

УДК 66.47.3.049.6:615.371

Влияние режимов сублимационного высушивания на показатели качества вакцины чумной живой

© 2019 Н.В. АБЗАЕВА¹, С.Е. ГОСТИЦЕВА^{1,*}, Д.В. РОСТОВЦЕВА¹, Г.Ф. ИВАНОВА¹, А.В. КОСТРОМИНОВ¹, М.В. ПИЛИПЕНКО¹

¹Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора), Ставрополь, 355035

*e-mail: chumnpl@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.06.2019 г.

После доработки 14.07.2019 г.

Принята к публикации 03.08.2019 г.

Проведена оптимизация параметров лиофилизации препарата для улучшения показателей качества вакцины чумной живой. Исходя из полученных данных о точке эвтектики вакцинной взвеси, температура заморозки $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 6–7 ч при давлении над поверхностью препарата в 40 мТорр (десорбция при 20 мТорр) – наиболее оптимальные условия для процесса сублимации. Учитывая результаты экспериментальных исследований с вариациями скорости нагрева полок, глубины вакуума, длительности промежуточных температурных показателей, разработан усовершенствованный режим высушивания, способствующий отбору наиболее жизнеспособных особей. Вакцинный препарат, лиофилизированный в новых условиях, имеет низкую остаточную влажность (до 2%) и высокий показатель жизнеспособности, сохраняющийся в течение всего срока годности.

Ключевые слова: лиофилизация, сублимация, эвтектика, вакцина чумная живая, остаточная влажность, жизнеспособность.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-73-78

Для промышленной консервации микроорганизмов, в т.ч. вакцины чумной живой, широко используется метод низкотемпературного замораживания с последующим лиофильным высушиванием [1–3].

Лиофилизация является методом высушивания материалов, суть которого состоит в том, что влага из замороженного состояния (льда) переходит в газообразное состояние, минуя жидкую фазу. При замораживании вакцины происходит частичная гибель микробов в так называемом пороге выживания причем наиболее интенсивно – в интервале температур от -20 до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ [4]. Гибели бактериальных клеток способствует повышение концентрации внутриклеточных солей при замораживании, что влечет повреждение мембран и связанных с ними ферментов и ферментативных комплексов [5, 6]. Важнейшую роль в поддержании структуры биологических мембран, а особенно в обеспечении их барьерной функции, играет вода, как в свободном, так и в связанном состоя-

нии. Свободная вода играет основную роль в протекании биохимических процессов жизнедеятельности микробной клетки [7]. Для препарата вакцины свободной водой является вся та жидкость, в которой взвешены микробные клетки – влага среды высушивания и небольшое количество конденсационной влаги, попадающей в препарат при смыве с плотной среды. Что касается связанной воды, то помимо входящей в гидратную оболочку мембран, существует так называемая «связанная влага» [8]. В лиофилизации данный термин обозначает ту часть подвижной воды, которая прочно связана с липидами мембран, не замерзает при обычных условиях и плохо удаляется при высушивании. Поэтому для удаления связанной влаги требуется гораздо больше времени, чем для эвакуации свободной воды.

Таким образом, гибель клеток при замораживании обусловлена как внутриклеточным льдообразованием, так и воздействием гиперконцентрированных растворов солей, образующихся

вследствие быстрого вымерзания свободной влаги. Для предохранения клеток от влияния солей в процессе замораживания и лиофилизации используются защитные среды высушивания (стабилизаторы).

В условиях производства полностью исключить влияние низких температур на клетки вакцинного штамма чумного микроба даже с помощью защитных сред не удается [9]. В связи с этим ранее существовала рекомендация замораживать чумную вакцину до температуры, лежащей выше пределов порога выживания. Так как верхний предел ее ограничен самим процессом высушивания в лиофильных сушках, в промышленном регламенте на производство вакцины чумной живой ПР 01897080-09-09 существовала рекомендация замораживать вакцину до -30 °С. Но для любого сложного раствора существует эвтектическая точка – температура, при которой происходит полное замораживание материала и в замороженной массе не остается свободной влаги.

