

Мембранные технологии в производствах иммунобиологических лекарственных препаратов, выпускаемых филиалом федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров)

**А.А. Лещенко, Д.А. Шаров, В.В. Бирюков, И.В. Косенков, И.П. Погорельский,
А.Г. Лазыкин, А.В. Ежов, С.В. Багин, С.В. Логвинов, Д.А. Мохов, В.В. Крупин**

**Филиал федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации, 61000,
Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119**

Поступила 09.01.2019 г. Принята к публикации 17.06.2019 г.

В филиале федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров) проведены теоретические и экспериментальные исследования по внедрению метода тангенциальной фильтрации для разделения биологических смесей в производство иммунобиологических лекарственных препаратов. Метод микрофильтрации в тангенциальном потоке заменил процесс седиментации на стадии концентрирования полуфабрикатов вакцинных препаратов, значительно сократив продолжительность процесса, а также позволил получать суспензии из некондиционной по показателю концентрации микробных клеток культуральной жидкости. Одновременно с этим метод микрофильтрации дал возможность концентрировать седиментационно-устойчивые культуры *Yersinia pestis* вакцинного штамма EV. В сравнении с центробежным сепарированием концентрация живых микробных клеток вакцинного штамма EV *Y. pestis* увеличилась в полтора раза, объем выхода концентрата – в два раза, а продолжительность процесса сократилась в четыре раза. Фильтрация в тангенциальном потоке в установке «АСФ-020» по выходу спорового продукта сибиреязвенной вакцины СТИ-1 (в млн доз) в 1,8 раз более эффективна по выходу в сравнении с центробежным сепарированием. В конструкцию фильтрующих модулей для выпуска иммуноглобулина противосибиреязвенного включены капсулы «Сартобран-РР», показавшие высокую эффективность стерилизации. Мембранный метод позволил сократить продолжительность технологического процесса, высвободить при этом производственные площади путем демонтажа малоэффективного оборудования. В настоящее время мембранные процессы используются в филиале при производстве чумной, сибиреязвенной, бруцеллезной и сапной вакцин, противосибиреязвенного иммуноглобулина, диагностических препаратов и стерилизации жидких питательных сред. При стерилизации питательных сред данный вид оборудования содействует более рачительному отношению к энергопотреблению и выступает альтернативой процессам термической стерилизации жидкостей, обеспечивая при этом сохранение их биологической и технологической полноценности. Эксперименты по применению металлокерамических фильтров, стерилизующих воздух, подаваемый для аэрации, показали снижение продолжительности подготовительных операций на 20 ч и повышение общих эксплуатационных возможностей системы.

Ключевые слова: иммунобиологический лекарственный препарат; мембранный метод фильтрации; оборудование для глубинного культивирования микроорганизмов; промышленное культивирование микроорганизмов; противосибиреязвенный иммуноглобулин; разделение биологических смесей; сибиреязвенная вакцина; тангенциальная фильтрация; технологический процесс; чумная вакцина.

Библиографическое описание: Лещенко А.А., Шаров Д.А., Бирюков В.В., Косенков И.В., Погорельский И.П., Лазыкин А.Г., Ежов А.В., Багин С.В., Логвинов С.В., Мохов Д.А., Крупин В.В. Мембранные технологии в производствах иммунобиологических лекарственных препаратов, выпускаемых филиалом федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров) // Вестник войск РХБ защиты. 2019. Т. 3. № 2. С. 137–149.

Методы разделения биологических смесей в производстве иммунобиологических лекарственных препаратов (далее – ИЛП) развивались и совершенствовались параллельно с процессами промышленного культивирования микроорганизмов. Получаемая культуральная жидкость представляет собой сложную дисперсионную многофазную систему. Водная фаза культуральной жидкости содержит клетки микроорганизмов-продуцентов, продукты их жизнедеятельности, не использованные компоненты питательной среды, пузырьки воздуха и т.д. Содержание биомассы микробных клеток в культуральной жидкости достигает 10 %, а концентрация целевого продукта чаще всего не превышает 1,5 % [1]. Выделение столь малого количества микробных клеток из культуральной жидкости является серьезной технологической задачей, которую решают, применяя методы концентрирования [2, 3]. Первоначально такие методы были связаны исключительно с процессом седиментационного концентрирования бактериальной массы из культуральной жидкости. Для повышения их эффективности использовали флокулянты и коагулянты, способные ускорить процесс гравитационного осаждения бактерий [4]. Передовыми в рамках данного технологического направления считаются способы центробежного (машинного) разделения культуральных жидкостей. Развитие химической технологии высокомолекулярных соединений позволило создавать и активно внедрить в биотехнологические процессы искусственные полупроницаемые мембраны на основе синтетических материалов [5–7].

Наибольшее применение в практике производства ИЛП нашел способ фильтрации из тангенциального потока, когда жидкость непрерывно прокачивается при определенной скорости и давлении через каналы, в которых все стенки являются полупроницаемыми мембранами. При этом культуральная жидкость проходит сквозь поры мембран и отводится из разделительного аппарата, а в циркулирующем потоке остается взвешенная дисперсная фаза в виде микробных клеток. Многократной

рециркуляцией обрабатываемой культуральной жидкости достигается требуемая степень разделения [8–13].

