

Совершенствование сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах

А.В.Комиссаров¹, С.А.Бадарин¹, Д.Н.Бибиков¹, Н.В.Синицына¹, Н.И.Костылева¹, Е.А.Глазкова¹,
А.С.Феськова¹, М.В.Овчинникова¹, А.К.Никифоров^{1,2}

¹ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация;
²Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И.Вавилова, Саратов, Российская Федерация

В доступной литературе отсутствуют сведения по разработке технологии сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах. В связи с этим исследование процесса лиофилизации данных препаратов для обоснования оптимальных параметров процесса является актуальной научно-практической задачей.

Цель работы. Исследование процесса сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах для обоснования оптимальных параметров процесса.

Материалы и методы. Лيوфилизацию холерных диагностических сывороток проводили на установке Martin Christ Epsilon 2-6D. Остаточную влажность сухих сывороток определяли с использованием влагомера Sartorius MA 150. Для нахождения базовой модели и расчетной зависимости потери массы при высушивании от технологических параметров лиофилизации использовали полный факторный эксперимент 2ⁿ.

Результаты. Установлено, что этап сублимации описывается линейным повышением температуры препарата, при этом резкий скачок увеличения температуры свидетельствует об окончании первичной сушки. Определены температуры полного замерзания, нижней и верхней эвтектической температуры холерных диагностических сывороток. Выявлено, что при протекании процесса в ампулах имеется значительная гетерогенность подвода энергии по площади кюветы, при этом первичная сушка в крайних ампулах происходит интенсивнее, чем в тех, которые находятся ближе к центру кюветы. Установлено, что с увеличением высоты материала в первичной упаковке при одном и том же его количестве возрастает время лиофилизации препаратов. Выявлено, что на продолжительность лиофилизации препарата значительное воздействие производит уровень наполнения плит и плотность расположения ампул. Разработана прогностическая модель определения времени десорбции для установления требуемого значения потери массы при высушивании.

Заключение. Обоснованные нами приемы установления рационального режима лиофилизации холерных диагностических сывороток используются при производстве данных препаратов.

Ключевые слова: холерные диагностические сыворотки, лиофилизация, ампулы, исследование

Для цитирования: Комиссаров А.В., Бадарин С.А., Бибиков Д.Н., Синицына Н.В., Костылева Н.И., Глазкова Е.А., Феськова А.С., Овчинникова М.В., Никифоров А.К. Совершенствование сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах. Бактериология. 2023; 8(2): 34–41. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-34-41

Improvement freeze-drying of diagnostic cholera sera in ampoules

A.V.Komissarov¹, S.A.Badarin¹, D.N.Bibikov¹, N.V.Sinitsyna¹, N.I.Kostyleva¹, E.A.Glazkova¹,
A.S.Fes'kova¹, M.V.Ovchinnikova¹, A.K.Nikiforov^{1,2}

¹Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation;
²N.I.Vavilov Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering, Saratov, Russian Federation

There is no information in the available literature on the development of freeze-drying technology for cholera diagnostic serums in ampoules. In this regard, the study of the lyophilization process of these drugs to substantiate the optimal parameters of the process is an urgent scientific and practical task.

Purpose of the work. Was a study of freeze-drying of diagnostic cholera sera in ampoules to substantiate the optimum process parameters.

Для корреспонденции:

Комиссаров Александр Владимирович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (917) 2132-402
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 28.04.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Alexander V. Komissarov, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (917) 2132-402
E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 28.04.2023, accepted for publication 30.06.2023

Materials and methods. Cholera diagnostic sera. Lyophilization was carried out on a Martin Christ Epsilon 2-6D unit. The residual moisture content in dried sera was determined using a Sartorius MA 150 hydrometer. A full factorial experiment 2^n was used to find the baseline model and the calculated dependence of weight loss on drying on lyophilization process parameters.

Results. It has been established that the sublimation stage is characterized by a linear increase in the temperature of the preparation, while a sharp temperature rise indicates the end of primary drying. The temperatures of complete freezing, lower and upper eutectic temperatures of cholera diagnostic sera have been determined. It has been found that when the process flows in ampoules, there is a significant heterogeneity of energy supply across the cuvette: the primary drying in the outermost ampoules occurs more intensively than in those that are closer to the center of the cuvette. It has been established that with an increase in the height of the material in the primary packaging at the same amount of it, the time of lyophilization of preparations increases. It is revealed that the duration of the lyophilization of the drug is significantly affected by the filling level of the plates and the proximity of the ampoules. A predictive model for determining the desorption time to establish the required value of weight loss during drying has been developed.

Conclusions. The methods we have substantiated for establishing a rational lyophilization regime for cholera diagnostic serums are used in the production of these drugs.

