

Совершенствование технологии производства вакцины чумной живой

Д.А. Шаров, А.А. Лещенко, С.В. Багин, С.В. Логвинов, А.В. Ежов,
А.Г. Лазыкин, Д.А. Мохов, В.В. Крупин, А.Р. Зиганшин

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации, 610000,
Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119

Поступила 19.12.2016 г. Принята к публикации 30.08.2017 г.

На базе филиала 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров) в рамках ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации» была создана автоматизированная информационная система контроля производства лекарственных средств АИС КП ЛС. Система использована для усовершенствования технологии глубинного культивирования вакцины чумной живой. В работе использовали вакцинный штамм EV чумного микроба линии НИИЭГ, а также модернизированные ферментеры модели БИОР-0,25 с автоматизированной информационной системой контроля производства. Рассмотрены вопросы совершенствования технологии производства лекарственных средств. Экспериментально показана пригодность совместного использования ферментеров с автоматизированной информационной системой контроля производства лекарственных средств. Созданный аппаратный комплекс способен накапливать, систематизировать и документировать научно-техническую информацию, касающуюся анализа видов и последствий отказов измерительных систем, состояния выполнения операций, картирования процесса, формирования полученных данных для отчетов и протоколов опытов. Проведенные исследования позволили расширить технологические возможности оборудования и усовершенствовать стадию глубинного культивирования в производстве вакцины чумной живой.

Ключевые слова: автоматизированная информационная система; глубинное культивирование; вакцина чумная живая; технологический процесс.

Библиографическое описание: Шаров Д.А., Лещенко А.А., Багин С.В., Логвинов С.В., Ежов А.В., Лазыкин А.Г., Мохов Д.А., Крупин В.В., Зиганшин А.Р. Совершенствование технологии производства вакцины чумной живой // Вестник войск РХБ защиты. 2017. Т. 1. № 3. С. 30–37.

Присоединение Российской Федерации к системе европейских стандартов применительно к биопрепаратам, современный уровень развития исследований в области микробиологии, приборо-, аппаратостроения позволяют выделить автоматизацию как одно из значимых направлений совершенствования производства вакцинных технологий. Автоматизация такого рода производств обусловлена объективным ходом научно-технического прогресса, при котором посредством применения взаимоувязанной системы машин, механизмов, реак-

торов, приборов минимизируется влияние «человеческого фактора» [1]. В данном случае управление технологическим процессом проводится автоматизированной системой, которая осуществляет непрерывный мониторинг критических параметров в режиме реального времени и автоматически вносит требуемые корректировки для обеспечения стандартности процесса и продукта.

В технологиях производства вакцинных препаратов на основе живых микроорганизмов определяющим является этап глубинного выращивания микробных

культур [2]. Существовавшее до недавних пор оснащение стадии культивирования вакцинного штамма EV чумного микроба линии НИИЭГ в филиале 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров) не позволяло решать вопросы сокращения доли ручного труда, повышения энергоэффективности, обеспечения надежности контроля и управления производственным процессом. В данном случае измерение технологических параметров процесса сопровождалось выполнением сопутствующих операций (к примеру, отбора проб из аппарата и их анализа в цеховой лаборатории) [3]. Такой, установленный регламентом производства, порядок значительно усложнял проведение измерений, поскольку приводил к временным затратам на получение данных о ходе процесса, давая отрывочную информацию о непрерывно культивируемой системе. Все это требовало от исследователей переосмысления существующего состояния производства и изыскания инновационных подходов, направленных на поддержание, контроль и регулирование процесса с применением современных автоматизированных систем управления. Неоспоримыми преимуществами новых подходов является их способность обеспечить:

стандартность технологического процесса получения продукта;

снижение влияния «человеческого фактора», характеризующегося максимальным числом ошибок;

повышение информативности об изготовлении каждой серии препарата (все данные, подтверждающие соблюдение технологии в пределах регламента производства вакцины надлежащего качества).

Цель работы – совершенствование способа глубинного культивирования с использованием инновационных решений в технологии производства вакцины чумной живой.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинный штамм EV чумного микроба линии НИИЭГ.

Культивирование культуры чумного микроба проводили в аппарате-культиваторе модели БИОР-0,25 вместимостью 0,25 м³, коэффициентом заполнения 0,6, с перемешивающим устройством турбинного типа с частотой вращения от 10 до 500 об./мин.

