

УДК 619:615.37.012

DOI:10.31857/2500-2082/2022/6/77-80, EDN: KDBBRE

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Татьяна Анатольевна Скотникова, *доктор биологических наук*

Лариса Анатольевна Неминушая, *доктор биологических наук*

Наталья Киреевна Еремец, *кандидат биологических наук*

Алена Алексеевна Казаку, *аспирант*

Владимир Иванович Еремец, *доктор биологических наук, профессор*

Юрий Дмитриевич Фролов, *кандидат биологических наук*

*Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности,
Московская обл., Россия*

E-mail: ook_vnitibp@mail.ru

Аннотация. Работа выполнена в отделе обеспечения качества лекарственных средств для ветеринарии и животноводства ФГБНУ ВНИТИБП. Нормативными документами РФ и Евразийского экономического союза установлены единые требования к организации производства и контроля качества лекарственных средств для медицинского и ветеринарного применения. Важный элемент жизненного цикла иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) — определение и контроль их стабильности при различных предполагаемых условиях хранения. Требования по стабильности применяют как к основным, так и вспомогательным веществам, входящим в состав препарата (субстанции, антигены, буферные системы и другие добавки). В соответствии с рекомендациями ФАО/ВОЗ и документами Евразийского экономического союза по оценке пробиотиков исследована термостабильность и стабильность при длительном хранении в жидкой и сухой формах штаммов пробиотических бактерий *L. plantarum*, штамм 8PA3 (ВКПМ № В-11007) и *V. subtilis*, штамм М-8 (ВКПМ № В-1948), депонированных во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИгенетика. Установлен срок годности пробиотиков при температуре хранения 8–10°C: на основе бактерий *L. plantarum* (жидкая форма — 3 мес., сухая — 9 мес.); *V. subtilis* (жидкая форма — 9 мес., сухая — 12 мес.).

Ключевые слова: пробиотики, активность, кинетика, стабильность, термостабильность, фармакопея, срок годности, контроль

INVESTIGATIONS OF THE BIOLOGICAL DRUGS STABILITY BASED ON PROBIOTIC BACTERIA FOR VETERINARY USAGE

T.A. Skotnikova, *Grand PhD in Biological Sciences*
L.A. Neminushchaya, *Grand PhD in Biological Sciences*
N.K. Eremets, *PhD in Biological Sciences*

A.A. Kazaku, *PhD student*

V.I. Eremets, *Grand PhD in Biological Sciences, Professor*

Yu.D. Frolov, *PhD in Biological Sciences*

All-Russian Research Technological Institute of Biological Industry, Moscow Region, Russia

E-mail: ook_vnitibp@mail.ru

Abstract. The work was carried out in the Department of Quality Assurance of Medicines for Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry" (FS-BNU VNITIBP). Currently, the regulatory documents of the Russian Federation and the Eurasian Economic Union have established uniform requirements for the organization of production and quality control of medicines for medical and veterinary use. An important element of the life cycle of immunobiological medicinal products (ILPs) is the determination and control of their stability under various proposed storage conditions. Stability requirements apply to both the main and excipients included in the product: substances, antigens, buffer systems and other additives. In accordance with the recommendations of FAO/WHO and the documents of the Eurasian Economic Union on the assessment of probiotics, the thermal stability and stability in long-term storage in liquid and dry forms of strains of probiotic bacteria *L. plantarum*, strain 8RA3 (VKPM No. V-11007) and *B. subtilis*, strain M-8 (VKPM No. B-1948), deposited in the All-Russian Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) FSUE GosNIIGenetics, the shelf life of probiotics at a storage temperature of 8–10°C is established: based on *L. plantarum* bacteria (3 months in liquid form, 9 months in dry form), *B. subtilis* bacteria (9 months in liquid form, 12 months in dry form).