Современные лиофильные установки обладают широкими функциональными возможностями и работают не только в автоматическом режиме, но и в ручном, позволяя одновременно корректировать сразу нескольких параметров. Для получения оптимального конечного результата нами были внесены некоторые изменения в режим лиофилизации препарата.

Цель работы – изучение влияния скорректированных условий сублимационного высушивания на жизнеспособность готового препарата вакцины чумной живой.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Производство препарата вакцины чумной живой – многоступенчатый процесс, состоящий из нескольких этапов, результаты которых влияют на качество готовой продукции (рис. 1). Один из наиболее значимых этапов – замораживание с последующим сублимационным высушиванием. Проведенные исследования были направлены на отработку режимов замораживания/высушивания для оптимизации процесса лиофилизации.

Штаммы

В работе использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (депонирован в ГКПМ, III–IV группы патогенности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 910301).

Лиофилизация препарата

Выращенную биомассу вакцинного штамма смывали стабилизатором (тиомочевинная среда высушивания) и фасовали по 2 мл в ампулы ШПВ-6. По окончании фасовки кассеты с ампулами помещали на полки сублимационной установки LP-30 R (IIShin, Южная Корея). Материал замораживали до температуры -50 °С, выдерживали не менее 6 ч после выхода на температурный режим последней загруженной кассеты. Для определения эвтектической точки заморозки был использован кондуктометр (SanXin, Южная Корея). Процесс сублимации проводили при

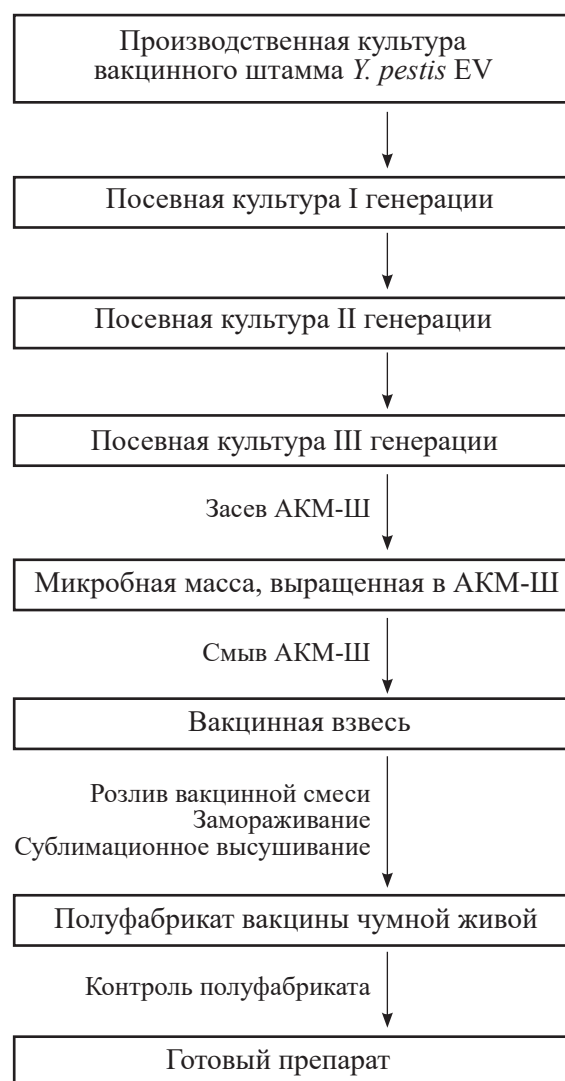


Рис. 1. Технологическая схема производства вакцины чумной живой согласно ПР 01897080-09-16. АКМ-III – аппарат для культивирования микроорганизмов Шестеренко (Россия)

Fig. 1. Technological scheme of production of plague vaccine live

плавном подъеме температуры до 30 °С в вакууме 20 мТорр. После достижения продуктом требуемой температуры производили досушивание в течение 3 ч. Ампулы запаивали под вакуумом и хранили при температуре (4±2) °С.

