляющего большинства родственных организмов, с различной степенью гомологичности генов, продукты которых отвечают за основные функции жизнедеятельности организмов; пластичный геном – вариативная часть, гены присутствуют в большей или меньшей степени у родственных организмов, функции различны, часть не охарактеризована.

Как известно, геном фагов является мозаичным [12]. При изучении пан-генома T4-подобных вирусов было показано, что большинство генов, относящихся к пластичной части, и некоторая часть, относящаяся к консервативной (квазикоргены [10]), способны “выпадать” из ДНК. При этом они образуют форму кольца за счет инвертированных повторов. Кроме открытых рамок считывания, такие элементы содержат регуляторные, что позволяет им, при встраивании в геном, начать транскрибироваться, без нарушения целостности генетического аппарата организма. Была показана такая возможность, на примере родственных бактериофагов. Некоторые гомологичные гены, находившиеся в инвертированном положении относительно друг друга, осуществляли продукцию белка, без нарушения процесса синтеза. Кроме одиночных вставок, делеций, инверсий, перестановок, была показана возможность передачи блоков генов [13,14]. Таким образом, одной из возможных причин мозаичности геномов фагов может являться данный процесс. К сожалению, механизм этого явления на данный момент не известен.

Встал вопрос, о возможности передачи и экспрессии генов не только у родственных бактериофагов, но и от вируса бактерии-хозяину за счет данного процесса. Также появляется сомнение, относительно способов подбора вирусов для фаговых коктейлей, которые используются в настоящее время.

Бактериофаг T4 содержит гидроксиметилцитозин в составе своей ДНК вместо цитозина и не способен к трансдукции, но так называемый

«цитозиновый мутант» этого фага GT7 (general transducer alc7) является эффективным переносчиком ДНК между штаммами *E.coli* [15,16]. Данный мутант был получен в лаборатории и отличается от фага T4 дикого типа по семи генам [15]. Появление в природе данного мутанта соответственно имеет вероятность 10^{-28} – 10^{-56} . Но бактериофаги T4-типа, относящиеся к так называемым «псевдо-T-четным бактериофагам» (это таксономически две группы фагов: RB43-подобные и RB49-подобные подсемейства *Tevenvirinae*, семейства *Myoviridae*) не содержат цитозина в своей ДНК и являются эффективными трансдюсерами [17,18]. Они способны с частотой до 10^{-4} переносить детерминанты резистентности бактерий к антибиотикам в составе плазмид от одного штамма *E.coli* к другому. Более того они способны к эффективной трансдукции пар плазмид [18]. То есть при выборе фага для терапии необходимо четко отделить бактериофаги данных групп от ближайших родственников самого T4, которые можно применять для терапии. В случае включения данных фагов T4-типа в терапевтический препарат можно столкнуться с актом быстрого распространения как генов устойчивости к антибиотикам, так и других детерминант патогенности в кишечнике пациента или подвергаемого лечению таким препаратом животного. Селекция штаммов бактериофагов на их принадлежность к различным группам внутри подсемейства *Tevenvirinae* может быть проведена с помощью специфичного ПЦР или секвенирования геномов. Последнее на сегодняшний день является международной нормой для предложения фагов для лечебного препарата. После таксономического определения штамма T4-фага также необходимо провести экспериментальное исследование на наличие или отсутствия у него способности к трансдукции генетического материала.

3.2. Создание коллекции и первичные исследования

Брюсовым и коллегами была создана коллекция T4-подобных фагов, которая включает в себя 99 штаммов. Бактериофаги были получены из

образцов стула больных диареей, здоровых детей, образцов сточных вод, водных источников из Бангладеша и Швейцарии [19].

Была проведена ПЦР-диагностика и электронная микроскопия этих вирусов. Анализ позволил выделить три основные группы: 45 фаговых изолятов кластера T4D, 14 ассоциированных с RB69, 36 изолятов представляющих подгруппу фага JS98. Также один бактериофаг представлял подгруппу RB49-подобных. Для выявления принадлежности к T4-подобным фагам использовали метод ПЦР с вырожденными праймерами для определения наличия гомологов гена *g23* [20]. Он относится к консервативной части пан-генома вирусов T4-типа, кодирует главный белок головки. Отношение к определенной подгруппе определяли по последовательностям ПЦР-продуктов [21].

