

Никифорова Марина Владимировна

**РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ,
ПРОИЗВЕДЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ
МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЫ**

14.04.02 фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва – 2020

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» на кафедре фармацевтической и токсикологической химии медицинского института.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Сыроешкин Антон Владимирович

Научный консультант:

кандидат медицинских наук

Тарасов Сергей Александрович

Официальные оппоненты:

Белоусов Михаил Валерьевич, доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой фармацевтического анализа Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Воронин Александр Васильевич, кандидат фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «23» апреля 2020 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.001 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте организации dissovet.rudn.ru

Автореферат разослан « _____ » _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ПДС 0300.001,
доктор фармацевтических наук, профессор

Успенская Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Производство современных лекарственных субстанций и готовых лекарственных форм в большинстве случаев является сложным, многостадийным и трудоемким процессом. Одним из перспективных направлений в автоматизации и совершенствовании технологических и аналитических процедур является использование микрофлюидных систем, создание которых было спровоцировано успехами в супрамолекулярной химии и в микро- и нанотехнологиях. Микрофлюидные системы позволяют точно управлять потоками жидкостей, которые ограничены геометрией каналов малых размеров (миллиметровых и субмиллиметровых масштабов) [Kuznetsov I.A., 2010]. В микрореакторах достигается интенсификация необходимых процессов с помощью различных конструктивных особенностей микрофлюидных каналов, позволяющих увеличить площади поверхности между смешиваемыми жидкостями и уменьшить диффузионный путь. Важно, что проточные микрореакторы представляют собой закрытые системы, в которых проще достичь стандартизованных условий приготовления растворов, чем в обычных реакторах.

Вышесказанное делает незаменимой данную технологию для производства препаратов, содержащих малые (несколько микрограммов) и сверхмалые (фемтограммы и даже меньше) концентрации веществ. Интерес к эффектам подобных препаратов неуклонно растет, так как они способны вызвать выраженные клинические эффекты, имея при этом высокий профиль безопасности. К подобным препаратам можно отнести лекарственные средства, содержащие сверхвысокие разведения антител к различным биологически-активным молекулам – так называемые «релиз-активные» (РА) препараты [Энштейн О.И., 2008; Энштейн О.И., 2013]. Данные препараты хорошо зарекомендовали себя для лечения широкого спектра заболеваний: инфекционных, метаболических и психоэмоциональных расстройств и т.д. Их эффективность и безопасность доказана в многочисленных доклинических и клинических рандомизированных исследованиях [Castagne V., 2008; Chu X., 2008; Kheyfets I.A., 2012; Nicoll J., 2013; Bailbe D., 2013; Авалуева Е.Б., 2014; Tarasov S.A., 2016; Rafalsky V., 2016; Skarnovich M.A., 2017; Kardash E.V., 2018; Mkrtumyan A., 2018]. Препараты зарегистрированы в Российском государственном реестре лекарственных средств (ЛС) с 2000 года (например, Р N003362/01, ЛСР-007362/10, ЛСР-006927/10), а также зарегистрированы в странах ближнего и дальнего зарубежья. В основе их производства лежит процесс многократного последовательного разбавления аффинно очищенных антител к определенным антигенам (поэтапного снижения их концентрации растворителем) с интенсивным перемешиванием каждого раствора. Процесс многократного последовательного разбавления активной субстанции является многостадийным. Одним из подходов к автоматизации данного процесса может быть использование микрофлюидных систем

для автоматического приготовления разбавленных растворов активных субстанций и их эффективного перемешивания в изогнутых микроканалах микрореакторов (так называемых микросмесителях), в которых создаются турбулентные потоки, вихри различного размера: от крупных до очень маленьких.

Согласно Правилам организации производства и контроля качества ЛС (GMP) все производственные процедуры получения ЛС должны быть валидированы, то есть для каждого технологического процесса получено подтверждение, что он (в пределах установленных параметров) позволяет стабильно производить лекарственный препарат, соответствующий установленным спецификациям и характеристикам качества. Валидация процесса получения лекарственного препарата возможна только при проведении измерений аналитическими методиками, разработанных и валидированных с учетом специфики анализируемого вещества. Одним из основных фармакопейных методов количественного определения АФИ является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод ВЭЖХ зарекомендовал себя как один из самых точных, специфичных, чувствительных и достаточно быстрых. При использовании тонкодисперсных сорбентов (размером менее 2 мкм) в ВЭЖХ были достигнуты еще более высокие показатели эффективности и скорости разделения некоторых веществ. Такой режим работы ВЭЖХ получил название ультра-ВЭЖХ (УВЭЖХ). Данный метод используется в контроле качества ЛС и может быть применен для валидации методики автоматизированного приготовления последовательного уменьшения концентрации активных веществ.

