

М.В.Овчинникова, А.В.Комиссаров, Е.Г.Абрамова, М.Н.Киреев, А.Ю.Ульянов, Д.Н.Бибиков,
М.Н.Исляева, А.К.Никифоров

РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГОТОВОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВОХОЛЕРНОГО ИММУНОЭНТЕРОСОРБЕНТА

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследования: экспериментальное обоснование возможности получения лекарственной формы противохолерного иммуноэнтеросорбента в форме таблетки. **Материалы и методы:** Экспериментальный антитоксический противохолерный иммуноэнтеросорбент, стабилизированный методом лиофильного высушивания. Остаточную влажность лиофилизата энтеросорбента определяли с использованием влагомера Sartorius MA 150. Ситовой анализ порошков и гранулятов проводили просеиванием образцов сыпучего материала через набор сит с отверстиями различного размера. Определение насыпной плотности проводили с помощью прибора SVM-10. Гранулирование специфического энтеросорбента проводили на аппарате GPCG 2 LabSystem. Изготовление таблеток осуществляли на таблеточном прессе MiniTabT. Определение твердости таблеток проводили с использованием тестера ТВН 125 TD. Испытания на истираемость таблеток осуществляли на приборе GTA 120. **Результаты и выводы.** Экспериментально обосновано использование в качестве вспомогательных веществ для гранулирования лактозы моногидрата, целлюлозы микрокристаллической и поливинилпирролидона. Установлено, что полученный гранулят с удовлетворительными значениями технологических характеристик может являться основой для готовой лекарственной формы специфического энтеросорбента. Определена оптимальная масса таблеток-ядер противохолерного энтеросорбента. Показана возможность применения кишечнорастворимого покрытия Acryl-eze для нанесения защитной оболочки на таблетки. Изучена специфическая активность таблетированного энтеросорбента в тесте *in vitro*, подтверждена его устойчивость в условиях, моделирующих желудочно-кишечный тракт. В результате проведенных исследований разработана технология получения противохолерного антитоксического иммуноэнтеросорбента – таблетки, покрытой кишечнорастворимой оболочкой. В долгосрочных испытаниях при хранении сконструированного лечебно-профилактического препарата при температуре от 4 до 8 °С в течение 24 мес (срок наблюдения) выявлено сохранение активности энтеросорбента, что свидетельствует о его стабильности, определен срок годности специфического противохолерного иммуноэнтеросорбента в таблетированной форме.

Ключевые слова: противохолерный иммуноэнтеросорбент, гранулирование, таблетирование, нанесение защитного покрытия, специфическая активность, стабильность.

Корреспондирующий автор: Овчинникова Мария Владимировна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

M.V.Ovchinnikova, A.V.Komissarov, E.G.Abramova, M.N.Kireev, A.Yu.Ul'yanov, D.N.Bibikov, M.N.Islyayeva,
A.K.Nikiforov

Development of Pharmaceutical Dosage Form of Anti-Cholera Immune-Enterosorbent

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to experimentally substantiate the possibility of production of anti-cholera immune-enterosorbent in the pharmaceutical form of a pill. **Materials and methods:** experimental antitoxic immune-enterosorbent against cholera, stabilized using cool dehumidification. Residual moisture of enterosorbent lyophilizate was determined by means of Sartorius MA 150 moisture meter. Screen assay of the powders and granulates was performed applying the sieving of bulk material samples through screen set with sieve openings of various sizes. Specification of tap density was carried out with the help of SVM-10 unit. Granulation of specific enterosorbent was done using GPCG 2 LabSystem. The pills were manufactured in tablet press, MiniTabT. The hardness of the pallets was carried out by means of TBH 125 TD tester. The test for friability of the pills was performed in GTA 120. **Results and conclusions.** Utilization of cellulose microcrystalline and polyvinyl pyrrolidone as pharmaceutical aids for granulation of lactose monohydrate is experimentally substantiated. It is established that the obtained granulate with passable values of technological parameters can serve as the basis for pharmaceutical dosage form of specific enterosorbent. Identified has been optimum mass of anti-cholera enterosorbent tablet cores. Demonstrated has been the possibility of Acryl-eze enteric coating application as protective shell of the pills. Studied has been specific activity of the pelleted enterosorbent *in vitro*, verified is its resistance capacity under conditions modeling gastrointestinal tract. In consequence of the performed trials and tests, technology for the production of antitoxic enterosorbent against cholera – enteric-coated tablet – has been developed. Long-term trials: the storage of the constructed preparation at 4–8°C within 24 months period (the observation time) – have revealed retention of enterosorbent activity, which testifies to its stability and defined the shelf life of specific tableted anti-cholera immune-enterosorbent.