Также было проведено секвенирование методом Illumina для создания ридов длиной 50 п.н., картирование при помощи Seqman NGen и анализ на конфликтность, дублирование. Некартированные неповторяющиеся чтения были исследованы при помощи сборки *de novo* и той же программы и BLASTN с базой данных EMBL. Помимо этого был проведен поиск нежелательных генов при помощи трех баз данных: внутренней DUG, общедоступных ARDB [22], VFDB [23]. Две последние базы совпадений не нашли, а первая нашла 66. 55 из них относились к генам синтеза холина, лизина, элементов адгезии хвоста фага, сборки хвоста, интегразы, транспозазы. 11 включали гены транспорта метаболитов, регуляции транскрипции, фактора элонгации. Также у этих изолятов бактериофагов был найден ген устойчивости к акридину, но он не является фактором устойчивости к антибиотикам.

Для оценки биологической безопасности на животных использовались обычные и стерильные мыши, моноколонизированные непатогенными устойчивыми и неустойчивыми мечеными штаммами кишечной палочки. Фаги с концентрацией от 10^3 до 10^6 вирионов на мл поступали в них

вместе с питьевой водой. Обычным мышам также добавлялись восприимчивые к фагам и меченные геном устойчивости к ампициллину штаммы. При гистологическом исследовании не было обнаружено повреждения слизистых. При изучении стерильных мышей с неустойчивым штаммом показатели титра были такие же, как при экспериментах *in vitro*. Репликация же фагов у обычных прошло слабее (300 кратное увеличение титра по сравнению со стерильными с устойчивой кишечной палочкой). Бактериофаг был обнаружен при низких титрах в тонкой кишке и с высокими титрами в слепой кишке и ободочной кишке, но его нет в крови [24]. Таким образом, можно сделать вывод, что T4 фаги действительно достаточно специфичны, воздействует только на своего хозяина, а также локализуются только в кишечнике и не оказывают вредного эффекта.

Для оценки биологической безопасности данных фагов на людях был создан коктейль из 9 изолятов коллекции и применен на здоровых взрослых добровольцах из Бангладеша. Вирусами заражали непатогенные штаммы *Escherichia coli* K12 и изолировали потомство с помощью центрифугирования и стерильной фильтрации. Основываясь на предыдущем тестировании швейцарских взрослых, которым вводили перорально с $3 \cdot 10^7$ БОЕ общего количества фагов, в следующем эксперименте [25] дозу увеличили в 100 раз, чтобы проверить возможность побочных эффектов, прежде чем расширять тест и испытывать коктейль на госпитализированных детях. Смесь фагов помещалась в 150 мл минеральной воды, давали 3 дозы по 50 мл через каждые 6 часов. Проводили 3 испытания: высокая доза ($3 \cdot 10^9$ БОЕ), малая доза ($3 \cdot 10^7$ БОЕ) и плацебо. При помощи клинических и лабораторных тестов [21] не было установлено вредного воздействия на почки, кишечник, гематологические функции. Однако доза оказалась и в этом случае мала, недостаточной для достижения лечебного эффекта, при этом использование доз 10^{11} - 10^{12} БОЕ может представлять проблемы, связанные с финансовыми затратами и доступностью.

Г. Брюссовым и коллегами рассматривалась идея добавления бикарбоната, для нейтрализации кислотности желудка [26], но она была отвергнута, так как данная среда также задерживает патогенные микроорганизмы, тем более этот показатель у больных диареей снижен. Было также сделано предположение о том, что в случае применения данного фагового коктейля детьми более низкой дозы будет достаточно. Еще одним важным фактором является отсутствие у здоровых испытуемых основной мишени для этих специфичных штаммов, поэтому это также может быть причиной низкого титра фагов в стуле, следовательно, исследования необходимо проводить на больных диареей.

В дальнейшем был проведен эксперимент с участием больных детей Бангладеша. Данный коктейль не показал клинического преимущества перед стандартной медицинской помощью с точки зрения частоты стула, регидратации. Однако эти наблюдения необходимо интерпретировать с осторожностью, так как возможен ложноотрицательный результат, связанный с малым количеством больных, у которых диарея была вызвана кишечной палочкой, а не другими причинами. Также возможен низкий порог репликации T4 фага *in vitro* [27].

3.3. Биотехнологические лабораторные исследования

Доктором Гаральдом Брюссовым с коллегами были проведены исследования по культивированию и очистке фаговых препаратов относительно титра, уровня загрязнения, стабильности и технической доступности. Ими были использованы различные системы: колба Эрленмейера, одноразовые биореакторы Wave, перемешивающий биореактор.