Key words: cholera diagnostic sera, lyophilization, ampoules, research

For citation: Komissarov A.V., Badarin S.A., Bibikov D.N., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., Glazkova E.A., Fes'kova A.S., Ovchinnikova M.V., Nikiforov A.K. Improvement freeze-drying of diagnostic cholera sera in ampoules. Bacteriology. 2023; 8(2): 34–41. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-34-41

Ф КУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора для идентификации *Vibrio cholerae* производит 5 наименований диагностических холерных сывороток. Эти препараты выпускаются в ампулах в виде лиофилизата. Методические приемы производства данных препаратов в форме лиофилизата разработаны в 1950-х гг. Однако нам не удалось найти в доступной литературе сведения о разработке технологии их сублимационной сушки. В связи с этим исследование процесса лиофилизации холерных диагностических сывороток в ампулах для обоснования оптимальных параметров процесса является актуальной научно-практической задачей.

Материалы и методы

Лиофилизация образцов препаратов проводилась на лиофилизационной машине Epsilon 2-6D (Martin Christ, Германия). Потерю массы при высушивании находили с помощью инфракрасного термогравиметрического анализатора влажности MA 150 (Sartorius, Германия).

Для нахождения базовой модели и расчетной зависимости потери массы при высушивании (ПМВ) от технологических параметров лиофилизации использовали полный факторный эксперимент (ПФЭ) 2^n [1]. Методика постановки и реализации подробно изложена в наших исследованиях по разработке расчетных зависимостей для оценки ПМВ при лиофилизации модельных растворов диагностических бактериофагов [2].

Результаты и обсуждение

Специфика лиофилизации препарата в единичной ампуле

Традиционно процесс сублимационного высушивания (лиофилизации) дифференцируют по трем ключевым этапам: замораживание, сублимация (первичное высушивание) и десорбция (вторичное высушивание) [3–6]. Лиофилизация препаратов состоит из совокупности персональных процессов, происходящих в комплексе отдельных ампул. Возможность контроля уменьшения веса всех ампул при проведении сушки отсутствует. Соответственно нереально представить динамику индивидуального процесса лиофилизации каждой ампу-

лы. В связи с этим существует потребность создания методики управления процессом сублимационного высушивания. Нами предпринята попытка обоснования опытным путем способа определения завершения первичной сушки на основе анализа кривых, отражающих изменение температуры препарата во времени при его лиофилизации.

В начале процесса обсуждения результатов исследований следует сказать о том, что численные значения полученных результатов отличались для разных наименований холерных диагностических сывороток в пределах от 2 до 5%. Практически полное совпадение полученных данных объясняется одинаковой технологией их производства. В связи с этим в дальнейшем мы будем говорить обобщенно по всем сывороткам.

На рис. 1 изображена кривая, отражающая изменение температуры холерной диагностической сыворотки во времени при ее лиофилизации в одиночной ампуле ШП-5 на полке лиофилизатора. Количество препарата составляло 1,1 мл. Заморозка производилась на полке лиофилизатора до минус 45°C. Лиофилизация осуществлялась при остаточном давлении 0,1–0,15 мбар. Анализ данных, представленных на рис. 1, позволяет констатировать следующее.

После включения вакуумного насоса за 0,5 ч в сушилке устанавливается заданное значение вакуума. Визуально на конденсаторе лиофилизатора в этот момент наблюдается легкий налет льда, что свидетельствует об удалении замороженной влаги, имеющейся на конструкциях продуктового

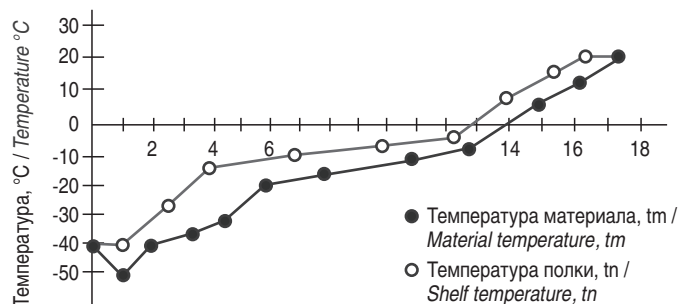


Рис. 1. Кривая отражающая изменение температуры холерной диагностической сыворотки во времени при ее лиофилизации в одиночной ампуле ШП-5.

Fig. 1. The curve expressing the change in the temperature of cholera diagnostic serum over time during its lyophilization in a single ampoule 5 ml.

отсека, и начале процесса первичного высушивания препарата. При этом происходит дополнительное охлаждение материала до -50°C . После процесс лиофилизации выходит на стационарный уровень, который, собственно, обозначается как этап сублимации. На кривой, отражающей изменение температуры холерной диагностической сыворотки во времени при ее лиофилизации, он описывается линейным повышением температуры препарата от -50°C до -38°C . Спустя 4,5 ч от начала процесса фиксируется скачок температуры в $5\text{--}10^{\circ}$ (в области точки А на рис. 1), после чего наблюдается выравнивание температур препарата и плит. Данный этап лиофилизации принято обозначать вторичным высушиванием. При десорбции уже отсутствует «несвязанная» влага и протекает извлечение из материала «связанной». Лيوфилизация заканчивается в момент достижения препаратом температуры полки сушильной установки t_m , нагретой, как правило, до комнатной температуры.

