

А.В.Комиссаров, Н.Н.Кочкалова, Н.В.Синицына, С.А.Бадарин, Н.И.Костылева, О.А.Волох,  
О.Д.Клокова, А.К.Никифоров

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА СУБЛИМАЦИОННОГО ВЫСУШИВАНИЯ ИММУНОГЕНОВ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

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

**Цель работы** – экспериментальное обоснование возможности повышения эффективности производства холерной химической вакцины за счет применения новых технологических решений процесса сублимационного высушивания иммуногенов вакцины. **Материалы и методы.** В качестве специфических иммуногенных компонентов вакцины использовали холероген-анатоксин и О-антигены Инаба и Огава. В ходе проведения исследований определены значения температуры эвтектики О-антигенов Инаба и Огава (примерно минус 35 °С). Холероген-анатоксин при достижении его температуры минус 55 °С замерзает не полностью. Полное отвердевание препарата достигнуто за счет его «отжига». Выявлено отсутствие влияния примененных режимов замораживания антигенных компонентов холерной химической вакцины на их свойства. Опытным путем установлены необходимые значения технологических параметров процессов первичного высушивания и десорбции. Проведенное изучение активности лиофилизатов иммуногенов холерной химической вакцины свидетельствовало о соответствии нормируемым требованиям. **Результаты и выводы.** Результаты исследований позволили существенно сократить время технологического процесса и получать качественные препараты.

**Ключевые слова:** сублимационное высушивание, протективные антигены, вакцина холерная.

Корреспондирующий автор: Комиссаров Александр Владимирович, e-mail: rusrapi@microbe.ru

A.V.Komissarov, N.N.Kochkalova, N.V.Sinitsyna, S.A.Badarin, N.I.Kostyleva, O.A.Volokh, O.D.Kloкова,  
A.K.Nikiforov

## Studies of Freeze-Drying of Cholera Chemical Vaccine Immunogens

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

**Objective** of the study was to substantiate experimentally the possibility to enhance efficiency of manufacturing process through application of novel engineering solutions in the course of freeze-drying of vaccine immunogens. **Materials and methods.** Cholera-anatoxin and O-antigens, Inaba and Ogawa, served as specific immunogenic components of the vaccine. Identified were temperature values for O-antigen eutectics (approx. -35°C). At reaching -55°C cholera-anatoxin froze incompletely (fractionally). Full solidification of the preparation was achieved by means of the “annealing”. Revealed was non-effect of the tested freeze modes on the properties of antigen components of chemical cholera vaccine. Desired values of technological parameters for primary drying and desorption were specified by trial. Investigations of activity of chemical cholera vaccine immunogen lyophilizates testified to the compliance with the rated critical requirements. **Results and conclusions.** Results of the study provided for significant time expenditure reduction and obtainment of high-quality preparations at once.

**Key words:** freeze-drying, protective antigens, cholera vaccine.

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

Corresponding author: Aleksander V. Komissarov, e-mail: rusrapi@microbe.ru

Citation: Komissarov A.V., Kochkalova N.N., Sinitsyna N.V., Badarin S.A., Kostyleva N.I., Volokh O.A., Kloкова O.D., Nikiforov A.K. Studies of Freeze-Drying of Cholera Chemical Vaccine Immunogens. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 1:90–93. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-90-93

В соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации № 1426-р от 02.10.2009 г. в ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» произведена реконструкция аппаратно-технологической линии производства вакцины холерной бивалентной химической таблетированной. На технологическом участке сублимационного высушивания взамен старых лиофилизационных установок, полностью исчерпавших свой эксплуатационный ресурс, введены в технологический процесс новые, современные. Применение технологических приемов сушки, описанных в нормативной документации производства вакцины для имевшихся ранее лиофилизаторов, давало, в ряде случаев, существенное ухудшение сублимационно высушенных иммуногенов холерной химической вакцины.

Лиофилизация состоит из трех основных этапов:

замораживание, первичная сублимация и десорбция (досушивание) [2]. Замораживание является первой и важнейшей стадией лиофилизации, при которой формируется окончательная структура продукта, влияющая на качество лиофилизированного материала. Скорость замораживания и температура определяются конкретно для каждого препарата с целью подбора условий, обеспечивающих максимальную сохранность структурной целостности продукта [8]. При замораживании необходимо учитывать значение эвтектической температуры подлежащего высушиванию препарата. Температурой эвтектики считается температура полного отвердевания (кристаллизации) замораживаемого объекта [5].