Для исследования применялись фаги из коллекции, приведенные ранее. Были выбраны 11 фагов, названные NPC (Nestlé Phage Collection) 1000, 1001, 1002, 1003, 1004, 1005, 1006, 1007, 1008, 1009, и 1024, выбор основан на их пригодности для составления фагового коктейля.

3.3.1. Выращивание носителя и размножение фагов

Штаммы кишечной палочки выращивались при температуре 37°C на сердечно-мозговом бульоне и агаре, среде Херши, среде LB, среда GCA. Культуры хранили при температуре 4°C не более 30 дней. В качестве носителей выступали штаммы кишечной палочки WG5 для NPC 1003, K803 для остальных тестовых бактериофагов.

Для размножения фагов использовали рассмотренные ранее питательные среды, в которые добавляли 1% ночную бактериальную культуру и инкубировали при 37°C 2 часа. Затем заражали фаговым лизатом при MOI (отношение числа вирусных частиц, взятых для заражения, к числу заражаемых клеток) равном 10 и инкубировали, пока не происходил лизис. Затем фаги были очищены от клеточных остатков центрифугированием, после чего супернатант фильтровали.

Подсчет фагов осуществлен путем анализа бляшек в соответствии со стандартным протоколом [28].

3.3.2. Культивирование фагов в колбах Эрленмейера

При культивировании в больших колбах Эрленмейера при покачивании проводились исследования влияния питательной среды, фазы роста бактериальной культуры на конечный титр фагов, а также для дальнейшего изучения способов очистки. Выбор питательной среды (LB, бульона Херши, сердечно-мозгового) имело малое влияние на конечный титр.

Далее рассматривалось влияние фазы роста. Инфицирование клеток в ранней экспоненциальной фазе роста давало намного большие результаты, чем в лаг фазе или в поздней экспоненциальной.

3.3.3. Культивирование фагов в ферментерах

Для исследования культивирования в ферментере использовался штамм NPC 1000 и инженерный биореактор.

Среду инокулировали ночной культурой штамма K-12, инфицировали NPC 1000 с MOI равным 1. Процесс культивирования остановили через

7 часов. Нелизированные бактерии и клеточные остатки удалили центрифугированием и стерильной фильтрацией. Титр фагов подсчитывали по стандартному протоколу.

Культивирование штаммов NPC 1001, 1002, 1005 проводилось раздельно в одноразовом мешочном биореакторе с контролем pH и pO_2 .

Мешки наполняли на половину общего объема, добавляли культуру, инфицировали фагами с MOI 0,1. Процесс культивирования остановили через 4 часа.

В результате, во всех случаях был достигнут необходимый титр фагов.

3.3.4. Очистка препаратов фагов

Центрифугирование и фильтрация. Фаговые лизаты, полученные в 2-литровых колбах Эрленмейера очищались от клеточных остатков путем низкоскоростного центрифугирования и пропусканием через мембранные фильтры. Затем фаги осаждали ультрацентрифугированием. Осадок ресуспендировали в стерильной воде или фаговом буфере. Также возможно использование пролонгированного среднескоростного центрифугирования для осаждения, чтобы уменьшить механический стресс.

Так как поры мембраны приближаются к размерам фагов, была возможность их потери. Однако при сравнении титров до и после фильтрации потери были незначительны (у штаммов NPC 1002, 1003 и 1004) или их не было совсем. Однако этого нельзя сказать об ультрацентрифугировании. Потеря фага NPC 1000 была незначительной, однако NPC 1003, 1006, 1009 показывают значительное снижение титра. Особенно возникли проблемы с NPC 1003, при электронном микроскопировании обнаружилось агрегирование концов фагов друг с другом.

Потеря фагов была ожидаема из-за высокой силы тяжести. Данную проблему решили путем высокоскоростного центрифугирования через сахарозный градиент. Применение этого метода оказалось более эффектив-

ным, чем уменьшение механического напряжения путем пролонгированного среднескоростного центрифугирования.

Хроматография. Фаги NPC 1001, 1004, 1006, 1008, размноженные в больших колбах Эрленмейера, были сконцентрированы анионообменной хроматографией [29].