Определение качества вакцинного препарата

После высушивания качество экспериментальных серий вакцины было исследовано на соответствие требованиям ФСП 42-8654-07 по следующим основным показателям качества: жизнеспособность и термостабильность, потеря в массе при высушивании, отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов, стабильность в течение срока годности. Испытания проводили согласно Государственной фармакопеи РФ, ФС 3.3.1.0022.15 «Вакцина чумная живая».

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отработка режима замораживания

Для уточнения эвтектической точки вакцины из штамма *Y. pestis* EV использовали эффект резкого увеличения сопротивления при переходе жидкости (проводник второго ряда) в твердое состояние – лед, который по своим характеристикам аналогичен диэлектрику. По результатам трех замеров температуры окончательного замерзания связанной воды в вакцинной суспензии выведен средний показатель –45 °С. Скорость замораживания вакцины 1–1,5 мм/мин. При таком режиме заморозка начинается со стороны основания ампулы и распространяется через слой жидкости. Верхняя допустимая высота заполнения ампулы вакциной 15 мм. Исходя из полученных данных о точке эвтектики вакцинной взвеси, установлена температура заморозки –50 °С. Длительность заморозки 6–7 ч после выхода на режим последнего загруженного лотка с вакциной (Промышленный регламент на производство вакцины чумной живой ПР 01897080-09-16 предписывает ≥ 5 ч).

После проведения тестовых сушек с корректировкой программируемых параметров (скорость нагрева полок, глубина вакуума, длительность промежуточных температурных показателей) был усовершенствован действующий режим лиофильного высушивания.

Снижение остаточной влажности

Большую роль при лиофилизации для последующего хранения играет остаточная влага, количество которой влияет на жизнеспособность готового продукта и стабильность данного показателя. Так, при остаточной влажности 8–9% количество жизнеспособных клеток сразу после лиофилизации составляет около 40%. Однако через 7–10 дней жизнеспособность падает до 2% [10, 11]. Доказано, что оптимальная величина показателя остаточной влажности (потери в массе при высушивании) для чумной вакцины составляет 1–4%, что отражено и в нормативной документации на препарат [12].

Снижения остаточной влажности можно достигнуть несколькими путями: 1) увеличением температуры досушивания, при котором происходит значительная денатурация белков, что влияет на сохранность жизнеспособных клеток; 2) увеличением времени досушивания при регламентированных температурах, что также снижает жизнеспособность препарата. Ранее проведенные исследования показали, что используемый традиционный режим лиофилизации способствует получению популяции микробных клеток, значительно различающихся по устойчивости к температурному фактору в процессе хранения, часть их погибала в первые 1–3 мес. после приготовления вакцины. Клетки, которые оставались жизнеспособными в случае традиционного режима лиофилизации, погибали в первую очередь и не играли существенной роли в препарате, предназначенном для длительного хранения [13].

Отработка режима высушивания

Для удаления воды из препарата при высушивании требуется создать над его поверхностью давление 40 мТорр, (20 мТорр – десорбция), так как только такая разница делает процесс сублимации (превращения льда в пар, минуя жидкую фазу) наиболее эффективным. Кроме того, водяной пар перемещается в сторону более низких температур, причем со скоростью, напрямую зависящей от разницы температур высушиваемого материала и окружающего пространства, куда пар перемещается.

Стандартный процесс лиофильного высушивания можно разделить на несколько этапов, каждый из которых предъявляет конкретные требования к давлению и температуре. На первом этапе была скорректирована температура замораживания продукта (–50 ... –55 °С), ниже точки эвтектики. После выдержки в течение 6–7 ч производилось постепенное повышение температуры полок до 30 °С (2-й этап), вакуум при этом оставался в

пределах 40 мТорр. Длительность этапа составляла около 30 ч, при этом нагрев самого продукта происходил более медленно и плавно, без резких температурных скачков. Таким образом, второй этап – первичное высушивание (сублимация в вакууме) – проходил изначально ниже эвтектической точки, и влажность препарата к концу периода составляла 5–10%, что было обусловлено связанной водой.