Цель работы – изучить возможность применения мембранных технологий в производствах иммунобиологических лекарственных препаратов, выпускаемых филиалом федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации.

Материалы и методы

В работе использовали культуры микроорганизмов: *Yersinia pestis*, вакцинный штамм EV линии НИИЭГ, *Bacillus anthracis*, вакцинный штамм СТИ-1. Питательные среды готовили на основе кислотных гидролизатов казеина и рыбной кормовой муки. Биомассу вакцинных штаммов получали методом глубинного культивирования с использованием биореактора «БИОР-0,25» компании BIORUS®.

Разделение биологических смесей центробежным методом осуществляли на сепараторе модели «АСГ-3МБ» акционерного общества «Плавский машиностроительный завод «Плава».

Разделение биологических смесей методом тангенциальной фильтрации осуществляли на установках «АСФ-020» и «Сартокон-мини» (производство ЗАО «Владисарт») с использованием фильтрующих элементов МКМ 46020 06Ш.

Стерилизацию белковых препаратов проводили методом микрофильтрации с использованием капсулы «Сартобран-PP» фирмы Sartorius.

Оценку качества стерилизации воздуха с применением фильтрующих элементов тонкой очистки ФЭТО-60 и МКФС-140 проводили по бактериальному аэрозолю методом высева на питательные среды сорбированных в жидкость проб.

Оценку качества полупродуктов вакцин, противосибиреязвенного иммуноглобулина, стерильных питательных сред, воды очищенной проводили в соответствии с методиками, изложенными в нормативной документации¹.

¹ ФСП ЛП-000535-051114 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, ингаляций и кожного скарификационного нанесения». Р 001273/01-020914 «Вакцина сибиреязвенная живая». ЛСР-0072771/10-280710 «Иммуноглобулин противосибиреязвенный».

Таблица 1 – Характеристика концентрированных споровых суспензий вакцинного штамма сибиреязвенного микроба СТИ-1, полученных сравниваемыми методами ($X \pm I_{95}$, $n=8$)

Наименование показателя, единица измерения	Значения показателя для споровых суспензий, полученных методом	
	центробежным	мембранным
Концентрация спор, млрд×спор/мл	8,1±3,2	8,2±2,6
Содержание спор, нормально окрашенных по Цилю-Нильсену, %	94,5±3,5	95,5±2,5
Содержание жизнеспособных спор, %	93,5±3,5	93,5±2,1
Содержание общего азота, мг/млрд спор	0,09±0,02	0,06±0,01
Содержание живых спор, определенное чашечным методом, млрд×спор/мл	4,3±1,5	4,3±1,6
Концентрация ионов водорода pH, ед. pH	8,6±0,2	8,7±0,1
Наличие посторонней микрофлоры	Отсутствует	Отсутствует
Выход целевого продукта, млн доз	14	25

Статистическая обработка экспериментальных данных была выполнена в соответствии с рекомендациями [14].

Результаты

Экспериментальная оценка использования установки тангенциальной фильтрации типа «АСФ-020» в технологии сибиреязвенной вакцины показала возможность отделения клеточной биомассы с помощью мембранных модулей, выполненных из полиэфирсульфона с размером пор 0,2 мкм [15]. Процесс концентрирования микробных культур осуществляется в режиме проточной фильтрации с давлением от 0,15 до 0,20 МПа и производительностью по материальному потоку от 12 до 16 л/ч.

В таблице 1 представлена характеристика концентрированных споровых суспензий вакцинного штамма сибиреязвенного микроба СТИ-1, полученных центробежным и мембранным методом тангенциальной фильтрации на установке «АСФ-020» (средние величины получены на основе анализа 8 серий суспензий, полученных по каждому методу концентрирования). Концентрация экспериментальных культуральных жидкостей составляла от 0,5 до 0,9 млрд спор/мл. Все серии приготовленных споровых

концентратов соответствовали требованиям производственного регламента².

Из анализа данных таблицы 1 следует, что фильтрация в тангенциальном потоке установке «АСФ-020» по выходу целевого продукта (в млн доз) в 1,8 раз более эффективна в сравнении с центробежным сепарированием.

В настоящее время установка «АСФ-020» успешно используется на стадии концентрирования в технологии сибиреязвенных вакцин. На рисунке 1 представлен производственный участок концентрирования культуральной жидкости при производстве сибиреязвенной вакцины.

На протяжении многих лет филиалом федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров) для практических нужд здравоохранения осуществляется выпуск чумных вакцин. Формы выпуска: лиофилизат для приготовления суспензий для инъекций, ингаляций и кожного скарификационного нанесения и таблетки для рассасывания.

Изначально на стадии концентрирования предусматривалось использование метода седиментации микробной взвеси

МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.

МУК 4.1/4.2.588-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям». М.: Минздрав России. 1998.

МУ-78-113 «Приготовление, хранение и распределение воды очищенной и воды для инъекций».

ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств».

² ПР 08461522-19-14. «Промышленный регламент на производство вакцины сибиреязвенной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения».