Key words: anti-cholera immune-enterosorbent, granulation, pelletizing, application of protective coating, specific activity, stability.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Maria V. Ovchinnikova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Ovchinnikova M.V., Komissarov A.V., Abramova E.G., Kireev M.N., Ul'yanov A.Yu., Bibikov D.N., Islyayeva M.N., Nikiforov A.K. Development of Pharmaceutical Dosage Form of Anti-Cholera Immune-Enterosorbent. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:100–104. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-100-104

Протекающая в настоящее время седьмая пандемия холеры характеризуется появлением новых штаммов холерного вибриона O1 серогруппы, обладающих повышенными вирулентностью и адаптацией к условиям внешней среды [9]. Сложившиеся обстоятельства диктуют в дополнение к существующей традиционной терапии необходимость разработки и внедрения в практическое здравоохранение новых подходов к лечению и профилактике данной конвенционной болезни [7].

Ранее исследователями РосНИПЧИ «Микроб» разработана экспериментальная технология получения антитоксического энтеросорбента для интраинтестинальной нейтрализации экзотоксина холерного вибриона. Препарат представляет собой хитозановую матрицу с иммобилизованными на ее поверхности антитоксическими противохолерными иммуноглобулинами, выделенными из сыворотки крови животных, иммунизированных холерным токсином [1, 6]. Полученный иммуоэнтеросорбент стабилизирован лиофильным высушиванием с добавлением 2,5 % глицина и 1 % сахарозы, однако вопрос о лекарственной форме экспериментального препарата остался открытым.

Готовые лекарственные формы выпуска энтеросорбционных препаратов, зарегистрированных на территории Российской Федерации, представлены в виде порошков для приготовления растворов, гранулятов, капсул, болюсов. Однако опыт производства лекарственных средств в России и за рубежом свидетельствует, что таблетированная форма препаратов занимает одно из ведущих мест на рынке фармацевтической продукции. Точность дозирования, компактность, удобность упаковки, простота хранения, транспортировки и возможность целевого применения даже при отсутствии питьевой воды делают данную лекарственную форму оптимальной в санитарной и противоэпидемической практиках [10].

Вышесказанное определило цель исследования, заключающуюся в разработке лекарственной формы противохолерного иммуоэнтеросорбента в виде таблетки, покрытой кишечнорастворимой оболочкой.

Материалы и методы

Остаточную влажность определяли с использованием влагомера Sartorius MA 150 (Германия). Ситовой анализ порошков и гранулятов проводили с использованием автоматического процесса просеивания образца сыпучего материала через набор сит с отверстиями различного размера с использованием анализатора ВА 200N: 2500, 1000, 500, 112, дно. Просеивание проводили в течение 5 мин при амплитуде, равной 1,5. Для определения сыпучести в сухую воронку, выходное отверстие которой закрыто заслонкой, помещали без уплотнения навеску испытуемого вещества массой 50 г, взвешенную с точностью до 0,01 г. Включали виброустройство и через 20 с открывали заслонку. Определяли время,

необходимое для полного истечения испытуемого вещества из воронки. Сыпучесть рассчитывали по формуле (1):

$$C = \frac{m}{t - 20}, \quad (1)$$

где C – сыпучесть испытуемого порошка или гранулята; m – масса навески испытуемого вещества, г; t – время истечения испытуемого вещества, с.

Для определения насыпной плотности порошков и гранулятов навеску образца с заранее измеренной массой помещали в градуированный цилиндр вместимостью 100 мл. Отношение массы навески к заполненному объему (V_0) цилиндра являлось насыпной плотностью до утряски. После проведения утряски на приборе SVM-10 (Erweka, Германия) при количестве встряхиваний последовательно 500, 750 и 1250 измеряли заполненный объем цилиндра (V_k) и определяли насыпную плотность после утряски. Угол естественного откоса α определяли при насыпке материала на ровную поверхность.