Представляет интерес довольно интенсивное увеличение температуры в области точки А через 4,5 ч от начала сушки за сравнительно небольшой период времени (40–50 мин). Зрительно выявлено, что данный перегиб совпадает с достижением высушенного материала дна ампулы, что может свидетельствовать об окончании сублимации. Последующее определение потери массы при высушивании в препарате, извлеченном из сушильной установки, показало, что данная величина составляет $12 \pm 1\%$. Принимая во внимание, что количество «несвязанной» влаги в замороженных препаратах, по данным литературы [7–9], составляет 80–90%, с большой долей вероятности можно утверждать об окончании этапа первичного высушивания.

Определение температуры полного замерзания, нижней и верхней эвтектической температуры холерных диагностических сывороток

Процесс сублимационной сушки материалов начинается с заморозки. Определяющими параметрами, дающими возможность установить оптимальные характеристики этапов

заморозки и дальнейшей сушки, служат температура полного отвердевания, нижняя и верхняя эвтектическая температуры [8, 10, 11]. Для определения этих параметров применяли методику, разработанную L.Reu [12]. При реализации данной методики проводят одновременное определение температуры исследуемого вещества и электрического сопротивления в течение заморозки с последующим размораживанием материала. Данные процедуры проводили на лиофилизационной машине Epsilon 2-6D. На этой установке измеряемое датчиком электрическое сопротивление выводится на дисплей в процентах. Данная методика была успешно применена нами при исследовании теплофизических характеристик иммуногенов холерной химической вакцины [13].

На рис. 2 показана кривая, выражающая взаимосвязь электрического сопротивления и температуры исследуемых образцов, изучение которой позволяет определить значения температуры полного отвердевания (-40°C , точка А), нижней (-35°C , точка В) и верхней (-25°C , точка С) эвтектической температуры.

На основании полученных данных и заключений, представленных в работах, посвященных исследованию процессов лиофилизации [11, 14], можно утверждать о желательности заморозки холерных диагностических сывороток до $-40\text{--}45^{\circ}\text{C}$ (на $5\text{--}10^{\circ}\text{C}$ меньше величины нижней эвтектической температуры) и сублимации препаратов при температуре $-25\text{--}35^{\circ}\text{C}$.

С целью подтверждения возможности проведения сублимации в найденных интервалах эвтектических температур были проведены сушки при температурах препарата -30°C (интервал между верхней и нижней эвтектическими температурами) и -20°C . В первом случае после окончания полного цикла лиофилизации сухой материал имел вид хорошо сформированной однородной таблетки. Во втором случае таблетка была неоднородной, с хорошо сформированной структурой в верхней части, а нижняя часть была деформированной. При этом таблетка не прилегала к дну ампулы, как в первом случае. Это свидетельствует о том, что во время сублимации произошло частичное оттаивание препарата и «подскок» таблетки.

Характер подвода тепла при лиофилизации препаратов в ампулах

Ранее было выявлено, что для одиночной ампулы допускается определять завершение первичной сушки по резкому увеличению температуры на кривой изменения температуры сыворотки во времени. Представляло определенный научно-практический интерес исследование динамики первичной сушки в различных местах кюветы с ампулами. Размер кюветы составлял 225×300 мм (ширина \times глубина), всего в нее при полной загрузке помещалось 300 ампул. Датчики температуры были помещены в ампулы с препаратом в соответствии со схемами, показанными на рис. 3. Было проведено по 3 цикла сушки, протекающей в соответствии с установленными в технологической документации параметрами (вакуум – 0,1–0,15 мбар; профиль нагрева плиты – нагрев от -40°C до 20°C с шагом $10^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, выдерживание при данной температуре до достижения продуктом температуры 20°C , нагрев до 25°C и выдерживание при ней в течение 6 ч).

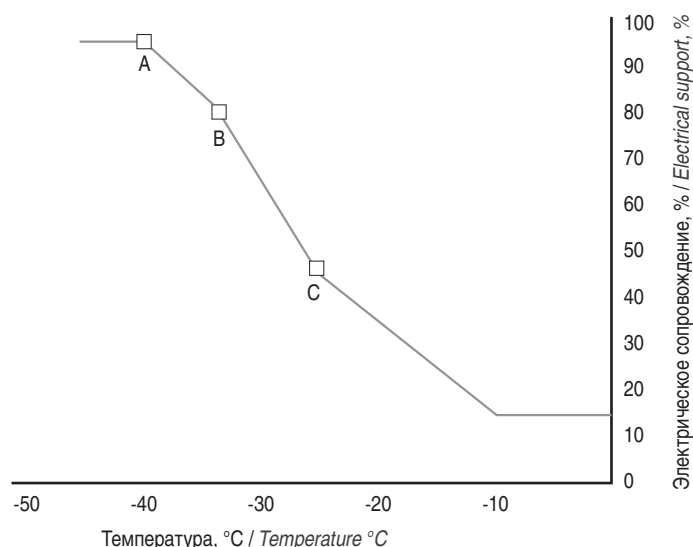


Рис. 2. Кривая, выражающая взаимосвязь электрического сопротивления и температуры холерной диагностической сыворотки.

Fig. 2. The curve expressing the relation between electrical resistance and temperature of cholera diagnostic serum.