Преимущество этой системы в том, что, используя 8-литровые колонки, возможно получить в разумные сроки сотни литров очищенного фагового лизата без применения повышенного давления.

ПЭГ. Фаговый лизат штамма NPC 1000 из колбы Эрленмейера очищали от клеточных обломков низкоскоростным центрифугированием. Бактериофаги осаждали полиэтиленгликолем (ПЭГ) и NaCl в течение ночи при 4°C, затем собирали центрифугированием и суспендировали в фаговом буфере до получения нужной концентрации. После чего фаги экстрактировали хлороформом, осторожно переворачивая. Затем водную фазу, содержащую фаг центрифугировали и фильтровали. В данном методе использовались 2 штамма кишечной палочки: K12 и В. В результате с первого штамма удалось получить 30% от общего количества фагов, на В – 90%, причем во втором случае такое большое количество было получено экстракцией хлороформом из клеточного осадка.

3.3.5. Проверка контаминации

Для проверки возможной контаминации коктейля, а также его конечного состава в качестве быстрого метода Брюссовым была предложена масс-спектрометрия. Отмечено, что такие способы как рестрикционный анализ, секвенирование консервативных генов не могут быть использованы в данном случае.

Для проведения масс-спектрометрии фаги очищались комбинацией медленного и высокоскоростного центрифугирования, фильтрацией. В результате частицы давали простой масс-спектр с небольшим числом пиков при помощи анализа MALDI-TOF.

Затем производили анализ полученных паттернов, каждый штамм показывал свой результат. Строили дендрограмму. Полученные отношения паттернов коррелировали с результатами классификации по последовательностям гомологов гена *g23*, на основе которых выделяли подгруппы. Таким образом, метод анализа пиков масс-спектра может быть использован для проверки контаминации.

3.3.6. Консервация, стабилизация, хранение

Для консервации фага его ресуспендировали после фильтрации и центрифугирования в 0,9% NaCl и помещали на хранение при 4°C на 96 дней. Через 7, 14, 21, 28, 56, 96 дней проверялся титр по стандартному протоколу.

Было проверено, что данные фаги в большинстве своем не выдерживают температуры пастеризации и быстро теряют титр при 70°C. В холодильнике коктейль из 9 штаммов сохранял титр с малыми потерями в течение 2 лет в фаговом буфере.

Однако, во многих странах невозможно поддерживать постоянно низкий уровень температуры. Необходимо создание стабильной формы фагового коктейля.

Большинство препаратов бактериофагов являются простыми суспензиями, и мало было проведено исследований по разработке лекарственных форм, которые необходимы при проведении дальнейших испытаний. По мнению Брюссова, фаги можно рассматривать как большой белковый комплекс, обрамляющий генетическое ядро, поэтому логичным шагом, является использование хорошо изученных стратегий стабилизации, используемых для белковых препаратов: лиофилизация, спреи, мази, биоразлагаемые полимерные матрицы, микрочастицы. [30].

Стоит отметить, что в исследовании создания фагового коктейля на основе вирусов из коллекции Nestlé Research Center, рассмотренном ранее, для стабилизации в суспензию добавляли Mg^{2+} , в результате чего препарат был

способен поддерживать хороший титр при 30°C в течение месяца. Показанные далее стратегии стабилизации были проверены на других вирусах.

Лиофилизация.

Для защиты фаговых частиц от деструктивного воздействия процесса лиофилизации использовали лецитин, яичный белок, дрожжевой экстракт и другие органические экстракты. Полученные в результате порошки сохраняли стабильность 12 месяцев при 37°C в присутствии осушителя [31–35].

В некоторых других исследованиях фаги иммобилизовали на различных мембранах (целлюлоза, полиэфирамид). Использовали лиофилизованные порошки. Титр фагов в полученных порошках и таблетках оставался стабильным в течение 12 месяцев [36–38]. Основным фактором поддержания такой стабильности во всех случаях являлось сохранение низкой влажности.

Распылительная сушка. Данный метод позволяет превратить жидкие составы в сухие порошки, которые можно возможно восстановить для инъекций или нанесения на раневую поверхность или использовать для создания таблеток, пилюль, специальных бинтов. В основном распылительную сушку используют для придания стабильности. Наилучшим стабилизатором при таком методе показала себя трегалоза. Считается, что при взаимодействии с фаговой частицей она создает водородные связи (теория замены воды), образуя стабильное аморфное трегалозное стекло с высокой температурой стеклования (теория стеклования). Аморфная матрица замедляет молекулярную подвижность капсидных белков вириона и другие вредные химические процессы. В последующих исследованиях стабильности титра фага при длительном хранении было показано, что высокая влажность вызывала кристаллизацию аморфной трегалозы с понижением титра. Таким образом, при использовании распылительной сушки в каче-

стве метода увеличения стабильности, фаги наиболее устойчивы при охлаждении в отсутствие влажности [39, 40].

