DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-5-4
УДК 619:615.37.012

Оценка влияния стабилизаторов на термодинамические характеристики сухой вирусной вакцины

Ковальский И.В.
Kovalskiy I.V.

Ковальский И.В., кандидат технических наук, младший научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств

Скотникова Т.А., доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств

Неминушая Л.А., доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела обеспечения качества лекарственных средств

Еремец Н.К., кандидат биологических наук, доцент, заведующий отделом обеспечения качества лекарственных средств

Гринь С.А., член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, директор института

Еремец В.И., доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе

Самуйленко А.Я., академик РАН, доктор ветеринарных наук, заместитель директора по бионанотехнологиям

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский технологический институт биологической промышленности" (ФГБНУ "ВНИТИБП") Минобрнауки, Московская обл., Щелковский р-н, п. Биокомбината, стр. 17., e-mail: vnitibp@mail.ru

Assessment of the impact of stabilizers on thermodynamic characteristics of a dry virus vaccine

Kovalskiy I.V., Skotnikova T.A., Neminushchaya L.A., Yeremets N.K., Gryn S.A., Yeremets V.I., Samuylenko A.Ya.

Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Scientific Research Technological Institute of Biological Industry" (VNITIBP) Ministry of Education, Schelkovo, e-mail: ook_vnitibp@mail.ru

Key words: virus vaccine, stabilizer, thermoinactivation, algorithm, mathematical model, thermodynamical coordinates.

Abstract. Using the StatPlus software package, an algorithm for quantitative evaluation of the stability of dry virus vaccine against Newcastle Disease La Sota strain and a mathematical model of the process of thermal inactivation of the virus were developed. The developed model was used to statistically substantiate the thermodynamic parameters of the vaccine depending on the type of stabilizer used.

Ключевые слова: вирусвакцина, стабилизатор, термоинактивация, алгоритм, математическая модель, термодинамические параметры.

Резюме. С применением ранее разработанных алгоритма количественной оценки стабильности сухой вирусвакцины против ньюкаслской болезни штамм Ла-Сота и математической модели процесса термоинактивации вируса показано, что константа скорости инактивации является количественной оценкой стабильности вакцины. Разработанную модель применили для статистического обоснования термодинамических параметров вакцины в зависимости от вида применяемого стабилизатора.

Введение

Выбор биологической модели обусловлен актуальностью проблемы борьбы с ньюкаслской болезнью (НБ). Спе-

Для цитирования / For citation

Оценка влияния стабилизаторов на термодинамические характеристики сухой вирусной вакцины / И.В. Ковальский [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2019. - № 5 - С. 14-16

Assessment of the impact of stabilizers on thermodynamic characteristics of a dry virus vaccine / I.V. Kovalskiy [et. al.] // Veterinaria i kormlenie. - 2019.- № 5 - P. 14-16

цифическая профилактика опасного зоонозного заболевания с помощью живых и инактивированных вакцин – важная составная часть контроля и борьбы с НБ. На современном этапе вирус ньюкаслской болезни является перспективной моделью для создания генно-инженерных вакцин, например, против гриппа птиц, против онкологических заболеваний человека. Поэтому исследования по оценке стабильности вируса НБ являются актуальными [1, 2, 3].

В настоящее время широко применяется сублимационное высушивание, успех которого во многом определяется введением в состав исходного материала эффективного стабилизатора [4]. Согласно современным представлениям о механизмах защитного действия стабилизаторов, эффективная защитная среда должна быть многофункциональной, сочетающей коллоидные и гидрофильные свойства. Избежать слепого метода "проб и ошибок" при разработке рецептуры стабилизатора можно путем применения математических методов планирования многофакторного эксперимента.