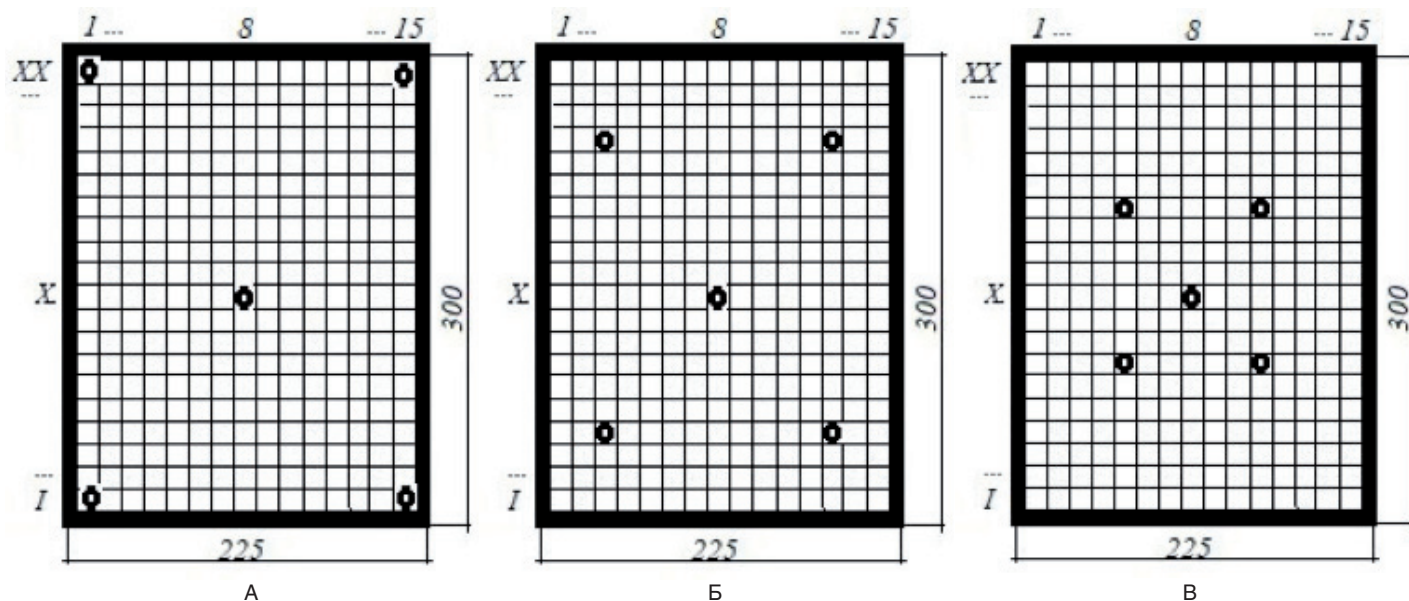


Рис. 3. Схема расположения датчиков температуры.
 Fig. 3. Scheme of temperature sensors.

В табл. 1 представлены данные эксперимента по определению времени начала резкого увеличения температуры на кривой, отражающей изменение температуры холерной диагностической сыворотки.

Полученные данные свидетельствуют о том, что интенсивность первичной сушки в периферийных ампулах протекает интенсивнее, чем в тех, которые находятся ближе к центру кюветы. Данный феномен объясняется, на наш взгляд, неоднородностью подвода тепла по площади охлаждающей плиты.

Площадь соприкосновения стандартных цилиндрических ампул мала, поэтому интенсивность переноса тепла между ампулами незначительна. Между тем при повышении температуры плиты периферийные ампулы приобретают больше энергии из-за неуправляемого подвода тепла от конструкций продуктового отсека путем радиации и конвекции. Ампулы воспринимают эту теплоту всей площадью, поверхность которой на порядок больше высушиваемого продукта. Дополнительная энергия, приобретенная периферийными ампулами, полностью расходуется на первичную сушку продукта в них самих и не распространяется на ампулы, расположенные ближе к центру, вследствие сильного сопротивления передачи. Следовательно, продукт в крайних ампулах кюветы находится в положении, более благоприятном для сублимации, с более низкой температурой полки высыхает значительно раньше.

Эти результаты убедительно говорят о целесообразности управления процессом по температуре материала в ампулах, расположенных в центральной части кюветы, где возможность повреждения продукта гораздо больше.

Лиофилизация препаратов при различных геометрических характеристиках первичной упаковки

Представляло интерес сравнительное исследование кинетики лиофилизации препаратов в ампулах и флаконах. Материал разливался по 1,1 мл во флаконы ФО-10 вместимостью 10 мл. Высота слоя материала составляла 3 мм (при получении материала в ампуле ШП-5 она была 6 мм). Кроме того, флаконы ФО-10 и ампулы ШП-5 различаются по геометрическим характеристикам. Было проведено по 3 цикла сушки препаратов в ампулах и флаконах при полной загрузке сублимационной установки, протекающих в соответствии с установленным в технологической документации параметрами (вакуум – 0,1–0,15 мбар; профиль нагрева плиты – нагрев от -4°C до 20°C с шагом 10°C/ч, выдерживание при данной температуре до достижения продуктом температуры

