

Казымова Илаха Вагиф кызы

**СТАНДАРТИЗАЦИЯ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ДИСПЕРСНОСТИ МЕТОДАМИ
СТАТИЧЕСКОГО И ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2023

Диссертационная работа выполнена на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

Научный руководитель:

Успенская Елена Валерьевна

доктор фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Сливкин Алексей Иванович

доктор фармацевтических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Фармацевтический факультет, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии

Мельникова Нина Борисовна

доктор химических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», химический факультет, профессор кафедры аналитической и медицинской химии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «25» мая 2023 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.021 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6

Электронная версия диссертации, автореферат и объявление о защите размещены на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ПДС 0300.021

кандидат химических наук, доцент

М.А. Морозова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Контроль размера частиц порошков, жидких лекарственных форм, аэрозолей имеет решающее значение в проявлении фармакологической активности лекарственных средств. Стандартные методы определения размера, такие как эксклюзионная хроматография, оптическая микроскопия, ситовой анализ требуют затрат большого количества образца и временных затрат [Moser M.R. et al., 2022]. Размер частиц является важным параметром, определяющим механизм интернализации клеток: частицы вводятся в клетки посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза ($d_{\text{частиц}} \leq 200$ нм), пиноцитоза или кавеоло-опосредованного эндоцитоза ($d_{\text{частиц}} \geq 200-500$ нм) [Petithory T. et al., 2021]. Измерение размеров малых молекул в настоящее время представляет большой интерес в связи с активным введением в фармацию наночастиц в виде липосомальных препаратов природного и синтетического происхождения, векторных систем и других средств направленного транспорта активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) [Bonaccorso A. et al., 2021]. Дисперсный анализ статического и динамического светорассеяния — это валидированные аналитические методы обратного определения размера частиц, не требующие калибровки, что является их преимуществом в сравнении со многими прямыми методами анализа. Несмотря на введение метода малоуглового рассеяния лазерного света (статическое светорассеяние, LALLS) в фармацевтический анализ и структуру фармакопей РФ, США и Евросоюза более 15 лет назад, его применение до сих пор не занимает лидирующих позиций в контроле дисперсности лекарственных средств, уступая прямым методам оптической микроскопии и ситового анализа. Текст общей монографии «Анализ размера частиц методом динамического светорассеяния» (DLS, фотонной корреляционной спектроскопии) для включения в фармакопею Евросоюза (*Ph. Eur*) находится на стадии гармонизации (по состоянию на 31 января 2022 г.) под контролем Европейского управления качества лекарственных средств и здравоохранения (EDQM <https://www.edqm.eu/en>). Поскольку проблема качества фармацевтических средств рассматривается как важнейшая составляющая качества жизни населения, то разработка подходов и методик анализа дисперсных систем методами статического и динамического рассеяния света позволит решить проблему стандартизации лекарственных средств различного происхождения – синтетических, природных и транспортных векторных.

Степень разработанности темы исследования. Существенный вклад в изучение проблемы стандартизации дисперсных лекарственных средств лазерными методами

внесли исследователи: *Сыроешкин А.В.2021, Плетенева Т.В.2018, Лесников Е.В.2011, Бункин Н.Ф.2020, Смирнов А.Н.2005, Гончарук В.В.2010*, а также исследовательские группы кафедры химической и биомолекулярной инженерии инженерной школы Тандон Нью-Йоркского университета (США), института молекулярной, клеточной и системной биологии Университета Глазго, работы которых в значительной мере способствовали изучению мицеллообразования, коэффициентов диффузии и профиля распределения размера частиц при изучении агрегации и гетерогенности.

Область исследований. Диссертационная работа соответствует формуле специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) и конкретно пунктам 3, 4 и 6 паспорта специальности:

Пункт 3 – Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Пункт 4 – Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Пункт 6 – Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

Объект и предмет исследования. В рамках диссертационного исследования изучали физико-химические и биологические свойства (растворение, *n*КИЭ, способность поглощать, пропускать, рассеивать и испускать ЭМИ, взаимодействие с клеточным биосенсором) таких объектов, как противомикробные фторхинолоны, компоненты низкоминерализованных пелоидов и иммунобиологические ЛП для фармакокинетических исследований, разработки и валидации новых методов контроля их качества всех этапах их обращения.

Цель работы заключается в разработке новых подходов к стандартизации и контролю дисперсности лекарственных средств, биологически активных веществ и тестовых препаратов различной природы и фармакологического применения методами статического и динамического рассеяния лазерного света.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Разработать и валидировать аналитическую методику определения скорости растворения синтетических антибактериальных ЛС на примере моксифлоксацина гидрохлорида $Mxf \cdot HCl$ методом статического рассеяния лазерного света (LALLS) для исследований *in vitro*.

2. Оценить возможность применения оригинального способа модификации свойств и растворения малорастворимых лекарственных веществ на основании исследования *нормального* кинетического изотопного эффекта (нКИЭ) по растворителю методом LALLS.

3. Разработать подходы к стандартизации, контролю качества и биологической активности дисперсных полиэлектролитных систем природного происхождения на примере компонентов низкоминерализованных пелоидов – гуминовых и фульвовых кислот, как перспективных лекарственных средств.

4. Обосновать необходимость применения метода динамического светорассеяния (DLS) в контроле дисперсности и коллоидной стабильности частиц м-РНК и ДНК-содержащих иммунобиологических лекарственных препаратов (ИБЛП) – вакцин для человека и животных на основании изучения их электрофоретической подвижности.

Научная новизна диссертационного исследования заключается в разработке практических, оригинальных подходов к стандартизации лекарственных средств разной степени дисперсности на основе методов статического и динамического рассеяния света. Ключевые результаты исследования, составляющие его научную новизну, состоят в:

1. апробации LALLS методики кинетической оценки растворения моксифлоксацина гидрохлорида $Mxf \cdot HCl$ в условиях повторяемости, внутрилабораторной воспроизводимости с определением линейности и аналитической области;

2. обосновании наблюдаемого нормального кинетического изотопного эффекта (нКИЭ) по растворителю при исследовании растворения $Mxf \cdot HCl$ в воде, обедненной по изотопу H_1^2 (D);

3. разработке подходов к контролю качества компонентов низкоминерализованных пелоидов – гуминовых и фульвовых кислот, продемонстрировавших противовирусную активность в отношении SARS-CoV-2;

4. проведении DLS-исследования дисперсных и электрокинетических свойств частиц в м-РНК и ДНК-содержащих вакцин с целью контроля нанообъектов и определения иммуногенности/реактогенности.

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в разработке шаблона, состоящего из новых положений и этапов контроля качества и стандартизации ЛС и БАВ разной природы; в выявлении эффекта в водных растворах, основанного на различиях в скорости растворения одного и того же вещества в зависимости от изотопии воды; в обосновании необходимости контроля наночастиц в ИБЛП с целью определения их иммуногенности/реактогенности, в также в внедрении методик в лабораторный практикум учебного процесса кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института ФГАОУ ВО «РУДН».