Гранулирование специфического энтеросорбента проводили на аппарате GPCG 2 LabSystem (Glatt, Германия), реализующем гранулирование материалов методом псевдооживленного слоя с подачей связующего вещества сверху. Для изготовления таблеток проводили прессование гранулята на таблеточном прессе MiniTabT (Luxner, Германия). Определение твердости таблеток проводили с использованием тестера ТВН 125 TD, используя режим работы перемещения измерительного молотка «постоянная скорость» при величине ньютон-фактора, равной 19,0. Количество таблеток каждой серии составляло не менее 10. Испытания на истираемость таблеток осуществляли на приборе GTA 120 (Erweka, Германия) при числе качаний флакона в минуту, равном 300, в течение 3 мин. В каждом флаконе находилось по 20 таблеток. Истираемость таблеток вычисляли по формуле (2). Нанесение покрытия на таблетку осуществляли в коутере GMPC I Mini (Glatt, Германия).

$$И = \frac{M_1 - M_2}{M} \times 100 \%, \quad (2)$$

где $И$ – истираемость таблеток специфического энтеросорбента, %; M_1 – масса таблеток до испытания, г; M_2 – масса таблеток после испытания, г.

Определение распадаемости таблеток проводили в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул» [2]. Таблетки в количестве трех штук помещали во флакон вместимостью 100 мл с 25 мл 0,1 М раствора соляной кислоты и выдерживали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 3 ч при периодическом встряхивании (3–4 раза через каждые 10 мин). Затем кислоту удаляли, таблетки заливали 25 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и выдерживали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч при периодическом встряхивании (3–4 раза через каждые 10 мин).

Опыт по взаимодействию специфического энтеросорбента и неиммобилизованных антитоксиче-

ских иммуноглобулинов с протеолитическими ферментами проводили в два этапа. На первом этапе к раствору неиммобилизованного иммуноглобулина и таблеткам специфического энтеросорбента добавляли 200 мг пепсина и 1 мл 0,1 М раствора соляной кислоты, значение рН смесей соответствовало $(2,0 \pm 0,1)$, что является оптимумом для пепсина. Смесью инкубировали в течение 2 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Далее проводили нейтрализацию 0,1 Н раствором натрия гидроксида до рН $(7,8 \pm 0,1)$ – оптимуме для трипсина.

На втором этапе к полученным «нейтрализованным» реакционным смесям добавляли 300 мл трипсина и инкубировали в течение 3 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. После экспозиции с целью инактивации трипсина добавляли 0,1 М раствор соляной кислоты до установления рН $(4,0 \pm 1,0)$ и нейтрализовали 0,1 Н раствором натрия гидроксида до рН $(7,2 \pm 0,1)$. Далее экспериментальные образцы центрифугировали 10 мин при 14 тыс. об./мин, супернатанты декантировали. Из осажденных взвесей готовили 10 % суспензии специфического энтеросорбента и 10 % растворы антитоксического иммуноглобулина в 0,01 М фосфатном буфере рН $(7,3 \pm 1,0)$ для определения специфической активности образцов в непрямом варианте дот-иммуноанализа (ДИА).

Специфическую активность противохолерного иммуноэнтеросорбента выявляли *in vitro* в дот-иммуноанализе с использованием диагностикума на основе наночастиц коллоидного золота и белка *A Staphilococcus aureus*.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено, что распределение частиц по размеру в лиофилизате энтеросорбента, определенное ситовым методом, составляло следующие величины: пыль – 38 %; 112–500 мкм – 40 %; 500 мкм – 1,0 мм – 12 %; 1,0–2,5 мм – 5 %; >2,5 мм – 5 %. Потеря в массе при высушивании составила $(1,1 \pm 0,3)$ %. Насыпная плотность (до/после утряски) составила 0,04/0,05 г/см³. Выявленная величина угла естественного откоса, равная 65° , и значение сыпучести, равное 0, свидетельствовали о крайне низкой сыпучести лиофилизованного материала [12].

На основании изучения технологических характеристик порошка-лиофилизата можно сделать вывод, что данная субстанция является крайне неоднородной по фракционному составу, при этом большое количество лиофилизата находится в виде пыли. Неудовлетворительные показатели сыпучести, насыпной плотности и угла естественного откоса свидетельствуют о непригодности данной субстанции для получения готовой лекарственной формы. В связи с этим необходимо было получить субстанцию в виде гранулята.

