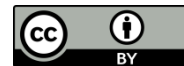


Оригинальная статья / Original article

УДК 579.66

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514>



Разработка расчетной зависимости для оценки величины потери массы при лиофилизации диагностических препаратов

© А.В. Комиссаров^{*,**}, Д.Н. Бибиков^{*}, С.А. Бадарин^{*}, Н.В. Сеницына^{*},
Н.И. Костылева^{*}, М.В. Овчинникова^{*}, Г.И. Коровкина^{*}, О.С. Зинина^{*},
И.А. Плотников^{*}, А.К. Никифоров^{*,**}

*Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»,
г. Саратов, Российская Федерация

**Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова,
г. Саратов, Российская Федерация

Резюме: Цель исследования – разработка расчетных зависимостей для оценки величины потери массы при лиофилизации диагностических препаратов в зависимости от температурно-временных режимов досушивания. В качестве модельного раствора при лиофилизации использовали бульон Хоттингера со стабилизаторами: желатин (1,5%) и пептон (10%). Для достижения цели был спланирован и реализован полный факторный эксперимент 2^3 , в котором исследуемыми факторами являлись температура и время досушивания, а также количество препарата в первичной упаковке. В результате проведения полного факторного эксперимента при использовании ампул в качестве первичной упаковки было получено уравнение регрессии. Проведенная статистическая обработка полученного уравнения показала адекватность математической модели. При ее интерпретации было установлено, что с увеличением температуры и времени досушивания величина потери массы при высушивании уменьшается, а при повышении количества препарата во вторичной упаковке – увеличивается. В результате проведения экспериментов выявлено соответствие опытных и расчетных значений потери массы при высушивании. Изучено влияние высоты высушиваемого материала на потерю массы при высушивании для лиофилизации эквивалентного количества вещества во флаконах. Обоснованная ранее математическая модель для сушки в ампулах модернизирована для описания процесса лиофилизации во флаконах. Результаты подтверждающих экспериментов показали возможность вычисления потери массы при высушивании для полученной модели. Разработанные расчетные зависимости позволяют оценивать текущее значение величины потери массы при лиофилизации препаратов, что приобретает особую значимость для уменьшения затрат при обосновании температурно-временных параметров досушивания новых биопрепаратов, нормативных производственных режимов при изменении количества продукта, вида первичной упаковки, условий десорбции.

Ключевые слова: лиофилизация, потеря массы при высушивании, полный факторный эксперимент, ампулы, флаконы, расчетная зависимость

Информация о статье: Дата поступления 22 октября 2019 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Комиссаров А.В., Бибиков Д.Н., Бадарин С.А., Сеницына Н.В., Костылева Н.И., Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Зинина О.С., Плотников И.А., Никифоров А.К. Разработка расчетной зависимости для оценки величины потери массы при лиофилизации диагностических препаратов. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 3. С. 506–514. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514>

Calculation of dependences for estimating the amount of weight loss during lyophilization of diagnostic preparations

Alexander V. Komissarov^{*,**}, Dmitry N. Bibikov^{*}, Sergey A. Badarin^{*},
Nataliya V. Sinitsyna^{*}, Nataliya I. Kostyleva^{*}, Marya V. Ovchinnikova^{*},
Galina I. Korovkina^{*}, Olga S. Zinina^{*}, Igor A. Plotnikov^{*}, Aleksey K. Nikiforov^{*,**}

*Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation

**N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov, Russian Federation

Abstract: *In this study, we aimed to calculate dependencies for assessing the value of weight loss during lyophilization of diagnostic preparations depending on the drying temperature and time. A model solution for lyophilization was Hottinger broth with gelatin (1.5%) and peptone (10%) used as stabilizers. To achieve the aim, a full factorial experiment 2^3 was planned and implemented, the investigated factors in which were the temperature and time of final drying, as well as the amount of substance in the primary packaging. Using ampoules as containers for primary packaging, a regression equation was obtained. The conducted statistical processing of the obtained equation showed the feasibility of the developed mathematical model. According to the model, an increase in the drying temperature and time leads to a decrease in the amount of weight loss; however, weight loss increases under an increase in the amount of substance in the secondary packaging. As a result of the experiments, a correspondence between the experimental and calculated values of weight loss during drying was revealed. The effect of the height of the material under drying on the weight loss was studied when drying an equivalent amount of substance in vials. The developed mathematical model for drying in ampoules was modified to describe the process of lyophilization in vials. The experimental results confirmed the possibility of calculating weight loss during drying using the proposed model. The developed dependencies can be used for estimating the value of weight loss during lyophilization of various substances, which is of particular importance in terms of reducing costs when establishing the temperature and time parameters of drying new biological products and modifying production regimes when changing the amount of product, type of primary packaging or desorption conditions.*