Методология и методы диссертационного исследования для решения поставленных задач включали инструментальные подходы, основанные на применении современного аналитического оборудования (DLS, LALLS, SEM) для экспериментального изучения строения, различных спектральных свойств, механизмов растворения, а также взаимодействия с клеточным биосенсором.

Положения, выносимые на защиту:

1. доказана пригодность аналитической методики определения скорости растворения $Mx_f \cdot HCl$ в воде для применения в качестве самостоятельного испытания на всех стадиях разработки и обращения ЛС;
2. продемонстрировано развитие $nKIЭ$ по растворителю в условиях обеднения по содержанию тяжелого изотопа H_1^2 , как способ модификации свойств малорастворимых ЛВ;
3. разработаны подходы контролю качества гуминовых веществ и фульвокислот, как представителей дисперсных полиэлектролитов природного происхождения, проявляющих анти-SARS-CoV-2 активность;
4. обоснована необходимость контроля размеров и коллоидной стабильности частиц в м-РНК и ДНК-содержащих ИМБЛП методом DLS.

Степень достоверности результатов исследования подтверждается валидированными методиками, используемым современным физико-химическим оборудованием, многочисленными повторами, обеспечивающими статистически достоверные данные таблиц и графиков, а также подтвержденными ссылками на литературные источники зарубежных и отечественных авторов.

Апробация результатов исследования по диссертации «Стандартизация и контроль качества лекарственных средств разной степени дисперсности методами статического и динамического рассеяния света» проведена на заседании кафедры фармацевтической и

токсикологической химии ФГАОУ ВО «РУДН» (протокол № 0300-35-04/03 от 27.10.2022). Основные результаты исследования отражены в 11 публикациях, среди которых 9 статей в журналах, индексируемых в международных базах цитирования (Scopus, WoS и CAS), 2 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК, а также в 6 тезисах докладов конференций: IX Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2019 г.); XXI Международном конгрессе " Здоровье и образование в XXI веке " (Москва, 2019 г); Третьей всероссийской конференции «Физика водных растворов» ИОФ им. А.М. Прохорова РАН (Москва, 2020 г); XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов” (Москва, 2021 г.); Четвертой всероссийской конференции «Физика водных растворов» ИОФ им. А.М. Прохорова РАН (Москва, 2021); Пятой всероссийской конференции «Физика водных растворов» ИОФ им. А.М. Прохорова РАН (Москва, 2022).

Структура и объем диссертации. Общий объем диссертации составляет 121 страниц машинописного текста, включая 28 рисунков, 19 таблиц, 162 ссылки на источники зарубежных и отечественных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования: субстанция моксифлоксацина гидрохлорида (Xi'an Henrikang Biotech Co., Ltd. Китай, серия MXI0615003); природный комплекс ГК низкоминерализованных пелоидов (ООО «Система-БиоТехнологии», РФ); экстракт фульвовых кислот (Terra Aquatica, France); двухвекторная м-РНК вакцина против SARS-CoV-2 (РФ) из рекомбинантных аденовирусных частиц (РАЧ) 26 серотипа, содержащих ген белка S вируса SARS-CoV-2 в количестве $1,0 \cdot 10^{11}$ частиц (вектор 1) и из РАЧ 5 серотипа, содержащих ген белка S вируса SARS-CoV-2 в том же количестве (вектор 2); тестовый образец VLP-вакцины, состоящей из рекомбинантных вирусоподобных частиц структурных белков S, M, N, E вируса SARS-CoV-2; ДНК-содержащие вакцины для животных; *Spirotox*-метод. Оборудование и методы: анализатор размера частиц MasterSizer 3600E (Malvern Instruments, UK); анализатор гидродинамического размера ZetaSizer (Malvern Instruments, UK); бинокулярный микроскоп «Альтами БИО 2»; сушильный шкаф BINDER FD (Germany); USB Digital-микроскоп LX200 (Levenhuk DTX 50, USA); сканирующий электронный микроскоп четвертого поколения Mira 3 (3 (Tescan,

Brno – Kohoutovice, Czech Republic); ПО *Origin Lab Corporation* для обработки результатов прямых измерений.

Результаты и обсуждение

1. Методика определения скорости растворения моксифлоксацина гидрохлорида

В настоящей работе продемонстрированы возможности лазерного дифракционного анализатора, основанного на регистрации индикатрисы рассеяния при взаимодействии электромагнитного излучения с частицами дисперсной фазы, оценивать скорость растворения лекарственных субстанций во времени. Задача – нетривиальная в рамках существующих фармакопейных тестов, определяющих растворимость лекарственной субстанции (термодинамический барьер) согласно визуальной, приблизительной процедуре [*Jesper Larsson, 2009*]. Оценка растворения во времени позволит предсказать ограничение биодоступности (кинетический барьер) лекарственного средства *in vivo*. Следовательно, валидация и введение в анализ методики количественной оценки (k , c^{-1}) растворения АФС представляет актуальную задачу современной фармацевтической химии. Применяя закономерности кинетики первого порядка в описании гетерогенных процессов [*Shaikh HK. et al. 2015*]:

$$V = -dC/dt = \kappa C \quad (1); \quad \kappa = 1/t \ln C_0/C \quad (2); \quad C = C_0 e^{-\kappa t} \quad (3),$$

нами проведены исследования скорости растворения на основании требований руководства FDA, а также ОФС.1.1.0012.15 по параметрам: повторяемость (*repeatability*), внутрилабораторная (*intermediate precision*), линейность (*linearity*), аналитическая область (*range*).

Повторяемость (прецизионность внутри методики) оценена в условиях проведения шести независимых результатов измерений лазерным измерителем дисперсности, в пределах короткого промежутка времени.

Прецизионность, как выражение близости результатов между сериями измерений, была оценена при проведении испытаний внутри лаборатории в разные дни на образцах одной серии Mxf HCl (таблица 1).

Таблица 1. Оценка аналитической методики (АМ)

Повторяемость (<i>repeatability</i>) АМ (n=6, P=0,95, f=5)					
\bar{k} , c^{-1}	SD	S ²	RSD, %	$(\bar{k} \pm \Delta k)$, c^{-1} t_p , f = 2,57	$\bar{\varepsilon}$, %
0,058	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$9,6 \cdot 10^{-6}$	5,3	$0,058 \pm 0,003$	–

Внутрилабораторная прецизионность (<i>precision</i>) АМ (n=18, P=0,95, f=17)					
0,057	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$	8,3	$0,057 \pm 0,002$	4,1

Линейность, как прямую зависимость регистрируемого сигнала лазерного затемнения от концентрации в пределах аналитической области подтверждали приготовлением отдельных (модельных) навесок Mxf HCl с использованием разработанной АМ. Для установления линейности готовили растворы Mxf HCl шести концентраций, исходя из данных по фармакопейной растворимости ФС в воде (0,01 г/мл) (рисунок 1).