Анализ литературных данных показал, что в технологии гранулирования лекарственных пре-



Рис. 1. Гранулят лиофилизованного противохолерного энтеросорбента

паратов достаточно широко применяются такие вспомогательные вещества, как целлюлоза микрокристаллическая и лактозы моногидрат, а в качестве связующего вещества – водные растворы поливинилпирролидона. Свой выбор остановили на следующей рецептуре, рекомендованной рядом исследователей: по 50 массовых процентов микрокристаллической целлюлозы и лактозы [3, 5], а в качестве связующего – 10 % раствор поливинилпирролидона (Plasdone K90) [3, 5]. В работе использовали технологические режимы, обоснованные А.В.Комиссаровым и соавт. при гранулировании компонентов холерной химической вакцины [4, 6].

После гранулирования энтеросорбента (рис. 1) проводили изучение технологических характеристик гранулята: форма и размер частиц, распределение частиц по размеру, насыпная плотность, сыпучесть, угол естественного откоса, потеря в массе при высушивании.

Выявлены следующие технологические характеристики гранулята: распределение частиц по размеру: пыль (<112 мкм) – 3 %; 112–500 мкм – 13 %; 500 мкм – 1,0 мм – 42 %; 1,0–2,5 мм – 42 %; >2,5 мм – нет; насыпная плотность (до/после утряски) составила 0,35/0,41 г/см³; значение текучести – 13 г/с; величина угла естественного откоса – 21° , что свидетельствовало об удовлетворительной его сыпучести [12]. Потеря в массе при высушивании имела значение $(1,9 \pm 0,2)$ %.

Учитывая значения характеристики полученного гранулята иммуноэнтеросорбента, можно сделать вывод о возможности его дальнейшей дозировки в кишечнорастворимые капсулы или получения готовой лекарственной формы в виде таблетки.

Изготовление таблетированной формы – процесс многостадийный, включающий в себя этапы подготовки лекарственного вещества, смешение основного и вспомогательных компонентов, их сушка, гранулирование и непосредственно таблетирование.

Для удобства применения таблетированного энтеросорбента *per os* массу таблетки, содержащей необходимое количество активного вещества, устанавливали в пределах от 0,240 до 0,260 г. Результаты исследований характеристик таблеток-ядер противохолерного иммуноэнтеросорбента при прессовании гранулята представлены в табл. 1.

Анализируя данные таблицы, можно сделать вывод, что при значениях давления прессования, превы-

Таблица 1

Результаты исследований характеристик таблеток-ядер противохолерного иммуноэнтеросорбента

Давление прессования, кН	Механическая прочность на сжатие, Н	Истираемость, %
5	20,00±1,20	3,70±0,80
10	50,00±1,50	2,10±0,45
15	77,00±3,08	1,50±0,33
20	90,00±3,50	1,10±0,30
25	120,00±4,10	0,50±0,04

шающих 20 кН, таблетки-ядра обладают значениями механической прочности на сжатие, позволяющими спрогнозировать повышенное время растворения таблетки, а таблетирование при 5 кН приводит к повышенной истираемости – (3,7±0,8) при требовании не более 3 % [2]. Следовательно, оптимальным диапазоном давления прессования являются значения от 10 до 15 кН.

Нанесение защитной оболочки на таблетку осуществляли 20 % водным раствором кишечнорастворимого покрытия Acryl-EZE до увеличения массы таблетки на 8 %. Для нанесения пленочного покрытия на водной основе использовали технологические режимы, разработанные для готовой лекарственной формы холерной химической вакцины [4, 5]. Масса таблетки с нанесенным покрытием в среднем составила (270±1,5) мг. Гладкое и равномерное желтое пленочное покрытие закрывало все кромки таблеток (рис. 2). Необходимо отметить, что механическая прочность на сжатие таблетки с покрытием возросла до 110 Н.

В результате определения распадаемости было выявлено, что при выдерживании в 0,1 М растворе соляной кислоты в течение 3 ч каждая таблетка энтеросорбента сохраняла форму и оболочку; при воздействии 0,1 М раствором натрия гидроксида в течение 40 мин таблетка распадалась до рыхлой массы без сохранения оболочки. Это свидетельствовало о хорошем качестве кишечнорастворимого покрытия и правильном выборе диапазона прессования гранулята.

