

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Бердибаева А.Б.

Национальная академия наук Кыргызской Республики, институт биотехнологии,
Республика Кыргызстан
*acan@rambler.ru.

Аннотация. В данной обзорной статье рассматриваются методы и технологии лиофилизации вакцинных препаратов. Анализируются основные этапы процесса, а также некоторые подходы к оптимизации условий сублимации для повышения эффективности и качества конечного продукта. Особое внимание уделяется роли защитных сред в обеспечении стабильности, безопасности и биологической активности вакцин, а также расширению условий их хранения и транспортировки. Представленный обзор позволяет получить комплексное представление о текущем состоянии развития технологий лиофилизации в производстве вакцинных средств и выявить перспективные направления дальнейших исследований в данной области.

Ключевые слова: методы хранения, лиофилизация, защитные среды, вакцинные препараты

В настоящее время сублимационное высушивание (лиофилизация) считается одним из наиболее перспективных методов стабилизации вакцин, обеспечивающим сохранение их биологической активности и продление срока хранения при условиях, препятствующих развитию микробиологической активности. Технологический процесс включает удаление воды из замороженного продукта путём сублимации, что способствует сохранению структурной целостности и функциональных характеристик вакцины.

В последние годы развитие современных методов и технологий лиофилизации обусловлено необходимостью повышения эффективности производства, улучшения стабильности вакцинных препаратов и расширения условий хранения, особенно в условиях ограниченных логистических возможностей [1]. В данной статье представлены ключевые технологические подходы к лиофилизации вакцинных препаратов, включая инновационные технологические решения, направленные на оптимизацию процесса, повышение качества конечного продукта, а также обеспечение его безопасности и эффективности.

Исторические источники свидетельствуют, что концепция сохранения биологических образцов посредством высушивания в условиях вакуума и при низких температурах восходит к XIX веку, что связано с активным развитием микробиологических исследований в этот период [2]. Однако жизнеспособность образцов зачастую была ограничена из-за их термолабильности, что затрудняло изучение широкого спектра микроорганизмов. Попытки усовершенствовать методы хранения биологических материалов посредством воздушной или контактной сушки часто оказывались неэффективными вследствие значительной потери вирулентности и биологической активности образцов.

В 1890 году Рихард Альтман впервые получил высушенные ткани при низком давлении и температуре около -20°C , заложив основы вакуумной сушки. Однако широкое применение методов сохранения биологических образцов началось лишь в 1905 году, когда Бенедикт и Мэннинг сообщили о высушивании животной ткани при давлениях ниже 1 атм. В их системе использовался химический насос, создававший низкое давление посредством вытеснения воздуха паром этилового эфира, который затем удалялся с помощью абсорбции в серной кислоте. Для контроля давления применялась U-образная трубка с ртутью. Несмотря на изобретательность конструкции, эффективность системы была ограничена: для снижения влажности образца до 20% требовалось около двух недель [3].

Несколько лет спустя (В 1920-х годах) Шаккелл (L.F. Shackell) опубликовал работу

«Совершенный метод высушивания», в которой использовал аппарат, сходный с конструкциями Бенедикта и Мэннинга, но с механическим вакуумным насосом, устранив необходимость в этиловом эфире. Его устройство достигало давления менее 1 мм рт.ст. за около 2 минут и включало компоненты, аналогичные современным сублимационным сушилкам: камеру, конденсатор и вакуумную систему. Шакелл впервые показал возможность стабилизации биологических образцов при низком давлении и замороженном состоянии, что позволяло сохранять их активность и предотвращать химические реакции. Эксперименты с лиофилизацией тканей мозга и крови у животных подтвердили возможность восстановления биологической активности после высушивания и последующего увлажнения. Хотя его исследования не раскрывали механизмы процесса, они заложили основы современной лиофилизации, которая активно развивается с 1950-х годов и является ключевой технологией стабилизации термолабильных веществ [4].