Также была использована автоматизированная информационная система контроля производства лекарственных средств, тип АИС КП ЛС.

Оценку качества готовой формы вакцины и вспомогательного сырья проводи-

ли в соответствии с методами, изложенными в ЛП-000535 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, ингаляций и накожного скарификационного нанесения».

Статистическую обработку результатов экспериментальных данных проводили в соответствии с рекомендациями [4].

Результаты и обсуждение

Отличительной особенностью процессов культивирования является тот факт, что при соблюдении, казалось бы, абсолютно одинаковых условий осуществления процесса невозможно обеспечить полностью повторяемые циклы ферментаций.

Глубинное аппаратное культивирование представляет собой взаимодействие всех систем обеспечения и ведения процесса выращивания микроорганизмов [5]. К ним следует отнести порядка восьми систем, обеспечивающих: ввод добавок; отбор проб полуфабрикатов и продукта; пеногашение; подачу воздуха и отвод газов; контроль величин давления, вакуума и температуры, значений pH и pO₂, уровня пены, оптической плотности.

Современные достижения в области техники и информационных технологий, а также теории управления производством дают возможность увязать и синхронизировать эти процессы.

На базе филиала 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров) в рамках ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации» была создана автоматизированная информационная система контроля производства лекарственных средств АИС КП ЛС. Проводимая модернизация вакцинных производств позволила решить исследовательские задачи, направленные на усовершенствование конструкции аппаратов БИОР-0,25 и оценку пригодности совместного использования ферментеров с АИС КП ЛС.

Усовершенствование конструкции модуля культивирования заключалось в изменении устройства основных элементов биореакторов, а именно – крышки и обечайки корпуса с рубашкой.

В ходе модернизации установленным порядком для сосудов, работающих под давлением, были смонтированы дополнительные устройства, позволяющие разместить порты датчиков контроля параметров процесса.

На рисунках 1 и 2 представлены модернизированный аппарат для производства вакцины чумной живой с автоматизирован-



Рисунок 1 — Модернизированные аппараты-культиваторы с автоматизированной системой контроля ведения процесса