После достижения продуктом температуры 30 °С проводилось досушивание (3-й этап) в течение 2–3 ч при вакууме 20 мТорр, во время которого связанная вода удалялась, а влажность снижалась до 1–2%. Общая длительность сушки по изложенному режиму составляла 36–38 ч.

На рис. 2 (таблица) показаны десять сегментов программы сушки (SV01–SV10), для каждого из которых задана температура полки (°С), величина вакуума (мТорр) и заданное время (мин). На пятой строке – обратный отсчет времени, по истечении заданного времени – переход к следующему сегменту.

Замораживание вакцинной суспензии ниже определенной опытным путем точки эвтектики приводит к полному замерзанию связанной воды в клетке, что при усовершенствованном режиме высушивания оказывает наименее губительное действие на мембраны клеточной стенки и позволяет достичь максимального количества неповрежденных клеток.

Таким образом, разработан усовершенствованный режим высушивания, способствующий отбору наиболее жизнеспособных особей. Препараты, лиофилизированные в таких условиях, имеют более низкую остаточную влажность – до 2%.

Для уточнения влияния усовершенствованного режима высушивания на лиофилизированный препарат вакцины чумной живой был проведен сравнительный анализ серий, полученных как традиционным способом, так и по оптимизированной технологии с применением различных режимов высушивания. В табл. 1 приведены данные по наиболее значимым для иммуногенной активности препарата показателям: жизнеспособность, остаточная

	SV01	SV02	SV03	SV04	SV05	SV06	SV07	SV08	SV09	SV10
Temp (°C)	-50	-25	-25	-15	-15	+10	+10	+30	+30	+30
Set. Vac (mTorr)	40	40	40	40	40	40	40	20	20	20
Set. Time (min)	120	60	60	60	60	180	800	60	120	9999
Elpase. Time (min)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9483

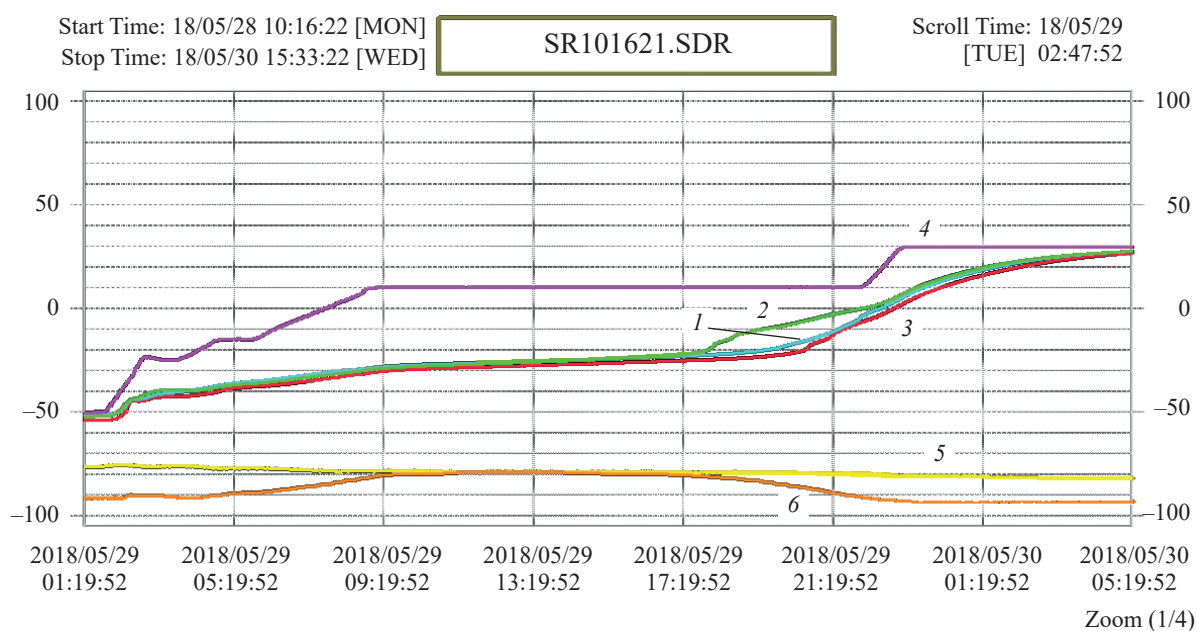


Рис. 2. Графическое отображение режима лиофильного высушивания препарата вакцины чумной живой по усовершенствованному режиму. Кривые 1, 2, 3 – температура продукта, 4 – заданный программой температурный режим, 5 – температура конденсора, 6 – значение показателя вакуума

