

На правах рукописи

Петров Глеб Владимирович

Разработка метода контроля качества лекарственных препаратов, содержащих биологически активные наночастицы, на основе их собственного радиотеплового излучения

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института.

Научный руководитель:

Сыроешкин Антон Владимирович, профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО «РУДН».

Официальные оппоненты:

Сяткин Сергей Павлович, профессор, доктор биологических наук, профессор кафедры общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Гармонов Сергей Юрьевич, профессор, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет».

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Защита диссертации состоится «20» июня 2024 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.021 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, Москва, 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 «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ПДС 0300.021

кандидат химических наук, доцент

Левицкая Ольга Валерьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Наночастицы, как коллоидные образования с размером около 100 нм и менее, обладают крайне высокими значениями удельной площади поверхности, на порядки большими по сравнению с суспензиями. На поверхности наночастиц могут быть реализованы специфические физические процессы, например, плазмонный резонанс, квантовые точки (*Kumbhakar P. et al., 2014, Khlebtsov N.G. et al., 2010*), что приводит к изменению фармакокинетики и возможности управления площадью под кривой (area under the curve – AUC) (*Reddy Obireddy S. et al., 2023*). Активно разрабатываются наночастицы – носители активных фармацевтических ингредиентов – для их целенаправленной доставки с эффективным преодолением тканевых барьеров (*Qiao R. et al., 2022*). Современная фармацевтическая химия путем применения коллоидных адъювантов добилась стабилизации иммунобиологических лекарственных средств, состоящих как из олигомерных белков, так и нуклеиновых кислот (*Kogo T. et al., 2022, Черепушкин С.А. et al., 2021*). Применение адъювантов вносит известные трудности в классические методы стандартизации и контроля качества лекарственных средств с наночастицами, включая абсорбционную спектрометрию и методы лазерного светорассеяния (*Janvier S. et al., 2018*). Причем отделение адъюванта с сохранением нативности биологически активных наночастиц является зачастую трудно выполнимой задачей.

Мы предположили, что можно зарегистрировать собственное радиотепловое излучение от поляризованных биологически активных наночастиц при их активации. Действительно, оказалось, что наночастицы сложной формы (например, антитела, интерфероны (ИФН), вирусоподобные частицы (virus-like particles – VLP)) излучают в микроволновом диапазоне волн на порядок и более интенсивнее фона после их нагрева или облучения светом (*Syroeshkin A.V. et al., 2023*). Этот феномен радиотепловой эмиссии наночастиц использован в настоящей работе для контроля качества лекарственных средств. При выборе наночастиц мы сосредоточили основное внимание на препаратах, необходимых для противодействия новой коронавирусной инфекции и сопутствующим ей микс-инфекциям. Именно поэтому в перечне исследуемых наночастиц присутствуют моноклональные антитела (МАТ) к SARS-CoV-2, VLP к SARS-CoV-2 и ротавирусу, гуминово-фульвовые кислоты (ГФК) и препараты ИФН и антител к ним.

Степень разработанности темы исследования

Известно, что супрамолекулярные лекарственные средства (включая, биополимеры), помимо доказанного для низкомолекулярных веществ многоточечного кулоновского связывания, взаимодействуют с супрамолекулярной мишенью за счет дисперсионных (дерягинских) взаимодействий «поверхность-поверхность» (*Derjaguin B.V. et al., 2015*). Особенностью этих взаимодействий является кулоновская подстройка мерцающих диполей за счет взаимного

электромагнитного излучения поверхностей (Stöhr M. et al., 2021). Динамическое перераспределение поверхностных диполей при связывании супрамолекулярных лекарственных веществ и супрамолекулярных рецепторов является важным условием в механизме действия биологически активных наночастиц. На примере вируса SARS-CoV-2 было продемонстрировано, что при частоте 95 ГГц инфекционная активность вируса полностью подавляется (Kaczmarczyk L.S. et al., 2021). Данное исследование подтверждает значимость электромагнитного излучения, генерируемого мерцающими диполями, которые находятся на поверхности наночастиц. Оно также демонстрирует влияние излучения на лиганд-рецепторное взаимодействие. Эти данные мы приняли во внимание при разработке нового метода контроля качества лекарственных препаратов с наночастицами (в том числе, без вскрытия фабричной упаковки, поскольку регистрируется миллиметровое радиоизлучение), а также объединили их с достижениями нашего коллектива по контролю качества дисперсных лекарственных средств, выпустившего новую фармакопейную статью по применению лазерного светорассеяния (ОФС.1.2.1.0008.15 ГФ РФ XV) и опытом определения размеров наночастиц в мутных и непрозрачных средах (Kolyabina E.S. et al., 2023).

Цель работы:

Разработать экспресс-метод контроля качества лекарственных препаратов с наночастицами, в том числе без вскрытия упаковки.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие основные задачи:

1. Описать кинетику активации собственного радиотеплового излучения наночастиц лекарственных средств различных фармакологических групп и лечебно-профилактического питания.
2. Изучить влияние температуры и световой активации в видимом диапазоне на интенсивность радиотепловой эмиссии препаратов, содержащих наночастицы.
3. Оптимизировать условия измерения радиотеплового излучения наночастиц в части геометрии установки и кюветного отсека.
4. Провести валидацию нового метода детекции радиотеплового излучения по следующим характеристикам: специфичность, повторяемость, воспроизводимость, линейность, предел обнаружения.

Научная новизна работы. Впервые в мировой практике обнаружено собственное радиотепловое излучение в миллиметровом диапазоне биологически активных наночастиц неправильной формы. Впервые показано, что радиотепловая эмиссия зависит от природы наночастиц с линейным соотношением между интенсивностью излучения и концентрацией наночастиц. Впервые метод детектирования радиотеплового излучения был применен при

производстве вакцин и контроле качества лечебно-профилактического питания, в том числе в постановке без вскрытия первичной упаковки.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в обнаружении миллиметрового радиоизлучения от активированных наночастиц неправильной формы, что является творческим развитием дерягинской теории коллоидных систем и открывает возможность описания плазменных состояний поляризованных наночастиц. Практическая значимость для фармацевтической химии обусловлена возможностью контроля стабильности иммунобиологических препаратов без вскрытия упаковки. Для нового поколения белковых вакцин на основе VLP этот метод включен в стандарт предприятия СТП № 01897357–002–2023 для экспресс-контроля производственных процессов и условий хранения. Результаты диссертационной работы были апробированы и внедрены в практику при доклинических испытаниях вакцины на основе VLP по Государственному контракту № 8а-04/23–051, заключенному между РУДН и ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи».