Сконструированный экспериментальный анти-



Рис. 2. Готовая лекарственная форма противохолерного энтеросорбента

токсический энтеросорбент предполагает применение *per os*, являющееся наиболее простым и распространенным способом эфферентной терапии. Однако во всех отделах пищеварительного тракта, особенно в желудке и кишечнике, сорбент неизбежно будет подвергнут воздействию желудочного сока и ферментов, которые могут инактивировать специфические компоненты препарата. Практический и научный интерес представляло изучение стабильности полученного таблетированного энтеросорбента в условиях, моделирующих желудочно-кишечный тракт. Стабильность энтеросорбента исследовали в соответствии с [2], с некоторыми модификациями, описанными ранее А.Л.Сироко и соавт. при изучении угольных энтеросорбентов [8].

В работе использовали три серии неиммобилизованного антитоксического иммуноглобулина и три серии экспериментального специфического энтеросорбента в таблетированной форме. Протеолитические ферменты – пепсин кристаллический и трипсин кристаллический применяли для моделирования условий желудочно-кишечного тракта.

Полученные данные свидетельствовали, что после взаимодействия с протеолитическими ферментами произошло заметное снижение специфической активности неиммобилизованных иммуноглобулинов, титры антитоксических антител в ДИА составили 1:640, тогда как до обработки ферментами их активность составляла 1:12800–1:6400. Специфический энтеросорбент, в отличие от неиммобилизованного иммуноглобулина, наиболее чувствительного к действию пепсина и трипсина, сохранил свои антитоксические свойства на высоком уровне, в ДИА были зарегистрированы значения активности препарата до и после обработки ферментами 1:12800–1:6400 и 1:6400–1:3200 соответственно.

Учитывая перспективу практического применения экспериментального антитоксического энтеросорбента для профилактики и лечения холеры, несомненный интерес представляло изучение стабильности препарата при хранении с соблюдением оптимального температурного режима согласно [11].

При исследовании стабильности таблетированного энтеросорбента в долгосрочных испытаниях выявляли активность *in vitro* в непрямом ДИА трех экспериментальных серий препарата на момент получения и после хранения при температуре от 2 до 8 °С в течение 6, 12 и 24 мес (срок наблюдения). Проводили не менее трех испытаний каждой серии энтеросорбента. Результаты оценки активности исследуемых серий экспериментального препарата в процессе хранения приведены в табл. 2. Из полученных данных следует, что при хранении энтеросорбента при температуре от 2 до 8 °С [11] в течение обозначенного времени активность таблетированного препарата оставалась на высоком уровне, что свидетельствует о стабильности сконструированного лечебно-профилактического препарата. На основании полученных результатов был определен срок

Таблица 2

Активность экспериментальных серий таблетированного антитокического энтеросорбента в процессе хранения

Срок наблюдения	Титры специфических антител в дот-иммуноанализе		
	Серия 01	Серия 02	Серия 03
На момент получения	1:25600	1:12800	1:6400
6 месяцев	1:10240	1:12800	1:5120
12 месяцев	1:10240	1:12800	1:6400
24 месяца	1:10240	1:10240	1:5120

годности иммуноэнтеросорбента – 2 года.

Таким образом, в результате проведенных исследований была разработана экспериментальная таблетированная форма противохолерного иммуноэнтеросорбента, подтверждена стабильность ее свойств, что позволяет приступить к этапу доклинических испытаний препарата.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аленкина Т.В., Овчинникова М.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Перспективные сорбционные матрицы для конструирования антитокического холерного энтеросорбента. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:66–70.
2. Государственная Фармакопея РФ. Издание 13. Том II. М.; 2015. 1004 с.
3. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К. Гранулирование компонентов холерной химической вакцины. Современные проблемы науки и образования. 2014; 3. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/117-13326> (дата обращения 12.11.2015).
4. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К. Экспериментальное обоснование внедрения пленочного покрытия на водной основе для готовой лекарственной формы холерной химической вакцины. Современные проблемы науки и образования. 2013; 6. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/113-11114> (дата обращения 12.11.2015).
5. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К. Новые подходы в технологии получения таблетки вакцины холерной бивалентной химической. *Биофармацевтический журнал.* 2015; 7(1):30–9.
6. Овчинникова М.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Сорбционные свойства полимерного энтеросорбента и его специфического модификанта в модельных растворах холерного токсина *in vitro*. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:71–4.
7. Реализация новых рекомендаций по ведению диареи. Руководство для лиц, ответственных за принятие решений, и программных менеджеров. Женева; 2006. 36 с. [Электронный ресурс]. URL: http://w.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0007/127618/9244594218R.pdf (дата обращения 14.11.2015).
8. Сироко А.Л., Яфаев Р.Х., Адамов А.К. Реакция агломе-