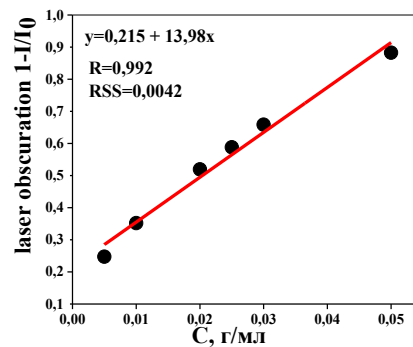


Рисунок 1-Зависимость лазерного затемнения от концентрации раствора Mxf HCl

Источник: составлено автором

Аналитическая область, как диапазон применения АМ, определена нами при анализе линейности и составила от $5 \cdot 10^{-3}$ г/мл до $5 \cdot 10^{-2}$ г/мл. Для подтверждения линейности и аналитической области представлены статистические показатели: коэффициент корреляции ($R > 0,99$), остаточная сумма квадратов отклонений ($RSS = 0,0042$), свободный член регрессии ($a = 0,215$), тангенс угла наклона линии регрессии ($b = 13,98$) (см. рисунок 1).

1.1. Кинетический изотопный эффект растворения

Нами предложена оригинальная методика, основанная на применении в качестве среды растворения воды с пониженным, по отношению к природному уровню, содержанием тяжелого изотопа водорода H_1^2 (deuterium depleted water, ddw, «легкая» вода), как способ повышения растворимости и растворения мало и очень растворимых в воде ЛВ. Вода ddw — признанный растворитель-адыювант в фармакокинетических/фармакодинамических исследованиях в области медицины и фармацевтической химии [Halenova T. et al. 2020]. На рисунке 2 представлены кинетические кривые, демонстрирующие различия в скорости снижения лазерного затемнения (LO) в водных растворах Mxf HCl с природным (около 145 ppm) и пониженным (4 ppm) содержанием H_1^2 .

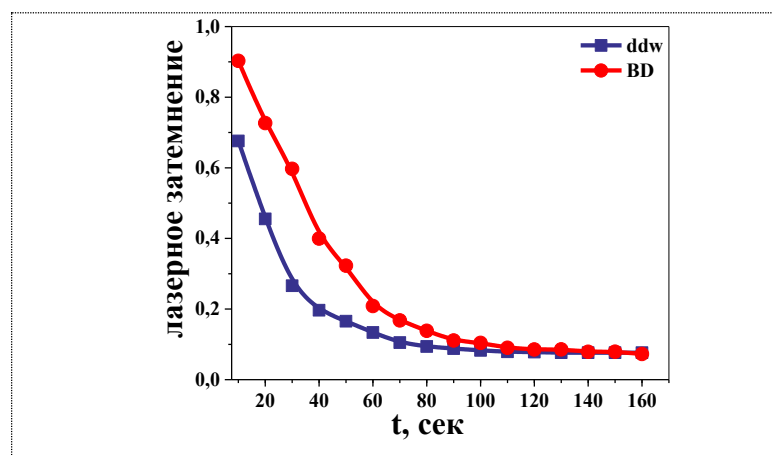


Рисунок 2 - Кинетические кривые процесса растворения $Mxf \cdot HCl$ в воде с различным изотопным составом по водороду ($n=6$, $P=0,95$)

Источник: составлено автором

Обе кинетические кривые демонстрируют экспоненциальное уменьшение во времени величины LO с линейным участком в начальный момент времени. Однако дифференциальный подход к анализу кинетических кривых по методу тангенсов показал, что стадия растворения $Mxf \cdot HCl$ в воде ddw протекает в 3,5 раза быстрее в сравнении со сверхчистой водой (BD) (таблица 2).

Таблица 2. Константы скорости и КИЭ в средах с различным изотопным составом по водороду ($n=6$, $P=0,95$)

Содержание H_1^2	$(k \pm SD) \cdot 10^2, c^1$	$\Delta k \cdot 10^2$ $t_{p,f} = 2,78, P=0,95 n=5, f=4$	кн/кD
145	1.20 ± 0.14	0.17	3.5
4	4.24 ± 0.2	0.25	

Это указывает на значительную роль соотношения дейтерий/протий (D/H) в растворении лекарственной субстанции с среде растворения [Kurzbach D. et al. 2020]. Концепция растворения субстанции в воде (с вариациями D/H), включающего прохождение стадии образования переходного/активированного комплекса (АК), представлена на рисунке 3:

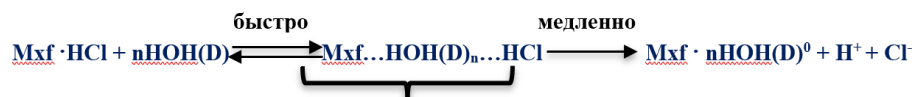


Рисунок 3 - Схема растворения $Mxf \cdot HCl$ в воде с вариациями H_1^2

Источник: составлено автором

Известно, что снижение концентрации H_1^2 приводит к изменению физико-химических

свойства воды, что свидетельствует об "управляющей" функции «тяжелых» HOD и DOD молекул воды [Yves M. et al. 2007]. Особенности свойств воды с вариациями D/H может приводить к изменению длин и энергии связей между атомами вещества и растворителя, валентных углов и эффективных зарядов, поляризации, гидратации и, следовательно, энергии, необходимой для разрушения связи R—H и R—D на лимитирующей стадии реакции. Согласно полученным результатам, при обеднении воды H_1^2 развивается *нормальный* кинетический изотопный эффект (нКИЭ) при ($k_H/k_D > 1$). Следовательно, модификация растворителя стабильными изотопами водорода выступает в качестве средства управления свойствами образующихся растворов. регрессии ($b=13,98$) (см. рисунок 3).

2. Стандартизации и контроль качества дисперсных систем природного происхождения

Группа гумусовых веществ (ГВ) - основных действующих компонентов низкоминерализованных пелоидов (НП) - сложные, гетерогенные, полидисперсные системы (ПС). Молекулы ГВ могут связываться друг с другом, образуя разветвленную супрамолекулярную структуру в зависимости от рН, ионной силы и минерального состава раствора. Структура ГВ, как полифункциональных соединений, не имеет постоянного химического состава по причине стохастической природы процессов гумификации, их фракционируют на гуминовые (ГК) и фульвокислоты (ФК) на основании различной растворимости в воде [Zanin, L. et al. 2019]. В литературе имеются многочисленные данные о проявлении ГВ биологически активных (антибактериальных, противовирусных) свойств [Melnikova, N. et al. 2017].

2.1. Оптимизация методики определения потери в массе при высушивании

Содержание сухого вещества дает более удобное представление о дисперсном составе анализируемого материала. Потерю в массе при высушивании (%) в экстрактах ГВ и ФК рассчитывали в соответствии расчетной формулой:

$$w = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где m_1 – масса бюкса, доведённого до постоянного веса (г); m_2 – масса бюкса с испытуемым образцом до сушки (г); m_3 – масса бюкса с испытуемым образцом после сушки (г).