Методология и методы исследования. Новый метод детекции собственного радиотеплового излучения наночастиц прошел двухлетние сличения и интеркалибрации с методом динамического светорассеяния (DLS) для белковых и гуминово-фульвовых наночастиц. Особенностью работы являются еженедельные, ежемесячные исследования на воспроизводимость в отношении лекарственных препаратов при 7-кратном исследовании на повторяемость. Специфичность метода была продемонстрирована на МАТ к различным эпитомам вируса SARS-CoV-2. Была использована линейка иммунобиологических методов для выделения характеристики антител, нового поколения белковых вакцин (VLP), а также для описания гуморального и клеточного иммунного ответа вакцинированных лабораторных животных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Наночастицы сложной формы (невыпуклые многогранники) при нагреве или облучении светом могут излучать в миллиметровом диапазоне с плотностью потока на два порядка выше фонового уровня.

2. Радиотепловое излучение биологически активных наночастиц может быть зарегистрировано в миллиметровом диапазоне широкополосным интегральным детектором, что открывает возможность вести контроль стабильности иммунобиологических лекарственных препаратов без вскрытия фабричной упаковки.

3. Старение биологически активных наночастиц (денатурация, коагуляция) приводит к потере радиоизлучающей способности в миллиметровом диапазоне.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность предложенного метода подтверждается следующими валидационными характеристиками. Специфичность активации радиотеплового излучения составила 99,5 % для антител с вируснейтрализующей активностью. Предел обнаружения собственной радиотепловой эмиссии наночастиц составил 0,008% для ГФК, при котором значения плотности потока излучения превышали фон в 7 раз. Линейная зависимость радиотеплового излучения нанопрепаратов от концентрации образца была оценена при помощи коэффициента Пирсона, который составил 0,990. Внутрिलाбораторная прецизионность и повторяемость характеризовались малой величиной относительного стандартного отклонения $\pm 5\%$.

Апробация результатов диссертационной работы. Основные результаты диссертационного исследования были представлены на следующих конференциях: 3-я Международная конференция «Modern Research in Biological, Pharmaceutical, Medical and Environmental Sciences» (Индия, 9 октября 2022 г., <https://iaraconference.com/>); 12-ая Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая Фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, Россия, 14 марта – 18 апреля 2022 г., <https://youngpharmacy.tilda.ws>); 3-я Международная конференция «Global issues in Multidisciplinary Academic Research» (Индия, 29 июля 2023 г., <https://icgimar.com/#IARA>); 8-ая Международная конференция СНГ МГО по гуминовым инновационным технологиям (НИТ-2023) «Гуминовые вещества и фармация» (Томск, Россия, 4 – 6 октября 2023 г., <https://conf.ssmu.ru/>). А также на научном семинаре кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН, на плановом совещании в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ РФ, на совещании с руководством Федерального государственного унитарного предприятия Специального конструкторского бюро Института радиотехники и электроники РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе научных статей в журналах, индексируемых в Scopus – 3, Chemical Abstracts – 1.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.4.2 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» по следующим областям исследования (п. 1 и 3):

п.1. Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ.

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

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в проведении научных экспериментов и получении экспериментальных данных, обработке и интерпретации полученных результатов, апробации и внедрении результатов исследования, а также совместной с другими авторами подготовке публикаций по выполненной работе.

Структура и объём диссертации. Полный объём диссертации составляет 200 страниц, в том числе 37 рисунков и 6 таблиц. Библиографический список содержит 241 наименование. Описание представляемого исследования включает введение, 3 главы, заключение, библиографический список и два приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты и методы исследования

1.1. Лекарственные препараты интерферона

В работе использовали следующие объекты:

1) Лекарственный препарат (ЛП) «Гриппферон» рег. № «Р N000089/01» от 05.01.11, классификация анатомо-терапевтическо-химическая (АТХ) L03AB05 ИФН – $\alpha 2b$, производителя ООО «Фирн М», Россия. Лекарственная форма – капли назальные. Содержание действующего вещества (ДВ) – 10000 МЕ/мл;

2) ЛП «Виферон» рег. № «Р N000017/01» от 06.10.10, классификация АТХ L03AB05 ИФН – $\alpha 2b$, производителя ООО «ФЕРОН», Россия. Лекарственная форма – суппозитории ректальные. Содержание ДВ – 3000000 МЕ в 1 супп.;

3) ЛП «Виферон» рег. № «Р N001142/01» от 06.11.07, классификация АТХ L03AB05 ИФН – $\alpha 2b$, производителя ООО «ФЕРОН», Россия. Лекарственная форма – мазь для наружного и местного применения. Содержание ДВ – 40000 МЕ/г;

4) ЛП «Тебериф» рег. № «ЛП-004137» от 13.02.17, классификация АТХ L03AB07 ИФН – $\beta 1a$, производителя АО «БИОКАД», Россия. Лекарственная форма – раствор для подкожного введения. Содержание ДВ – 44 мкг/доза (24 млн. МЕ/мл);

5) ЛП «Ингарон» рег. № «ЛС-001330» от 27.08.10, классификация АТХ L03AB03 ИФН – γ , производителя ООО «НПП ФАРМАКЛОН», Россия. Лекарственная форма – лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения. Содержание ДВ – 100000 МЕ в одном флаконе.

1.2. Иммунобиологические препараты

В данной диссертационной работе также исследовали иммунобиологические препараты – вакцины на основе VLP и MAT:

1) Вакцина на основе вирусоподобных частиц «Гам-VLP–мультивак» № РКИ 518 от 31.08.22, производителя ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ РФ (филиал «Медгамал»). Содержание ДВ – 120 мкг/доза;

2) Вакцины производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», основой которых стали вирусоподобные частицы к ротавирусным инфекциям «Гам-VLP-рота» № РКИ 293 от 31.05.23. Содержание ДВ – 120 мкг/доза, 80 мкг/доза, 60 мкг/доза, 30 мкг/доза;

3) МАТ к различным эпитомам вируса SARS-CoV-2 (домен RBD к клонам 1G2, 3D3, 2E7, 2E1);

4) Антитела к ИФН- γ (АТ_{ИФН- γ}) (как компонент зарегистрированного ЛС № ЛСР-005119/08 RU) были получены в составе порошкообразной субстанции со вспомогательным веществом.