Рисунок 1 – Участок мембранного концентрирования в производстве живой сибиреязвенной вакцины на установке «АСФ-020» (фотография авторов)



Рисунок 2 – Использование микрофилтрационной установки «Сартокон-мини» в отработке технологии получения чумных вакцин (фотография авторов)

в аппаратах-осадителях объемом 63 л³. При совершенствовании технологии была рассмотрена целесообразность применения мембранного метода разделения нативных культур на микрофилтрационной установке тангенциального типа в сравнении с осаждением [16]. Процесс осуществлялся с использованием установки «Сартокон-мини» на мембранах с размером пор 0,2 мкм из полипропилена при температуре от 18 до 20 °С, рабочем давлении от 0,15 до 0,20 МПа, производительности от 6 до 8 л/ч.

В таблице 2 представлена характеристика шести серий концентратов вакцинного штамма чумного микроба, полученных методами седиментации и микрофилтрации.

Как следует из таблицы 2, во всех приготовленных сериях концентратов значения показателя рН соответствовали нормативным и находились в интервале от 7,5 до 7,8 единиц

рН. Показатели общей концентрации микробных клеток и концентрации живых микробных клеток также отвечали регламентным требованиям (таблица 2). Данное обстоятельство позволило включить в состав аппаратурно-технологической линии производства чумных вакцин установку «Сартокон-мини» (рисунок 2).

Метод микрофилтрации в тангенциальном потоке заменил процесс седиментации на стадии концентрирования полуфабрикатов вакцинных препаратов, значительно сократив продолжительность процесса, а также позволил получать суспензии из некондиционной по показателю концентрации микробных клеток культуральной жидкости. Одновременно с этим метод микрофилтрации дал возможность концентрировать седиментационно-устойчивые культуры *Y. pestis* вакцинного штамма EV [17].

Таблица 2 – Характеристика концентрированных суспензий вакцинного штамма EV *Y. pestis* и технологические параметры, полученные сравниваемыми методами ($X \pm I_{95}$, n=6)

Наименование показателя, единица измерения		Значения показателя для концентрированных суспензий, полученных методом	
		седиментационным	микрофилтрационным
Общая концентрация микробных клеток, млрд м.кл./мл		120±12	130±14
Концентрация живых микробных клеток, млрд ж.м.кл./мл, определенная методом...	осмооптическим	54,8±3,1	65,0±4,6
	высева на плотную питательную среду	48,2±5,1	62,0±3,4
Концентрация ионов водорода рН, ед. рН		7,6±0,1	7,7±0,1
Объем выхода концентрата, мл/л культуры		20	40
Продолжительность процесса получения концентрата, ч		48	12

³ ПР 08461522-23-14. «Промышленный регламент на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, ингаляций и накожного скарификационного нанесения».

Замена в технологии производства чумных вакцин аппаратов-осадителей, эксплуатация которых характеризовалась низкой производительностью и значительной продолжительностью процесса осаждения, на мембранную технику способствовала улучшению технологических показателей. Данные таблицы 2 показывают, что концентрация живых микробных клеток вакцинного штамма EV Y. *pestis* увеличилась в полтора раза, объем выхода концентрата – в два раза, а продолжительность процесса сократилась в четыре раза.

Полученные результаты послужили основой внедрения мембранных технологий и в другие стадии технологии производства вакцинных препаратов. Так были выделены основные этапы технологических процессов получения полуфабрикатов вакцин, при осуществлении которых представлялось целесообразным оценить возможность использования мембранного оборудования. Помимо «сгущения» микробных культур, были экспериментально изучены процессы мембранной стерилизации питательных сред и белоксодержащих растворов, стерилизации воздуха фильтрацией, подготовка апиrogenной воды.

При производстве вакцинных препаратов одной из основных стадий является приготовление питательных сред требуемого качества. Серьезной проблемой в процессе приготовления стерильных питательных сред является обеспечение их биологической полноценности за счет сохранения термолабильных компонентов, а также предотвращение образования ингибиторов роста и размножения бактерий (продуктов разложения углеводов). Действие всех стерилизующих агентов основано на инактивации важнейших внутриклеточных веществ, необходимых для роста и репродукции клеток.

Многие белки, особенно ферменты, которые включаются во все фазы клеточного развития и пролиферации, денатурируются под воздействием температуры [18, 19]. Одним из путей решения данной проблемы является внедрение мембранного метода



Рисунок 3 – Микрофильтрационные капсулы различной производительности (фотография авторов)

фильтрации (или так называемой «холодной» стерилизации) в технологический процесс приготовления вакцинных препаратов [20]. В ходе экспериментов, выполненных на установке тангенциальной фильтрации «АСФ-020» с мембранными модулями, размер пор которых составлял 0,2 мкм, осуществлялась «холодная» стерилизация питательных сред, приготовленных на основе кислотных гидролизатов казеина и рыбной кормовой муки, в объемах до 200 л.

По результатам более 10 экспериментов было доказано, что применение мембранной техники гарантированно обеспечивает приготовление стерильного продукта, сохраняет его питательную ценность в отношении выращиваемых культур и исключает процессы образования ингибиторов бактериального роста.