После публикации работ Шакелла, согласно данным исследований, другие ученые начали применять новые технологии лиофилизации для стабилизации термолабильных веществ [5]. Например, согласно данным исследования Хаммера, лиофилизация *E. coli* позволяет сохранять жизнеспособность микроорганизмов до 54 дней, в то время как при высушивании на воздухе стабильность культуры ограничивается несколькими днями [6]. В 1934 году был запатентован аппарат с холодной ловушкой, заменяющей серную кислоту Шакелла (патент США №979956), а Флосдорф и Мадд использовали смесь сухого льда и метилцеллозоля для охлаждения и замораживания образцов [7] и в 1939 году Грейвс впервые описал использование механического охлаждения в сушильных аппаратах и определил ключевые параметры процесса [8]. Но первые документальные подтверждения применения сублимационной сушки для получения живых вакцин относятся к началу XX века, в частности, в 1950–60-х годах исследования Рея, Меримана и других заложили теоретические основы лиофилизации [9].

В современном производстве большинство коммерческих живых вакцин реализуется в твердой форме, полученной методом лиофилизации. Однако технологический процесс обезвоживания посредством сублимационного высушивания требует тщательной оптимизации параметров, поскольку неправильный подбор условий может негативно повлиять на жизнеспособность микроорганизмов и, следовательно, на эффективность вакцины. В большинстве случаев параметры процесса определяются методом проб и ошибок, что может приводить к увеличению времени проведения процедуры и повышению себестоимости продукции. Также лиофилизация является одним из основных методов долгосрочного хранения микроорганизмов, однако применение стандартных технологических подходов требует учета специфических нормативных требований [10]. Например, для некоторых вакцинных препаратов минимальное допустимое содержание жизнеспособных клеток после лиофилизации составляет от 40% до 50% и основной целью хранения является сохранение жизнеспособности отдельных клеток для последующего восстановления штаммов или проведения научных экспериментов [11]. В последующие годы методы высушивания микробов, особенно лиофилизация, были значительно усовершенствованы и получили широкое распространение в микробиологической практике [12]. Несмотря на долгую историю развития, технология продолжает активно совершенствоваться и остается важной задачей в области ветеринарной и фармацевтической науки.

В процессе лиофилизации важную роль играют параметры технологического цикла и состав защитных сред, поскольку их характеристики определяют эффективность сохранения структурной целостности и биологической активности активных компонентов вакцинных препаратов. Обзор литературы, посвященный разработке защитных сред для сохранения живых микроорганизмов, свидетельствует о широком использовании традиционных компонентов, таких как пептонные гидролизаты, обезжиренное молоко, сахарозы и другие стабилизирующие вещества, которые формируют микросреду, препятствующую повреждению клеточных структур и антигенов в условиях замораживания и сублимационной сушки. Эти компоненты демонстрируют высокую эффективность в обеспечении клеточной жизнеспособности и стабильности микроорганизмов при длительном хранении [13].

На основании литературных данных выделены основные требования к защитным средам, используемым при лиофилизации микроорганизмов: 1) среда должна обеспечивать защитное действие на всех этапах процесса; 2) лиофилизированные микроорганизмы в такой среде должны

сохранять стабильность при хранении в широком диапазоне температур; 3) после удаления свободной воды среда должна формировать мелкопористую, плотную структуру, предотвращая унос микробов и их повреждение во время вскрытия ампул; 4) среда должна быть достаточно гидрофильной для оптимальной остаточной влажности; 5) защитная среда должна быть максимально очищена от солей и приготовлена на дистиллированной воде; 6) для вакцинных препаратов дополнительно предъявляются требования соответствия фармакопейным стандартам, хорошей растворимости, однородности формы и отсутствия антигенных свойств [14, 15].