Fig. 2. Graphic display of freeze-dried regimen of the plague live vaccine preparation according to the improved regime

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ СУБЛИМАЦИОННОГО ВЫСУШИВАНИЯ

влажность, стабильность в течение срока годности (3 года). Показатели термостабильности и отсутствия посторонних микроорганизмов и грибов определялись при выпуске препарата однократно и соответствовали регламентированным нормам.

Показано, что средняя жизнеспособность серий, лиофилизированных усовершенствованным способом, статистически выше при более низких показателях остаточной влажности (потеря в массе при высушивании).

Дальнейшему сравнению подверглись показатели стабильности тех же серий препарата в течение срока годности. Применяемый сублимацион-

ный режим оказал влияние на степень изменения жизнеспособности в процессе хранения. Через три года хранения при (2–6) °С в сериях, лиофилизированных традиционным способом, доля живых микробных клеток снизилась в среднем на 7,8%; в препарате лиофилизированном усовершенствованным способом – на 2,1% ($p \leq 0,05$), т.е. в сериях, высушенных традиционно, снижение жизнеспособности наблюдается в большей степени, чем в сериях, полученных по усовершенствованной методике. Исходя из вышеизложенного, вполне определенно можно говорить о стабильности препарата, полученного по предложенной методике.

Таблица 1

Сравнительный анализ показателей качества образцов вакцины чумной живой, полученных с применением различных режимов лиофилизации

Comparative analysis of the quality indicators of live plague vaccine samples obtained using different lyophilization regimes

Выпуск (год)	Традиционный режим		Выпуск (год)	Усовершенствованный режим	
	Остаточная влажность, %	Жизнеспособность, %		Остаточная влажность, %	Жизнеспособность, %
2005	1,7	44,3	2016	1,5	26,8
	1,6	44,6		1,4	28,4
	2,1	48,1		1,2	33,4
	2,0	33,7		1,6	46,2
	2,4	28,8		1,3	45,1
	1,5	33,3		1,7	47,8
	1,7	27,0		1,8	44,8
	1,6	26,2		1,5	53,6
2006	3,1	32,5	2017	1,3	43,1
	1,0	33,5		1,2	38,5
	1,1	35,6		1,3	41,4
	0,7	32,1		1,3	64,3
	1,9	31,8		1,5	66,5
	3,3	31,7		1,1	66,0
	3,3	31,3		1,4	67,7
	2,3	39,9		1,3	65,0
2009	1,1	37,5	2018	0,8	30,4
	1,5	31,3		1,0	51,5
	0,7	30,3		1,3	35,0
	1,3	27,0		1,3	37,5
	2,8	31,7		1,2	36,5
	2,7	32,0		1,0	57,7
	2,8	30,2		1,2	62,6
	1,9	29,4		1,0	70,4
<i>M±m</i>			<i>M±m</i>		
	1,92±0,16	33,49±1,16		1,30±0,05	48,34±2,83
Срок хранения	1 год	30,09±1,08	Срок хранения	1 год	47,99±2,65
	2	28,89±1,12		2*	47,01±2,62
	3	25,69±0,87		3**	46,24±2,43

Примечание: $M \pm m$ – среднее арифметическое и ошибка среднего арифметического (arithmetical mean and arithmetic mean error).

*определение проводилось в сериях выпуска 2016 и 2017 г.