Второй этап лиофилизации – первичная сублимация или первичное обезвоживание, в процессе которого происходит удаление из высушиваемого объ-

екта основной массы воды. Данный этап является наиболее продолжительным в процессе лиофильного высушивания. Оптимизация условий первичной лиофилизации является обязательной для разработки экономичных режимов сушки. Для оптимизации лиофилизации биоматериалов необходимо учитывать критические температурные зоны для высушиваемого препарата. К ним относится температура коллапса, выше которой препарат, подвергнутый лиофилизации, теряет макроскопическую структуру и разрушается при высушивании. Если нагревание материала происходит при температуре, превышающей эвтектическую, существует риск вспенивания продукта из-за образования микрозон переохлажденной жидкости, что ведет к снижению качества сухого продукта; температура первичной лиофилизации препарата должна быть всегда на несколько градусов ниже эвтектической [1, 2].

Основными параметрами этапа десорбции, определяющими физико-химические и биологические характеристики сухих препаратов, являются температура материала и длительность процесса досушивания. При выборе оптимальных значений данных параметров должны быть учтены биологические особенности лиофилизируемого препарата в связи с тем, что именно на этой стадии могут произойти повреждения в биоструктуре молекулы препарата [4].

К сожалению, нам не удалось найти данные по влиянию вышеназванных факторов, присущих процессам лиофилизации, на свойства иммуногенов холерной химической вакцины. Это вызвало необходимость исследования процесса сушки антигенных компонентов вакцины с целью выявления ее оптимальных технологических режимов.

## Материалы и методы

В работе использовали выделенные из безмикробных центрифугатов антигенные компоненты, полученные при производственном выращивании штаммов *V. cholerae* М-41 Огава и 569В Инаба. Сублиминационное высушивание осуществляли на установке Martin Christ Epsilon 2-6D (Германия). Остаточную влажность сухих антигенов определяли с использованием влагомера Sartorius MA 150 (Германия).

Активность О-антигенных компонентов холерной вакцины определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) по Оухтерлони и реакции непрямой агглютинации (РНГА) с О1 сывороткой. Активность холерогена-анатоксина устанавливали в РИД с антихолерогенной сывороткой (АХС) и по единицам связывания анатоксина (ЕС), определенным при подкожном введении препарата кроликам массой  $(2,7 \pm 0,25)$  кг.

Эвтектические температуры определяли методом измерения удельного электрического сопротивления, разработанным L.Rey [6]. Установка Martin Christ Epsilon 2-6D позволяет проводить эту операцию в режиме реального времени.

## Результаты и обсуждение

На первоначальном этапе работы устанавливали значения точки эвтектики каждого из трех компонентов холерной вакцины. Значение эвтектической температуры каждого образца получали, проецируя начало прямолинейного отрезка кривой зеленого цвета на ось температур, в установке Martin Christ Epsilon 2-6D этот фиксируемый показатель называется LyoRx. По данным литературы известно, что эвтектическая температура 27 % раствора натрия хлористого равна минус 21 °С [3]. Проведенные измерения этого вещества выявили, что вышеназванная температура достигается при значении LyoRx равного 96–97 %.

Проведение исследований дало следующие значения температуры эвтектики О-антигенов Инаба и Огава – примерно минус 35 °С (рис. 1). Достичь полного промораживания холерогена-анатоксина при создании минимально возможной при использовании установки Martin Christ Epsilon 2-6D температуры продукта, равной минус 55 °С, не удалось. Величина параметра LyoRx не превышала 85 %. По результатам этого этапа работы можно сделать заключение, что замораживание холерогена-анатоксина, как изложено в нормативной документации производства, до температуры в интервалах от минус 40 до минус 50 °С не является оптимальным. Применение данной области температур для О-антигенов Инаба и Огава обеспечивает полное замораживание материала.

Что касается неполного отвердевания холерогена-анатоксина, то нами применен технологический прием, описанный в литературе [7] и заключающийся