Различные защитные вещества, применяемые для консервации микроорганизмов, обладают преимущественно специфическим защитным действием в отношении отдельных неблагоприятных факторов окружающей среды. Учитывая данный факт, целесообразно использовать сложные защитные среды, состоящие из двух или более компонентов, обеспечивающих комплексную защиту. Важным аспектом является разработка индивидуальных составов защитных сред для каждого вида микроорганизмов, включающих тщательно сбалансированный набор компонентов по качеству и концентрации. Такой состав должен минимизировать негативные эффекты, связанные с процессами замораживания и сублимационной сушки, а также способствовать снижению клеточной гибели и уменьшению отходов продукции за счёт улучшения физических свойств конечного продукта. Оптимизация состава защитных сред и соотношений стабилизаторов является ключевым фактором повышения эффективности сохранения жизнеспособности микроорганизмов при длительном хранении и последующем использовании [14].

Процесс лиофилизации представляет собой многоступенчатый технологический цикл, в каждом этапе которого выделены критические точки, определяющие качество и стабильность конечного продукта. Он включает подготовку исходного материала (раствор или суспензию), с применением фильтрационной стерилизации; стадию замораживания, при которой жидкость переходит в твердое состояние с образованием кристаллов или стекловидных структур, вызывающих механические напряжения и концентрацию растворенных веществ; первичную сушку (сублимацию), осуществляемую под вакуумом с контролируемым нагревом для удаления льда без коллапса или обратного плавления; вторичную сушку (десорбцию), при которой удаляется связанная влага при температурах выше нуля и низком давлении, достигая заданных уровней остаточной влажности для обеспечения стабильности продукта. После завершения сушки осуществляется кондиционирование и укупорка лиофилизата в условиях, исключающих воздействие влаги, кислорода, света и загрязнений. Контроль этих факторов является критически важным для сохранения биологических и физико-химических свойств конечного продукта [16]. В соответствии с представленными литературными данными, процесс лиофилизации включает в себя следующие основные этапы:

1. Этап замораживания: данный этап предполагает быстрое охлаждение исходного продукта с целью его превращения в твердую матрицу, что способствует формированию структурных характеристик, оптимальных для последующей сушки.

2. Этап первичной сушки (сублимационной сушки): на этом этапе осуществляется удаление льда посредством сублимации при одновременном снижении давления окружающей среды и повышении температуры продукта. В некоторых случаях перед началом основной сушки проводится дополнительный этап – отжиг или термоциклирование, направленный на улучшение структурных свойств и стабилизацию продукта.

3. Этап вторичной сушки: на данном этапе удаляется связанная вода до достижения целевого уровня остаточной влаги, что обеспечивает сохранность структурной целостности полученного лиофилизата и его пригодность для последующего приготовления растворов для инъекций или таблетированных форм.

Данная последовательность стадий обеспечивает эффективное сохранение биологических и физико-химических свойств исходного продукта при минимизации деградационных процессов. Такие данные о последовательности этапов подробно описаны во многих литературных источниках и являются одними из наиболее приемлемых и широко используемых в данной области [17–20]. Необходимо подробно охарактеризовать каждый этап процесса лиофилизации, включая его технологические особенности, условия проведения и основные параметры, что позволит более полно понять механизмы сохранения свойств продукта и оптимизировать технологический процесс:

Этап замораживания определяет морфологию ледяных кристаллов и физическое состояние продукта, влияя на скорость сушки, пористость и стабильность. Методы замораживания варьируют от медленного направленного охлаждения до быстрого погружения в жидкий азот, при этом скорость охлаждения влияет на структуру льда: медленное замораживание формирует крупные пластины с низкой пористостью, а быстрое — мелкие сферические кристаллы с большей пористостью. Контроль структуры замороженного слоя и одновременное образование кристаллов обеспечивают однородность продукта. Процесс замораживания может вызвать механические напряжения и негативно повлиять на активность веществ вследствие низких температур, кристаллизации или денатурации. Оптимизация метода замораживания важна для повышения эффективности последующих стадий и сохранения свойств конечного продукта [21].