Новые подходы к расшифровке механизмов стабилизации дает использование современных перспективных методов исследования системы по некоторым характеристикам ее состояния. Термодинамические активационные параметры (изменение свободной энергии, энтропия и теплота активации) определяют с помощью кинетических исследований, подвижность воды в системе – с помощью спиновых меток, калориметрии, и других физических методов. Преимущество кинетического подхода к исследованию состояния сложных систем состоит в том, что рассматриваются не только начальное и конечное состояния системы, но и скорости протекающих в ней процессов [5]. Изучение кинетики инактивации вируса при различных температурах, расчет констант скоростей, исследование и анализ зависимости константы от температуры, основанный на положениях теории абсолютных скоростей реакций Эйринга, позволяет оценить изменения свободной энергии, энтропию и теплоты активации процессов инактивации вируса в зависимости от условий реакции.

Цель работы. Определить с применением программы StatPlus термодинамические характеристики состояния системы вирус – защитная среда (энтальпия, энтропия и свободная энергия системы) в зависимости от наличия и вида стабилизатора и дать статистическую оценку достоверности величин исследуемых показателей.

Методика

Для эксперимента использовали образцы 3-х экспериментальных серий (опытное производство ВНИТИБП) сухой вакцины, высушенных без стабилизатора и со стабилизаторами обезжиренное молоко (ОМ) и ГБЛФ (гидролизат белка, лактоза, стабилизированный/модифицированный фосфатный буфер). Для оценки стабильности вирусвакцины применяли лицензированный программный пакет StatPlus. Термодинамические характеристики определяли с использованием разработанной математической модели процесса термоинактивации вируса НБ [6,7].

Результаты и обсуждение

Одним из главных путей разрешения проблемы стабилизации вакцин является понимание механизмов процессов повреждения и защиты, которые протекают в такой сложной физико-химической системе, как вирус - стабилизатор. Использование стабилизатора приводит к значительному снижению скорости инактивации его инфекционной активности.

Для расшифровки этих механизмов необходимо определение основных термодинамических характеристик ее состояния – свободной энергии Гиббса, энтропии и энтальпии – ΔG , ΔS и ΔH , соответственно.

Термодинамические характеристики состояния системы вирус – защитная среда определяли исходя из того, что:

- снижение инфекционной активности вируса НБ в сухой вакцине при воздействии повышенных температур независимо от используемых защитных сред происходит линейно и описывается кинетическим уравнением первого порядка;
- зависимость константы скорости инактивации виру-

Рисунок 1 - Значения ΔS для различных стабилизаторов при температурах 20, 37, 55 и 70°C.

Рисунок 2 - Значения ΔG для различных стабилизаторов при температурах 20, 37, 55 и 70°C.

Figure 1 - ΔS Values for various stabilizers at temperatures of 20, 37, 55 and 70 °C.

Figure 2 - ΔG Values for various stabilizers at temperatures of 20, 37, 55 and 70 °C.

са НБ от температуры в координатах ($\ln K_T$ от $1/T$) является линейной и описывается уравнением Аррениуса, которое на основании общих положений теории скоростей Эйринга записано в виде (уравнения 1–4):

$$\ln K_T = \ln(k_B \times T/h) + \Delta S/R - \Delta H/RT \quad (1), \text{ тогда}$$

$$\Delta H = -a_1 \times R \times 10^3 \quad (2);$$

$$\Delta S = a_0 \times R - R \times \ln(k_B/h) - \ln T \quad (3);$$

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S \quad (4),$$

где K_T – константа скорости инактивации вируса при температуре T ;

T – температура (в °K); ΔS – энтропия, кал/(моль $\times$ градK); ΔH – энтальпия активации, ккал/моль; ΔG – свободная энергия активации, ккал/моль; $k_B = 1,38 \times 10^{-16}$ эрг/град $\times$ моль – постоянная Больцмана; $h = 6,63 \times 10^{-27}$ эрг $\times$ сек – постоянная Планка; $R = 1,986$ кал/град $\times$ моль – газовая постоянная.