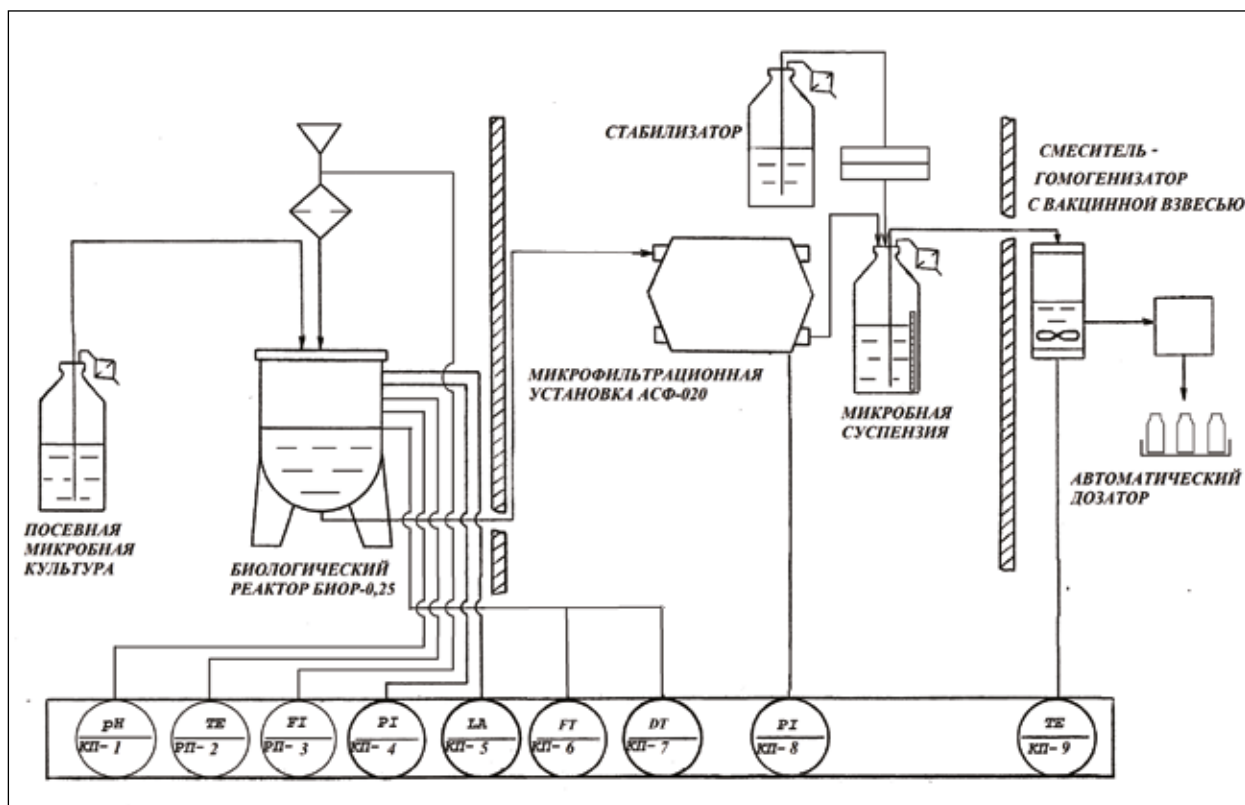


Рисунок 2 — Принципиальная схема усовершенствованной технологии получения вакцины чумной живой

Таблица 1 — Элементы автоматизированной системы непрерывного контроля и управления процессом

Наименование элемента системы	Состав элементной базы
Термостатирование	Емкость-накопитель, электронагреватель с датчиком температуры, циркуляционный насос
Ввод добавок	Четыре автоклавируемые емкости (1 л) с растворами, поддерживающими величину pH, процессы пеногашения и питания, а так же перистальтические насосы со скоростью дозирования добавок (100 об./мин)
Отбор проб полуфабрикатов и продукта	Устройство отбора проб со стерилизуемой емкостью (250 мл) и воздушным фильтром
Пеногашение	Перистальтический насос подачи пеногасителя. Асинхронный мотор-редуктор, вал с дисковым импеллером, частота вращения которого 100-1000 об./мин
Подача воздуха и отвод газов	Редуктор с ротаметром, электронный измеритель-регулятор расхода воздуха, фильтрационный модуль (0,22 мкм), а также клапанные устройства подачи воздуха в барботер и отвода конденсата
Контроль величин давления, pH, pO_2 , уровня пены и оптической плотности	Датчики величин давления, pH, pO_2 , уровня пены и оптической плотности

ной системой непрерывного управления глубинным культивированием и принципиальная схема усовершенствованной технологии.

Каждая система состоит из набора технических элементов, соединенных коммуникациями с внутренней полостью ферментеров.

Системы укомплектованы датчиками непрерывного контроля параметров ведения технологического процесса (температуры, давления, уровня пены, pH, O_2 , CO_2 , оптической плотности) [6].

Элементы системы непрерывного контроля и управления процессом представлены в таблице 1.

Из таблицы 1 следует, что выполненные усовершенствования привели к некоторому усложнению конструкции аппаратов БИОР-0,25 за счет увеличения состава элементной базы. Однако это не повлияло на надежность работы созданной системы. Комплексное опробование модуля культивирования не выявило отказов как при испытании систем в отдельности, так и биореакторов в целом. Разработанный специалистами филиала 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров) алгоритм технологии глубинного культивирования в совокупности с программным обеспечением повысили управляемость процессом и дали возможность осуществлять его в режиме реального времени.

Блок управления технологией выращивания вакцинного штамма чумного микроба представлен оборудованием автоматического контроля параметров культивирования и программными средствами регулирования.

Возможности автоматического управления технологической стадией существенно облегчили задачи в плане оценки технического состояния оборудования, накопления и си-

стематизации научно-производственной информации, касающейся расчета параметров технологического процесса и показателей качества готовой и незавершенной продукции (спектротурбидиметрических, осмооптических характеристик, параметров кинетики роста), анализа видов и последствий отказов измерительных систем, состояния технологических процессов, а также документирования процесса производства и формирования отчетов/протоколов.