Keywords: *lyophilization, weight loss on drying, full factorial experiment, ampoules, vials, calculated dependence*

Information about the article: *Received October 22, 2019; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.*

For citation: Komissarov AV, Bibikov DN, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, Ovchinnikova MV, Korovkina GI, Zinina OS, Plotnikov IA, Nikiforov AK. Calculation of dependences for estimating the amount of weight loss during lyophilization of diagnostic preparations. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2020;10(3):506–514. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514>

ВВЕДЕНИЕ

Процесс лиофилизации дифференцируется по трем фазам: заморозка, сублимация и десорбция. Заморозка определяет структуру вещества, от которой зависит протекание последующих стадий процесса и, как правило, характеристики готового продукта [1–5]. При сублимации удаляется основной объем замороженной несвязанной влаги (до 90%), после чего она завершается [6, 7]. С целью десорбции связанной жидкости используют повышение температуры вещества до установления необходимой величины потери в массе при высушивании (ПМВ) [8, 9].

Скорость десорбции обуславливается интенсивностью диффузии влаги. Установлено, что значение ПМВ определяется температурой процесса десорбции и площадью вещества и не зависит от значения вакуума в лиофилизаторе и высоты высушиваемого продукта [10, 11]. Уровень ПМВ сухого продукта определяется прежде всего температурно-временными параметрами досушивания: чем больше температура продукта и время досушивания, тем меньше значение ПМВ.

При конструировании лиофилизаторов биопрепаратов, а также при высушивании существующих продуктов следует иметь представление о достигаемом в процессе десорбции значении

ПМВ вещества при варьировании температурно-временных характеристик процесса.

Известно, что целевые свойства лиофилизаторов биопрепаратов лучше сохраняются при определенном значении ПМВ, при этом конкретное значение данного параметра является индивидуальным для каждого продукта [12–15]. Таким образом, задача обоснования температурно-временных режимов десорбции приобретает большое значение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве модельного раствора использовали бульон Хоттингера со стабилизаторами: желатин (ГОСТ 11293-89) и пептон (ГОСТ 13805-76), расчетная концентрация 1,5 и 10% соответственно. Соединение бульона Хоттингера со средой высушивания осуществляли в соотношении 1:1. Бульон Хоттингера применяется при выращивании фагов, а вышеназванные стабилизаторы – при лиофилизации препаратов в производстве чумного Л-413С, Покровского (П) и псевдотуберкулезного диагностических бактериофагов.

Лиофилизация образцов осуществлялась на сублимационной сушильной установке Martin Christ Epsilon 2-6 (Германия). Образцы разливали в ампулы типа ШП-6 объемом 6 см³ или флаконы ФО-10 вместимостью 10 мл, замораживали

до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ на полках продуктового отсека машины, сублимировали в зоне эвтектики в соответствии с методическими приемами, обоснованными ранее [16], и досушивали при различных температурно-временных режимах. Потерю массы при высушивании устанавливали с применением анализатора влажности Sartorius MA 150 (Германия). Объем серий составлял 400 ампул. Эксперименты проводились в трех повторностях.

Для нахождения базовой модели и расчетной зависимости ПМВ от технологических параметров лиофилизации использован математический метод планирования экспериментов, в частности, полный факторный эксперимент (ПФЭ) 2^n . Базовая модель содержала линейные члены и их взаимодействия различного порядка:

$$Y(b, X) = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{\substack{i=1 \\ k=i+1}}^n b_{ik} X_i X_k + \sum_{\substack{i=1 \\ k=i+1 \\ l=k+1}}^n b_{ikl} X_i X_k X_l + \dots, \quad (1)$$

где $Y(b, X)$ – целевая функция; $X_{i,k,l}$ – фактор независимой переменной в кодированном виде; N – число исследуемых факторов; b_i – коэффициенты при линейных факторах; b_{ik} – коэффициенты при парных взаимодействиях факторов; b_{ikl} – коэффициенты при взаимодействии трех факторов.