Keywords: probiotics, activity, kinetics, stability, thermal stability, pharmacopoeia, shelf life, control

Важный аспект производства иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) — определение и контроль его стабильности, то есть способности сохранять свои функциональные характеристики в пределах, установленных изготовителем. [1–4] Обязанность производителя — не только изначально оценить стабильность препарата, но и определить и верифицировать срок годности при хранении, транспортировании и использовании. Срок годности при хранении — это период времени, в течение которого препарат в его оригинальной упаковке сохраняет свою стабильность в условиях, установленных изготовителем. [2, 3] Таким образом, стабильность и срок годности — взаимосвязанные понятия. Оценивать стабильность требуется в реальном времени и ускоренно со стрессовыми условиями внешней среды для прогнозирования срока годности. Исследования также определяют безопасность и эффективность препарата в зависимости от воздействия факторов окружающей среды в течение времени. Программа исследований составляется в соответствии с фармакопейной статьей по стабильности биологических лекарственных средств. [2]

Пробиотик (probiotic) — функциональный пищевой ингредиент в виде непатогенных и нетоксикогенных живых микроорганизмов, обеспечивающий при систематическом употреблении в пищу как препаратов, так и в составе пищевых продуктов благоприятное воздействие на организм человека в результате нормализации состава и (или) повышения биологической активности нормальной микрофлоры кишечника (ГОСТ Р 52349-2005 «Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения»).

Цель работы — исследовать термостабильность и стабильность при длительном хранении в жидкой и сухой формах штаммов пробиотических бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект изучения — пробиотические бактерии *Lactobacillus plantarum*, штамм 8РА3 (ВКПМ № В-11007) и *Bacillus subtilis*, штамм М-8 (ВКПМ № В-1948); жидкие и сухие (высушенные сублимационно) препараты, полученные при культивировании бактерий *L. plantarum* и *B. subtilis*.

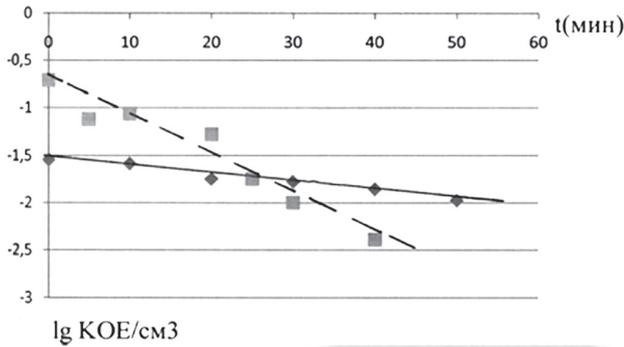
Термостабильность определяли в соответствии с разработанными во ВНИТИБП «Методическими рекомендациями по исследованию стабильности иммунобиопрепаратов на этапе разработки и в условиях действующего производства». [1]

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объекты изучения соответствуют требованиям, предъявляемым к штаммам микроорганизмов, перспективных для использования их в качестве пробиотиков.

Стабильность — один из основных показателей качества ИЛП, поскольку обеспечивает сохранение их терапевтических или профилактических свойств в процессе производства, хранения, транспортировки и применения. Ускоренные испытания стабильности при повышенных температурах (термостабильность) проводят в процессе разработки новых препаратов в ходе сравнительных исследований различных вариантов экспериментальных прописей, технологических приемов, с их помощью устанавливают первоначальный срок годности. Результаты долгосрочных испытаний (в реальном времени) — основание для установления и подтверждения сроков годности лекарственных средств при их регистрации и в последующий период. [5]

Стабильность штаммов бактерий — продуцентов пробиотиков (*L. plantarum* и *B. subtilis*) мы изучали



Динамика снижения количества жизнеспособных лактобактерий в жидкой (50°C) и сухой (60°C) формах.

для определения сроков годности и условий хранения препаратов, полученных из этих штаммов.

Исследование стабильности бактерий *L. plantarum*. Критерием оценки служила стабильность количества жизнеспособных лактобактерий. На образцах эталонной серии выявляли сохранность бактерий в жидкой и сухой формах при повышенных температурах (термостабильность) и длительном хранении.

Исследование термостабильности бактерий *L. plantarum* в жидкой форме. Образцы препарата прогревали в течение 15 мин. на водяной бане при температурах 40, 45, 50, 55, 60°C. Количество живых клеток определяли методом титрования на селективной среде MRS.

По результатам четырех опытов установили, что при нагревании (50°C) в течение 15 мин. количество живых клеток снижается, в среднем на 52%.