Результаты комплексных испытаний модуля культивирования представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 следует, что полученные образцы глубинных культур вакцинного штамма EV чумного микроба по основным параметрам (содержанию живых микробов, водородному показателю, содержанию посторонней микрофлоры) при осуществлении процесса выращивания в автоматизированном режиме соответствуют требованиям промышленного регламента.

С целью оценки возможности использования полуфабриката на последующих технологических этапах вакцинного производства исследовалась степень зрелости микробной культуры. Достижение микробной популяции штамма EV стационарной фазы роста определяли методом фазово-контрастной микроскопии (рисунок 3).

Как следует из рисунка 3а, в логарифмической фазе роста наблюдалось большое количество не разделившихся клеток со значительными размерами. Характеризующая технологическую завершенность процесса культивирования стационарная фаза роста, имеет существенно большее количество разделившихся клеток, а также минимальные различия в их размерах (рисунок 3б).

Таблица 2 — Технологические параметры выращивания и характеристики качества культур чумного микроба (штамм EV), полученные при ведении процессов в автоматизированном режиме (n=6)

Технологические параметры и характеристики качества, ед. измерения	Требования НД*	Автоматизированный режим
Продолжительность выращивания микробной взвеси, ч	27	27
Скорость вращения вала перемешивающего устройства, оборотов/мин	300	300
Объем воздуха, подаваемого для аэрации, удельный расход воздуха на 1 л культуральной жидкости, л/мин	0,2±0,02	0,2±0,01
Температура, °C	27±2	27±1
Содержание живых микробов (осмооптический метод), млрд ж.м.кл./мл	15,0 не менее	22±2
Водородный показатель, ед. pH	7,7±0,3	7,6±0,2
Содержание посторонней микрофлоры	Не допускается	Отсутствует
*НД – промышленный регламент ПР 08461522-23-14.		

Модернизированное оборудование позволяет устойчиво поддерживать технический уровень и эффективность вакцинного производства, гарантируемые регламентом, в том числе за счет автоматизированного выполнения технологических операций. Проведенные на стадии культивирования расчеты согласно ОСТ [7] показали снижение на 7 % норм расхода энергозатрат (пар, электроэнергия), а также уменьшение величины трудозатрат на 37 %.

С использованием полученных глубинных культур были приготовлены три экспериментальные серии вакцины чумной живой сухой.

Результаты изучения биологических и физико-химических свойств экспериментальных серий представлены в таблице 3.

Как свидетельствуют результаты, представленные в таблице 3, по изученным биологическим и физико-химическим показателям экспериментальные серии вакцины чумной живой сухой соответствуют требованиям НД [8], регламентирующим ее качество.

Таким образом, проведенные исследования по модернизации аппаратов БИОР-0,25 совместно с автоматизированной информационной системой производственного контроля позволили расширить тех-