Планирование, реализацию и обработку данных полного факторного эксперимента осуществляли по следующему алгоритму:

- кодировка исследуемых факторов;
- построение матрицы планирования эксперимента в кодированных переменных;
- вычисление коэффициентов уравнения регрессии;
- проверка найденных коэффициентов на значимость;
- проверка адекватности полученного уравнения регрессии;
- интерпретация полученной модели;
- преобразование уравнения регрессии от кодированных к натуральным переменным.

Кодировка исследуемых факторов осуществлялась по формуле:

$$X_i = \frac{Z_i - Z_i^0}{\lambda_i}, \quad (2)$$

где Z – фактор независимой переменной в натуральном виде; Z_i^0 – основной (нулевой) уровень факторов; λ_i – интервал варьирования факторов.

Z_i^0 и λ_i находили по следующим соотношениям:

$$Z_i^0 = \frac{Z_i^+ + Z_i^-}{2}. \quad (3)$$

$$\lambda_i = \frac{Z_i^+ - Z_i^-}{2}. \quad (4)$$

Коэффициенты уравнения регрессии находили с помощью метода наименьших квадратов, применяя следующие выражения:

$$b_0 = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \bar{Y}_j, \\ b_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \bar{Y}_j X_{i,j}, \quad i = \overline{1, k}, \quad (5) \\ b_{r,p} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \bar{Y}_j X_{j,r} X_{j,p}, \quad r < p, \quad r = \overline{1, k}, \quad p = \overline{1, k}.$$

Проверка найденных коэффициентов на значимость осуществлялась по критерию Стьюдента: при $|b| > t_{кр} S_{\text{коэф}}$ b считали значимым. В противном случае коэффициент признавали незначимым и принимали его равным нулю. Критическую точку $t_{кр}$ находили из таблиц распределения Стьюдента [5] по числу степеней свободы $n(m-1)$ и заданной вероятности P . $S_{\text{коэф}}$ вычисляли по формуле:

$$S_{\text{коэф}} = \sqrt{\frac{S_y^2}{nm}}. \quad (6)$$

Дисперсию воспроизводимости рассчитывали, используя формулу:

$$S_y^2 = \frac{1}{n(m-1)} \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2, \quad (7)$$

где n – число экспериментов (строк в матрице ПФЭ); m – число опытов в каждом эксперименте; Y_{ij} – результат отдельного i -ого наблюдения в j -м наблюдении; \bar{Y}_j – среднее выборочное значение для j -го эксперимента.

Проверка адекватности полученного уравнения регрессии проводилась по критерию Фишера, при этом уравнение считали адекватным, если соблюдалось неравенство: $F_{\text{расч}} < F_{\text{табл}}$.

$F_{\text{расч}}$ вычисляли по формуле:

$$F_{\text{расч}} = \frac{S_{\text{ост}}^2}{S_y^2}, \quad (8)$$

где $S_{\text{ост}}^2$ – остаточная дисперсия, определяемая в соответствии с выражением:

$$S_{\text{ост}}^2 = \frac{m}{n-r} \sum_{j=1}^n (\tilde{Y}_j - \bar{Y}_j)^2, \quad (9)$$

где r – число значимых коэффициентов в уравнении регрессии; \tilde{Y}_j – значение изучаемого параметра, определенное по уравнению регрессии со значимыми коэффициентами для j -го эксперимента.

$F_{табл}$ находили из таблиц критических точек распределения Фишера [17] по заданной вероятности и соответствующим степеням свободы $k_1=n-r$, $k_2=n(m-1)$.

Интерпретация полученной модели осуществлялась по уравнению регрессии в кодированных переменных. При этом знак «плюс» у коэффициента говорит о том, что с увеличением данного фактора увеличивается исследуемый параметр, а при знаке «минус», наоборот, уменьшается.

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли по стандартной методике определения грубых ошибок. Расчеты осуществляли с помощью Microsoft Office Excel 2010 и Mathcad (версия 15.0).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С целью получения расчетной зависимости для оценки величины ПМВ диагностических препаратов использованы математические методы планирования экспериментов. Был спланирован и реализован полный факторный эксперимент 2^3 . Исследуемыми факторами, влияющими на значение ПМВ, были: температура досушивания, время досушивания и количество препарата в ампуле. Значения названных параметров брались в интервалах, применяемых при производстве лиофилизации диагностических препаратов.