Микрокристаллы и микросферы.

При инкапсулировании фагов, например, в водорастворимый биоразлагаемый полимер, они могут образовывать микрочастицы, которые проще контролировать. Однако исследования микрокристаллов и микросфер не показывают значительных результатов, так как при хранении происходит потеря титра относительно быстро (не более 6 недель при 4°C) [41-43].

Помимо приведенных стратегий, также возможно создание мазей, ПЭГелирование фагов, и некоторые другие, но в практике на данный момент они не находят применения [30, 44, 45].

4. Клинические испытания

Гаральд Брюссос с коллегами отмечают, что большое число первой и второй фазы клинических испытаний фаговой терапии завершены. Они показывают, что фаговые коктейли не проявляют заметных побочных эффектов. Хотя до сих пор остаются проблемы, связанные с их эффективным действием, они остаются перспективны для будущих третьих фаз.

I и II фаза клинических испытаний. Несмотря на возобновленный интерес к фаговой терапии, о чем свидетельствуют недавние комментарии в ведущих научных журналах, таких как Nature [46, 47] и существенного количества обзорной литературы о фаговой терапии, немногие клинические испытания продвинулись к II фазе на Западе. На самом деле, только несколько фагов, прошедших терапевтические испытания, зарегистрированы на сайте Клинических Испытаний Национальных Институтов Здравоохранения США.

III фаза клинических испытаний. До сих пор нет хорошо задокументированных исследований III фазы на Западе. Единственные убедительные доказательства эффективности фаговой терапии являются резуль-

таты большого клинического испытания, проведенного полвека назад, в котором проводился III этап клинических исследований [30].

5. Проблемы, связанные с промышленным производством

Для возможности использования бактериофагов в качестве лечебного средства, их крупномасштабное культивирование должно быть недорогим, при этом необходимо обеспечивать достаточный лабораторный и производственный уровень. Недорогие питательные среды должны содержать только добавки пищевого качества.

Самые большие затраты, по мнению доктора Брюссова и коллег, идут даже не на культивирование фагов и бактерий, а на очистку. Достаточно сложно придумать какой метод может подойти для развивающихся стран, которым наиболее необходима фаговая терапия, особенно связанная с лечением диареи. Наиболее вероятными можно считать среднескоростное центрифугирование, очистку ПЭГ.

Большие объемы, содержащие высокий титр фагов, могут быть получены для некоторых T4-подобных и в стандартных условиях биотехнологической промышленности. Стерильный препарат можно получить путем пропускания через 0,2 мкм мембранные фильтры. Проблему, связанную с районированием эпидемиологической ситуации можно решить следующим образом: выделить преобладающие патогены и выбрать оптимальные для этого хозяина фаги из коллекции [48].

Заключение

В данном обзоре было рассмотрено конструирование фаговых коктейлей на основе T4-подобных бактериофагов на примере многочисленных работ группы профессора Гаральда Брюссова, который в течение ряда лет уделял особое внимание как бактериофагии в целом, так и специфично использованию бактериофагов T4-типа в терапии.

Были отмечены следующие этапы данного процесса: анализ существующих коктейлей, подбор фагов для препарата; создание коллекции; ла-

бораторные и опытно-промышленные исследования выращивания бактерии-хозяина, размножения вирусов; очистка препарата; проверка контаминации; консервация, стабилизация и хранение; доклинические и клинические испытания. Рассмотрены проблемы производства, связанные с различными этапами.

При анализе существующих фаговых коктейлей были использованы следующие методы: электронная микроскопия, метагеномный анализ, а также проведены испытания на мышах и людях (не было упомянуто в обзоре). В результате, было определено наличие в российских препаратах вирусов бактерий различных групп. Это связано с методикой отбора в нашей стране фагов для коктейлей. Испытания на мышах и людях показали, что препараты не вызывают побочных действий. Также, исследования выявили районную специфичность фаговых коктейлей, которая зависит от эпидемиологической ситуации. Таким образом, при конструировании препарата, используя различные стратегии подбора штаммов, необходимо следить за изменением патогенной микрофлоры и вовремя менять состав.