1.3. Лечебно-профилактическое питание на основе комплекса гуминовых и фульвовых кислот

В работе использовали следующие объекты:

1) Гуминовый комплекс концентрат водный – лечебно-профилактическое питание, производства ООО «Система-БиоТехнологии», VimaVita, Россия;

2) Концентраты, содержащие лекарственное растительное сырье (ЛРС) – осина обыкновенная (*Populus tremula*), ива белая (*Salix alba*), толокнянка обыкновенная (*Uva Ursi*), родиола четырехнадрезная (*Rhodiola quadrifida*), первоцвет весенний (*Primula veris*), ольха серая (*Alnus incana*), календула лекарственная (*Calendula officinalis*), ортилия однобокая (*Orthilla secunda*), донник лекарственный (*Melilotus officinalis*);

3) Гуминовый комплекс концентрат водный «Прогумин», производства Faberlic, Россия;

4) Гуминовый комплекс концентрат водный «БИОДРОН», производства «NL International», Россия.

1.4. Остальные реактивы для исследований были получены от фирмы Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США) с классификацией ACS-grade, а именно: лиофилизированный препарат бычьего сывороточного альбумина, вода высокоомная 18,2 М Ω ×см (Milli-Q). Интактный порошок лактозы моногидрата SuperTab^R30GR фирмы DFE Pharm (Германия). Мицеллярная вода производства Faberlic (Россия) и BioDerma (Франция) использовались, как поверхностно активные вещества для исследования собственного радиотеплового излучения мицелл. Серебра протеинат был получен в составе готового ЛП (№ ЛП-005802). Латексные сферы (Invitrogen, США) также использовались для исследования собственного радиотеплового излучения сферических инертных наночастиц.

2. Методы исследования

2.1. Получение иммунобиологических препаратов и лечебно-профилактического питания

Получение моноклональных антител к RBD SARS-CoV-2 (рецептор-связывающий домен) было достигнуто способом, описанным ранее (Syroeshkin A.V. et al., 2023). VLP, имитирующие ротавирус А, были получены, как описано ранее (Черепушкин С.А. et al., 2021). VLP были получены путем самосборки из рекомбинантных белков, синтезированных в системе экспрессии бакуловируса, несущих гены четырех белков (S, E, М и N) SARS-CoV-2. Характеристики препарата ГФК были описаны ранее (Uspenskaya E.V. et al., 2019).

2.2. Динамическое рассеяние света

Для определения размерного спектра наночастиц и контроля их монодисперсности был использован спектрометр динамического рассеяния света ZetasizerNano ZSP (DLS) (MALVERN Instruments, Малверн, Великобритания). Принцип метода был описан нами ранее (Uspenskaya E.V. et al., 2019).

2.3. Детекция собственного радиотеплового излучения

В диссертационной работе применяется метод детекции собственного радиотеплового излучения лекарственных препаратов наноразмерной природы (Syroeshkin A.V. et al., 2023, Petrov G.V. et al., 2023). Плотность потока радиотеплового излучения в микроволновом диапазоне длин волн определяли с помощью прибора TES-92 (TES Electrical Electronic Corp., Тайбэй, Тайвань) с устройством, настроенным на анизотропное измерение вдоль оси Z. Результаты измерений регистрировались как максимальное среднее значение плотности потока в заданный момент времени с усреднением каждые 300 мс. Порошки или растворы нагревали с помощью твердотельного термостата с элементами Пельтье (Термо 24-15, Россия). Контроль за температурой образца осуществляется с помощью дистанционного лазерного инфракрасного термометра (Benetech GM320, Китай). Образцы активировались облучением светодиодами нового поколения, которые обеспечивают плотность мощности до 50 мВт/см² в области 412 нм при ширине спектральной линии до 2–4 нм (включая модель AA3528LVBS/D, тип C503B-BCN-CV0Z0461, CreeLED, Дарем, Северная Каролина, США). Все измерения проводились на приборе строго одинаковой геометрии, расположенном в помещении, где с помощью второго устройства TES-92 контролировали распределение микроволнового фонового излучения с шагом по высоте, ширине и длине 50 см. Фоновое излучение в экспериментальной комнате не превышало 1 мкВт/м² во всех точках мониторинга. Водные растворы наносили каплями по 100 мкл (если в подписи к рисунку не указано иное) на центр дна стерильных 10-сантиметровых чашек Петри. Капли наносились в осевом направлении вдоль оси Z на расстоянии 10 мм от измерительной головки прибора. Порошки насыпали в дозах по 30 г (если в подписи к рисунку не указано иное)

в стерильные чашки Петри диаметром 3 см с равномерной усадкой. Все измерения проводились не менее семи раз. TES-92, как измеритель напряженности электрического поля, был откалиброван и прошёл поверку производителем с относительной погрешностью в 1 дБ и имел низкую температурную погрешность (0,2 дБ в диапазоне от 0 °С до 50 °С).

2.4. Определение содержания белка

Референтное определение содержания белка проводили методом Лоури (ОФС.1.2.3.0012.15 ГФ РФ 15).

2.5 Метрологическое обеспечение

Стандартная статистическая обработка результатов в предположении модели нормального распределения, определение средних значений и среднеквадратичных стандартных отклонений, расчёт коэффициента корреляции с учетом доверительного интервала проводились с помощью ПО OriginPro Lab 21 (Origin Lab Corporation, США). Метод был валидирован согласно фармакопейной статье (ОФС.1.1.0012 ГФ РФ 15).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оптимизация условий измерения

В ходе разработки экспресс-метода контроля качества лекарственных препаратов и лечебно-профилактического питания, содержащих наночастицы, был исследован ряд факторов, влияющих на интенсивность детектируемого радиотеплового излучения, а именно влияние нагрева и светового облучения, зависимость собственной эмиссии препаратов от формы поверхности, экранирование радиосигнала, релаксационные характеристики препаратов. Было оптимизировано взаимное расположение широкополосного детектора, кюветного отсека, устройства нагрева и облучения светом: как для обеспечения прецизионности результатов, так и с точки зрения эргономики.

3.1.1. Активация собственного радиотеплового излучения наночастиц

Было обнаружено, что собственное радиотепловое излучение, генерируемое различными лекарственными формами препаратов, содержащих наночастицы, может быть усилено при воздействии нагрева или же облучения светом видимой области спектра ($\lambda=412$ нм). Было показано, что плотность мощности потока от ряда препаратов различной природы и размеров (Гам-VLP-мультивак, ИФН- $\alpha 2b$, АТ_{ИФН- γ} , гуминово-фульвовых наночастиц) превышала более чем на порядок фоновое радиотепловое излучение (Рисунок 1). В качестве контроля возможных ошибок на измерительной установке TES-92, использовались данные собственного радиотеплового излучения сферических латексных наночастиц (ЛСф) и полипептидных наночастиц бычьего сывороточного альбумина (БСА), радиотепловое излучение которых незначительно отличалось от окружающего фона.