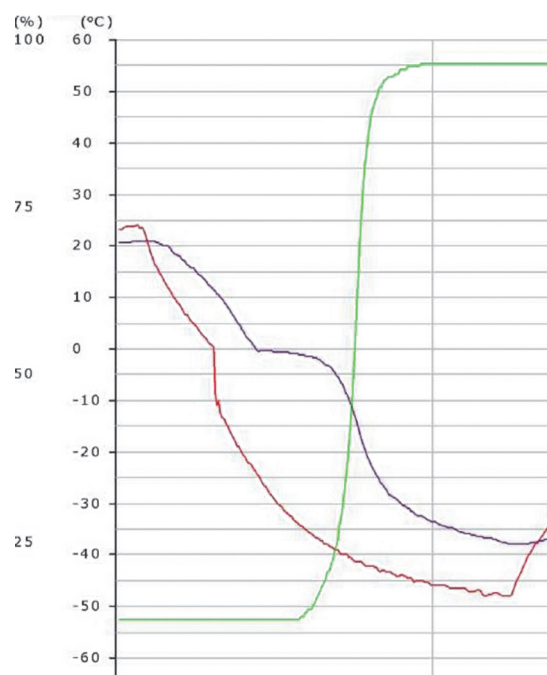


Рис. 1. Фрагмент диаграммы, протоколируемой установкой Martin Christ Epsilon 2-6D и отражающей ход протекания процесса определения точки эвтектики О-антигена Инаба и Огава:

кривая красного цвета – температура полки установки, на которую подается теплоноситель; кривая фиолетового цвета – температура продукта

ся в следующем: замороженный до минус 50–55 °С препарат нагревают на полках лиофилизационной установки до минус 20 °С, выдерживая при данной температуре в течение часа. Далее опять охлаждают до минимально возможной температуры, одновременно начиная процесс сублимации. Данный технологический прием использован американскими учеными при изучении процесса замораживания 10 % сахарозы. Ими установлено, что такая «термическая обработка», еще ее называют «отжиг», приводит к увеличению кристаллов льда и полному затвердеванию всего вещества [7]. Использование этого технологического приема позволило добиться полного замораживания холерогена-анатоксина.

Следующим шагом работы стало исследование продолжительности замораживания на качество лиофилизатов антигенных компонентов холерной вакцины. В процессе изучения влияния скорости замораживания на свойства препаратов, их разливали по 5 мл во флаконы вместимостью 10 мл и замораживали от температуры хранения ( $6 \pm 2$ ) °С до температуры эвтектики (для холерогена анатоксина до минус 50–55 °С), применяя следующие режимы замораживания: 1 (быстрый) – со скоростью замораживания 0,5 °С/мин, 2 (медленный) – со скоростью замораживания 0,045 °С/мин.

После этого замороженные растворы антигенов, полученные этими способами, сублимационно высушивали по технологическим режимам, описанным в производственном регламенте. Оценку влияния способа замораживания на качество лиофилизатов проводили по следующим показателям: внешний вид препарата, остаточная влажность, растворимость, рН, активность иммуногенов в РИД.

По внешнему виду лиофилизаты, полученные как путем быстрого, так и медленного замораживания, представляли собой сухую порошкообразную массу коричневатого-белого цвета. Остаточная влажность для препаратов была практически одинаковой и составляла от 0,5 до 0,7 %. Значение рН растворов, полученных после растворения лиофилизатов, было от 6,9 до 7,1. Полученные лиофилизаты легко растворялись в 5 мл воды в течение 1–2 мин. Эти результаты соответствовали нормируемым требованиям. Активность О-антигенов Инаба и Огава в РИД составляла 1024 (это значение было у препаратов как до замораживания, так и после лиофилизации). У холерогена-анатоксина активность в РИД снизилась в 4 раза. До замораживания величина была равна 256, после лиофилизации – 64. Можно сделать вывод, что примененные режимы замораживания оказывают одинаковое воздействие на основные показатели лиофилизатов иммуногенов.

Следующим этапом работы стала оптимизация условий первичной лиофилизации, заключающаяся в подборе оптимальной температуры продукта, которая должна быть на несколько градусов ниже эвтектической температуры. Это возможно обеспечить поддержанием параметра  $LyoRx$  в пределах 96–97 % во время первичной лиофилизации. Необходимо

отметить, что остаточное давление и температура конденсатора-вымораживателя на протяжении всего процесса было постоянным и составляло 0,02 мбар и минус 70 °С соответственно. В качестве примера на рис. 2 представлена диаграмма, протоколируемая установкой Martin Christ Epsilon 2-6D и отражающая ход протекания процесса лиофилизации холерогена-анатоксина.

Анализируя данные рис. 2, можно сделать вывод о том, что постепенный подъем температуры полки сублиматора от минус 50 до 25 °С в течение 3 ч обеспечивает плавный нагрев высушиваемого продукта и поддержание параметра  $LyoRx$  в пределах 96–97 % во время лиофилизации.

Наше внимание привлек довольно длительный окончательный этап десорбции, изложенный в производственном регламенте, протекающий при температуре 25 °С в течение 14 ч. Поэтому на заключительном этапе работы изучали влияние температурно-временных интервалов этого процесса на свойства лиофилизатов иммуногенов холерной химической вакцины. В результате проведения исследований выявлено, что сокращение этой процедуры с 14 до 5 часов не оказывает влияния на нормируемые характеристики препаратов.