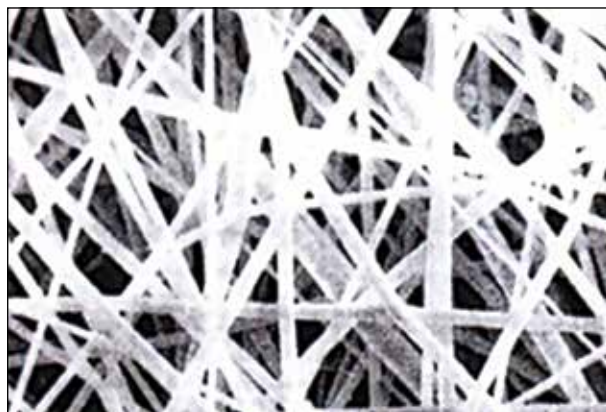
Стерильность – основополагающая характеристика сывороточных лечебно-профилактических препаратов. Применительно к технологии противосибирязвенного иммуноглобулина на стадии стерилизации влажного белкового осадка, нами была экспериментально показана возможность использования микрофильтрационных капсул взамен установки стерилизующей фильтрации «УСФ-293» (рисунок 3).

Преимуществом фильтрационных капсул является их постоянная готовность к работе,

Таблица 3 – Результаты стерилизующей фильтрации иммуноглобулина противосибирязвенного с использованием установки «УСФ-293» и капсулы «Сартобран-PP»*

Наименование устройства	Пропускная способность, л	Величина потерь,...		Стерильность
		л	процентов	
УСФ-293	3,1± 0,2	0,20± 0,2	6,5	Стерилен
«Сартобран-PP»	6,2± 0,3	0,05± 0,2	0,8	

*ПР 08461522-10-09. «Промышленный регламент на производство иммуноглобулина противосибирязвенного, раствора для внутримышечного введения».



А



Б

Рисунок 4 – Структура пористого слоя фильтров под микроскопом [24]
(А – фильтр «ФЭТО-60»; Б – фильтр «МКФС-140»)

не требующая продолжительных по времени подготовительных операций. В таблице 3 представлены средние значения результатов пяти сравнительных испытаний установки «УСФ-293» и капсулы «Сартобран-РР» в процессе фильтрации полуфабриката иммуноглобулина противосибиреязвенного [21, 22].

Данные, приведенные в таблице 3, свидетельствуют о том, что величина пропускной способности капсулы «Сартобран-РР» в два раза выше установки УСФ-293, а потери препарата иммуноглобулина при осуществлении технологической операции уменьшились почти в восемь раз. Кроме того, экспериментально доказана возможность эксплуатации капсулы как минимум в пяти циклах стерилизующей фильтрации после ее регенерации.

Внедрение капсулы «Сартобран-РР» в технологию производства иммуноглобулина на стадии стерилизующей фильтрации позволяет повысить суммарную производительность процесса и сократить производственные площади для размещения технологического оборудования.

Повышающиеся требования правил производства и контроля качества иммунобиологических лекарственных средств⁴ потребовали поиска новых технических решений в области эффективности стерилизации воздушных фильтров. При экспериментальном изучении мембранных технологий на этапе подготовки стерильного воздуха для аэрации процесса глубинного культивирования вакцинных штаммов была опробована возможность применения металлокерамических фильтрующих систем

марки «МКФС-140» [23]. На момент данных исследований стерилизация воздуха осуществлялась посредством фильтрующих элементов тонкой очистки «ФЭТО-60», фильтрующий материал - ткань типа ФПП-15-1,5, разработанная академиком АН СССР И.В. Петряновым-Соколовым⁵. Применение данных элементов очистки имело ряд недостатков:

- малая эффективность очистки воздуха от частиц размером до 0,15 мкм;
- низкая механическая прочность фильтрующего полотна;
- критическое снижение эффективности при намокании фильтрующего полотна;
- гарантированный срок службы менее 6 месяцев;
- невозможность стерилизации фильтра насыщенным водяным паром.

На рисунке 4 показана микроскопическая структура пористого слоя фильтров «ФЭТО-60» и «МКФС-140».

Основу фильтрующих систем «МКФС-140» составляет полученный методом электрического формования фильтрующий материал – «НП-2». Он предназначен для тонкой и сверхтонкой очистки воздуха и газов от твердых сухих частиц, а также радиоактивных, токсичных, бактериальных и других высокодисперсных аэрозолей с начальной концентрацией не более 0,5 мг/м³. Материал «НП-2» при прохождении через него воздуха задерживает мелкие твердые частицы. Фильтрация осуществляется благодаря извилистым и многослойным порам, жесткому, фиксированному расположению вспененных металлических частиц. Фильтрующий эффект материала «НП-2» обеспечивает степень очистки воздуха от микробных клеток и соизмеримых по размеру частиц на 99,999 % [23].

⁴ ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств».

⁵ Петрянов-Соколов Игорь Васильевич. <https://getsiz.ru/nasledie-petryanova-sokolova-r-110-letiyu.html> (дата обращения: 7.12.2018 г.).