При температуре 50°C исследовали кинетику инактивации бактерий. Пробы (n = 4) прогревали 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин. Обработка полученных данных методом наименьших квадратов показала, что снижение количества жизнеспособных бактерий в суспензии зависит от продолжительности теплового воздействия и описывается кинетическим уравнением первого порядка

$$\lg y = \lg y_0 - Kt,$$

где y_0 — исходная активность препарата; y — величина активности через время t ; K — константа скорости инактивации (1/ед. времени).

В координатах $\lg y$ от t данное уравнение — прямая линия с тангенсом угла наклона к оси X, равным константе скорости инактивации (рис. 1).

Достоверность степени линейности связи подтверждена статистически ($r = -0,92$). Величина константы скорости инактивации $K_T = -1,6 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$. Линейный характер зависимости потери жизнеспособности клеток от продолжительности теплового воздействия позволяет рекомендовать в качестве экспресс-теста оценки стабильности бактерий в жидкой форме тест «ускоренного старения» при 50°C в течение 15 мин.

Исследование термостабильности сублимационно высушенных (сухая форма) бактерий *L. plantarum* про-

водили по аналогичной схеме. Образцы (n = 4) прогревали 30 мин. при температурах 45, 50, 55, 60, 65 и 70°C. При нагревании (60°C) в течение 30 мин. количество живых клеток снижалось, в среднем, на 44,4%.

Исследовали кинетику инактивации бактерий. Пробы нагревали при 60°C в течение 10, 20, 25, 30, 40 и 50 мин. Провели три опыта. Обработка полученных результатов методом наименьших квадратов показала, что, как и для жидкого препарата, снижение количества жизнеспособных бактерий в суспензии зависит от продолжительности теплового воздействия и имеет линейный характер, $r = -0,73$. Величина константы скорости инактивации: $K_T = -3,8 \times 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$. Для оценки стабильности бактерий *L. plantarum* в сухой форме можно использовать тест «ускоренного старения» при 60°C в течение 30 мин.

Стабильность жидкой и сухой формы бактерий *L. plantarum* при длительном хранении определяли по снижению количества живых лактобактерий при 8...10°C в течение 6 мес. и при 18...20°C — 12 мес. (табл. 1, 2).

Анализ полученных результатов показал, что с учетом определенной нами ошибки титрования ($\pm 0,5 \text{ лг КОЕ/см}^3$) достоверное снижение количества жизнеспособных лактобактерий начинается: для жидкой формы — через четыре месяца хранения при 8...10°C и через один месяц хранения при 18...20°C; для сухой формы — через восемь месяцев при 8...10°C и через четыре месяца при 18...20°C.

Таким образом, срок годности препаратов на основе бактерий *L. plantarum* при температуре хранения 8...10°C — три месяца в жидкой форме и девять — в сухой.

Исследование стабильности бактерий *B. subtilis* при хранении.

Известно, что из-за способности образовывать спорую форму бациллобактерии более стабильны, чем неспорообразующие лактобактерии.

Таблица 1. Данные по хранению жидкой формы *L. plantarum* (n=4)

Срок хранения, мес.	Содержание живых бактерий ($\times 10^8 \text{ КОЕ/см}^3$)	
	8...10°C	18...20°C
0	2,2	2,4
1	2,1	1,7
2	2,0	0,8
3	2,0	0,4
4	1,5	0,3
5	0,9	0,1
6	0,8	0,1

Таблица 2. Данные по хранению сухой формы *L. plantarum* (n=4)

Срок хранения, мес.	Содержание живых бактерий ($\times 10^8 \text{ КОЕ/см}^3$)	
	8...10°C	18...20°C
0	6,8	6,7
2	7,0	7,1
4	7,1	6,5
6	6,8	5,4
8	5,9	4,3
10	4,5	3,1
12	3,8	3,1

Таблица 3.

Показатели биологической активности при хранении жидкой формы бактерий *B. subtilis* (n=4)

Срок хранения, мес.	Содержание живых бактерий (x10 ⁹ КОЕ/см ³)	
	8...10°C	18...20°C
0	1,2	1,4
2	1,1	1,1
4	1,0	1,2
6	1,0	1,0
8	0,9	0,9
10	0,8	0,2
12	0,2	0,1

Таблица 4.