Подставляя в уравнения (1 и 4) значения a_0 и a_1 , определяли ΔH , ΔS и ΔG . ΔH – показатель, не зависящий от температуры; ΔS и ΔG , зависящие от температуры, рассчитаны для каждой исследуемой T (см. рис. 1, 2).

Значения ΔH (термодинамического показателя, не зависящего от температуры) составили: без стабилизатора – 30,94 ккал/моль; для ОМ – 29,28 ккал/моль для ГБЛФ – 30,64 ккал/моль.

Для того, чтобы сделать заключения о том, значимы ли термодинамические характеристики системы в зависимости от состава стабилизатора и температуры, необходимо провести их статистическую оценку.

Исследования по статистической оценке термодинамических характеристик системы реализовывали в следующей последовательности:

1. По t -критерию осуществляли сравнение значений $\Delta H_{б/с}$, $\Delta H_{ОМ}$ и $\Delta H_{ГБЛФ}$ на значимость различий. Результаты анализа показали, что попарные различия между $\Delta H_{б/с}$ и $\Delta H_{ОМ}$, $\Delta H_{б/с}$ и $\Delta H_{ГБЛФ}$, $\Delta H_{ОМ}$ и $\Delta H_{ГБЛФ}$ не значимы между собой. В исследуемом интервале температур теплота инактивации одинакова для всех рассмотренных случаев (вирус, высушенный без стабилизатора; вирус, высушенный со средами ОМ и ГБЛФ). Это может свидетельствовать о том, что в рамках условий данного эксперимента не изменяется механизм инактивации вируса. Далее проводили анализ более тонких различий в характеристиках термодинамических состояний системы.

2. Для этого оценивали значимость различий характеристик энтропии (ΔS) и свободной энергии (ΔG) в зависимости от температуры (20, 37, 55, 70°C) и состава защитной среды (б/с, ОМ, ГБЛФ) методом однофакторного дисперсионного анализа в модификации Fisher LSD.

Результаты дисперсионного анализа различия значений ΔS и ΔG при различных температурах показали:

– в интервале температур (20 – 70) °C различия ΔS не значимы (т.е. эту характеристику можно получать при любой из температур данного интервала);

– в интервале температур (20 – 70) °C значимо различаются только значения ΔG_{20} и ΔG_{70} ;

Это, по нашему мнению, свидетельствует о том, что значения, полученные при температуре 20°C (и тем более при 4°C) могут применяться только в качестве экстраполируемых величин.

Результаты дисперсионного анализа различия значений ΔS и ΔG в зависимости от состава защитной среды (б/с, ОМ, ГБЛФ), показали:

– энтропийные факторы для каждого вида стабилизатора значимо отличаются друг от друга. Однако анализ значений статистики, свидетельствующих о силе критерия (т.е. чем выше значение статистики, тем более достоверны различия между анализируемыми данными), показывает, что пары " $\Delta S_{б/с} - \Delta S_{ОМ}$ " и " $\Delta S_{б/с} - \Delta S_{ГБЛФ}$ " достаточно близки между собой и почти в 10 раз больше значений для пары " $\Delta S_{ОМ} - \Delta S_{ГБЛФ}$ ". Это может говорить о том, что введение

стабилизатора существенно меняет состояние системы по энтропийному фактору, однако влияние на него природы данных стабилизаторов выражено гораздо меньше (в рамках применяемого метода);

– при оценке различий ΔG значимы только различия между значениями $\Delta G_{б/с}$ и $\Delta G_{ГБЛФ}$. Это свидетельствует о том, что свободная энергия системы статистически достоверно изменяется только при использовании защитной среды ГБЛФ.

Заключение

Таким образом, по результатам оценки сухой вакцины, как сложной физико-химической системы, с применением программы StatPlus определено влияние различных стабилизаторов на величину термодинамических кинетических параметров сухой вакцины против НБ.