Уровни варьирования факторов и зависимость кодированной переменной X_i от натуральной Z_i , а также матрица планирования полного факторного эксперимента с его результатами представлены в табл. 1, 2.

В наших исследованиях базовая модель (1) приняла следующий вид:

$$Y(b, X) = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1X_2 + b_5X_1X_3 + b_6X_2X_3 + b_7X_1X_2X_3, \quad (10)$$

Применяя метод наименьших квадратов по методике статистической обработки результатов экспериментов, представленной в разделе «Экспериментальная часть», были определены коэффициенты b_i выбранной модели при переменных X_1 , X_2 , X_3 и их взаимодействиях, а также точностные характеристики, определяющие значимость коэффициентов b_i и адекватность модели.

Данные статистической обработки результатов проведенного эксперимента представлены в табл. 3.

В результате обработки данных проведенного эксперимента было получено следующее уравнение регрессии:

$$Y = 1,15 - 0,45X_1 - 0,3X_2 + 0,175X_3 - 0,025X_{2,3} - 0,025X_{1,3} - 0,025X_{1,2,3}. \quad (11)$$

Таблица 1. Уровни варьирования факторов и зависимость кодированной переменной X_i от натуральной Z_i

Table 1. Rate of factor variation and dependence of coded variable X_i on natural one Z_i

Фактор	Основной уровень (нулевой)	Интервал варьирования	Верхний уровень (+)	Нижний уровень (-)	Зависимость кодированной переменной от натуральной
Z_1 – температура досушивания, °C	25,0	5,0	30,0	20,0	$X_1 = \frac{Z_1 - 25}{5}$
Z_2 – время досушивания, ч	10	5	15	5	$X_2 = \frac{Z_2 - 10}{5}$
Z_3 – количество препарата в ампуле, мл	1,25	0,75	2,0	0,5	$X_3 = \frac{Z_3 - 1,25}{0,75}$

Таблица 2. План многофакторного эксперимента и его результаты

Table 2. Scheme of multifactorial experiment and its results

Номер варианта	Факторы			Потеря массы при высушивании (Y), %			
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_{cp}
1	+	+	+	0,5	0,4	0,6	0,5
2	-	+	+	1,5	1,5	1,5	1,5
3	+	-	+	1,0	1,2	0,8	1,2
4	-	-	+	2,0	2,1	2,2	2,1
5	+	+	-	0,3	0,2	0,4	0,3
6	-	+	-	1,1	1,1	1,1	1,1
7	+	-	-	0,8	1,0	0,6	0,8
8	-	-	-	1,6	1,7	1,8	1,7

Таблица 3. Данные статистической обработки результатов эксперимента
 Table 3. Statistical processing of experimental results

b_0	b_1	b_2	b_3	$b_{1,2}$	$b_{1,3}$	$b_{2,3}$	$b_{1,2,3}$	$t_{кр} S_{коэф}$
1,15	0,45	-0,3	0,175	0	-0,025	-0,025	-0,025	0,19
$F_{табл}=3,01; F_{расч}=2,25$								

Последующая статистическая обработка выражения (11) с принятой вероятностью $P = 95\%$ значимости коэффициентов b_i при $t_{кр}=2,12$ и адекватности модели $F_{расч}=2,25$ выявила, что коэффициенты регрессии для факторов $X_{1,3}; X_{2,3}; X_{1,2,3}$ не являются значимыми, их можно не учитывать. Следовательно, уравнение (11) выглядит следующим образом:

$$Y = 1,15 - 0,45X_1 - 0,3X_2 + 0,175X_3. \quad (12)$$

Или в натуральных величинах факторов:

$$Y = 1,15 - 0,45 \left(\frac{Z_1 - 25}{5} \right) - 0,3 \left(\frac{Z_2 - 10}{5} \right) + 0,175 \left(\frac{Z_3 - 1,25}{0,75} \right). \quad (13)$$

Представляло определенный интерес выявление соответствия расчетных и полученных ПМВ при тех значениях температуры и времени досушивания, а также количества препарата в ампуле, при которых исследования не проводились. Для проведения экспериментов были выбраны следующие значения вышеназванных технологических факторов: 35 °С, 12 ч и 1,0 мл. Рассчитанная величина ПМВ составляла 0,07%, а определенная экспериментально – 0,05%. Данные значения являются дополнительным подтверждением адекватности уравнения (13).