В результате проведенных испытаний потеря в массе жидких экстрактов за счет воды и летучих веществ составила 92,63% и 99,66%, содержание сухого остатка – $7,34 \cdot 10^{-2}$ г/мл и $3,36 \cdot 10^{-3}$ г/мл для экстрактов ГВ и ФК, соответственно.

2.2. Морфология частиц ГК и ФК

2.2.1. Микроскопические методы. Поскольку размер кристаллов твердого вещества, а также их форма и пространственная организация являются индивидуальными характеристиками образца, нами проведены исследования морфологии и гранулометрического анализа частиц в остатке после высушивания методами оптической, сканирующей электронной (СЭМ), а также *Digital*-микроскопии (рисунок 4).

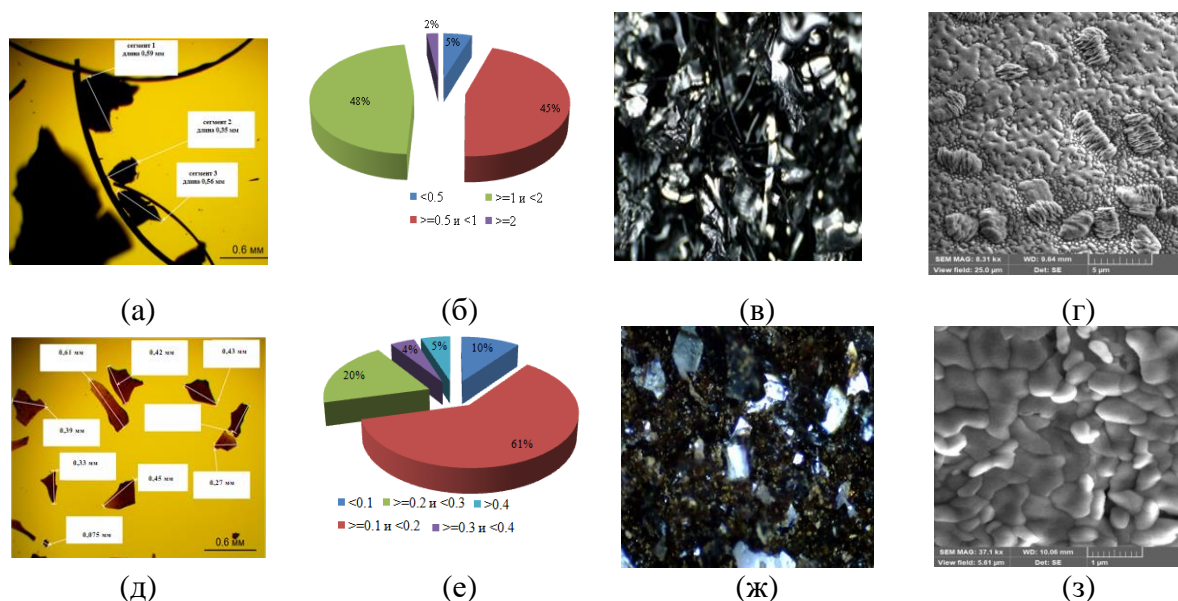


Рисунок 4-Морфология, гранулометрическое распределение и исследования СЭМ частиц в высушенных образцах: (а), (б), (в), (г) - ГК; (д), (е), (ж), (з) – ФК

Источник: составлено автором

В образце ГК присутствует несколько минеральных фаз с разной формой частиц и размерами от 0,5 до 2 мм (кристаллы, осколочные частицы, сложные агрегаты, протяженные линейные структуры), большая доля которых 48% и 45%. Образец сухого остатка ФК (см. рис. 4 д и е), представляет собой высокодисперсный, однородный микроагрегатный состав, большая доля фракции (61%) которого не превышает 0,2 мм. При просмотре в объективе бинокля частицы ФК – однородные, окатанные обломки минералов. Анализ и *Digital* визуализация рельефа поверхности образцов ГК и ФК (см. рис. 4 в и ж) демонстрируют различия качественных признаков микроструктуры их поверхности, характеризующейся удлинёнными телами и скоплением дискретных минеральных фрагментов. Структура поверхности твердых частиц по данным метода СЭМ неоднородна и представлена субмикронными частицами, инкапсулированными во внутренние полости молекул полиэлектролитов ГК и ФК.

2.2.2. Оценка размера, ζ -потенциала частиц ГК и ФК по данным DLS-метода. Для

характеристики дисперсных систем природного происхождения использовались: функция ($I, \%—d, \text{нм}$), ширина (индекс PDI) распределения частиц по размерам, а также ζ -потенциал в качестве меры электростатического взаимодействия. Исследование проводилось с растворами ГВ различных разведений (рисунок 5, таблица 3).

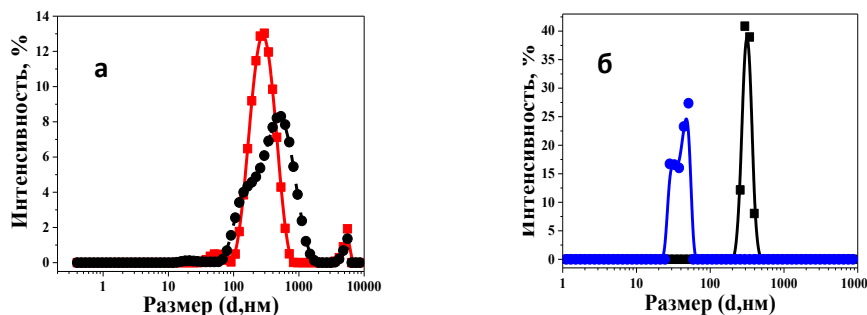


Рисунок 5 - Интенсивность (%) рассеянного лазерного света в дисперсиях природного происхождения: ГК (а): красный $-7,3 \cdot 10^{-5} \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$; черный $-3,7 \cdot 10^{-4} \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$; ФК (б): синий $-3,4 \cdot 10^{-5} \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$; черный $-3,4 \cdot 10^{-4} \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$

Источник: составлено автором

Таблица 3. DLS-Характеристика частиц в образцах ГК и ФК природного происхождения

Образец	Размер \pm SD, нм	PDI \pm SD	$\bar{\zeta} \pm$ SD, mV	C, г мл^{-1}
ГК	348 ± 230	$0,39 \pm 0,01$	-36 ± 8	$3,7 \cdot 10^{-4}$
	304 ± 117	$0,38 \pm 0,07$	-31 ± 12	$7,3 \cdot 10^{-5}$
ФК	280 ± 19	$0,4 \pm 0,07$	-34 ± 11	$3,4 \cdot 10^{-4}$
	50 ± 3	$1,00 \pm 0$	-41 ± 8	$3,4 \cdot 10^{-5}$

Видно, что разбавление растворов водой 1:10 демонстрирует сдвиг максимума распределения на кривой $I, \%—d, \text{нм}$ влево, что особенно заметно на примере ФК. Распределения по размерам в субмикронной области в растворах ГВ унимодальные, широкие и полидисперсные, исходя из значения индекса полидисперсности: значения PDI варьируются от 0,38 до 1,00 и зависят как от природы ДС ПП, так и от концентрации растворов.