При выборе штаммов, T4-подобные фаги являются одними из самых перспективных по ряду причин. Во-первых, это относительная достаточная изученность самих вирусов, их хозяев, инфекционных процессов, которые они вызывают. Во-вторых, бактериофаг T4 является одним из преобладающих в биосфере. В-третьих, данная группа представлена литическими фагами, у которых отсутствует процесс лизогении, а, следовательно, связанная с ней трансдукция, из-за чего понижается вероятность горизонтального переноса генов. Однако, следует отметить, что имеются важные замечания к данному пункту. T4-бактериофаги способны к псевдолизогении, а также к трансдукции. Кроме этого, они имеют мобильные регуляторные генетические элементы, которые могут участвовать в горизонтальной передаче генов, что в скором времени станет понятным. Таким образом, на данный момент не существует оптимального метода подбора штаммов

бактериофагов, который бы позволял учесть все возможные отрицательные характеристики вирусов для фаговой терапии. Изучение пан-генома данных вирусов в будущем позволит улучшить понимание механизмов экологического взаимодействия в системе клетка-вирус, что является главным пунктом подбора штаммов.

Для создания коллекции, в случае кишечных заболеваний, одним из основных источников фагов являются водные объекты, особенно сточные воды по понятным причинам (большая концентрация отходов биологических процессов), в случае других инфекционных заболеваний, вызванных бактериями, предпочтительнее биологические материалы, собранные в учреждениях здравоохранения. После выделения и очистки вирусов в коллекцию отбираются наиболее предпочтительные штаммы. Таким образом, можно отметить, что выбор и исследование объекта для отбора проб является важным этапом конструирования фаговых коктейлей. Необходимы комплексные знания в таких отраслях как биогеохимия, гистология, даже технология (например, при исследовании фагов сточных вод очистных сооружений, при отборе проб из резервуаров различных этапов очистки).

Лабораторные и опытно-промышленные исследования выращивания бактерии-хозяина, размножения вирусов проводились в колбах Эрленмейера, инженерном биореакторе, одноразовом мешочном биореакторе. Каждая система показала свою состоятельность. Каких-либо проблем не было выявлено.

В качестве методов очистки были исследованы следующие способы: ультраскоростное, среднескоростное, низкоскоростное центрифугирования, фильтрация, хроматография, очистка ПЭГ. Были определены потери, а также способы их уменьшения. В итоге, наиболее оптимальными методами являются очистка ПЭГ и среднескоростное центрифугирование, если также учесть затраты. Однако, в любом случае, очистка является одной из

самых больших проблем. Таким образом, данный этап конструирования фаговых коктейлей требует дальнейшего рассмотрения.

Для проверки контаминации препарата был предложен метод масс-спектрометрии, так как получаемая в итоге дендрограмма паттернов пиков вирусов коррелирует с взаимоотношением родственных фагов. Также этот способ является достаточно быстрым.

При рассмотрении стабилизации и хранения фагов были выделены следующие методы: лиофилизация, распылительная сушка, микрокристаллы и микросферы. Наиболее эффективным способом является лиофилизация, позволяющая сохранить стабильный титр вирусов максимально в течение 12 месяцев.

Исследование клинических испытаний показывает, что большинство I и II фаз завершено. Однако большинство фаговых коктейлей показали отрицательный результат с точки зрения терапевтического действия. На данный момент известен всего один случай проведения III фазы, которая хорошо документирована. Таким образом, необходимо дальнейшее рассмотрение процесса конструирования фаговых препаратов.

В целом, исследование подходов к конструированию фаговых коктейлей является перспективным направлением, в связи с широким распространением мультирезистентных к антибиотикам бактерий. Современные методики позволяют найти ошибки в ранее созданных препаратах, провести анализ и создать в будущем действительно качественные препараты с необходимым терапевтическим действием для лечения и профилактики колибактериозов у людей и сельскохозяйственных животных.

Список литературы

1. [Electronic resource]. URL: <https://www.unige.ch/medecine/frontiers-in-biomedicine/brussow> (Access date: 09.30.2017)
2. Brüssow H. What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? //Virology. – 2012. – Т. 434. – №. 2. – С. 138-142.