Табл. 1. Данные проведенного эксперимента по определению времени начала резкого увеличения температуры
 Table. 1. Data from the experiment to determine the time of the onset of the sharp increasing of temperature

Схема расположения датчиков температуры (рис. 3) / Scheme of temperature sensors (Fig. 3)	Место расположения точек контроля температуры / Location of temperature control points	Время начала резкого увеличения температуры, ч / Time of onset of the sharp increasing of temperature, h
Схема а Scheme a	I-1	6
	XX-1	6
	X-8	12
	XX-15	6
	I-15	6
Схема б Scheme b	III-3	8
	XV II-3	8
	X-8	12
	XV II-13	8
	III-13	8
Схема в Scheme v	V II-5	10
	XIV-5	10
	X-8	12
	XIV-11	10
	V II-11	10

Табл. 2. Результаты экспериментов по лиофилизации продукта при разном числе ампул, помещенных на плиты лиофилизатора
 Table. 2. Results of experiments on lyophilization of the product with different number of ampoules placed on the lyophilizer plates

Варианты эксперимента / Variants of the experiment		Время процесса, ч* / Process time, h*				
Вариант I (одна плита) / Option I (one plate)						
Площадь плиты с продуктом, % / Area of the plate with the product, %	Количество ампул, шт. / Number of ampoules, pcs.					
20	60	12				
40	120	15				
60	180	18				
80	240	21				
100	300	24				
Вариант II (2 плиты) / Option II (two plates)						
Площадь плиты I с продуктом, % / Plate area I with product, %	Количество ампул / Number of ampoules	Время процесса, ч / Process time, h*	Площадь плиты II с продуктом, % / Plate area II with product, %	Количество ампул / Number of ampoules	Всего ампул / Total ampoules	Время процесса, ч / Process time, h*
20	60	12	20	60	120	12
40	120	15	40	120	240	15
60	180	18	60	180	360	18
80	240	21	80	240	480	21
100	300	24	100	300	600	24
Вариант III (2 плиты) / Option III (two plates)						
Площадь плиты I с продуктом, % / Plate area I with product, %	Количество ампул / Number of ampoules	Время процесса, ч / Process time, h*	Площадь плиты II с продуктом, % / Plate area II with product, %	Количество ампул / Number of ampoules	Всего ампул / Total ampoules	Время процесса, ч / Process time, h*
20	60	12	100	300	360	24
40	120	15	80	240	360	21
60	180	18	60	180	360	18
80	240	21	40	120	360	15
100	300	24	20	60	360	12

*(по совпадению t_n и t_{ma}) / *(coincidence of t_n and t_{ma})

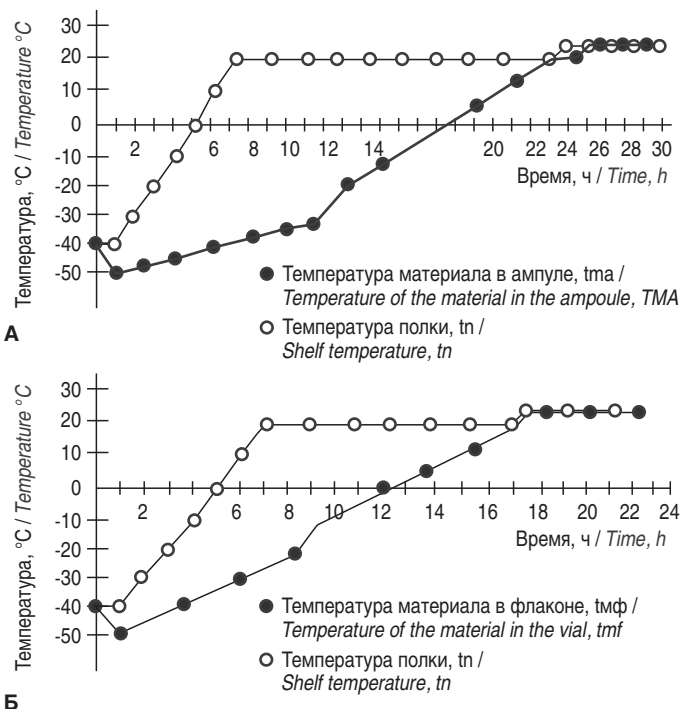


Рис. 4. Кинетика сушки препаратов в ампулах (а) и флаконах (б).
 Fig. 4. Kinetics of drying drugs in ampoules (a) and vials (b).

20°C, нагрев до 25°C и выдерживание при ней в течение 6 ч). Полученные данные представлены на рис. 4.

Данные рис. 4 позволяют сделать вывод о том, что с увеличением высоты материала в первичной упаковке при одном и том же его количестве возрастает время лиофилизации препаратов.