Согласно теории Дерягина-Ландау-Верви-Овербека, толщина диффузного двойного электрического слоя и поверхностный потенциал частиц являются наиболее важными факторами стабильности коллоидов [Gao X. et al. 2022]. При разбавлении раствора ФК наблюдается не только уменьшение диаметра частиц, но и увеличение абсолютного значения отрицательного ζ -потенциала. Это может быть связано с увеличением толщины двойного электрического слоя в результате уменьшения концентрации противоионов в диффузионном слое. Знание ζ -потенциала частиц в формуле может быть использовано для

логического выбора химического состава рецептуры для выбора наиболее подходящих материалов для обеспечения стабильности и увеличения срока годности.

2.3. Определение элементного состава в остатке после высушивания ГК и ФК

На рисунке 6 представлены результаты РФА содержания элементов в сухом остатке образцов ГК и ФК в виде зависимостей интенсивности флуоресценции и концентрации элемента от химического состава образцов.

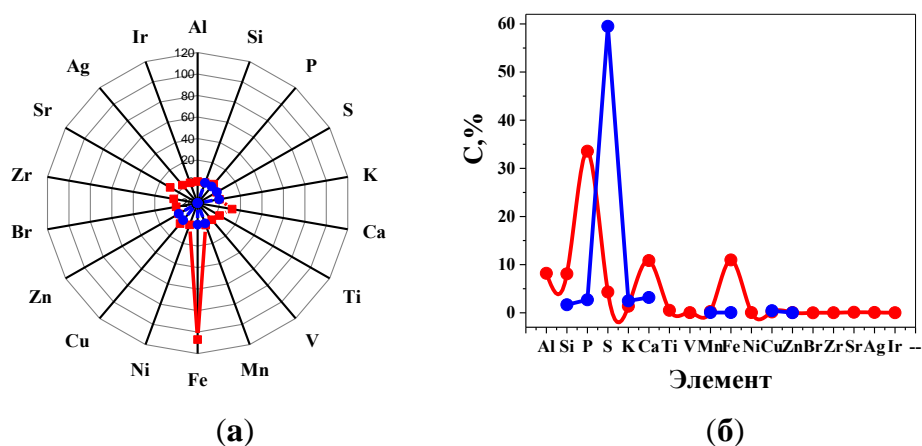


Рисунок 6 - РФА определение элементов в анализе ГК (красный) и ФК (синий): (а) зависимость интенсивности флуоресценции от химического состава и (б) зависимость концентрации определяемого элемента

Источник: составлено автором

В исследуемых образцах ГВ (сухой остаток) обнаружены атомы элементов Si, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn. Обращает внимание высокая интенсивность сигнала рентгеновской флуоресценции для атомов Fe в образце ГК. Это может быть связано со способностью ГК к образованию хелатов с железом, что способствует питанию растений, а также созданию запаса данного элемента [Zanin, L. et al. 2019]. По данным РФА ФК кислоты менее склонны к образованию нерастворимых комплексов с металлами (см. рис. 6 (синий)).

2.4. Спектральные методы анализа

2.4.1. Идентификация ГК и ФК проводилась методом Фурье-ИК на основе анализа колебательных спектров (метод диска с KBr) образцов сухих остатков (рисунок 7).

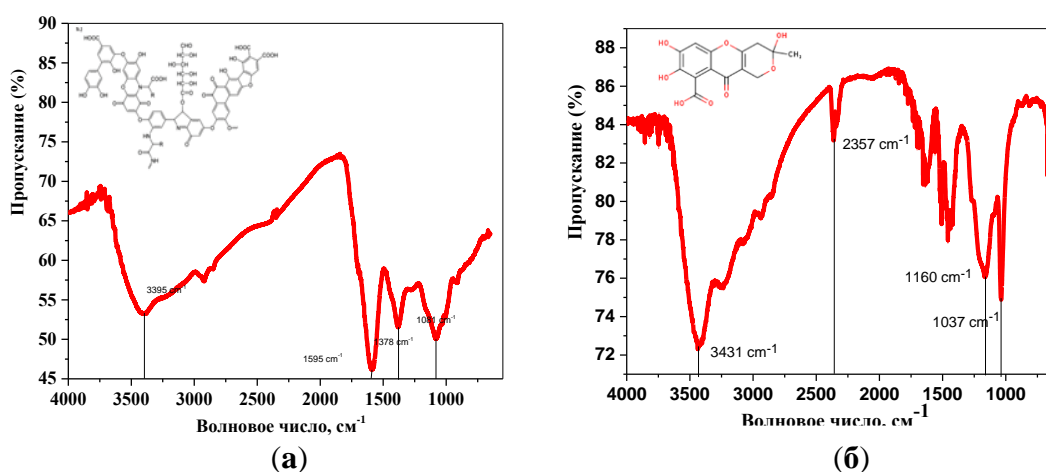
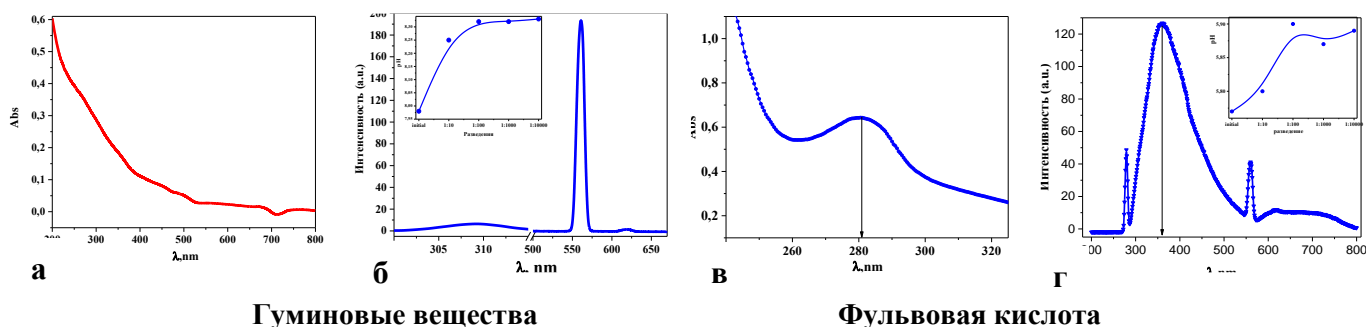


Рисунок 7 - ИК-спектры с Фурье-преобразованием ГВ в сухих остатках: (а) ГК; (б) ФК

Источник: составлено автором

Полученные спектры Фурье-ИКС образцов ГК и ФК характеризуются сходными частотами колебаний и формой полос пропускания для производных. Спектр ГК представлен несколькими характерными полосами при 3395, 1595, 1378 и 1081 cm^{-1} , обусловленные валентными колебаниями свободных и связанных гидроксильных групп (-ОН) и -С-О в спиртах, фенолах, а также первичных, вторичных аминогрупп и иминов, С-Н связей углеводородного скелета. При сравнительном анализе спектров пропускания исследуемых соединений установлено, что для образца ГК характерны более высокие значения коэффициентов экстинкции, в результате чего заметно снижается процент светопропускания, что, вероятно, обусловлено нестехиометрическим составом и нерегулярной гетерогенной структурой с многочисленными функциональными группами.