3. Mardis E. R. Next-generation sequencing platforms //Annual review of analytical chemistry. – 2013. – Т. 6. – С. 287-303.
4. Altschul S. F. et al. Basic local alignment search tool //Journal of molecular biology. – 1990. – Т. 215. – №.3. – С. 403-410.
5. Huson D. H., Mitra S. Introduction to the analysis of environmental sequences: metagenomics with MEGAN //Evolutionary Genomics: Statistical and Computational Methods, Volume 2. – 2012. – С. 415-429.
6. Brüßow H. Bacteriophage–host interaction: from splendid isolation into a messy reality //Current opinion in microbiology. – 2013. – Т. 16. – №. 4. – С. 500-506.
7. McCallin S. et al. Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects //Virology. – 2013. – Т. 443. – №. 2. – С. 187-196.
8. Miller E. S. et al. Bacteriophage T4 genome //Microbiology and molecular biology reviews. – 2003. – Т. 67. – №. 1. – С. 86-156.
9. Sarker SA, Brüßow H. From bench to bed and back again: phage therapy of childhood Escherichia coli diarrhea. Ann N Y Acad Sci. 2016 May;1372(1):42-52. doi: 10.1111/nyas.13087. Epub 2016 May 19. PubMed PMID: 27197768.
10. Petrov V. M. et al. Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution //Virology journal. – 2010. – Т. 7. – №. 1. – С. 292.
11. Medini D. et al. The microbial pan-genome //Current opinion in genetics & development. – 2005. – Т. 15. – №. 6. – С. 589-594.
12. Hatfull G. F. Bacteriophage genomics //Current opinion in microbiology. – 2008. – Т. 11. – №. 5. – С. 447-453.
13. Comeau A. M., Arbiol C., Krisch H. M. Composite Conserved Promoter–Terminator Motifs (PeSLs) that Mediate Modular Shuffling in the Diverse T4-Like Myoviruses //Genome biology and evolution. – 2014. – Т. 6. – №. 7. – С. 1611-1619.
14. Arbiol C. et al. Mobile regulatory cassettes mediate modular shuffling in T4-type phage genomes //Genome biology and evolution. – 2010. – Т. 2. – С. 140-152.
15. Wilson G.G., Young K.K.Y. et al . High frequency generalized transduction by bacteriophage T4. Nature. 1979. V. 280. N . 5717. P. 80-82
16. Young K.K.Y., Edlin G.J. Physical and genetical analysis of bacteriophage T4 generalized transduction. Molec.Gen.Genet. 1983. V. 192. P. 241-249
17. Taniashin VI, Zimin AA, Shliapnikov MG, Boronin AM. [Transduction of plasmid-antibiotic resistance determinants with pseudo-T-even bacteriophages]. Genetika.2003 Jul;39(7):914-26. Russian. PubMed PMID: 12942776.
18. Tanyashin V.I., Zimin A.A., Boronin A.M. The cotransduction of pET system plasmids by mutants of T4 and RB43 bacteriophages. Microbiology (Mikrobiologiya). 2003. T. 72. № 6. C. 694-700.
19. Chibani-Chennoufi S. et al. Isolation of Escherichia coli bacteriophages from the stool of pediatric diarrhea patients in Bangladesh //Journal of bacteriology. – 2004. – Т. 186. – №. 24. – С. 8287-8294.
20. Tétart F. et al. Phylogeny of the major head and tail genes of the wide-ranging T4-type bacteriophages //Journal of Bacteriology. – 2001. – Т. 183. – №. 1. – С. 358-366.
21. Sarker SA, McCallin S, Barretto C et al. Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh //Virology. – 2012. – Т. 434. – №. 2. – С. 222-232.
22. Liu, B., Pop, M., 2009. ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database. Nucleic Acids Res. 37, D443–D447.
23. Yang J. et al. VFDB 2008 release: an enhanced web-based resource for comparative pathogenomics //Nucleic acids research. – 2007. – Т. 36. – №. suppl_1. – С. D539-D542.