Особенности лиофилизации при разной величине загрузки плит продуктового отсека и взаиморасположения кювет с препаратом

В табл. 2 представлены результаты экспериментов по лиофилизации продукта при разном количестве ампул, помещенных на плиты лиофилизатора, при одинаковых режимах температуры полок и рабочего вакуума. Из этих данных следует, что продолжительность лиофилизации значительно увеличивается с расширением поверхности, занимаемой продуктом на плите, – время процесса при максимальном заполнении плиты в 2 раза больше, чем при заполнении на 20%. Также выявлено, что длительность лиофилизации обуславливается поверхностью загрузки плит установки, а не их количеством. При максимальной заполняемости двух плит длительность процесса аналогична таковой при максимальной заполняемости одной плиты. Таким образом, максимальная заполняемость одной плиты моделирует полную загрузку лиофилизатора. Результаты исследований позво-

Табл. 3. Пределы изменения показателей, взаимосвязь кодированного параметра X_i и натурального Z_i
Table. 3. Limits of change in indicators, the relatio of the coded parameter X_i and natural Z_i

Показатели / Parameters	Базовое значение / Basic meaning	Предел изменения / Limit of Changes	Максимальный предел изменения / (+) Maximum limit of change	Минимальный предел изменения (-) / Minimum limit of change (-)	Взаимосвязь кодированного параметра и натурального / The relatio of the coded parameter and natural
Z1 – температура десорбции, °C / Z1 – desorption temperature, °C	25,0	5,0	30,0	20,0	$X_1 = (Z_1 - 25)/5$
Z2 – продолжительность десорбции, ч / Z2 – duration of desorption, h	6	4	10	2	$X_2 = (Z_2 - 6)/4$

ляют сформулировать практическое предложение: следует избегать расположения продукта на одной плите продуктового отсека, а размещать его одинаковыми частями на каждой плите. Это позволит уменьшить время сушки.

Разработка прогностической модели определения времени десорбции с целью нахождения необходимой величины ПМВ

Для разработки прогностической модели, позволяющей рассчитывать значения ПМВ препаратов, был проведен ПФЭ 22. Изучаемыми показателями, воздействующими на величину ПМВ, приняты температура и продолжительность десорбции. Величины данных показателей принимались в пределах, которые используются в регламентированной технологии сублимационной сушки холерных диагностических сывороток.

В табл. 3 показаны пределы изменения показателей, взаимосвязь кодированного параметра X_i и натурального Z_i . Данные табл. 4 отражают программу проектирования ПФЭ и его итоги.

Для двух показателей, что применимо в наших экспериментах, базовая модель была следующей:

$$Y(b, X) = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{1,2} X_1 X_2, \quad (1)$$

где $Y(b, X)$ – целевая функция, b – коэффициенты регрессии при кодированных параметрах X .

В табл. 5. изложены результаты статистической обработки данных реализованных опытов.

Выражение (1) с использованием вычисленных коэффициентов будет иметь вид:

$$Y = 1,275 - 0,375X_1 - 0,725X_2. \quad (2)$$

С достоверностью $P = 95\%$ при $t_{кр} = 2,78$ и адекватности модели $F_{расч} = 6,9$ выявлена значимость всех коэффициентов уравнения (2), которое в натуральных величинах факторов приобрело вид:

$$Y = 1,275 - 0,375 ((Z_1 - 25)/5) - 0,725((Z_2 - 6)/4). \quad (3)$$

На заключительном этапе исследований определяли соответствие определенных по выражению (3) и выявленных опытным путем ПМВ при тех величинах температуры и продолжительности десорбции, которые не участвовали в экспериментах. С целью реализации опытов взяты: 15°C, 1 ч. Определенное по выражению (3) значение ПМВ было 2,3%, а выявленное в ходе лиофилизации – 2,25%. Это также служит доказательством адекватности выражения (12).

Табл. 4. Программа ПФЭ и его итоги
Table. 4. The CFE program and results

Показатель / Parameters		ПМВ (Y), % / PMV			
X_1	X_2	Y_1	Y_2	Y_3	Y_{cp}
+	+	0,1	0,3	0,2	0,2
-	+	0,9	1,1	0,8	0,9
+	-	1,6	1,6	1,6	1,6
-	-	2,6	2,4	2,2	2,4

Табл. 5. Результаты статистической обработки данных реализованных опытов
Table. 5. Results of statistical processing of data from implemented experiments

b_0	b_1	b_2	$b_{1,2}$	$t_{кр} S_{коэф}$
1,275	-0,375	-0,725	0,025	0,13

$F_{табл} = 7,71$; $F_{расч} = 6,9$, где
 $t_{кр}$ – критическая точка, определенная по таблице распределения Стьюдента [1]; $S_{коэф}$ – коэффициент, рассчитанный по данным эксперимента; $F_{табл}$ – критерий Фишера, определенный по таблице критических точек распределения Фишера [1]; $F_{расч}$ – критерий Фишера, рассчитанный по данным эксперимента
 $t_{кр}$ – critical point determined by the Student's table distribution [1]; S_{cof} – coefficient calculated from the data of the experiment; F_{table} – Fisher's criterion determined from the table of critical points of the Fisher distribution [1]; F_{rassch} – Fisher's criterion calculated from the experiment

Коэффициенты X_1 (температура десорбции) и X_2 (продолжительность десорбции) имеют знак «минус». Данное обстоятельство позволяет утверждать следующее: повышение значений этих показателей приводит к снижению значения ПМВ.