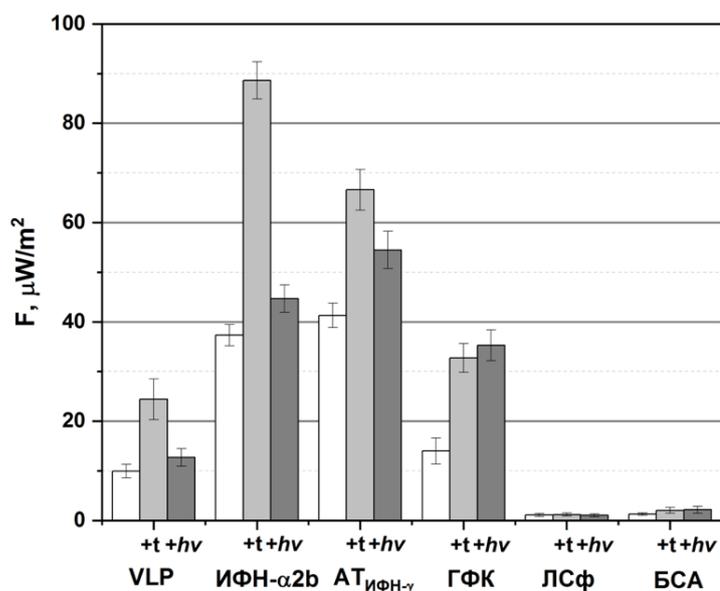


Рисунок 1. Плотность потока собственного радиотеплового излучения растворов наночастиц (Гам-VLP-мультивак, ИФН-α2b, ГФК, ЛСф 80 нм) и порошков, содержащих наночастицы (АТ_{ИФН-γ}, БСА). Показаны данные при 23⁰С – □, 37⁰С – ▨ (+t) и при облучении светом с длиной волны λ=412 нм – ▩ (+hv). *Источник: составлен автором.*

Активированная наночастица может быть рассмотрена как излучающая наноантенна, способная преобразовывать поглощаемую энергию в радиосигнал миллиметрового диапазона (Giannini V. et al 2011). Изучая влияние температурной активации для ГФК, на основе аррениусовской кинетики, была определена энергия активации исследуемого процесса (E_a), которая составила $10,3 \pm 0,2$ кДж/моль, что соизмеримо с кажущейся энергией активации диффузионных электрохимических процессов (8 – 20 кДж/моль) (Danilov F.I. et al., 2011). Этот результат указывает на быстрое образование дипольно-заряженных супрамолекулярных структур, имеющих диффузионные, а не кинетические ограничения (Jing M. et al., 2020).

3.1.2. Радиотепловое излучение наночастиц со сложной формой поверхности

Увеличение детектируемого радиотеплового излучения наночастицами может быть достигнуто за счет несферической формы. Это может обеспечить лучшую поляризуемость и возникновение долгоживущих диполей на расстоянии от нескольких нанометров до нескольких десятков нанометров. Полученные результаты по радиотепловой активности от сферических наночастиц и наночастиц сложной формы (Таблица 1) показали, что плотность потока радиотепловой эмиссии зависит не столько от размера наноизлучателей, сколько от их формы. Превышение фоновых значений наблюдается только в тех случаях, если форма наночастиц имеет сложный вид невыпуклого многогранника. Для препаратов ИФН-α2b и лекарственно-профилактического питания на основе ГФК было показано, что коагуляция частиц дисперсной

фазы, при ускоренном или естественном старении препарата приводит к потере радиоизлучающей способности.

Таблица 1. Зависимость радиотепловой эмиссии наночастиц от их формы.

Плотность потока радиотеплового излучения ($t=37^{\circ}\text{C}$), мкВт/м ²					
Сферические наночастицы			Наночастицы сложной формы		
Латексные сферы	20 нм	2,6±1,4	Моноклональные АТ к RBD SARS-CoV-2	7 нм	28±3
	40 нм	1,4±0,9			
	60 нм	2,6±0,6			
	80 нм	1,2±0,3			
	100 нм	1,6±0,4			
			Гам-VLP-мультивак	164 нм	24±4
			Гам-VLP-рота	95 нм	21±3
БСА	7 нм	2,1±0,6	ИФН- α 2b	4 нм	102±3
Мицеллярная вода, (Faberlic)	9 нм	0,4±0,1	Гуминово-фульвовые кислоты	200 нм	32±3
Мицеллярная вода, (BioDerma)	10 нм	0,5±0,2	Протеинат серебра	60 нм	38±2

Аликвота составляла 100 мкл водных растворов наночастиц. Концентрация наночастиц в водном растворе 10 мкг/мл. Содержание протеината серебра в парафине составляло 0,05% в пересчете на содержание Ag. Концентрация ГФК составляла 80 мг сухого остатка в 1 мл.

3.1.3. Оценка спектрального диапазона радиоизлучения наночастиц

Для проверки влияния экранирующих элементов на интенсивность детектируемого сигнала плотности потока радиотеплового излучения, в геометрию установки между детектором и образцом вносились пластины или пленки из различных материалов так, чтобы их площадь превышала в 10 раз площадь чашки Петри. В качестве излучателя был выбран препарат ИФН- α 2b. На рисунке 2 показана кинетика набора средних максимальных значений собственного радиотеплового излучения препарата с различными экранами.

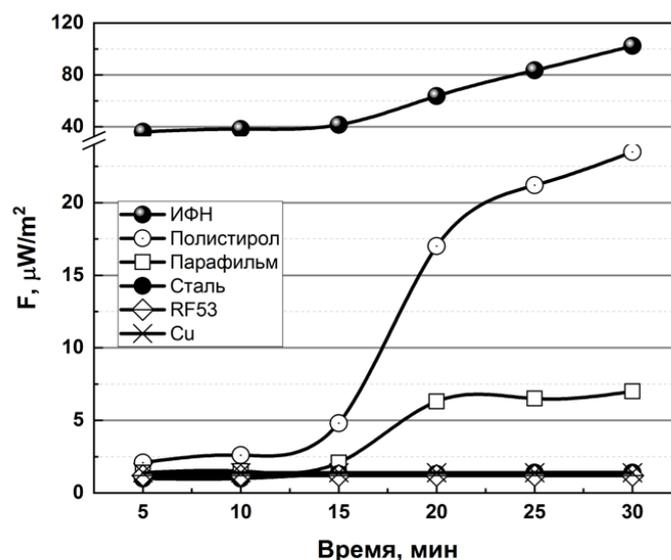


Рисунок 2. Экранирование собственного радиотеплового излучения препарата ИФН- $\alpha 2b$ экранами из полистирола (толщина – 1 мм), парафильма (1 мм), стали (5 мм), ткани с медно-никелевыми частицами «RF53» (1 слой), медной сетки («Cu», 0,2 мм, шаг ячейки – 1 мм).
 Источник: составлен автором.