24. Weiss M. et al. In vivo replication of T4 and T7 bacteriophages in germ-free mice colonized with *Escherichia coli* // *Virology*. – 2009. – Т. 393. – №. 1. – С. 16-23.
25. Bruttin A., Brüßow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2005. – Т. 49. – №. 7. – С. 2874-2878.
26. Jamalludeen N. et al. Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 infection of pigs // *Veterinary microbiology*. – 2009. – Т. 136. – №. 1. – С. 135-141.
27. Sarker S.A. et al. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh // *EBioMedicine*. – 2016. – Т. 4. – С. 124-137.
28. Karam J. D., Drake J. W. *Molecular biology of bacteriophage*. – Amer. Society for Microbiology, 1994. – Т. 4.
29. Adriaenssens E. M. et al. CIM® monolithic anion-exchange chromatography as a useful alternative to CsCl gradient purification of bacteriophage particles // *Virology*. – 2012. – Т. 434. – №. 2. – С. 265-270.
30. Vandenheuvel D., Lavigne R., Brüßow H. Bacteriophage therapy: advances in formulation strategies and human clinical trials // *Annual review of virology*. – 2015. – Т. 2. – С. 599-618.
31. Merabishvili M. et al. Stability of *Staphylococcus aureus* phage ISP after freeze-drying (lyophilization) // *PloS one*. – 2013. – Т. 8. – №. 7. – С. e68797.
32. Schade A. L., Caroline L. The preparation of a polyvalent dysentery bacteriophage in a dry and stable form: II. Factors affecting the stabilization of dysentery bacteriophage during lyophilization // *Journal of bacteriology*. – 1944. – Т. 48. – №. 2. – С. 179.
33. Schade A. L., Caroline L. The preparation of a polyvalent dysentery bacteriophage in a dry and stable form: III. Stability of the dried bacteriophage towards heat, humidity, age and acidity // *Journal of bacteriology*. – 1944. – Т. 48. – №. 2. – С. 243.
34. Alfadhel M. et al. Lyophilized inserts for nasal administration harboring bacteriophage selective for *Staphylococcus aureus*: in vitro evaluation // *International journal of pharmaceuticals*. – 2011. – Т. 416. – №. 1. – С. 280-287.
35. Golshahi L. et al. In vitro lung delivery of bacteriophages KS4-M and ФKZ using dry powder inhalers for treatment of *Burkholderia cepacia* complex and *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis // *Journal of applied microbiology*. – 2011. – Т. 110. – №. 1. – С. 106-117.
36. Anany H. et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes // *Applied and environmental microbiology*. – 2011. – Т. 77. – №. 18. – С. 6379-6387.
37. Markoishvili K. et al. A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly (ester amide) s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds // *International journal of dermatology*. – 2002. – Т. 41. – №. 7. – С. 453-458.

38. Jikia D. et al. The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant

Staphylococcus aureus-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90 //Clinical and experimental dermatology. – 2005. – Т. 30. – №. 1. – С. 23-26.

39. Vandenheuvel D. et al. Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections //European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2013. – Т. 84. – №. 3. – С. 578-582.

40. Matinkhoo S. et al. Spray-dried respirable powders containing bacteriophages for the treatment of pulmonary infections //Journal of pharmaceutical sciences. – 2011. – Т. 100. – №. 12. – С. 5197-5205.

41. Ma Y. et al. Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery //Applied and environmental microbiology. – 2008. – Т. 74. – №. 15. – С. 4799-4805.

42. Alvarez-Gonzalez E. et al. Bioprocessing of bacteriophages via rapid drying onto microcrystals //Biotechnology progress. – 2012. – Т. 28. – №. 2. – С. 540-548.

43. Puapermpoonsiri U., Spencer J., van der Walle C. F. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres //European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2009. – Т. 72. – №. 1. – С. 26-33.

44. Esteban P. P. et al. Enhancement of the antimicrobial properties of bacteriophage-K via stabilization using oil-in-water nano-emulsions //Biotechnology progress. – 2014. – Т. 30. – №. 4. – С. 932-944.

45. Kim K. P. et al. PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response //Microbial biotechnology. – 2008. – Т. 1. – №. 3. –

C. 247-257.

46. Reardon S. Phage therapy gets revitalized: the rise of antibiotic resistance rekindles interest in a century-old virus treatment //Nature. – 2014. – Т. 510. – №. 7503. – С. 15-17.

47. Matsuzaki S. et al. Perspective: the age of the phage //Nature. – 2014. – Т. 509. – №. 7498. – С. S9-S9.

48. Bourdin G. et al. Coverage of diarrhoea-associated Escherichia coli isolates from different origins with two types of phage cocktails //Microbial biotechnology. – 2014. – Т. 7. – №. 2. – С. 165-176.