Таблица 4 – Основные технические характеристики фильтров «ФЭТО-60» и «МКФС-140»* [25]

Наименование технической характеристики, единица измерения	Марка фильтров	
	«ФЭТО-60»	«МКФС-140»
Материал фильтрующего элемента	Полиакрилвиниловое волокно	Мелкопористый вспененный никель
Габаритные размеры: высота, мм диаметр, мм	280 165	136 59
Масса, кг	2,000	0,393
Площадь фильтрующей поверхности, м ²	1,500	~3,5
Номинальный объемный расход воздуха через фильтр, л/ч	60000	140000
Степень очистки воздуха от частиц, не менее 0,15 мкм, %	99,990	99,999
Возможность регенерации	Не предусмотрена	6 циклов (каждые 2 года эксплуатации)
Стерилизация насыщенным паром	Не предусмотрена	Возможна
Стерилизация химическим способом	Возможна	Возможна

*Воздушные фильтры. ООО «Фильтрационные Технологии». Екатеринбург, 2016.

В таблице 4 приведены сравнительные данные, характеризующие фильтры «ФЭТО-60» и «МКФС-140».

Как следует из данных, приведенных в таблице 4, фильтрующие системы марки «МКФС-140» превосходят фильтры «ФЭТО-60» по ряду технических и эксплуатационных характеристик. Металлокерамические фильтры более прочные, коррозионностойкие, сопротивляются разрушению и противостоят резким колебаниям тепло- и электропроводности. Они характеризуются высокой и сравнительно простой регенерацией. Введение металлокерамических фильтров марки «МКФС-140» в конструкцию системы аэрации реакторов типа «БИОР-0,25» позволило сократить время подготовки оборудования к работе с 22 до 2 ч, а также увеличить срок эксплуатации фильтров с 2 до 12 лет [25].

Требования правил надлежащей практики производства ИЛП в области контроля исходного сырья и расширение номенклатуры препаратов, выпускаемых филиалом федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), послужили причиной создания отдельного технологического участка для приготовления очищенной и апиrogenной воды.

В качестве основного оборудования для приготовления очищенной и апиrogenной воды была выбрана отечественная комбинированная

мембранная установка серии УВОИ-«М-Ф»⁶. Состав установки и получаемые иммунобиологические препараты показаны на рисунках 5 и 6.

Мембранные блоки первой и второй ступени очистки – главные элементы установки. Последовательная комбинация блоков (элементов) установки позволяет полностью очистить воду от взвешенных механических и коллоидных частиц, микроорганизмов, органических соединений и солей тяжелых металлов. Соли одно- и многовалентных ионов удаляются на 99 %. Автоматический непрерывный режим работы установки обеспечивает все производства ИЛП очищенной и апиrogenной водой в филиале федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), удовлетворяющей требованиям МУ-78-113⁷. Конструктивно система водоподготовки в сборе с комбинированной мембранной установкой выполнена из полимерных материалов без застойных зон, что неизменно обеспечивает приготовление водных полуфабрикатов высокого качества. Себестоимость очищенной воды, полученной на мембранной установке, почти в 10 раз ниже себестоимости воды, приготовленной технологией дистилляции.

Обсуждение

Теоретические и экспериментальные исследования, выполненные сотрудниками

⁶ Комбинированная мембранная установка серии УВОИ-«М-Ф». НПК «Медиана-фильтр». М.: 2008.

⁷ МУ-78-113 «Приготовление, хранение и распределение воды очищенной и воды для инъекций».



Рисунок 5 – Установка УВОИ-М-Ф

(1 – блок предварительной очистки воды; 2 – мембранные блоки первой и второй ступени очистки; 3 – ионообменный блок; 4 – блок стерилизующей фильтрации; 5 – блок управления с индикаторными приборами; 6 – емкость для очищенной воды. Фотография авторов)

филиала федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров) в области промышленной микробиологии, позволили внедрить и существенно расширить спектр использования мембранного оборудования в производстве ИЛП [24, 25].

В настоящее время мембранные процессы используются нами в производстве чумной, сибиреязвенной, бруцеллезной и сапной вакцин, противосибиреязвенного иммуноглобулина и ряда диагностических препаратов. Применение методов фильтрации обеспечивает увеличение в два раза концентрации спор вакцинного штамма сибиреязвенного микроба СТИ-1 в споровой суспензии, одновременно снижая производственные потери.

Мембранный метод позволил повысить значения показателя биологической концентрации клеток в суспензиях вакцинного штамма чумного микроба, сократить продолжительность технологического процесса, высвободить при этом производственные площади путем демонтажа малоэффективного оборудования.

Испытания установки тангенциальной фильтрации «АСФ-020» при стерилизации

питательных сред в технологиях вакцинных препаратов подтвердили ее универсальность. Данный вид оборудования содействует более рачительному отношению к энергопотреблению и выступает альтернативой процессам термической стерилизации жидкостей, обеспечивая при этом сохранение их биологической и технологической полноценности.