Установлено, что введение стабилизатора в состав вакцины:

– увеличивает (одинаково для ОМ и ГБ) упорядоченность системы (энтропийный фактор ΔS), при одинаковых значениях теплоты активации (ΔH) и изменения свободной энергии (ΔG) в пределах точности используемого метода их определения;

– показано, что введение исследованных стабилизаторов в состав вакцины способствовало упорядочению системы, увеличению ее жесткости, стабильности к повышенным температурам;

– проведена статистическая оценка достоверности величин исследуемых показателей.

Литература

1. Spectrum of Newcastle disease virus stability in gradients of temperature and pH / S. Rani [et al.] // *Biologicals*. - 2014/ - Nov; 42(6). - P. 351-354. doi: 10.1016/j.biologicals.2014.08.006.
2. Tayeb, Shay. Thermal stability of matrix protein from Newcastle disease virus / Shay Tayeb [et al.] // *Int J Biol Macromol*. - 2013. - Oct; 61. - P. 390-5. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.07.019.
3. Wen, Guoyuan. Molecular basis for the thermostability of Newcastle disease virus / Guoyuan Wen [et al.] // *Sci Rep*. - 2016. - 6: 22492.
4. Скотникова Т.А. Теоретические предпосылки и методические подходы к определению стабильности иммунологических лекарственных средств для животных // *Ветеринария и кормление*. - 2009. - №3. - С. 12-13.
5. Скотникова, Т.А. Совершенствование технологии производства и способов применения вакцин против ньюкаслской болезни : Автореф. дис. ... докт. биол. наук. - Щелково, 2010. - 48с.
6. Перспективы использования программных средств статистической обработки данных в биотехнологических исследованиях / А.Я. Самуйленко [и др.] // *Вестник Российской сельскохозяйственной науки*. - 2016. - № 6. - С. 8-11.
7. Алгоритм количественной оценки стабильности вакцины против ньюкаслской болезни птиц с применением программного пакета STATPLUS / А.Я. Самуйленко [и др.] // *Российская сельскохозяйственная наука*. - 2018. - № 1. - С. 56-59.

References

1. Spectrum of Newcastle disease virus stability in gradients of temperature and pH / S. Rani [et al.] // *Biologicals*. - 2014/ - Nov; 42(6). - P. 351-354. doi: 10.1016/j.biologicals.2014.08.006.
2. Tayeb, Shay. Thermal stability of matrix protein from Newcastle disease virus / Shay Tayeb [et al.] // *Int J Biol Macromol*. - 2013. - Oct; 61. - P. 390-5. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.07.019.
3. Wen, Guoyuan. Molecular basis for the thermostability of Newcastle disease virus / Guoyuan Wen [et al.] // *Sci Rep*. - 2016. - 6: 22492.
4. Skotnikova T.A. Teoreticheskiye predposylki i metodicheskiye podkhody k opredeleniyu stabilnosti immunologicheskikh lekarstvennykh sredstv dlya zhivotnykh // *Veterinariya i kormleniye*. - 2009. - №3. - S. 12-13.
5. Skotnikova. T.A. Sovershenstvovaniye tekhnologii proizvodstva i sposobov primeneniya vaksins protiv nyukasl'skoy bolezni : Avtoref. dis. ... dokt. biol. nauk. - Shchelkovo. 2010. - 48s.
6. Perspektivy ispolzovaniya programmnykh sredstv statisticheskoy obrabotki dannykh v biotekhnologicheskikh issledovaniyakh / A.Ya. Samuylenko [i dr.] // *Vestnik Rossiyskoy selskokhozyaystvennoy nauki*. - 2016. - № 6. - S. 8-11.
7. Algoritm kolichestvennoy otsenki stabilnosti vaksiny protiv nyukasl'skoy bolezni ptits s primeneniye programmnogo paketa STATPLUS / A.Ya. Samuylenko [i dr.] // *Rossiyskaya selskokhozyaystvennaya nauka*. - 2018. - № 1. - S. 56-59.