Заключение

Результаты исследования сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах позволяют сформулировать следующие выводы:

1) на кривой изменения температуры холерной диагностической сыворотки во времени при ее лиофилизации этап сублимации описывается линейным повышением температуры препарата, при этом резкий скачок увеличения температуры свидетельствует об окончании первичной сушки;

2) определены температура полного замерзания (-40°C), нижняя (-35°C) и верхняя (-25°C) эвтектические температуры холерных диагностических сывороток, что дает возможность управлять процессом замораживания и сублимации препаратов;

3) при лиофилизации в ампулах выявлена значительная гетерогенность подвода энергии по площади кюветы. В силу большой боковой площади у материала в ампулах происхо-

дит поглощение продуктом существенного количества направляемого тепла за счет конвекции от конструкций продуктового отсека. Первичная сушка в крайних ампулах происходит в 1,5–2 раза интенсивнее, чем в тех, которые находятся ближе к центру кюветы. Отсутствие однородности первичной сушки материала приводит к увеличению продолжительности процесса в силу того, что для недопущения перегрева препарата приходится уменьшать температуру полки;

4) при увеличении высоты материала в первичной упаковке при одном и том же его количестве возрастает время лиофилизации препаратов;

5) продолжительность лиофилизации препарата зависит от заполнения плит и плотности расположения ампул. Время сушки определяется не количеством используемых плит в сушилке, а степенью их заполнения. Итоговое время процесса обуславливается уровнем заполнения продуктом самой загруженной плитой;

6) разработана прогностическая модель, позволяющая определять продолжительность десорбции с целью получения необходимой величины ПМВ при назначенных температуре и продолжительности процесса.

Следует сказать о том, что представленные в данной работе итоги исследований были установлены только для сушилки Martin Christ Epsilon 2-6D. В случае использования других машин технологические параметры лиофилизации продукта могут варьировать. Вместе с тем обоснованные нами приемы установления рационального режима сушки могут быть востребованными также при использовании на сублимационных установках различных наименований. Практика производства выявила, что технологические приемы лиофилизации холерных диагностических сывороток, разработанные с применением сушилки Martin Christ Epsilon 2-6D, с успехом использовались на установке iShin LP50R (Республика Корея).

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках выполнения НИР 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (номер государственной регистрации АААА-А21-121012090066-4).

Financial support

The work was carried out as part of the implementation of research work 89-2-21 «Scientific and applied aspects of the production and improvement of drugs for immunoprophylaxis and diagnosis of dangerous bacterial and viral infections» (state registration number АААА-А21-121012090066-4).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Адлер ЮП, Маркова ЕВ, Грановский ЮВ. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М.: Наука, 1971.

2. Комиссаров АВ, Бибииков ДН, Бадарин СА, Синицына НВ, Костылева НИ, Овчинникова МВ, и др. Разработка расчетной зависимости для оценки величины потери массы при лиофилизации диагностических препаратов. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020;10(3):506-14. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514
3. Franks F, Auffret T. Freeze-Drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals. Cambridge, UK: RSCPublishing; 2007. DOI: 10.1039/9781847557704
4. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharm Res. 2004 Feb;21(2):191-200. DOI: 10.1023/b:pham.0000016234.73023
5. Комиссаров АВ, Бибииков ДН, Волох ОА, Бадарин СА, Синицына НВ, Костылева НИ, и др. Лиофилизации живых вакцин. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2018;14(3):56-73. DOI: 10.30906/2073-8099-2020-12-2-13-31
6. Могилук В. Аспекты лиофилизационной сушки водных растворов. Фармацевтическая отрасль. 2014;5(46):46-53.
7. Pikal MJ, Rambhatla S, Ramot R. The Impact of the Freezing Stage in Lyophilization: Effects of the Ice Nucleation Temperature on Process Design and Product Quality. Journal of the American Pharmacists Association. 2002;5:48-53.
8. Гусаров ДА. Лиофилизация биофармацевтических белков. Биофармацевтический журнал. 2010;2(5):3-7.
9. Rambhatla S, Ramot R, Bhugra Ch, Pikal MJ. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying: II. Control and characterization of the degree of supercooling. AAPS PharmSciTech. 2004;5(4):54-62. DOI: 10.1208/pt050458
10. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. Eur J Pharm Biopharm. 1998 May;45(3):221-9. DOI: 10.1016/s0939-6411(98)00004-6
11. Нежута АА, Сербис ЕС. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов. Биотехнология. 2001;6:59-67.
12. Rey L, May JC. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. London: Informa Healthcare; 2010.
13. Комиссаров АВ, Кочкалова НН, Синицына НВ, Бадарин СА, Костылева НИ, Волох ОА, и др. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины. Проблемы особо опасных инфекций. 2016;1:90-3. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-90-93
14. Constantino HR, Pikal MJ. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA, USA: AAPS Press; 2004.