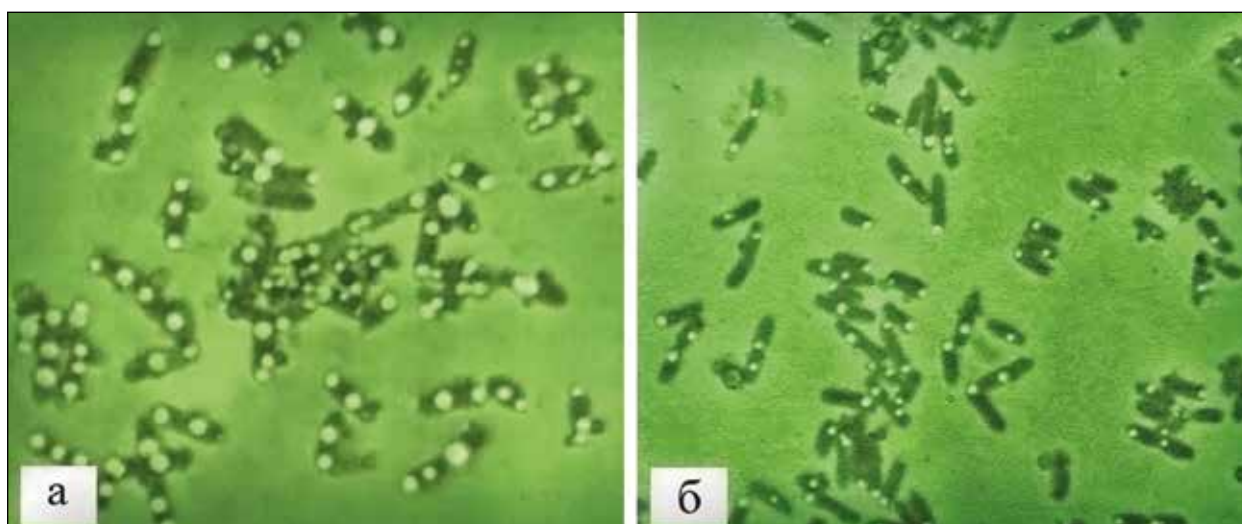


Рисунок 3 — Фазово-контрастная микроскопия гранул формазана в бактериях вакцинного штамма EV чумного микроба линии НИИЭГ

(а - клетки глубинной культуры в логарифмической фазе роста;

б - клетки глубинной культуры в стационарной фазе роста)

Фазовый контраст, иммобилизация клеток агаровым гелем, х 1350

Таблица 3 — Характеристика вакцины чумной живой сухой

Показатель качества, единица измерения	Требования нормативной документации [8]	Результаты исследований вакцины серии ...		
		1	2	3
Описание	Пористая масса серовато-белого цвета	Пористая масса серовато-белого цвета		
Подлинность	Вакцина должна содержать чистую культуру вакцинного штамма чумного микроба	Вакцина содержит чистую культуру вакцинного штамма чумного микроба		
Время растворения, мин	В течение 3 мин. Растворенный препарат - гомогенная взвесь серовато- белого цвета без посторонних примесей и хлопьев	В течение 3 мин. Растворенный препарат – гомо- генная взвесь серовато-белого цвета без посторонних приме- сей и хлопьев		
pH, ед.	От 6,8 до 7,4	7,2	7,3	7,1
Размер частиц	Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840	Суспензия свободно проходит в шприц через иглу № 0840		
Время седиментационной устойчивости, мин	5, не менее	8	7	8
Потеря в массе при высушивании, процент	4, не более	3,4	3,2	3,0
Средняя масса и однородность по массе, процент	5, не более	2,7	3,3	3,1
Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов	Вакцина не должна содер- жать посторонних микро- организмов и грибов	Вакцина не содержит посто- ронних микроорганизмов и грибов		
Специфическая активность:				
Концентрация микробных клеток, м.кл.	В 1 мл ресуспендированно- го препарата должно со- держаться от 5×10 ¹⁰ до 1×10 ¹¹	6,5×10 ¹⁰	7,0×10 ¹⁰	7,0×10 ¹⁰
Процент живых микробных клеток	25, не менее	31,9	29,4	30,3
Иммуногенность*	Вакцина должна быть иммуногенной	Вакцина иммуногенна		
Термостабильность, сутки	4, не менее	5,1	6,0	5,4
*Примечание. Показатель иммуногенности определяли биологическим методом по величине ED ₅₀ для морских свинок и белых мышей.				

нологические возможности оборудования и усовершенствовать стадию глубинного выращивания культур вакцинного штамма EV чумного микроба линии НИИЭГ. Это, прежде всего, касается снижения энерго-, трудозатрат (на 7 и 37 %), а также способности созданного аппаратного комплекса нака-

пливать, систематизировать и документировать научно-техническую информацию в отношении анализа видов и последствий отказов измерительных систем, состояния выполнения операций, картирования процесса, формирования экспериментальных данных для отчетов и протоколов опытов.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

Список источников

1. Селевцов Л.И. Автоматизация технологических процессов. М.: Академия, 2014. 352 с.
2. Туманов Ю.В., Болдырев А.Н., Аутеншлюс А.И. Медицинская биотехнология: диагностика заболеваний и создание лекарственных препаратов. Новосибирск.: НГТУ, 2016. 214 с.
3. Патент РФ на изобретение 2510825 (2013).
4. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа; 1990
5. Безбородов А.М., Загустина Н.А., Попов В.О. Ферментативные процессы в биотехнологии. М.: Наука, 2008. 335 с.
6. Руководство по эксплуатации и обслуживанию фармацевтического оборудования. URL: <http://www.Biotechno.ru/2016/catalog/87.html/>.
7. ОСТ 64-02-003-2002. Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения. Введены 15.04.2003. М., 2003.
8. Фармакопейная статья предприятия ЛП-000535 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, ингаляций и накожного скарификационного нанесения». Введ. 12.05.2011.