2.4.2. Идентификация ГК и ФК УФ-СФ и СПФЛ методами. Хорошо известно, что соединения, представляющие собой концентрированные ядра бензола с окисленным пираном (кумарины, хромоны), являются флуорофорами или хромофорами из-за их высокой фотостабильности, большого стока сдвига и интенсивной флуоресценции с высоким квантовым выходом [Tang, Y. et al. 2019]. Спектры флуоресценции ГК и ФК были записаны на длине волны их возбуждения (рисунок 8).



Гуминовые вещества

Фульвовая кислота

Рисунок 8 - Спектры УФ-СФ (а,в) и СПФЛ (б,г) водных разведений ГК ($7,3 \cdot 10^{-12}\%$) и водного раствора образца ФК ($3,4 \cdot 10^{-3}\%$). На вставках - рН растворов-разведений

Источник: составлено автором

Истинный спектр флуоресценции ФК был зарегистрирован при длине волны 360 нм; $\lambda_{\text{возбуждения}} = 280 \pm 2$ нм. Поскольку раствор ГК продемонстрировал прозрачность в ближнем ультрафиолетовом диапазоне и увеличенное поглощение в дальнем ультрафиолетовом диапазоне при отсутствии обнаруживаемых аналитических длин волн, удобно характеризовать их структуру по спектрам флуоресценции. Фотофизические свойства молекул, содержащих многочисленные замкнутые циклы, делокализованные π -связи претерпели некоторые изменения; интенсивность флуоресценции ГК появилась в области 620 нм и значительно увеличилась в области 560 нм.

2.4.3. Spirotox-тест с использованием образцов ГК и ФК продемонстрировали отсутствие токсичности и значительную продолжительность жизни клеточного биосенсора в данных средах. Мы предполагаем, что причина наблюдаемого явления заключается в уникальной способности гуминизированных веществ воспринимать производимые воздействия без изменения свойств неопределенно длительный период, проявляя эффект ассимиляционного потенциала (AP) [Palumbo, G. et al. 2018]. Для оценки биологической активности ГВ нами применен подход, заключающийся в добавлении ксенобиотика (Mxf HCl) к среде исследования с целью изучения снижения токсического эффекта. Обнаружено, что лиганд-индуцированные клеточные переходы линеаризованы в координатах Аррениуса [Goncharuk V.V. et al. 2017]. В полулогарифмических координатах тангенс наклона прямой $\ln(1/t_L) = f(1/T)$ к оси абсцисс равен E_a/R (табл. 4).

Таблица 4. $^{obs}E_a$ процесса гибели *S. ambigua* в водном и ГК растворах Mxf HCl

Образец	$^{obs}E_a \pm SD, \text{кДж/моль}$
0,094% водный р-р Mxf HCl	157 \pm 2,5
0,160 % Раствор ГК Mxf HCl	196 \pm 7

Наибольшее значение $^{obs}E_a$, а также увеличение t_L *Sp. ambigua* примерно в 1,25 раза при той же температуре для комбинированного раствора ГК+Mxf•HCl по сравнению с водным раствором Mxf•HCl, указывает на способность ГВ снижать токсичность.

3. DLS-исследования вирусоподобных (VLP) частиц, адьювантов (векторов), инактивированных микробных частиц в ИБЛП для человека и животных

Современные тенденции в разработке иммунобиологических лекарственных препаратов (ИБЛП, вакцин) предполагают введение в их состав наноматериалов— адьювантов, усиливающих их иммуногенность (липосомы, полимерные микрочастицы, наночастицы, вирусоподобные частицы и иммуностимулирующие комплексы) [Bonam S. R. et al. 2017]. Известно, что факторы нанотоксичности, связанные со значительной удельной площадью их поверхностью (отношением площади частиц к размерам), обуславливают высокую адсорбционную и проникающую активность наноадьювантов. Однако в существующей ОФС.1.7.1.0004.15 «Вакцины и анатоксисны» нет указаний на нормирование в ИБЛП наночастиц. Поскольку содержание наноадьювантов или векторов мРНК в ИБЛП определяет соотношение иммуногенности/реактогенности вакцины, актуально исследование на содержание (размер и распределение) и коллоидную стабильность ($\bar{\xi}$ потенциал) наночастиц с целью стандартизации ИБЛП.

3.1.1. VLP-вакцина против SARS-CoV-2 (производство РФ). ИБЛП на основе вирусоподобных (*virus-like particles*, VLP) частиц – принципиально новая стратегия создания (дизайна) иммуногена на основе включения специфических гликопротеинов вируса в вирусоподобные частицы. Однако синтезированный пептид, корректно представляющий главную антигенную детерминанту патогена, не проявляет иммуногенных свойств из-за малого размера (<10 нм) и подверженности протеолитической деградации. Решением является экспонирование на поверхность частиц антигенные детерминанты патогена. Частицы VLP состоят из мономеров основных структурных белков, имитирующих конформационную структуру эпитопов, с целью увеличения иммуногенности. Многократное ‘повторение’ антигенной детерминанты на поверхности VLP облегчает фиксацию комплемента и кластеризацию рецепторов В-лимфоцитов для активации иммунного ответа. Сходство с вирусами позволяет VLP проникать в лимфу, а также эффективно поглощаться антигенпрезентирующими клетками.

На рисунке 9 представлены дисперсные характеристики тестового образца VLP-вакцины, состоящей из рекомбинантных вирусоподобных частиц структурных белков *S*, *M*, *N*, *E* вируса SARS-CoV-2, синтезированных в бакуловирусной системе экспрессии.