Медный, медно-никелевый (радиоэкранирующая ткань RF53) и стальной экраны, как и следовало ожидать, полностью подавили сигнал на детекторе. Более чем на 90% сигнал был экранирован на пленке парафильма (преимущественно состоящего из восков). Почти 70% экранирования оказывает одномиллиметровый слой полистирола. Это указывает на то, что более двух третей мощности сигнала приходится на чрезвычайно высокую частоту (в диапазоне 30–300 ГГц) (Syroeshkin A.V. et al., 2023). Более того, судя по имеющимся данным о спектрах затухания миллиметровых волн в атмосфере и аэрозольной среде (Жижин В.В 2017; Kuchumov A.A. et al., 2017), можно прогнозировать, что основная мощность излучения растворов наночастиц сосредоточена в диапазоне частот свыше 75 ГГц (W-диапазон и более высокие частоты).

3.1.4. Релаксационные характеристики собственного радиотеплового излучения от раствора наночастиц

При активации наночастиц Гам-VLP-мультивак методом светового облучения, продемонстрирован переход из возбужденного состояния в исходное (Рисунок 3). Рост среднего максимального значения плотности радиотеплового излучения проходит за время не более 5 минут, а релаксация к исходному состоянию после деактивации источника светового облучения – не более 10 минут для раствора Гам-VLP-мультивак.

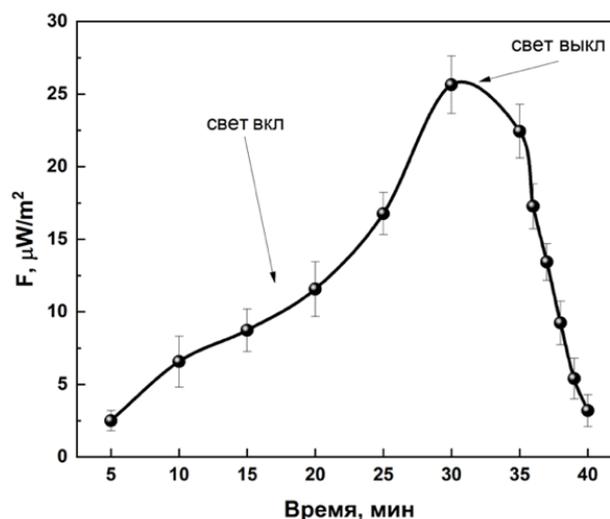


Рисунок 3. Кинетика возрастания и релаксации плотности потока собственного радиотеплового излучения вакцины Гам-VLP-мультивак. Стрелками указано включение и выключение освещения при 412 нм. *Источник: составлен автором.*

Полученные релаксационные характеристики подтверждают правильность выбранной методики – измерение в течение 30–40 минут, то есть в несколько раз больше характерных времен релаксации.

3.2. Элементы валидации метода детекции собственного радиотеплового излучения

В ходе разработки экспресс-метода контроля качества лекарственных препаратов и лечебно-профилактических продуктов питания немаловажной составляющей является валидация получаемых результатов по основным характеристикам: специфичность, предел обнаружения, линейность и прецизионность.

3.2.1. Специфичность радиотеплового излучения наночастиц

В первую очередь специфичность собственного радиотеплового излучения была продемонстрирована на примере растворов наночастиц моноклональных антител к различным эпитопам RBD-домена SARS-CoV-2 (Таблица 2). Выявлено, что именно вируснейтрализующие антитела (2E1) обладают максимальной излучающей способностью, которая не зависит от активирующих факторов. Другие МАТ дифференциально реагируют на нагрев или освещение. Соотношение плотности потока радиотеплового излучения (F_t – при нагреве, F_L – при освещении) можно использовать, как диагностический признак. Из таблицы 2 следует, что соотношение $K = F_t/F_L$ для каждого из образцов составляет (МАТ 2E1 – 1,0; 1G2 – 0,5; 2E7 – 2,7; 3D3 – 6,1).

Таблица 2. Специфичность активации радиотепловой эмиссии на примере моноклональных антител к различным эпитопам RBD вируса SARS-CoV-2.

Препарат	Плотность потока ЭМИ в радиодиапазоне по данным TES-92, %	
	нагрев до 37 °С	освещение, $\lambda=412$ нм
Контроль (фосфатно-солевой буфер)	5	3
2E1	99	100
1G2	42	92
2E7	73	27
3D3	55	9

Аликвота каждого препарата составляла 100 мкл. Концентрация антител – 10 мкг/мл. 100% плотности потока ЭМИ соответствует 28 ± 3 мкВт/м² для антител 2E1 (без освещения, $T = 23$ °С) при фоне (контроль, $T = 23$ °С) $1,3 \pm 0,4$ мкВт/м².

На примере препаратов ИФН- $\alpha 2b$ и ИФН- γ («Ингарон») продемонстрирована возможность использования метода для детектирования радиотеплового излучения в разных лекарственных формах. Показано, что максимальное радиотепловое излучение характерно для жидких лекарственных форм (капли для интраназального применения). Для твердых и мягких форм этих препаратов (мазь для наружного применения, суппозитории ректальные и порошок для приготовления интраназального раствора) наблюдается снижение интенсивности радиотепловой эмиссии (Рисунок 4 А, Б).

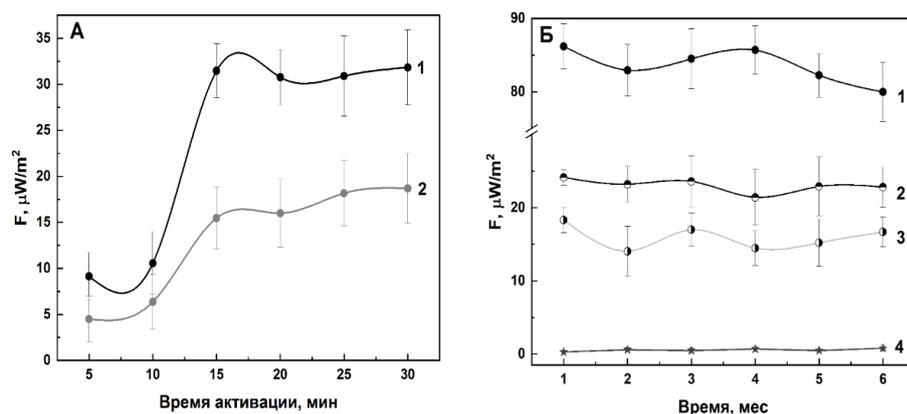


Рисунок 4. (А) Кинетика развития сигнала радиотеплового излучения для препарата ИФН - γ во время его активации, где 1 – раствор, 2 – порошок; (Б) Полугодовая кривая интенсивности собственного радиотеплового излучения препаратов ИФН - $\alpha 2b$, где 1 – раствор, 2 – мазь для наружного применения, 3 – суппозитории ректальные, 4 – контроль (высокоомная вода Milli-Q). *Источник: составлен автором.*

Продемонстрированная специфичность радиотеплового излучения наночастиц в составе различных лекарственных форм (Таблица 2 и Рисунок 4 А, Б) предполагает потенциальную возможность использования интегрального радиотеплового излучения для экспресс-контроля стабильности лекарственных препаратов.