**определение проводилось в сериях выпуска 2016 г.

В результате проведения исследований усовершенствованы параметры на определенных этапах лиофилизации вакцины чумной живой, включая режим замораживания, температурные параметры и оптимизацию показателей вакуума, что позволило достичь оптимального соотношения остаточной влажности и количества живых микроорганизмов в сублимированном препарате.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kevin R. W. Ed: Matejtschuk P. Lyophilization of pharmaceuticals and biological. *New Technologies and Approaches*. 2019, 382. doi: 10.1007/978-1-4939-8928-7
2. Николаева Л.Л., Гулякин И.Д., Орлова О.Л., и др. Лиофилизация как способ стабилизации лекарственных препаратов (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2017, (4), 54–59.
3. Семакова А.П., Кудрявцева О.М., Попова П.Ю., и др. Стабилизация путем лиофилизации иммуногенных антигенов *Bacillus anthracis* в составе прототипа рекомбинантной вакцины против сибирской язвы. *Биотехнология*. 2017, 33(3), 57–65. doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-57-65
4. Тинкер А.И. Влияние температуры предварительного замораживания на число жизнеспособных микробов в сухой противочумной вакцине ЕВ. Особо опасные и природно-очаговые инфекции. М.: Медгиз, 1962, 192–197.
5. Тинкер А.И. Влияние сублимационного (лиофильного) высушивания на штамм ЕВ чумного микроба. Автореф. дисс. ... доктора мед. наук. Саратов, 1971.
6. Печников Н.Е. Оптимизация режимов лиофильного высушивания чумной живой вакцины ЕВ. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Саратов, 1991.
7. Жученко М.А., Пашкова М.А., Потапенко О.В. Лиофилизация биопрепаратов в двухкамерных шприцах. *Биотехнология*. 2015, 31(4), 79–84. doi: 0.21519/0234-2758-2015-4-79-84
8. Бекер М.Е., Дамберг Б.Э., Рапопорт А.И. Анабиоз микроорганизмов. Рига: Зинатне, 1981, 246.
9. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016, (3), 5–12. doi: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12
10. Лапина В.Э. Выживаемость и активность *Lactobacillus acidophilum* в 20 в процессах обезвоживания и хранения: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Рига, 1970.
11. Тугова Э.Г., Гисина К.Б., Дельдман Р.И., и др. К вопросу лиофилизации материалов в ампулах. *Пром. теплотехника*. 1981, (3), 77–83.
12. Данилова М.В., Надирова И.М., Емцева Т.В. Зависимость жизнеспособности бактерий после лиофилизации и при длительном хранении от величины остаточной влажности. *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1980, (3), 449–451.
13. Печникова И.В., Тинкер А.И. Выживаемость микробов чумной живой сухой вакцины ЕВ в зависимости от их оптической плотности после лиофилизации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1974, (5), 64–68.

Influence of Freeze-Drying Modes on the Quality of Live Plague Vaccine

N.V. ABZAEVA¹, S.E. GOSTISCHEVA^{1*}, D.V. ROSTOVTSEVA¹, G.F. IVANOVA¹,
A.V. KOSTROMINOV¹, M.V. PILIPENKO¹

¹Federal Government Health Institution «Stavropol Plague Control Research Institute» of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol 355035, Russia

*e-mail: chumnpl@yandex.ru

Received June 28, 2019

Revised July 07, 2019

Accepted August 03, 2019

Abstract—The optimization of the drying schedule has been carried out to improve the quality indicators of the live plague vaccine. Based on the data obtained on the eutectic point of the vaccine suspension, the freezing temperature and freezing time were set to $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 6–7 h, respectively. A pressure of 40 mTorr over the surface of the drying suspension and 20 mTorr during the desorption were shown to be the best conditions for sublimation. The drying tests with different options for the shelf heating rate, vacuum depth and duration of intermediate temperature indicators were carried out to develop the improved freeze-drying mode providing the selection of the most adapted bacteria. A vaccine lyophilized under the developed conditions has low residual moisture (up to 2%) and high viability index that persists over the whole shelf life.

Key words: lyophilization, sublimation, eutectic, live plague vaccine, residual moisture, viability.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-4-73-78