В составе аппаратурно-технологической линии сывороточных лечебно-профилактических препаратов эксплуатировались стерилизующие мембраны, характеризовавшиеся низкой пропускной способностью. Данное обстоятельство выявило необходимость поиска новых технических решений, направленных на более рациональное использование полуфабрикатов и технологического оборудования. В этой связи конструкция фильтрующих модулей в виде эргономичных малогабаритных капсул с необходимой для выпуска иммуноглобулина противосибиреязвенного производительностью представлялась наиболее предпочтительной. Данный факт определил выбор оборудования для испытаний, а ход дальнейших экспериментов показал производственную пригодность, экономичность и эффективность капсул «Сартобран-РР».

Современные технологии изготовления фильтров, основу которых составляют



Рисунок 6 – Иммунобиологические препараты, полученные в филиале федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров) с помощью описанных в статье технологий

мелкопористые вспененные металлы, дали возможность опытным путем проверить их приемлемость для стерилизации технологического воздуха перед поступлением в биореактор. Эксперименты по применению металлокерамических фильтров, стерилизующих воздух, подаваемый для аэрации, показали снижение продолжительности подготовительных операций на 20 ч и повышение общих эксплуатационных возможностей системы.

В соответствии с техническим заданием, подготовленным специалистами филиала федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), научно-производственной компанией «Медиана-фильтр» была создана комбинированная мембранная установка серии УВОИ-«М-Ф», предназначенная для приготовления очищенной и апиrogenной воды в технологиях ИЛП. Результаты комплексного опробования установки в составе аппаратурно-технологической линии изготовления чумной вакцины подтвердили возможности установки по обеспечению потребностей Филиала в очищенной и апиrogenной воде.

Заключение

Теоретические и экспериментальные исследования по внедрению метода тангенциальной фильтрации для разделения биологических смесей в производство иммунобиологических лекарственных препаратов, выпускаемых на базе филиала федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), показали его высокую надежность и эффективность. Реализация мембранных технологий при стерилизации жидких сред предоставила ряд преимуществ по сравнению с термической стерилизацией. Применение металлокерамических материалов для фильтрации газовых фаз намного эффективнее и технологичнее применения тканевых фильтрующих материалов. Постадийная подготовка очищенной и апиrogenной воды заданного качества с применением, в том числе, мембранных методов, обеспечила соблюдение требований надлежащей практики вакцинного производства. Дальнейшие исследования по внедрению мембранных технологий целесообразно направить на решение проблемы обеззараживания отходов биотехнологических процессов.

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. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. СПб.: 1995.
2. Сазыкин Ю.Ю., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология / Под ред. Катлинского А.В. М.: 2014.
3. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: 2004.
4. Василенко Л.В., Никифоров А.Ф., Лобухина Т.В. Методы очистки промышленных сточных вод. Екатеринбург. 2009.
5. Дубяга В.П., Перепечкин Л.П., Каталевский Е.Е. Полимерные мембраны. М.: 1981.
6. Брок Т. Мембранная фильтрация. М.: 1987.
7. Мембраны и мембранные технологии / Под ред. чл. корр. РАН А.Б. Ярославцева. М.: 2013.
8. Орлов Н.С. Ультра- и микрофильтрация. М.: 2014.
9. Besnard L., Fabre V., Fetting M., et al. Clarification of vaccines: An overview of filter based technology trends and best practices // *Biotechnol Adv.* 2016. V. 34(1), P. 1–13. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.11.005.
10. Lutz H., Arias J., Zou Y. High concentration biotherapeutic formulation and ultrafiltration: Part 1 pressure limits // *Biotechnol Prog.* 2017 V. 33 (1), P. 113–124. doi: 10.1002/btpr.2334.
11. Emami P., Motevalian S.P., Pepin E., Zydney A.L. Purification of a Conjugated Polysaccharide Vaccine using Tangential Flow Diafiltration. *Biotechnol Bioeng.* 2018 doi: 10.1002/bit.26867.
12. Шлейкин А.Г., Панова Н.Е. Мембранные процессы в биотехнологии. СПб.: 2013.
13. Пименов Е.В., Дармов И.В., Кожухов В.В. и др. Актуальные проблемы совершенствования технологии асептического концентрирования при производстве МИБП // *Материалы юбилейной науч. конф., посвященной 70-летию образования НИИ микробиологии МО РФ*, 30 нояб.-1 дек. 1998 г. Киров, С. 324–325.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: 1990.
15. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты / Под ред. Г.Г.Онищенко, И.В.Дармова, С.В.Борисевича. М.: 2018.
16. Ежов А.В., Бирюков В.В., Мохов Д.А. и др. Возможность использования метода микрофильтрации в технологии вакцины чумной живой сухой // *Материалы Всероссийской научной конференции посвященной 80-летию основания ФГУ «48 ЦНИИ» Минобороны России*. Киров: ФГУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. 2008. Вып. 1. С. 313–316.
17. Лещенко А.А., Тетерин В.В., Лазыкин А.Г. и др. Экспериментальное обоснование возможности получения концентрата микробных клеток штамма *Yersinia pestis* EV методом микрофильтрации // *Биопрепараты*. 2014. № 1. С. 31–36.
18. Тихонов В.И., Рубан Е.А., Грязнева Т.Н. и др. Биотехнология / Под ред. акад. РАСХН Е.С. Воронина. СПб.: 2005.
19. Волова Т.Г. Биотехнология. Новосибирск. 1999.
20. Коваленко В.Н., Бирюков В.В., Ежов А.В. и др. «Холодная» сериализация сред высушивания в технологии производства чумной вакцины. Сборник научных трудов, посвященных 75- летию НИИ микробиологии МО РФ 2003. Киров. с.147.
21. Комиссаров А.В., Алешина Ю.А., Громова О.В. и др. Применение ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов // *Проблемы особоопасных инфекций*. 2015, Вып. № 1. С. 79–84.
22. Комиссаров А.В., Комоско Г.В., Лещенко А.А. и др. Изучение процесса стерилизующей фильтрации жидкого противосибиреязвенного глобулина // *Биотехнология*. 2002. № 2. С. 66–74.
23. Прусаков В.Н., Загнитко А.В., Никулин Е.А. и др. Многослойные металлические фильтрующие элементы для высокоэффективной очистки газов. Новые промышленные технологии. М.: 1994. Вып. 5. С. 38–40.
24. Дытнерский Ю.И., Каграманов Г.Г. Моделирование процесса фильтрации с помощью керамических мембран. М.: 2001.
25. Аршинов А.Н., Садовой Н.В., Косяков А.А. и др. Фильтры для высокоэффективной тонкой очистки технологического воздуха при культивировании микроорганизмов // *Биотехнология*. 1997. № 4. С. 27–30.