3.2.2. Предел обнаружения радиотеплового излучения наночастиц

Для определения предела обнаружения препаратов гуминовых кислот были приготовлены разведения ГФК (исходная концентрация 80 мг/мл). Разведения препаратов проводились с использованием высокоомной воды (Milli-Q). Все измерения контролировались по объему, в каждом измерении излучение детектировалось от 1 мл приготовленного разведения (Рисунок 5).

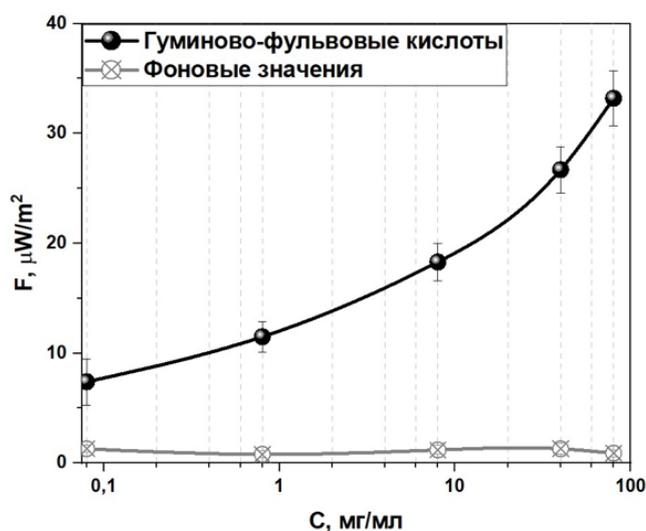


Рисунок 5. Концентрационная зависимость собственного радиотеплового излучения для лечебно-профилактического питания на основе ГФК. Стандартное отклонение на повторяемость фоновых значений внутри значка – перечеркнутый круг. *Источник: составлен автором.*

При минимальной концентрации 0,08 мг/мл плотность потока собственной радиотепловой эмиссии превышала фоновые значения в 7 раз, а с увеличением концентрации ГФК детектируемые данные закономерно увеличивались.

3.2.3. Линейность радиотеплового излучения наночастиц

Классические методы определения содержания белка, методом Лоури или методом Бредфорда не могут быть применены в мутных и непрозрачных средах. В ходе разработки экспресс-метода контроля качества иммунобиологических препаратов было выдвинуто предположение о возможности определения содержания белковой составляющей данных препаратов без вскрытия первичной упаковки. На примере вакцин Гам-VLP-Рота с разными концентрациями (60 и 120 мкг/доза) данная возможность была подтверждена (Рисунок 6).

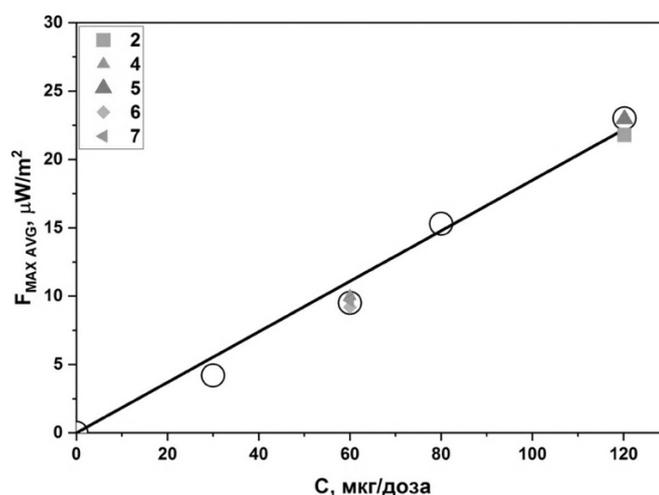


Рисунок 6. Зависимость собственного радиотеплового излучения от содержания белка в вакцине Гам-VLP-Рота без вскрытия первичной упаковки. Открытые черные кружки – калибровочный график. Фигуры иллюстрируют примеры определения содержания белка в промышленно производимых завальцованных флаконах, где номера 2; 5 – 120 мкг/доза, а 4; 6; 7 – 60 мкг/доза. *Источник: составлен автором.*

Получена калибровочная прямая, состоящая из четырех контрольных точек, каждая из которых характеризовала уровень собственного радиотеплового излучения для содержаний белка в вакцине: 30, 60, 80, 120 мкг/доза, а коэффициент корреляции по Пирсону составил 0,990. Полученные в ходе исследования данные пяти разных упаковок вакцин Гам-VLP-Рота совпали с калибровочными точками, что подтверждает возможность различать иммунобиологические препараты с разными концентрациями *без вскрытия первичной упаковки*. Следует подчеркнуть, что дистанционная детекция биологически активных наночастиц обусловлена самим методом пассивного измерения радиосигнала. Прежде чем перейти к измерениям готовых лекарственных форм, дистанционная детекция была валидирована на препаратах серебра протеината, иммобилизованного в парафинах. Также была показана возможность дистанционного мониторинга цитокинового ответа на вакцинацию у лабораторных животных.

3.2.4. Многомесячная прецизионность результатов при контроле образцов без вскрытия упаковки

Внутрилабораторная прецизионность метода проводилась еженедельно в условиях постоянной геометрии установки, одним и тем же исполнителем, на примере одних и тех же препаратов ИФН и ГФК. В течение года показатели собственного радиотеплового излучения проверяли на воспроизводимость путем измерения одних и тех же образцов разными исполнителями на разных установках. На рисунке 7 показаны сводные результаты многомесячного испытания на воспроизводимость, относительное стандартное отклонение составило $\pm 5\%$ (Рисунок 7 А, Б).