После замораживания структура продукта может быть дополнительно обработана термоциклированием («отжигом») для кристаллизации полиморфных веществ и увеличения размера льда. Этот этап повышает однородность, скорость сублимации и стабильность лиофилизата за счет перекристаллизации аморфных компонентов и снижения остаточной влаги. «Отжиг» включает выдержку при температуре выше точки эвтектики с последующим охлаждением, что способствует перераспределению кристаллов льда, их сферической форме и снижению внутреннего напряжения. Данный термический режим ускоряет рост крупных кристаллов, улучшает структуру поверхности и повышает эффективность последующих стадий сушки, а также оптимальные параметры зависят от состава продукта и требуют индивидуальной настройки для обеспечения качества и стабильности конечного лиофилизата [22, 23].

Первичная сушка (сублимация) является наиболее затратным по времени и энергии этапом лиофилизации, поскольку в этот период удаляется основная часть воды из продукта при введении вакуума. Оптимизация процесса достигается регулировкой температуры полки и давления в камере, а также контролем параметров, таких как состав, высота слоя, конфигурация флаконов и состояние конденсатора. Эффективность повышается при поддержании температуры полки в верхних пределах стабильности и давления в диапазоне 10–30% от парциального давления льда, что способствует улучшению теплопередачи без расплавления замороженного ядра. В течение процесса важно поддерживать вакуум для регулировки теплопередачи и предотвращения перегрева. На завершающем этапе необходимо постепенно увеличивать температуру для оптимизации скорости сублимации, избегая разрушения продукта из-за остаточной влаги. Правильная настройка этих параметров обеспечивает эффективность и качество лиофилизата [24].

Вторичная сушка (десорбция или досушивание), как правило, осуществляется при температурных режимах, обеспечивающих одновременное эффективное удаление влаги и сохранение стабильности ФС. Выбор данного режима и продолжительность его осуществления определяется ключевым параметром данного этапа – остаточной влажностью лиофилизата. Допустимый уровень остаточной влажности должен быть определен, прежде всего, на основе данных стабильности лиофилизата. Дальнейшую оптимизацию процесса рекомендуется осуществлять, базируясь на обратной зависимости величины остаточной влажности от температурных показателей и давления. Как правило, акцент делается на температуру полки, поскольку принято считать, что скорость удаления связанной воды для ЛС во время этапа вторичной сушки, определяется температурными факторами. Вторичная сушка обычно проводится при более высоком вакууме, когда температура лиофилизата достигает температуры выше нуля. Некоторыми исследователями показано, что изотермическая десорбция осуществляется наиболее интенсивно и позволяет снизить конечную остаточную влажность при уровне давления около 10–2 мбар, однако более высокие значения вакуума (10–3 мбар) не приводят к существенному улучшению работы. Вторичная сушка считается завершенной, когда остаточная влажность в продукте, достигает желаемого уровня. В этот момент пробирки закрываются пробками внутри камеры, камера аэрируется, и температура полки поддерживается на уровне около 4°C до выгрузки флаконов [25].

Первичная упаковка, включающая флаконы и/или ампулы, являются важными компонентами системы упаковки лиофилизации, существенно влияя на теплопередачу, качество и стабильность конечного продукта. Стекланные контейнеры, изготовленные из гидролитически стойкого стекла, широко применяются для упаковки лиофилизированных препаратов благодаря

своей высокой теплопроводности (около 1,05 Вт/м·К), что способствует эффективной сублимации и равномерному удалению влаги в ходе высушивания. Однако взаимодействие стеклянных поверхностей с растворами может приводить к растворению и выщелачиванию ионов (Na^+ , K^+ , H_3O^+), особенно при повышенных значениях pH, что потенциально негативно сказывается на качестве продукта за счет изменения его химического состава и снижения стабильности активных веществ. Для снижения таких негативных эффектов применяют силиконовое покрытие или осуществляют удаление поверхностного слоя стекла, что способствует уменьшению выщелачивания и повышению совместимости упаковки с содержимым [26]. Таким образом, оптимизация свойств первичной упаковки является критическим аспектом обеспечения эффективности лиофилизационного процесса и сохранения качества вакцинных препаратов.