Множители при X_1 (температура досушивания) и X_2 (время досушивания) отрицательны. Это свидетельствует о том, что при увеличении данных технологических параметров уменьшается величина ПМВ. Множитель при X_3 положительный. Это говорит о том, что при увеличении количества препарата в ампуле величина ПМВ, наоборот, увеличивается.

Следует отметить, что полученное уравнение регрессии (13) успешно используется при промышленном производстве диагностических бактериофагов: чумного Л-413С, Покровского (П) и

псевдотуберкулезного.

Представляло определенный научно-практический интерес изучение влияния высоты высушиваемого материала на ПМВ. С этой целью были спланированы и проведены эксперименты по лиофилизации эквивалентного количества продукта (имеющего одинаковую высоту) во флаконах ФО-10 вместимостью 10 мл и ампулах типа ШП-6 объемом 6 см³. Фасовка в ампулы составляла 2,0 мл (высота материала 15 мм), соответственно эквивалентное количество продукта во флаконе – 4 мл (коэффициент соотношения между количеством высушиваемого материала составил 0,5). Технологические параметры досушивания были следующие: температура – 30 °С, продолжительность – 15 ч. ПМВ как в ампулах, так и во флаконах составила 0,5%. Необходимо заметить, что значения ПМВ материала, высушенного в ампулах, идентичны рассчитанным по зависимости (13).

Преобразованная формула для вычисления ПМВ при лиофилизации во флаконах будет иметь вид:

$$Y = 1,15 - 0,45 \left(\frac{Z_1 - 25}{5} \right) - 0,3 \left(\frac{Z_2 - 10}{5} \right) + 0,175 \left(\frac{0,5Z_{флз} - 1,25}{0,75} \right), \quad (14)$$

где $0,5 Z_{флз}$ – количество препарата во флаконе, мл.

Результаты подтверждающих экспериментов при количестве препарата во флаконе 2 мл представлены в табл. 4.

Анализ данных, представленные в табл. 4, свидетельствует об удовлетворительной сходимости расчетных и экспериментальных значений. Это позволяет говорить о возможности применения выражения (14) для вычисления технологических характеристик.

Таблица 4. Результаты подтверждающих экспериментов при количестве препарата во флаконе 2 мл
 Table 4. Results of confirmation experiments, with 2 ml of preparation per flask

Режимы досушивания		ПМВ, %	
		рассчитанная	определенная экспериментально
Температура, °С	Время, ч		
25	5	1,27	1,3
25	15	0,67	0,7
20	5	1,72	1,75
20	15	0,8	0,8

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанные нами математические выражения (13) и (14) дают возможность:

– предсказывать, а также определять в процессе лиофилизации текущие величины промежуток величин ПМВ сухого биопрепарата при различных технологических параметрах десорбции;

– прогнозировать время процедуры десорбции для установления требуемого значения ПМВ при установленных температурно-временных параметрах;

– определить температуру биопрепарата при установленной длительности десорбции.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Гусаров Д.А. Лиофилизация биофармацевтических белков (миниобзор) // Биофармацевтический журнал. 2010. Т. 2. N 5. С. 3–7.

2. Комиссаров А.В., Бибиков Д.Н., Волох О.А., Бадарин С.А., Синицына Н.В., Костылева Н.И. [и др.]. Лиофилизация живых вакцин // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2018. Т. 14. N 3. С. 56–73.

3. Komissarov A.V., Bibikov D.N., Volokh O.A., Badarin S.A., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., et al. Lyophilisation of inactivated vaccines // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 3. С. 403–419. <http://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-403-419>

4. Pikal M.J., Rambhatla S., Ramot R. The impact of the freezing stage in lyophilization: effects of the ice nucleation temperature on process design and product quality // American Pharmaceutical Review. 2002. Vol. 5. P. 48–53.