Показатели биологической активности при хранении сухой формы бактерий *B. subtilis* (n=4)

Срок хранения, мес.	Содержание живых бактерий (x10 ⁹ КОЕ/см ³)	
	8...10°C	18...20°C
0	6,8	6,7
2	7,0	7,1
4	7,1	6,5
6	6,8	6,4
8	6,9	6,3
10	6,5	6,1
12	6,8	6,1

Стабильность бактерий *B. subtilis* в жидкой и сухой форме определяли по снижению количества живых бактерий при 8...10°C и 18...20°C в течение 12 мес. (табл. 3, 4).

С учетом определенной нами ошибки титрования ($\pm 0,5 \lg$ КОЕ/см³) количество жизнеспособных бактерий *B. subtilis* достоверно сохраняется: для жидкой формы – в течение 10 мес. хранения при 8...10°C и восьми – 18...20°C; сухой – 12 мес. (8...10 и 18...20°C).

Таким образом, срок годности препаратов на основе бактерий *B. subtilis* при температуре хранения 8...10°C в жидкой форме – 9 мес., сухой – 12 мес.

Высокая термостабильность препарата значительно упрощает технологию его применения.

В соответствии с рекомендациями ФАО/ВОЗ и документами Евразийского экономического союза по оценке пробиотиков исследована термостабильность и стабильность при длительном хранении в жидкой и сухой формах штаммов пробиотических бактерий *L. plantarum*, штамм 8РАЗ (ВКПМ № В-11007) и *B. subtilis*, штамм М-8 (ВКПМ № В-1948), депонированных во Всероссийской кол-

лекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, установлен срок годности пробиотиков при температуре хранения 8...10°C на основе бактерий: *L. plantarum* (3 мес. в жидкой форме и 9 – в сухой); *B. subtilis* (9 мес. в жидкой форме и 12 – в сухой).

Анализ результатов показал, что полученные закономерности не противоречат данным других исследователей и отражают современное состояние проблемы, связанной с изучением состава и свойств пробиотиков.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Методические рекомендации по исследованию стабильности иммунобиопрепаратов на этапе разработки и в условиях действующего производства, утв. РАСХН 28.03.08. М. 2009.
2. ОФС.1.1.0020.18. Стабильность Государственная Фармакопея Российской Федерации, Изд. XIV.
3. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г., № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств», глава № 8 «Исследования стабильности биотехнологических (биологических) препаратов».
4. Скотникова Т.А., Неминушая Л.А., Токарик Э.Ф. и др. Роль стабильности в обеспечении качества лекарственных средств (иммунобиологических препаратов) для животных // Научные основы производства ветеринарных биол. препаратов: мат. Межд. науч.-практ. конф. Шелково, 2009. С. 656–662.
5. Фармакопея Евразийского экономического союза от 11 августа 2020, № 100. Введена в действие с 1 марта 2021 г.

REFERENCES

1. Metodicheskie rekomendacii po issledovaniyu stabil'nosti immunobiopreparatov na etape razrabotki i v usloviyah dejstvuyushchego proizvodstva, utv. RASKHN 28.03.08. M. 2009.
2. OFS.1.1.0020.18. Stabil'nost' Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossijskoj Federacii, Izd. XIV.
3. Reshenie Soveta Evrazijskoj ekonomicheskoy komissii ot 03.11.2016 g., № 89 «Ob utverzhenii Pravil provedeniya issledovaniy biologicheskikh lekarstvennykh sredstv», glava № 8 «Issledovaniya stabil'nosti biotekhnologicheskikh (biologicheskikh) preparatov».
4. Skotnikova T.A., Neminushchaya L.A., Tokarik E.F. i dr. Rol' stabil'nosti v obespechenii kachestva lekarstvennykh sredstv (immunobiologicheskikh preparatov) dlya zhivotnykh // Nauchnye osnovy proizvodstva veterinarnykh biol. preparatov: mat. Mezhd. nauch.-prakt. konf. Shchelkovo, 2009. S. 656–662.
5. Farmakopeya Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza ot 11 avgusta 2020, № 100. Vvedena v dejstvie s 1 marta 2021 g.