Разработчикам и технологам на всех этапах разработки и масштабирования технологического процесса необходимо учитывать риски, связанные с неправильным подбором режимов лиофилизации, а также разрабатывать меры по предотвращению производства продукции низкого качества. Выбор технологии лиофилизации, состава вспомогательных веществ и температурных режимов сублимации основывается на физико-химических и технологических свойствах препаратов, а также особенностях их применения. В технологии лиофилизации биологических продуктов важно оптимизировать режим замораживания таким образом, чтобы обеспечить сохранение нативного состояния биологических мембран во время кристаллизации внутриклеточной жидкости, что критически влияет на биологическую активность и стабильность конечного продукта.

Заключение

На основании проведенного анализа можно заключить, что процесс лиофилизации представляет собой сложную многоэтапную технологическую процедуру, требующую строгого контроля технологических параметров и оптимизации состава защитных сред. Эффективность данного процесса во многом зависит от правильного подбора компонентов защитных сред и их концентраций, что обеспечивает сохранность структурной целостности и биологической активности препаратов в условиях замораживания и сушки. Только при реализации комплексного подхода возможно получение высококачественных, стабильных и безопасных вакцинных средств с длительным сроком хранения, что подтверждается многолетней практикой и научными данными о превосходстве лиофилизации как метода длительного сохранения живых микроорганизмов с неизменными свойствами. Эти выводы подчеркивают необходимость дальнейших исследований для совершенствования технологий лиофилизации и повышения их эффективности в производстве биологических препаратов.

Список использованных источников

1. Долинов К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов. М.: Медицина, 1969. 228 с.
2. Couriel B. Freeze drying: Past, present, and future // PDA J. Pharm. Sci. Technol. – 1980. – Vol. 34. – P. 352–357.
3. Нежута А. А. Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов [Текст] / А. А. Нежута, Э. Ф. Токарик, А. Я. Самуйленко [и др.] - Курск: Изд-во КГСХА, 2002. - 239 с.
4. Tang X. C. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice [Текст] / X. C. Tang, M. J. Pikal // Pharmaceutical research. – 2004. – Т. 21. – №. 2. – С. 191–200.
5. Shackell L.D. An improved method of desiccation, with some applications to biological problems // Am. J. Physiol. – 1909. – Vol. 24. – P. 325–340.
6. Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание-высушивание биологических препаратов. М.: Колос, 1979. 337 с.
7. Jennings T. A. Lyophilization: introduction and basic principles. [Текст] – CrC Press, 1999.
8. Алексеев К. В., Блынская Е. В., Тишков С. В. Теоретические и практические основы лиофилизации лекарственных препаратов. Москва. 2019. С. 11-12.
9. Смит О. Влияние низких температур на живые ткани и клетки. В кн.: Применение замораживания и высушивания в биологии / Под ред. Р. Харриса. Москва. 1956. 432 с.
10. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и

протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 3. – С. 5–12.

11. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. – 2009. – № 4(12). – С. 99–118.

12. Охапкина В.Ю. Методы поддержания микробных культур // Методы исследований. Модели и прогнозы / Теоретическая и прикладная экология. – 2009. – №4. С. 21-23.

13. Могилюк В. Аспекты лиофилизационной сушки водных растворов // Фармацевтическая отрасль. – 2014. – № 5(46). – С. 46–53.

14. Бланков Б.И., Клебанов Д.Я. Применение лиофилизации в микробиологии. Москва. 1961. 262 с.

15. Белоус А.М., Цветков И.В. Научные основы сублимационного консервирования. Киев: Наукова думка, 1985. 345 с.

16. Carpenter J. F. Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice. Rational design of stable protein formulations. [Текст] / J. F. Carpenter, B. S. Chang, W. Garzon-Rodriguez, T.W. Randolph // Pharm Biotechnol 2002:109–33. PMID: 11987749.