5. Tang X., Pikal M.J. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice // Pharmaceutical Research. 2004. Vol. 21. Issue 2. P. 191–200. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000016234.73023.75>

6. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 1998. Vol. 45. Issue 3. P. 221–229. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00004-6)

7. Collier L.H. The development of a stable smallpox vaccine // Epidemiology and Infection. 1955. Vol. 53. P. 76–101. <https://doi.org/10.1017/S002217240000053X>

8. Colandene J.D., Maldonado L.M., Creagh A.T., Vrettos J.S. Lyophilization cycle development for a high-concentration monoclonal antibody formulation lacking a crystalline bulking agent // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2007. Vol. 96. Issue 6. P. 1598–1608. <https://doi.org/10.1002/jps.20812>

9. Meister E., Gieseler H. Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: Drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to

corresponding glass transition Data // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009. Vol. 98. Issue 9. P. 3072–3087. <https://doi.org/10.1002/jps.21586>

10. Constantino H.R., Pikal M.J. Lyophilization of Biopharmaceuticals. Arlington, VA, USA: AAPS Press, 2004. 686 p.

11. Bhatnagar B.S., Pikal M.J., Bogner R.H. Study of the individual contributions of ice formation and freeze-concentration on isothermal stability of lactate dehydrogenase during freezing // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008. Vol. 97. Issue 2. P. 798–814. <https://doi.org/10.1002/jps.21017>

12. Нежута А.А., Сербис Е.С. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов // Биотехнология. 2001. N 6. С. 59–67.

13. Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Гостищева С.Е., Фисун А.А., Ляпустина Л.В. Сравнительный анализ экспериментальных серий вакцины чумной живой по показателям жизнеспособности и термостабильности // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. N 4 (102). С. 68–71. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-4\(102\)-68-71](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-4(102)-68-71)

14. Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ракитина Е.Л., Иванова Г.Ф., Фисун А.А. Биотехнология стабилизации живых микроорганизмов в биомассе и в препарате чумной вакцины // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6. N 1. С. 87–92.

15. Нежута А.А., Сербис Е.С., Диденко А.А., Головлева С.И. Некоторые аспекты сублимационного высушивания биоматериалов // Фармацевтические технологии и упаковка. 2012. N 4. С. 38–40.

16. Комиссаров А.В., Овчинникова М.В., Бадарин С.А., Бибиков Д.Н., Синицына Н.В., Костылева Н.И. [и др.]. Экспериментальное обоснование новой формы выпуска холерных диагностических сывороток // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. N 4. С. 38–40. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-4-38-40>

17. Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М.: Наука, 1976. 279 с.

REFERENCES

1. Gusarov DA. Freeze-drying of biopharmaceutical proteins (mini-review). *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Journal of Biopharmaceutics*. 2010;2(5): 3–7. (In Russian)

2. Komissarov AV, Bibikov DN, Volokh OA, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, et al. Lyophilization of live vaccines. *Vestnik biotekhnologii i fizi-*

ko-khimicheskoi biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova. 2018;14(3):56–73. (In Russian)

3. Komissarov AV, Bibikov DN, Volokh OA, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, et al. Lyophilisation of inactivated vaccines. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and*

Biotechnology. 2019;9(3):403–419. <http://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-409-419>

4. 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. *American Pharmaceutical Review*. 2002;5:48–53.

5. Tang X, Pikal MJ. Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice. *Pharmaceutical Research*. 2004;21(2):191–200. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000016234.73023.75>

6. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1998;45(3): 221–229. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)0004-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)0004-6)

7. Collier LH. The development of a stable smallpox vaccine. *Epidemiology and Infection*. 1955;53:76–101. <https://doi.org/10.1017/S002217240000053X>

8. Colandene JD, Maldonado LM, Creagh AT, Vrettos JS. Lyophilization cycle development for a high-concentration monoclonal antibody formulation lacking a crystalline bulking agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;96(6):1598–1608. <https://doi.org/10.1002/jps.20812>

9. Meister E, Gieseler H. Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures: drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to corresponding glass transition data. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98(9):3072–3087. <https://doi.org/10.1002/jps.21586>

10. Constantino HR, Pikal MJ. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*. Arlington, VA, USA: AAPS Press; 2004. 686 p.