рации угольной сыворотки. *Вестник Акад. мед. наук.* 1960; 5: 23–33.

9. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2010; 4:11–9.

10. Тихонов И.В., Грязнева Т.Н., Лиморенко А.П., Скворцов А.Э., Васильев П.Г. Разработка технологии производства пробиотика «Биод-5» и методов его контроля. *Ветеринарн. патол.* 2003; 1:161–3.

11. Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов СП 3.3.2.1248-03. М.; 2003. 7 с.

12. Хишова О.М. Таблетирование лекарственного растительного сырья. Витебск; 2005. 164 с.

References

1. Alenkina T.V., Ovchinnikova M.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Prospective sorption matrices for antitoxic cholera enterosorbent constructing]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:66–70.
2. [State Pharmacopeia (Russian Federation)]. 13th Edition. Vol. II. M.; 2015. 1004 p.
3. Komissarov A.V., Eremin S.A., Zadokhin S.N., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Vasin Yu.G., Klokova O.D., Livanova L.F., Nikiforov A.K. [Granulation of the components of cholera chemical vaccine]. *Sovrem. Probl. Nauki i Obrazovaniya.* 2014; 3. [Internet]. (Cited 12 Nov 2015). Available from: <http://www.science-education.ru/117-13326>.
4. Komissarov A.V., Eremin S.A., Zadokhin S.N., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Vasin Yu.G., Klokova O.D., Livanova L.F., Nikiforov A.K. [Experimental substantiation of water-based film coating application for pharmaceutical dosage form of cholera chemical vaccine]. *Sovrem. Probl. Nauki i Obrazovaniya.* 2013; 6. [Internet]. (Cited 12 Nov 2015). Available from: <http://www.science-education.ru/113-11114>.
5. Komissarov A.V., Eremin S.A., Zadokhin S.N., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Livanova L.F., Nikiforov A.K. [Novel approaches to manufacturing technology for the production of chemical bivalent cholera vaccine tablets]. *Biofarmatsevt. Zh.* 2015; 7(1):30–9.
6. Ovchinnikova M.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Sorption properties of polymeric enterosorbent and its specific modified analogue in simulated cholera toxin solutions *in vitro*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4: 71–4.
7. [Implementation of New Recommendations on Diarrhea Management. Guidelines for authorized decision-makers and project managers]. Geneva; 2006. 36 p. [Internet]. (Cited 14 Nov 2015). Available from: http://w.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0007/127618/9244594218R.pdf.
8. Siroko A.L., Yafaev R.Kh., Adamov A.K. [Charcoal serum aggregation assay]. *Bulletin of the Academy of Medical Sciences.* 1960; 5:23–33.
9. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Kutyrev V.V. [Evolution of cholera agent genome in the modern period]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2010; 4:11–9.
10. Tikhonov I.V., Gryazneva T.N., Limorenko A.P., Skvortsov A.E., Vasil'ev P.G. [Development of manufacturing technology for the production of probiotic “Biod-5” and methods for its control]. *Veterinar. Patol.* 2003; 1: 161–3.
11. [Terms and conditions of transportation and storage of medical immunobiological preparations]. SR 3.3.2.1248-03. M.; 2003. 7 p.
12. Khishova O.M. [Pelletizing of Medicinal Plant Raw Material]. Vitebsk; 2005. 164 p.

Authors:

Ovchinnikova M.V., Komissarov A.V., Abramova E.G., Kireev M.N., Ulyanov A.Yu., Bibikov D.N., Islyayeva M.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Овчинникова М.В., Комиссаров А.В., Абрамова Е.Г., Киреев М.Н., Ульянов А.Ю., Бибиков Д.Н., Исляева М.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 15.02.16.