Необходимо отметить, что полученные с применением усовершенствованных технологических приемов процесса сублимационного высушивания иммуногены холерной химической вакцины имели требуемый уровень активности по регламентным показателям. Так, активность холерогена-анатоксина составляла 6000 ЕС (при минимальном уровне этого показателя 2000 ЕС), а О-антигенов Инаба и Огава, по данным РНГА с О1 сывороткой, – 256 и 180 единиц соответственно (при норме для обоих О-антигенов не менее 100 единиц).

На основании проведенных исследований можно рекомендовать следующие технологические параметры процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины. Для холерогена-анатоксина: замораживание до 50–55 °С со скоростью понижения температуры от 0,045 до 0,5 °С/мин; повышение температуры препарата до минус 20 °С; выдержка при данной температуре в течение 1–2 ч; первичная сублимация при остаточном давлении 0,02 мбар, температуре конденсатора-вымораживателя 70 °С, постепенном подъеме температуры полки сублиматора от минус 40 до 25 °С в течение 3 ч и сохранение этой температуры до достижения препаратом 25 °С; десорбция при 25 °С в течение 5 ч. Для О-антигенов Инаба и Огава: замораживание до 40 °С со скоростью понижения температуры от 0,045 до 0,5 °С/мин; выдержка при данной температуре в течение 1–2 ч; первичная сублимация при остаточном давлении 0,02 мбар, температуре конденсатора-вымораживателя 70 °С, постепенном подъеме температуры полки сублиматора от минус 40 до 25 °С в течение 3 ч и сохранение этой температуры до достижения препаратом 25 °С; десорбция при 25 °С в течение 5 ч.