Об авторах

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 61000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119.

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

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

Бирюков Василий Васильевич. Начальник научно-исследовательского отдела – заместитель начальника управления, канд. техн. наук.

Косенков Иван Викторович. Младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела.

Погорельский Иван Петрович. Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела, д-р мед. наук, проф.

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

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

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

Логвинов Сергей Владимирович. 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. мед. наук.

Контактная информация для всех авторов: 23527@mil.ru

Контактное лицо: Лещенко Андрей Анатольевич; 23527@mil.ru

Membrane Technology in the Production of Immunobiological Preparations Produced by the Branch Office of the FSBE «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of Russia (Kirov)

A.A. Leshchenko, D.A. Sharov, V.V. Biryukov, I.V. Kosenkov,

I.P. Pogorelsky, A.G. Lazykin, A.V. Ezhov, S.V. Bagin,

S.V. Logvinov, D.A. Mokhov, V.V. Krupin

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 researchers of the Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov) organized theoretical and experimental studies on the introduction of a tangential filtration method for the separation of biological mixtures into the production of immunobiological preparations. The method of microfiltration in the tangential stream replaced the process of sedimentation at the stage of concoction of intermediate vaccines, reduced considerably the process time, and allowed to obtain suspensions from cultural liquid, substandard on an indicator of concentration of microbial cells. Along with this, the microfiltration method allowed to concentrate the cultures of *Yersinia pestis* of a vaccinal strain EV. In comparison with the centrifugal separation, the concentration of living microbial cells of a vaccinal strain of EV *Y. pestis* increased by one and a half times. The filtration in a tangential stream at the ASF-020 installation from the point of view of the production of the sporous product of anthrax vaccine STI-1 (in millions of doses), is 1.8 times more effective in comparison with the centrifugal separation. The membrane method allowed to reduce the duration of technological process. These membrane processes are used nowadays during the production of plague and anthrax vaccines, anthrax immunoglobulin, diagnostic medicines and during the sterilization of liquid nutrient mediums. This type of equipment for the sterilization of nutrient mediums can be considered as an alternative to the processes of the thermal sterilization of liquids and provides their biological and technological full functionality. Experiments on the use of the ceramic-metal filters sterilizing the air given for aeration, showed the decrease in duration of preparatory operations on 20 h and increase in the general operational opportunities of the system.

Keywords: *immunobiological preparation; membrane filtration method; equipment for deep cultivation of microorganisms; industrial cultivation of microorganisms; anthrax immunoglobulin; separation of biological mixtures; anthrax vaccine; tangential filtration; technological process; plague vaccine.*

For citation: Leshchenko A.A., Sharov D.A., Biryukov V.V., Kosenkov I.V., Pogorelsky I.P., Lazykin A.G., Ezhov A.V., Bagin S.V., Logvinov S.V., Mokhov D.A., Krupin V.V. Membrane Technology

in the Production of Immunobiological Preparations Produced by the Branch Office of the FSBE «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of Russia (Kirov) // Journal of NBC Protection Corps. 2019. V. 3. № 2.P. 137–149.