Об авторах

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119.

Шаров Дмитрий Александрович. Начальник научно-исследовательского отдела, канд. техн. наук.

Лещенко Андрей Анатольевич. Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела, д-р техн. наук, проф.

Багин Сергей Валерьевич. Научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. техн. наук.

Логвинов Сергей Владимирович. Научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Ежов Андрей Владимирович. Старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела, д-р мед. наук.

Лазыкин Алексей Геннадьевич. Старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Мохов Дмитрий Александрович. Научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Крупин Владимир Викторович. Заместитель начальника научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Зиганшин Андрей Ренатович. Старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела.

Адрес для переписки: NIC48CNII@mail.ru

The Improvement of Live Plaque Vaccine Production Technology

D.A. Sharov, A.A. Leshchenko, C.V. Bagin, S.V. Logvinov, A.V. Ezhov,

A.G. Lazykin, D.A. Mokhov, V.V. Krupin, A.R. Ziganshin

*Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment
«48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian
Federation, Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation*

The article is dedicated to the possible improvement of the production technology of live plaque vaccines. The automated information system (AIS) of the control of the production of pharmaceuticals has been elaborated in the branch office of the «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of Russia (Kirov) within the framework of the federal target program «The National System of Chemical and Biological Security of the Russian Federation». The AIS has been used for the improvement of the technology of submerged cultivation of live plaque vaccine. Strain EV, line NIEG, as well as the upgraded fermenter BIOR-0,25 with the AIS of the control of

the production have been used in this work. The problems of the improvement of the production technology of pharmaceuticals have been studied. The possibility of shared use of the fermenters and AIS of the control of the production of pharmaceuticals has been proven experimentally. This hardware system can accumulate, systemize and record scientific and technical information about all the operations. The above-mentioned studies allow to enhance the technological capabilities of the equipment and to improve the stage of the submerged cultivation in the production of live plaque vaccine.

Keywords: *automated information system; submerged cultivation; live plaque vaccine; technological process.*

For citation: Sharov D.A., Leshchenko A.A., Bagin C.V., Logvinov S.V., Ezhov A.V., Lazykin A.G., Mokhov D.A., Krupin V.V., Ziganshin A.R. *The Improvement of Live Plaque Vaccine Production Technology // Journal of NBC Protection Corps. 2017. V. 1 № 3. P 30–37.*

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

References

1. Selevtsov L.I. Automation of technological processes. Moscow: Academy, 2014. 352 p. (in Russian).
2. Tumanov Yu.V., Boldyrev A.N., Autenshlyus A.I. Medical Biotechnology: diagnostics of diseases and the creation of pharmaceuticals. Novosibirsk: Publ. NSTU, 2016. 214 p. (in Russian).
3. Patent RF 2510825 (2013) (in Russian).
4. Lakin G.F. Biometrics. Moscow: Higher School, 1990 (in Russian).
5. Bezborodov A.M., Zagustina N.A., Popov V.O. Enzymatic processes in biotechnology. Moscow: Nauka, 2008. 335 p. (in Russian).
6. Operation and maintenance of pharmaceutical equipment. Manual. URL: <http://www.Biotechno.ru/2016/catalog/87.html> (in Russian).
7. OST 64-02-003-2002. Medical industry products. Technological regulations of the production. The contents, the order of development, coordination and approval. Introd. 15.04.2003. Moscow, 2003 (in Russian).
8. Pharmacopeial article of the enterprise LP-000535 «Live plaque vaccine, lyophilizate for the production of the suspension for injections, inhalations and dermal scarifying application» (in Russian). Introd. 12.05.2011.

Authors

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation.

Sharov D.A. Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Technical Sciences.

Leshchenko A.A. Leading Researcher of the Scientific and Research Department. Doctor of Technical Sciences, Professor.

Bagin C.V. Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Technical Sciences.

Logvinov S.V. Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Ezhov A.V. Senior Researcher of the Scientific and Research Department. Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher.

Lazykin A.G. Senior Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Mokhov D.A. Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Krupin V.V. Deputy Head of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Ziganshin A.R. Senior Researcher of the Scientific and Research Department.

Address: NIC48CNII@mail.ru