17. Searles J. A. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing induced drying rate heterogeneity, and determine T(g)' in pharmaceutical lyophilization. [Текст]/ J. A. Searles, J. F. Carpenter, T. W. Randolph //J Pharm Sci 2001; 90(7): 872–87. PMID: 11458336.

18. Carpenter J.F., Chang B.S., GarzonRodriguez W., Randolph T.W. Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice. Rational design of stable protein formulations. Pharm Biotechnol 2002:109–33. PMID: 11987749.

19. Chang L.L., Shepherd D., Sun J. et al. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? J Pharm Sci 2005; 94(7):1427–44. DOI:

20. Hottot A., Vessot S., Andrieu J. Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 2007;46(7):666–74.

21. Suverkrup R. J. Fast Precise Freeze Drying of Hyaluronic Acid/Dextran Ophthalmic Lyophilisate Carrier Systems (OLCS) [Текст] / R. J. Suverkrup, O. Krasichkova, M. Diestelhorst //Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2006. – Т. 47. – №. 13. – С. 5130–5130.

22. Блынская Е. В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов [Текст] / Е. В. Блынская, С. В. Тишков, К. В. Алексеев// Российский биотерапевтический журнал. 2017. № 1. С. 6–11.

23. Searles J.A., Carpenter J.F., Randolph T.W. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezinginduced drying rate heterogeneity, and determine T(g)' in pharmaceutical lyophilization. J Pharm Sci 2001;90(7):872–87. PMID: 11458336.

24. Сушка биологических материалов, вопросы механизации и автоматизации // Труды Московского НИИ эпидемиологии, микробиологии, гигиены. Выпуск 7. М. 1960. 173 с.

25. Белоус А.М., Цветков И.В. Научные основы сублимационного консервирования. Киев: Наукова думка, 1985. 345 с.

25. Бланков Б.И., Клебанов Д.И. Некоторые критерии при исследовании процесса лиофилизации биологических материалов. — Труды Московс. Науч.-исслед.инст. эпидемиол., микробиол. и гигиены, М., 1960, вып.7, с.5 —12.

ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ҮДЕРІСІНІҢ НЕГІЗГІ ПРИНЦИПТЕРІ МЕН ТЕХНОЛОГИЯЛЫҚ ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ

Бердибаева А.Б.

Қырғыз Республикасы Ұлттық ғылым академиясы, Биотехнология институты,
Қырғыз Республикасы

Аннотация. Бұл шолу мақаласында вакциналық препараттарды лиофилизациялау әдістері мен технологиялары қарастырылады. Процестің негізгі кезеңдері мен сублимация шарттарын оңтайландырудың кейбір тәсілдері, сондай-ақ дайын өнімнің тиімділігі мен сапасын арттыру жолдары талданады. Қорғаныш орталардың вакциналардың тұрақтылығын, қауіпсіздігін және биологиялық белсенділігін қамтамасыз етудегі рөліне, сондай-ақ оларды сақтау және тасымалдау жағдайларын кеңейтуге ерекше назар аударылады. Бұл шолу лиофилизация технологияларының қазіргі даму жағдайы туралы кешенді түсінік береді және осы саладағы болашақ зерттеулердің перспективалық бағыттарын анықтайды.

Түйінді сөздер: сақтау әдістері, лиофилизация, қорғаныш орта, вакциналық препараттар

KEY PRINCIPLES AND TECHNOLOGICAL FEATURES OF THE LYOPHILIZATION PROCESS

Berdibaeva A.B.

National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic, Institute of Biotechnology,
Kyrgyz Republic

Abstract. This review article discusses the methods and technologies of vaccine lyophilization. It analyzes the main stages of the process as well as certain approaches to optimizing sublimation conditions to improve the efficiency and quality of the final product. Special attention is paid to the role of protective media in ensuring the stability, safety, and biological activity of vaccines, as well as in expanding their storage and transportation conditions. The presented review provides a comprehensive overview of the current state of lyophilization technologies in vaccine production and identifies promising directions for future research in this field.

Keywords: storage methods, lyophilization, protective media, vaccine preparations