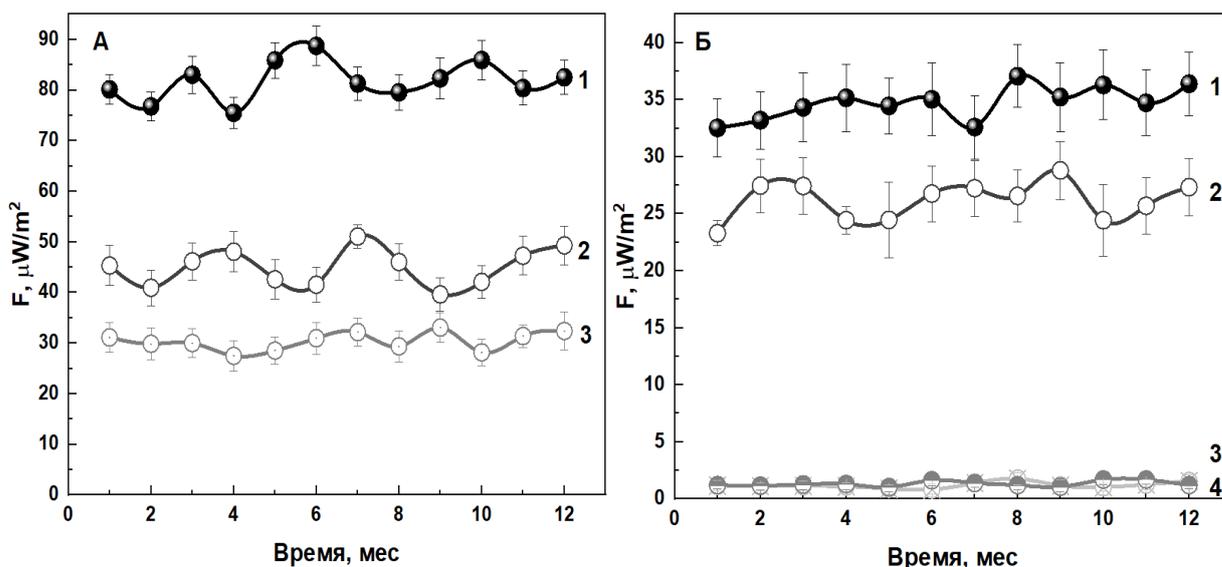


Рисунок 7. Годовая временная кривая воспроизводимости результатов, полученных при измерении собственного радиотеплового излучения образцов, где (А): 1 – ИФН – $\alpha 2b$, 2 – ИФН – $\beta 1a$, 3 – ИФН – γ ; (Б): 1 – ГФК Система БИО, 2 – ГФК Грузия, 3 – ГФК Faberlic, 4 – ГФК БИОДРОН. Все измерения проводились *без вскрытия первичной упаковки* в геометрии установки, описанной в разделе методы. *Источник: составлен автором.*

Для исследования влияния качественных характеристик иммунобиологических препаратов на их излучающую способность (Таблица 3), проверяли эмиссионную активность препаратов с надлежащим сроком годности, препаратов с истекшим сроком годности, просроченных более чем на полгода, и искусственно состаренных препаратов, подвергшихся нагреванию при температуре более 50°C в течение 1 часа, в случае с ИФН, и при температуре 100°C в течение 5 минут, в случае с Гам-VLP-мультивак. В опытах по ускоренному старению белковые структуры коагулировали из-за воздействия нехарактерных для их хранения температур (более 42°C). Это подтверждали контролем размера частиц методом DLS. Для ИФН- $\alpha 2b$ надлежащего срока годности – максимум размерного спектра $d=190$ нм, а в условиях искусственного старения он смещался до 615 нм. Для ИФН- $\beta 1a$ надлежащего срока годности $d=220$ нм, после искусственного старения $d=531$ нм. Аналогичная картина наблюдалась для ИФН- γ (295 и 712 нм) и для Гам-VLP-мультивак (190 и 220 нм).

Таблица 3. Сравнение собственного радиотеплового излучения иммунобиологических препаратов с различными качественными характеристиками *без вскрытия фабричной упаковки*: надлежащего срока годности, просроченные и искусственно состаренные препараты (n=7). Указаны средние значения за период 12 месяцев.

Образцы	ИФН- α 2b	ИФН- β 1a	ИФН- γ	Гам-VLP-мультивак
$F \pm SD, \text{ мкВт/м}^2$				
Надлежащего срока годности	89 \pm 4	41 \pm 3	31 \pm 3	13 \pm 1
Просроченный	55 \pm 3	21 \pm 3	19 \pm 3	9 \pm 2
Искусственно состаренный	31 \pm 4	19 \pm 3	20 \pm 3	4 \pm 1

Так же, как и в случае с препаратами ИФН, при помощи метода детектирования собственного радиотеплового излучения, подтверждена возможность различать лечебно-профилактические продукты питания, содержащие ГФК, с различными качественными характеристиками: с надлежащим сроком годности и просроченные более чем на полгода препараты (Таблица 4).

Таблица 4. Сравнение радиотеплового излучения препаратов ГФК и лекарственного растительного сырья (*без вскрытия фабричной упаковки*) с добавлением ГФК различного качества (n=7). Указаны средние значения за период 12 месяцев.

Образцы	ГФК Система БИО	<i>Orthilla secunda</i> +ГФК	<i>Alnus incana</i> +ГФК	<i>Terebinthina</i> +ГФК
$F \pm SD, \text{ мкВт/м}^2$				
Надлежащего срока годности	31 \pm 3	22 \pm 2	11 \pm 2	11 \pm 1
Просроченные	4 \pm 1	1 \pm 0,6	2 \pm 1	5 \pm 1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе разработан метод контроля качества лекарственных препаратов и лечебно-профилактического питания на основе биологически активных наночастиц. Его особенностью является детекция собственного радиотеплового излучения наночастиц. Новый метод включен в стандарт предприятия для контроля качества при производстве белковых вакцин на основе вирусоподобных частиц (VLP). Данная разработка позволяет проводить экспресс-контроль без вскрытия первичной упаковки препаратов, а также может быть применена для контроля активности иммунобиологических препаратов на стадии доклинических испытаний. Дистанционный контроль активных наночастиц открывает, с нашей точки зрения, возможность

неинвазивного мониторинга развития гуморального иммунного ответа при вакцинировании и инфицировании.

ВЫВОДЫ

1. Разработан и валидирован новый экспресс-метод контроля качества лекарственных препаратов, содержащих несферические наночастицы сложной формы, основанный на регистрации их радиотеплового излучения и позволяющий, в том числе, проводить контроль без вскрытия первичной упаковки.

2. Тепловая или световая активация собственного радиотеплового излучения в миллиметровом диапазоне наночастиц сложной формы в составе лекарственных средств различных фармакологических групп и лечебно-профилактического питания протекает с 10-минутной кинетикой, увеличиваясь на порядок и более, по сравнению с фоновыми значениями. Излучение сферических инертных наночастиц (латексные, мицеллы и т.п.) не отличается от фоновых.