11. Bhatnagar BS, Pikal MJ, Bogner RH. Study of the individual contributions of ice formation and

freeze-concentration on isothermal stability of lactate dehydrogenase during freezing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97():798–814. <https://doi.org/10.1002/jps.21017>

12. Nezhuta AA, Serbis ES. Development of scientifically grounded modes of freeze drying of biological products. *Biotehnologiya = Biotechnology*. 2001;6:59–67. (In Russian)

13. Budyka DA, Abzaeva NV, Ivanova GF, Gostischeva SE, Fissun AA, Lyapustina LV. Comparative Analysis of Experimental Series of Plague Live Vaccine as for Viability and Thermostability Indices. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2009;102:68–71. (In Russian) [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-4\(102\)-68-71](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2009-4(102)-68-71)

14. Budyka DA, Abzaeva NV, Gostischeva SE, Rakitina EL, Ivanova GF, Fissun AA. Living microorganism's stabilization in biomass biotechnology and plague vaccine preparation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2016;6(1):87–92. (In Russian)

15. Nezhuta AA, Serbis ES, Didenko AA, Golovleva SI. Some aspects of freeze drying of biomaterials. *Farmatsevticheskie tekhnologii i upakovka*. 2012;4:38–40. (In Russian)

16. Komissarov AV, Ovchinnikova MV, Badarin SA, Bibikov DN, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, et al. Experimental Substantiation of New Presentation Form of Cholera Diagnostic Sera. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017;4:38–40. (In Russian) <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-4-38-40>

17. Adler YuP, Markova EV, Granovskii YuV. *Planning an experiment to find optimal conditions*. Moscow: Nauka; 1976. 279 p. (In Russian)

Критерии авторства

Комиссаров А.В., Бибиков Д.Н., Бадарин С.А., Сеницына Н.В., Костылева Н.И., Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Зинина О.С., Плотников И.А., Никифоров А.К. выполнили работу, на основании полученных результатов провели обобщение и написали рукопись. Авторы имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Contribution

Alexander V. Komissarov, Dmitry N. Bibikov, Sergey A. Badarin, Nataliya V. Sinitsyna, Nataliya I. Kostyleva, Marya V. Ovchinnikova, Galina I. Korovkina, Olga S. Zinina, Igor A. Plotnikov, Aleksey K. Nikiforov carried out the experimental work, on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Комиссаров Александр Владимирович,
д.б.н., доцент, главный научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
Российский научно-исследовательский
Противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация;
профессор кафедры микробиологии,
биотехнологии и химии,
Саратовский государственный аграрный
университет им. Н.И. Вавилова,
410012, г. Саратов, Театральная пл., 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: Komissarov-9@yandex.ru

Бибиков Дмитрий Николаевич,
младший научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Бадарин Сергей Анаторльевич,
научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Синицына Наталья Викторовна,
научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Костылева Наталья Ивановна,
научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Овчинникова Мария Владимировна,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Alexander V. Komissarov,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor,
Chief Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation;
Professor,
Microbiology, Biotechnology, and Chemistry De-
partment,
N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University,
1, Teatral'naya Sq., Saratov, 410012,
Russian Federation,
✉ e-mail: Komissarov-9@yandex.ru

Dmitry N. Bibikov,
Junior Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Sergey A. Badarin,
Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Nataliya V. Sinitsyna,
Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Nataliya I. Kostyleva,
Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Marya V. Ovchinnikova,
Cand. Sci. (Biology),
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Коровкина Галина Ивановна,
к.м.н., старший научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Зинина Ольга Сергеевна,
к.м.н., старший научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Плотников Игорь Аркадьевич,
научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Никифоров Алексей Константинович,
д.б.н., доцент, заместитель директора,
Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»,
410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
Российская Федерация;
профессор кафедры микробиологии,
биотехнологии и химии,
Саратовский государственный аграрный
университет им. Н.И. Вавилова,
410012, г. Саратов, Театральная пл., 1,
Российская Федерация,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Galina I. Korovkina,
Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe», Candidate of medical sciences,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Olga S. Zinina,
Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Igor A. Plotnikov,
Researcher,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St, Saratov, 410005,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru

Aleksey K. Nikiforov,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Deputy Director on the research
and Manufacturing activities,
Russian Research Anti-Plague Institute
«Microbe»,
46, Univesitetskaya St., Saratov, 410005,
Russian Federation;
Professor,
Microbiology, Biotechnology, and Chemistry
Department,
N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University,
1, Teatral'naya Sq., Saratov, 410012,
Russian Federation,
e-mail: rusrapi@microbe.ru