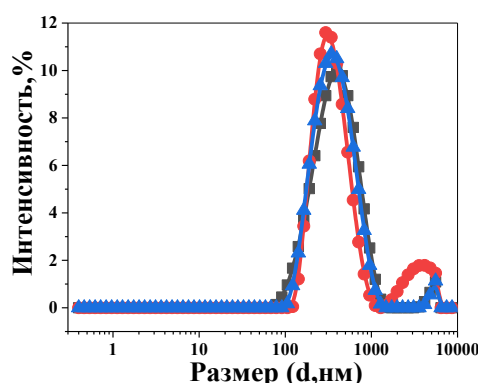


Рисунок 9 – Интенсивность (%) рассеянного лазерного света в тестовом образце VLP-вакцины против SARS-CoV-2 производства РФ (n=3)

Источник: составлено автором

Результаты метода динамического рассеяния света позволили определить гидродинамический размер вирусоподобной частицы ($d=349$ нм), состоящей из мономеров основных белков SARS-CoV-2, а также индекс полидисперсности ($PDI=0,26$) и $\bar{\xi}$ -потенциал (-69 mV). Полученные данные позволяют характеризовать тестовую VLP-вакцину, как стабильный, монодисперсный образец с размерами частиц, превышающими нанодиапазон и, предположительно, исключая эффект токсичности, с этим связанный.

3.1.2. Инактивированные ИБЛП для животных характеризуются, как правило, бимодальным распределением частиц по размеру в нано- (около 100 нм) и субмикронной (около 1 мкм) диапазонах. Измеренный индекс PDI («неоднородности») демонстрирует стабильность значений - от 0,6 до 0,8 и характеризует полидисперсность образцов вакцин, следовательно, их природу (таблица 5).

Таблица 5. Устойчивость частиц в дисперсиях ДНК-вакцин по данным метода DLS

Образец	Размер, нм	PDI \pm SD	$\bar{\xi} \pm$ SD, mV
Нобивак	d1=97; d2=1035	0,68 \pm 0,1	-10 \pm 0,4
Нобивак Лепто	d1=106; d2=712	0,65 \pm 0,1	-17 \pm 0,7
Рабифел	d1=87; d2=510	0,80 \pm 0,1	-25 \pm 0,47

Результаты исследований природы и устойчивости ИБЛП в профилактике и терапии вирусных и микробных заболеваний человека и животных методом рассеяния света на флуктуациях неоднородности в жидких коллоидных системах позволяют уверенно рекомендовать возможность включения DLS в спецификацию для вакцин с целью их стандартизации и надежного контроля качества.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые подходы к стандартизации и контролю дисперсности фармацевтических объектов различного происхождения и назначения: синтетических ЛС, БАВ природного происхождения и иммунобиологических ЛП, основанные на получении и анализе результатов определения индикатрисы лазерного рассеяния на дисперсных неоднородных объектах микронного уровня (метод LALLS) и флуктуации интенсивности рассеянного лазерного света на частицах нанодиапазона (метод DLS).

2. Разработана аналитическая методика определения константы скорости растворения моксифлоксацина гидрохлорида $Mxf\ HCl$ в воде по данным LALLS метода: $k=0,058\pm 0,003\text{c}^{-1}$; доказана прецизионность разработанной методики в условиях повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости (при $P=95\%$); определена линейность и аналитическая область. Достоверности полученных результатов и пригодности АМ по оценена по параметрам: коэффициент вариации $RSD<10\%$, относительная ошибка среднего $\bar{\epsilon}=4\%$.

3. Исследовано явление *нормального* кинетического изотопного эффекта (КИЭ) по растворителю методом LALLS: $k_H/k_D=3,5$. Установление данного факта может служить в качестве основы для оригинального способа модификации солюбилизационных характеристик водных растворов малорастворимых лекарственных веществ.

4. Разработаны подходы к стандартизации и контролю качества полиэлектролитов природного происхождения (гуминовых веществ и фульвокислот), включающие: определение сухого остатка – $7,34\cdot 10^{-2}$ г/мл и $3,36\cdot 10^{-3}$ г/мл в образцах экстрактов ГВ и ФК соответственно; анализ морфологии, гранулометрического распределения и результатов сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) частиц в высушенных образцах; оценку размера, распределения по размерам и ζ -потенциала частиц ГК и ФК по данным метода DLS; определение элементного состава в остатке после высушивания ГК и ФК, а также качественный анализ методами ИК-Фурье, УФ-СФ и спектрофлуориметрии.

5. Обоснована необходимость применения DLS-метода в контроле дисперсности и электрокинетической стабильности м-РНК и ДНК-содержащих вакцин для человека и животных. Нами показано, что профилактическая «химерная» м-РНК вакцина против SARS-CoV-2 у человека (производство РФ) представляет собой нановакцину с размерами частиц вектора-аденовируса **100 нм (вектор 1) и 140 нм (вектор 2)**. Анализ тестового образца профилактической вакцины с вирусоподобными частицами содержит устойчивые

($\bar{\xi} = -69 \text{ mV}$), монодисперсные частицы (PDI=0,26) с гидродинамическим размером **349 нм**. Данный факт может, предположительно, определять преимущество VLP-вакцины в условиях развития иммуногенности/реактогенности. ИБЛП для животных представляют собой ДНК-вакцины с микронными размерами устойчивых инактивированных микробных частиц.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АК активированный комплекс	ПС полидисперсные системы
АМ аналитическая методика	ФК фульвокислоты
АР ассимиляционный потенциал	СЭМ сканирующая электронная микроскопия
АФС активная фармацевтическая субстанция	РФА рентгенофлуоресцентный анализ
ДС ПП дисперсные системы природного происхождения	Фурье-ИКС инфракрасная спектроскопия
ОФС общая фармакопейная статья	УФ-СФ ультрафиолетовая спектрофотометрия
ФС фармацевтическая субстанция	СПФЛ спектрофлуориметрия
ЛВ лекарственное вещество	ИБЛП иммунобиологические ЛП
ЛО лазерное затемнение	РАЧ рекомбинантные аденовирусные частицы
ВД бидистиллированная вода	ЭМИ электромагнитное излучение
Mxf HCl моксифлоксацина г/хл	DLS динамическое светорассеяние
ЛД лазерная дифракция	VLP вирусоподобные частицы
nКИЭ n кинетический изотопный эффект	Digital-M цифровая микроскопия
ГК гуминовые кислоты	LALLS малоугловое рассеяние лазерного света
ГВ гумусовые вещества	НП низкоминерализованные пелоиды

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

Статьи в журналах, индексируемых в Scopus, WoS, CAS

1. Second-Order Scattering Quenching in Fluorescence Spectra of Natural Humates as a Tracer of Formation Stable Supramolecular System for the Delivery of Poorly Soluble Antiviral Drugs on the Example of Mangiferin and Favipiravir/ M.A. Morozova, T.V. Tumasov, **I.V. Kazimova**, T.V. Maximova, E.V. Uspenskaya, A.V. Syroeshkin// *Pharmaceutics* (Q1). 2022. 14, 767.<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040767>.
2. Uspenskaya, E. V., Zaborkina P. A., Ryndina, E. A., Pleteneva, T. V., Morozova, M. A., **Kazimova, I. V.**, & Syroeshkin, A. V. (2022). Application of mathematical modeling and physico-chemical analysis methods in the prediction of biological activity and quality control of gossypol derivatives. *International Journal of Applied Pharmaceutics* (Q3), 2022. 14(6). <https://doi.org/10.22159/ijap.2022v14i6.46052>
3. Uspenskaya EV, Syroeshkin AV, Pleteneva TV, **Kazimova IV**, Grebennikova TV, Fedyakina IT, Lebedeva VV, Latyshev OE, Eliseeva OV, Larichev VF, Garaev TM, Maximova TV, Morozova MA, Hanh PM. Nanodispersions of Polyelectrolytes Based on Humic Substances: Isolation, Physico-Chemical Characterization and Evaluation of Biological Activity.