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. Elinov N.P. Introduction in biotechnology. SPb.: 1995 (in Russian).
2. Sazykin Yu.Yu., Orekhov S.N., Chakaleva I.I. Biotechnology / Ed. Katlinsky A.V. M.: 2014 (in Russian).
3. Biryukov V.V. Introduction in the industrial biotechnology. M.: 2004 (in Russian).
4. Vasilenko L.V., Nikiforov A.F., Lobukhina T.V. Methods of purification of industrial sewage. Yekateriburg. 2009 (in Russian).
5. Dubyaga V.P., Perepechkin L.P., Katalevsky E.E. Polymeric membranes. M.: 1981 (in Russian).
6. Brock T. Membrane filtration. M.: 1987 (in Russian).
7. Membranes and membrane technologies / Ed. A.B. Yaroslavtsev. M.: 2013 (in Russian).
8. Orlov N.S. Ultra- and microfiltration. M.: 2014 (in Russian).
9. Besnard L., Fabre V., Fetting M., et al. Clarification of vaccines: An overview of filter based technology trends and best practices // *Biotechnol Adv.* 2016. V. 34(1), P. 1–13. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.11.005.
10. Lutz H., Arias J., Zou Y. High concentration biotherapeutic formulation and ultrafiltration: Part 1 pressure limits // *Biotechnol Prog.* 2017 V. 33 (1), P. 113–124. doi: 10.1002/btpr.2334.
11. Emami P., Motevalian S.P., Pepin E., Zydney A.L. Purification of a Conjugated Polysaccharide Vaccine using Tangential Flow Diafiltration. *Biotechnol Bioeng.* 2018 doi: 10.1002/bit.26867.
12. Shleikin A.G., Panova N.E. Membrane processes in biotechnology. SPb.: 2013 (in Russian).
13. Pimenov E.V., Darmov I.V., Kozhukhov V.V. et al. Actual issues of the improvement of aseptic concoction technology during the microbiological drugs production // Materials of the jubilee scientific conference, dedicated to the 70-th anniversary of the formation of the Scientific-Research Institute of Microbiology of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 30 November -1 December. 1998. Kirov, P. 324–325.
14. Lakin G.F. Biometrics. M.: 1990 (in Russian).
15. Anthrax: actual problems of the development of medical protection means / Eds. G.G. Onischenko, I.V. Darmov, S.V. Borisevich. M.: 2018 (in Russian).
16. Yezhov A.V., Biryukov V.V., Mokhov D.A. et al. Possibility of the use of microfiltration method in the technology of live dry plague vaccine // Materials of All-Russian scientific conference, dedicated to the 80-th anniversary of the foundation of FSBE «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Kirov: FSE «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. 2008. Vol. 1. P. 313–316 (in Russian).
17. Leshchenko A.A., Teterin V.V., Lazykin A.G. et al. Experimental verification of the possibility of obtaining *Yersinia pestis* EV strain microbial cells by microfiltration method // *Biopharmaceuticals.* 2014. № 1. C. 31–36 (in Russian).
18. Tikhonov V.I., Ruban E.A., Gryazneva T.N. et al. *Biotechnology* / Ed. E.S. Voronin. SPb.: 2005 (in Russian).
19. Volova T.G. *Biotechnology.* Novosibirsk. 1999 (in Russian).
20. Kovalenko V.N., Biryukov V.V., Yezhov A.V. et al. «Cold» serilisation of drying mediums in plague vaccines production technologies. Materials of the scientific conference, dedicated to the 70-th anniversary of the formation of the Scientific-Research Institute of Microbiology of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Kirov. P. 147 (in Russian).
21. Komissarov A.V., Aleshina Yu.A., Gromova O.V. et al. Use of ultra-filtration for antigene concoction and purification // *Problems of highly infectious diseases.* 2015, V. 1. P. 79–84 (in Russian).
22. Komissarov A.V., Komosko G.V., Leshchenko A.A. et al. Study of the process of sterilizing filtration of liquid anthrax immunoglobulin // *Biotechnology.* 2002. № 2. P. 66–74 (in Russian).
23. Prussakov B.N., Zagnitko A.V., Nikulin et al. Multilayer metal filter elements for highly effective gas purification. *New industrial technologies.* M.: 1994. V. 5. P. 38–40 (in Russian).
24. Ditnersky Yu.I., Kagramanov G.G. Filtration processes modelling with the ceramic membranes. M.: 2001 (in Russian).
25. Arshinov A.N., Sadovoy N.V., Kosyakov A.A. et al. Filters for the highly-effective fine purification of the process air during microorganisms cultivation // *Biotechnology.* 1997. № 4. P. 27–30 (in Russian).

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.

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

Dmitry Alexandrovich Sharov. Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Technical Sciences.

Vasily Vasilyevich Biryukov. Chief of the Scientific and Research Department – Deputy Head of the Unit. Candidate of Technical Sciences.

Ivan Viktorovich Kosenkov. Junior Researcher of the Scientific and Research Department

Ivan Petrovich Pogorelsky. Leading Researcher of the Scientific and Research Department. Doctor of Medical Sciences, Professor.

Alexey Gennadievich Lazykin. Senior Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Andrey Vladimirovich Ezhov. Senior Researcher of the Scientific and Research Department. Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher.

Cergey Valerievich Bagin. Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Technical Sciences.

Sergey Vladimirovich Logvinov. Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Dmitry Alexandrovich Mokhov. Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Vladimir Viktorovich Krupin. Deputy Head of the Department of the Scientific and Research Department. Candidate of Medical Sciences.

Contact information for all authors: 23527@mil.ru

Contact person: Leshchenko Andrey Anatolyevich; 23527@mil.ru