References

1. Adler YuP, Markova EV, Granovsky YuV. Planning an experiment in the search for optimal conditions. M.: Nauka, 1971. (In Russian).
2. Komissarov AV, Bibikov DN, Badarin SA, Sinityna NV, Kostyleva NI, Ovchinnikova MV, et al. Calculation of dependences for estimating the amount of weight loss during lyophilization of diagnostic preparations. Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya (Applied Chemistry and Biotechnology). 2020;10(3):506-514. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514 (In Russian).
3. Franks F, Auffret T. Freeze-Drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals. Cambridge, UK: RSCPublishing; 2007. DOI: 10.1039/9781847557704
4. Tang X, Pikal MJ. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharm Res. 2004 Feb;21(2):191-200. DOI: 10.1023/b:pham.0000016234.73023
5. Komissarov AV, Bibikov DN, Volokh OA, Badarin SA, Sinityna NV, Kostyleva NI, et al. Lyophilization of live vaccines. Yu.A.Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology. 2018;14(3):56-73. (In Russian).
6. Mogilyuk V. Aspekty liofilizacionnoj sushki vodnyh rastvorov. Farmaceuticheskaya otrasl'. 2014;5(46):46-53. (In Russian).
7. Pikal MJ, Rambhatla S, Ramot R. The Impact of the Freezing Stage in Lyophilization: Effects of the Ice Nucleation Temperature on Process Design and Product Quality. Journal of the American Pharmacists Association. 2002;5:48-53.

8. Gusarov DA. Lyophilization of biopharmaceutical proteins. *Biopharmaceutical Journal*. 2010;2(5):3-7. (In Russian).
9. Rambhatla S, Ramot R, Bhugra Ch, Pikal MJ. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying: II. Control and characterization of the degree of supercooling. *AAPS PharmSciTech*. 2004;5(4):54-62. DOI: 10.1208/pt050458
10. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998 May;45(3):221-9. DOI: 10.1016/s0939-6411(98)00004-6
11. Nezhuta AA, Serbis ES. Development of scientifically-substantiated modes for freeze-drying of biological preparations. *Biotehnologiya*. 2001;6:59-67. (In Russian).
12. Rey L, May JC. *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. London: Informa Healthcare; 2010.
13. Komissarov AV, Kochkalova NN, Sinitsyna NV, Badarin SA, Kostyleva NI, Volokh OA, et al. Studies of Freeze-Drying of Cholera Chemical Vaccine Immunogens. *Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections)*. 2016;1:90-93. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-90-93 (In Russian).
14. Constantino HR, Pikal MJ. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. Arlington, VA, USA: AAPS Press; 2004.

Информация об авторах:

Синицына Наталья Викторовна, научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Бадарин Сергей Анатольевич, научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Бибиков Дмитрий Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Костылева Наталья Ивановна, научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Глазкова Екатерина Алексеевна, младший научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Феськова Анна Сергеевна, младший научный сотрудник ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Овчинникова Мария Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая отделом ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Никифоров Алексей Константинович, доктор биологических наук, заместитель директора ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, профессор кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И.Вавилова

Information about authors:

Natalya V. Sinitsyna, Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Sergey A. Badarin, Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Dmitry N. Bibikov, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Natalia I. Kostyleva, Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Ekaterina A. Glazkova, Junior Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Anna S. Fes'kova, Junior Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Maria V. Ovchinnikova, PhD (Biological Sciences), Department Head, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor

Alexey K. Nikiforov, PhD, DSc (Biological Sciences), Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor; Professor of the Department of Microbiology, Biotechnology and Chemistry, N.I.Vavilov Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering

НОВОСТИ НАУКИ

Генетический переключатель контролирует колонизацию поверхности клетками *Pseudomonas aeruginosa*

Эффективная колонизация поверхностей слизистых оболочек имеет важное значение для условно-патогенных микроорганизмов, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, но то, как бактерии коллективно и индивидуально адаптируются для оптимизации адгезии, вирулентности и распространения, в значительной степени неясно. Здесь мы идентифицировали стохастический генетический переключатель, *hecR-hecE*, который экспрессируется бимодально и генерирует функционально различные бактериальные субпопуляции, чтобы сбалансировать рост и распространение *P. aeruginosa* на поверхностях. *HecE* ингибирует фосфодиэстеразу *BifA* и стимулирует дигуанилатциклазу *WspR*, повышая уровни вторичного мессенджера *c-di-GMP* и способствуя поверхностной колонизации в субпопуляции клеток; *HecE*-экспрессирующие клетки с низким уровнем диспергируются. Доля клеток *HecE*⁺ регулируется различными факторами стресса и определяет баланс между образованием биопленки и распространением клеток на большие расстояния в сообществах, выращенных на поверхности. Мы также демонстрируем, что путь *HecE* представляет собой лекарственную мишень для эффективного противодействия поверхностной колонизации *P. aeruginosa*. Выявление таких бинарных состояний открывает новые способы борьбы с инфекциями слизистых оболочек, вызываемыми основным патогеном человека.



Manner C, Dias Teixeira R, Saha D, et al.

A genetic switch controls *Pseudomonas aeruginosa* surface colonization. *Nat Microbiol*. 2023 Aug;8(8):1520-1533. DOI: 10.1038/s41564-023-01403-0