- Pharmaceutics (Q1). 2021 Nov 18;13(11):1954 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111954>
4. Uspenskaya, E.V.; Pleteneva, T.V.; Grebennikova, T.V.; **Kazimova, I.V.**; Fedyakina, I.T.; Lebedeva, V.V.; Latyshev, O.E.; Eliseeva, O.V.; Larichev, V.F.; Garaev, T.M.; Maximova, T.V.; Morozova, M.A.; Hang, P.M.; Syroeshkin, A.V. A Comprehensive Biological and Physico-Chemical Characterization of Humic and Fulvic Acids Nanoparticles as a Perspective Drug. Preprints 2021, 2021060245 (doi: 10.20944/preprints202106.0245.v1).
 5. Evaluation of poorly soluble drugs' dissolution rate by laser scattering in different water isotopologues/ E.V. Uspenskaya, T.V Pleteneva, **I.V. Kazimova**, A.V Syroeshkin// Molecules (Q1). 2021. 26, 601. <https://doi.org/10.3390/molecules26030601>
 6. Assessment of biology activity of the peeling substances by the physicochemical approaches on the *Spirostomum ambiguum* cell model/ E.V. Uspenskaya, T. V. Pleteneva, Pham My Hang, **I. V. Kazimova**// International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (CAS). 2021. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2021v13i7.41927>
 7. Role of stable hydrogen isotope variations in water for drug dissolution managing/ E.V. Uspenskaya, T.V Pleteneva, A.V Syroeshkin, **I.V Kazimova**, T.E. Elizarova, A.I. Odnovorov// Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences (Q4).2020. <https://doi.org/10.2478/cipms-2020-0017>
 8. Determination of Active Pharmaceutical Substances Dissolution Rate by Laser Light Diffraction Method/ E.V. Uspenskaya, **I.V. Kazymova**, T.V. Pleteneva, T.E. Elizarova, A.V. Syroeshkin// Drug development & registration.(Q3). 2020. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-75-81>
 9. Development of an effective way to increase the biological activity of nicotinamide - a new strategy to protect against photoageing and skin neoplasia/ E.V. Uspenskaya, T. V. Pleteneva, A.V Syroeshkin, **I. V. Kazimova**, N. Zakharova// BIO Web Conf. Volume 22, 2020. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202201005>

Статьи в журналах, рецензируемых ВАК

10. **Казымова И.В.**, Татарина А.Л., Успенская Е.В. ЭФФЕКТ СНИЖЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ФТОРХИНОЛОНОВ В СРЕДАХ РАСТВОРЕНИЯ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ/ Медико-фармацевтический журнал Пульс. 2022. Т. 24. № 6. С. 132-136. Doi: 10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-6.
11. Активация измельчением как способ изменения биологической активности и физико-химических свойств лекарственных субстанций на примере никотинамида/ Е. В. Успенская, А.Я. Ревтова, **И. В. Казымова**, А.М. Колдина, Т. В. Плетенева, А. В. Сыроешкин, Фам Ми Хань//Пульс. – 2020. <http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2020-22-2-61-66>

Казымова Илаха Вагиф кызы

(Азербайджан)

**СТАНДАРТИЗАЦИЯ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ДИСПЕРСНОСТИ МЕТОДАМИ СТАТИЧЕСКОГО И
ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЙЯНИЯ СВЕТА**

Качество лекарственных средств рассматривается как важнейшая составляющая качества жизни населения, следовательно, разработка подходов и методик анализа дисперсных систем методами статического и динамического рассеяния света позволит решить проблему стандартизации ЛС различного происхождения – синтетических, природных и транспортных векторных. В диссертационном исследовании разработана и экспериментально доказана пригодность аналитической методики определения константы скорости растворения $M_{xf} \cdot HCl$ в воде по данным статического светорассеяния, которая может быть использована в качестве самостоятельного испытания свойств фармацевтических субстанций на всех стадиях разработки и обращения ЛС. Продемонстрировано развитие *n*КИЭ по растворителю, обедненному по содержанию тяжелого изотопа водорода методом LALLS, что может служить основой для оригинального способа модификации свойств водных растворов малорастворимых лекарственных веществ. Разработаны подходы к стандартизации и контролю качества гуминовых веществ и фульвокислот, как представителей дисперсных полиэлектролитов природного происхождения, включающие: определение сухого остатка; анализ морфологии, гранулометрического распределения и результатов СЭМ частиц; оценку размера и ζ -потенциала частиц ГК и ФК по данным метода DLS; РФА-анализ, а также качественный анализ методами ИК-Фурье, УФ-СФ и СПФМ и биотестирование Spirotox. Обоснована необходимость контроля размеров и коллоидной стабильности частиц в м-РНК и ДНК-содержащих ИМБЛП методом динамического светорассеяния для определения факторов иммуногенности/реактогенности вакцин для человека и животных.

Kazimova Ilaha

(Azerbaijan)

**STANDARDIZATION AND QUALITY CONTROL OF MEDICINES OF VARYING
DEGREES OF DISPERSION BY STATIC AND DYNAMIC LIGHT SCATTERING
METHODS**

Since the quality of medicines is considered as the most important component of the quality of life of the population, therefore, the development of approaches and methods of analysis of dispersed systems by static and dynamic light scattering methods will solve the problem of standardization of drugs of various origin – synthetic, natural and transport vector. In the dissertation research, the suitability of an analytical technique for determining the rate constant of dissolution of $Mxf \cdot HCl$ in water according to static light scattering data was developed and experimentally proved, which can be used as an independent test of the properties of pharmaceutical substances at all stages of drug development and circulation. The development of $nKIE$ for a solvent depleted in the content of a heavy hydrogen isotope by the LALLS method is demonstrated, which can serve as the basis for an original method for modifying the properties of aqueous solutions of poorly soluble medicinal substances. Approaches to standardization and quality control of humic substances and fulvic acids, as representatives of dispersed polyelectrolytes of natural origin, have been developed, including: determination of dry residue; analysis of morphology, granulometric distribution and results of SEM particles; assessment of the size and ζ -potential of HA and FA particles according to the DLS method; X-Ray analysis, as well as qualitative analysis by IR methods-Fourier, UV- spectroscopy, spectrofluorometry and *Spirotox* biotesting. The necessity of controlling the size and colloidal stability of particles in mRNA and DNA-containing immunobiological drugs by dynamic light scattering to determine the immunogenicity/reactogenicity factors of vaccines for humans and animals is substantiated.