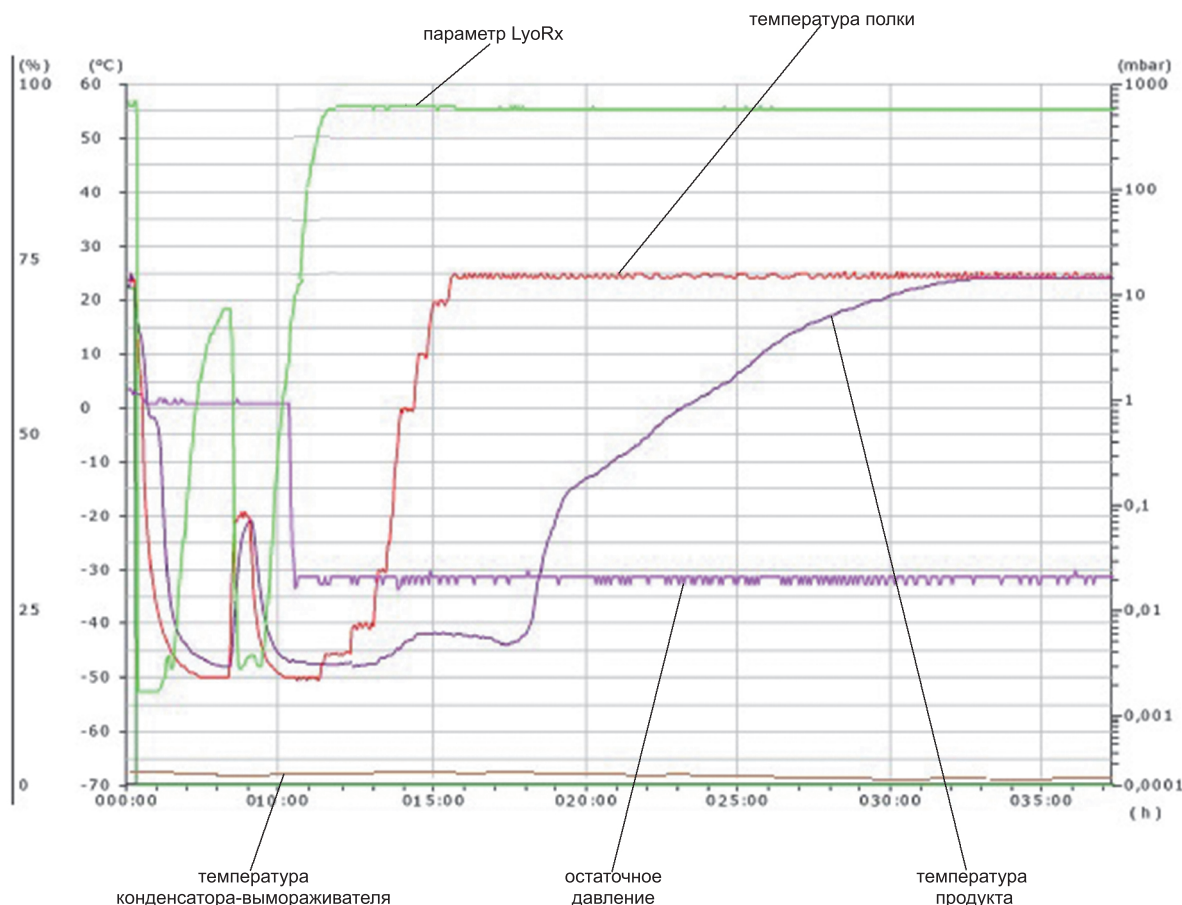


Рис. 2. Диаграмма, регистрируемая установкой Martin Christ Epsilon 2-6D и отражающая ход протекания процесса лиофилизации холерогена-анатоксина

Таким образом, в результате проведенных исследований усовершенствована технология лиофилизации антигенных компонентов вакцины, что позволило существенно сократить время технологического процесса и получать качественные препараты.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусаров Д.А. Лиофилизация биофармацевтических белков (миниобзор). *Биофармацевтический журн.* 2010; 2(5):3–7.
2. Нежута А.А., Сервис Е.С. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов. *Биотехнология.* 2001; 6:59–67.
3. Новикова Л.С., Шевченко Ю.Е., Чернов Н.Е. Эвтектические температуры некоторых растворов термолабильных препаратов. *Хим. фарм. журн.* 1977; 11:100–2.
4. Тутова Э.Г., Куц Э.И. Сушка продуктов микробиологического производства. М.: Агропромиздат; 1987. 155 с.
5. Abdul-Fattah A.M., Truong-Le V., Yee L., Nguyen L., Kalonia D.S., Cicerone M.T., Pikal M.J. Drying-induced variations in physico-chemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability (I): stability of a monoclonal antibody. *J. Pharm. Sci.* 2007; 96(8):1983–2008.
6. Rey L.R. *Traité de lyophilisation.* Paris; 1960. 411 p.
7. Searles J.A., Carpenter J.F., Randolph T.W. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine  $T(g)$  in pharmaceutical lyophilization. *J. Pharm. Sci.* 2001; 90(7):872–87.
8. Tsinontides S.C., Rajniak P., Pham D., Hunke W.A., Placek J., Reynolds S.D. Freeze drying-principles and practice for successful scale-up to manufacturing. *Int. J. Pharm.* 2004; 280(1–2):1–16.

#### References

1. Gusarov D.A. [Lyophilization of biological pharmaceutical proteins (Brief review)]. *Biofarmatsevtich. Zh.* 2010; 2(5):3–7.
2. Nezhuta A.A., Serbis E.S. [Development of scientifically-substantiated modes for freeze-drying of biological preparations]. *Biotechnologiya.* 2001; 6:59–67.
3. Novikova L.S., Shevchenko Yu.E., Chernov N.E. [Eutectic temperatures of certain solutions of heat-labile preparations]. *Khim. Farm. Zh.* 1977; 11:100–2.
4. Tutova E.G., Kuts E.I. [Drying of microbiological manufacturing products]. М.: "Agropromizdat"; 1987. 155 p.
5. Abdul-Fattah A.M., Truong-Le V., Yee L., Nguyen L., Kalonia D.S., Cicerone M.T., Pikal M.J. Drying-induced variations in physico-chemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability (I): stability of a monoclonal antibody. *J. Pharm. Sci.* 2007; 96(8):1983–2008.
6. Rey L.R. *Traité de lyophilisation.* Paris; 1960. 411 p.
7. Searles J.A., Carpenter J.F., Randolph T.W. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine  $T(g)$  in pharmaceutical lyophilization. *J. Pharm. Sci.* 2001; 90(7):872–87.
8. Tsinontides S.C., Rajniak P., Pham D., Hunke W.A., Placek J., Reynolds S.D. Freeze drying-principles and practice for successful scale-up to manufacturing. *Int. J. Pharm.* 2004; 280(1–2):1–16.

#### Authors:

Komissarov A.V., Kochkalova N.N., Sinitsyna N.V., Badarin S.A., Kostyleva N.I., Volokh O.A., Klokov O.D., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Комиссаров А.В., Кочкалова Н.Н., Синицына Н.В., Бадарин С.А., Костылева Н.И., Волох О.А., Клокова О.Д., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 08.07.15.