3. Удельная плотность потока и способ активации (нагрев или световое облучение при 412 нм) зависят от природы наночастиц, достигая среди изученных препаратов максимальных значений для VLP против коронавируса (24 ± 4 мкВт/м² при количестве действующего вещества 120 мкг, активация светом при 412 нм) и при активации интерферона- $\alpha 2b$ путем нагревания до температуры 37°C (89 ± 4 мкВт/м² при количестве действующего вещества 10000 МЕ), в заданной геометрии установки, когда фоновые значения не превышают 1 мкВт/м².

4. Оптимизированы условия измерений миллиметрового радиотеплового излучения наночастиц на основе широкополосного детектора, включая геометрию установки и кюветного отсека, а условия нагрева и светового облучения адаптированы для пользователя с точки зрения эргономики. Показано монотонное увеличение плотности потока миллиметрового излучения с увеличением массы, площади и объема образцов.

5. Проведены элементы валидации нового метода детекции радиотеплового излучения наночастиц по следующим характеристикам (для вируснейтрализующих антител, интерферона- $\alpha 2b$, вирусоподобных частиц и гуминово-фульвовых кислот): специфичность (99,5 %), прецизионность в вариантах повторяемости и воспроизводимости (4,3%), линейность ($r=0,990$), предел обнаружения (0,008%).

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, индексируемых в международных базах Scopus и Chemical Abstracts:

1. **Petrov, G.V.** Controlling the Quality of Nanodrugs According to Their New Property – Radiothermal Emission / **G.V. Petrov**, D.A. Galkina, A.M. Koldina, T.V. Grebennikova, O.V. Eliseeva, Y.Yu. Chernoyzh, V.V. Lebedeva, A.V. Syroeshkin // *Pharmaceutics*. – 2024. – V. 16. – N 2. – P. 180. DOI: 10.3390/pharmaceutics16020180
2. **Petrov, G.V.** Physical and chemical characteristics of aqueous colloidal infusions of medicinal plants containing humic acids / **G.V. Petrov**, I.A. Gaidashev, A.V. Syroeshkin, // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2023. – V. 16. – N 1. – P. 76-82. DOI: 10.22159/ijap.2024v16i1.49339
3. **Petrov, G.V.** Express method for quality control of products after the fluidized bed aerosol chamber by detecting radio thermal emission of nanoparticles / **G.V. Petrov**, V.V. Taranov, A.V. Syroeshkin // *European Chemical Bulletin*. – 2023. – V. 12. – N 6. – P. 3035-3041. DOI: 10.48047/ecb/2023.12.6.273
4. Syroeshkin, A.V. Radiothermal Emission of Nanoparticles with a Complex Shape as a Tool for the Quality Control of Pharmaceuticals Containing Biologically Active Nanoparticles / A.V. Syroeshkin, **G.V. Petrov**, V.V. Taranov, T.V. Pleteneva, A.M. Koldina, I.A. Gaydashev, E.S. Kolyabina, D.A. Galkina, E.V. Sorokina, E.V. Uspenskaya, I.V. Kazimova, M.A. Morozova, V.V. Lebedeva, S.A. Cherepushkin, I.V. Tarabrina, S.A. Syroeshkin, A.V. Tertysnikov, T.V. Grebennikova // *Pharmaceutics*. – 2023. – V. 15. – N 3. – P. 966. DOI: 10.3390/pharmaceutics15030966

Статьи в иных рецензируемых журналах:

5. Uspenskaya, E. Exploring the Effects of Cramped-Impact-Type Mechanical Action on Active Pharmaceutical Ingredient (Levofloxacin)—Prospects for Pharmaceutical Applications / Uspenskaya, E., Simutina, A., Kuzmina, E., Sukhanova, V., Garaev, T., Pleteneva, T., Koldina, A., Kolyabina, E., **Petrov, G.**, Syroeshkin, A. // *Powders*. – 2023. – V. 2. – N 2. – P. 464-483. DOI: 10.3390/powders2020028
6. **Petrov G.V.** Express quality control of products after aerosol cameras of the fluidized bed by radiation of nanoparticles / **G.V. Petrov**, I.A. Gaidashev, V.V. Taranov, A.V. Syroeshkin // *Int. J. of Adv. And Innov. Res.* – 2022. – V. 9. – N 3. – P. 137-140.

Статьи в сборниках конференций:

7. **Петров Г.В.** Индуцированное радиотепловое излучение лекарственных препаратов, содержащих биологически активные наночастицы / **Петров Г.В.** // «Молодая фармация – потенциал будущего», XII всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием (12 ; 2022; Санкт-Петербург). Сборник материалов конференции

«Молодая фармация – потенциал будущего», 14 марта – 18 апреля 2022г. – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ. – 2022. – С. 236-239.

8. **Петров Г.В.** Физико-химические характеристики водных коллоидных настоев лекарственных растений, содержащих гуминовые кислоты / **Г.В. Петров**, И.А. Гайдашев, А.В. Сыроешкин // Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы. II Международная научно-практическая конференция (г. Томск, 04-06 октября 2023 г.): сборник материалов; под ред. М.В. Белоусова. – Томск: Изд-во СибГМУ. – 2023. – С. 247-250.

Петров Глеб Владимирович

(Российская Федерация)

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ,
СОДЕРЖАЩИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ, НА ОСНОВЕ ИХ
СОБСТВЕННОГО РАДИОТЕПЛОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Диссертационная работа посвящена исследованию и разработке неразрушающего метода экспресс-контроля качества лекарственных препаратов с наночастицами, основанного на их собственном радиотепловом излучении в миллиметровом диапазоне. Показана зависимость собственного радиотеплового излучения препаратов от природы наночастиц, их формы и размерных спектров. Проведены базовые метрологические испытания и фармакопейная валидация нового метода. Описанный в диссертационной работе метод контроля качества наноразмерных препаратов был включен в стандарт предприятия для контроля качества VLP – вакцин нового поколения против SARS-CoV-2 и ротавируса, а также в качестве метода контроля качества лекарственных препаратов и лечебно-профилактического питания.

Petrov Gleb Vladimirovich

(Russian Federation)

**DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR QUALITY CONTROL OF MEDICINES
CONTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE NANOPARTICLES BASED ON THEIR
INTRINSIC RADIOTHERMAL EMISSION**

The dissertation work is devoted to the research and development of a non-destructive method of rapid quality control of medicines with nanoparticles based on their intrinsic radiothermal emission in the millimeter range. The dependence of the intrinsic radiothermal emission of drugs on the nature of nanoparticles, their shape and dimensional spectra is shown. The main metrological tests and pharmacopoeia validation of the new method have been carried out. The method of quality control of nanoscale preparations described in the dissertation work was included in the enterprise standard for quality control of VLP vaccines of a new generation against SARS-CoV-2 and rotavirus, as well as a method of quality control of medicines and therapeutic and preventive nutrition.