Предполагается, что в растворах РА форм антител образуются супрамолекулярные детерминанты (дисперсные системы), которые стабильны во времени и могут обуславливать биологическую активность (фармакологические эффекты) данных растворов. Ранее были разработаны методики, позволяющие обнаружить наличие РА форм антител в исследуемых образцах, регистрируя их функциональную активность: это метод иммуноферментного анализа (ИФА) [Gavrilova, E.S., 2014, Pschenitzka, M., 2014] и метод пьезокварцевых иммуносенсоров [Don, E., 2016]. Однако остается актуальной разработка новых физико-химических методик для исследования сверхвысоких разведений веществ. В связи с вышеописанным актуальным вопросом является не только создание нового подхода (новой методики) для автоматизации приготовления последовательных разбавлений активных субстанций, но и разработка системы контроля качества ЛС, произведенных по разработанной автоматизированной методике.

Степень разработанности темы исследования.

В настоящее время работы многих исследователей [Sackmann, E.K., 2014; Boyd-Moss, M., 2016; Samiei, E., 2016; Mou, L., 2017; Yáñez-Sedeño, P., 2017; Aziz, A.U.R., 2017; Mancera-Andrade, E.L., 2018; Kimura, H., 2018] посвящены различным разработкам микрофлюидных систем для автоматизации и совершенствования технологических и аналитических процедур. Интерес к

изучению микрофлюидных систем растет с каждым годом: за 2016 год опубликовано 3064 научных статей, в 2017 году – 3200 публикаций, в 2018 году - 3235 (информация из базы данных MEDLINE, состояние на январь 2019 г.). С помощью микрореакторов можно эффективно перемешивать различные жидкости за счет образования турбулентных потоков, вихрей от крупных до очень маленьких. Известно, что вихри малого размера (колмогоровские вихри) получают энергию в результате последовательного дробления крупных вихрей, диссипатируют (рассеивают) энергию тепловому движению. По теории профессора физической химии, лауреата Нобелевской премии по химии Пригожина И.Р. диссипативные структуры не только поддерживают себя в далеком от равновесия устойчивом состоянии, но могут даже развиваться и когда поток энергии и материи, пронизывающий их, нарастает, они могут пройти через новые состояния неустойчивости и трансформироваться в новые структуры повышенной сложности [Николис Г., 1979; Ванг В. К., 2008].

В исследованиях [Коновалов А.И., 2014; Рыжкина И.С., 2015] было показано, что в водных растворах сверхвысоких разведений различных биологически активных веществ присутствуют водные наноструктуры, которые могут характеризовать "особые" свойства и биологическую активность таких растворов. Кроме того, в литературе [Бурлакова Е.Б., 2003; Сыроешкин А.В., 2006; Choi T.H., 2010; Лантев Б.И., 2013; Ho M-W., 2014; Bell I.R., 2015] описано наличие гигантских гетерофазных кластеров воды (субмиллиметровых плотностных неоднородностей) в водных растворах высококонцентрированных веществ. Эти данные позволили предположить, что методы детекции аналогичных структур могут быть использованы для контроля качества при приготовлении РА препаратов [Рыжкина И.С., 2015].

Цель исследования.

Разработать систему получения и контроля качества лекарственных средств, произведенных с использованием автоматизированной микрофлюидной системы.

Задачи исследования:

1. Разработка автоматизированной микрофлюидной системы приготовления последовательных разбавлений активной фармацевтической субстанции.
2. Разработка и валидация методики контроля качества приготовления с помощью автоматизированной микрофлюидной системы последовательных разбавлений модельного вещества азорубина (метод УВЭЖХ).
3. Разработка и валидация методики контроля качества приготовления с помощью автоматизированной микрофлюидной системы последовательных разбавлений модельного вещества иммуноглобулина G человека (метод УВЭЖХ).

4. Разработка методики контроля качества релиз-активных форм антител к интерферону гамма человека, приготовленных с использованием автоматизированной микрофлюидной системы, методом малоуглового светорассеяния лазерного света.
5. Исследование фармакологической активности раствора активной фармацевтической субстанции, произведенного с использованием разработанной автоматизированной микрофлюидной системы.

Научная новизна.

Впервые разработана методика автоматизированного приготовления последовательных разбавлений активной субстанции с помощью микрофлюидной системы (Заявка на изобретение RU 2019131465 от 07.10.2019). Разработаны и валидированы две методики количественного определения модельных веществ в водных и водно-спиртовых растворах этих веществ, приготовленных с помощью автоматизированной микрофлюидной системы при последовательном разбавлении. Впервые разработана методика контроля качества РА форм антител к интерферону (ИФН) гамма методом малоуглового рассеяния лазерного света. Впервые показано, что РА формы антител к ИФН гамма, приготовленные на автоматизированной микрофлюидной системе, обладают биологической (противовирусной) активностью.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработана методика автоматизированного многостадийного снижения концентрации активной субстанции для получения РА форм антител к ИФН гамма с использованием микрофлюидной системы. Для разработки и подтверждения валидности автоматизированной методики разработаны и валидированы УВЭЖХ-методики для количественного определения модельных веществ: азорубина и IgG.

Внедрение результатов исследования.

Разработанная автоматизированная методика приготовления последовательных разбавлений активной фармацевтической субстанции с помощью микрофлюидной системы и УВЭЖХ методики количественного определения азорубина и IgG внедрены в практическую деятельность научно-исследовательской лаборатории ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» (г. Москва, справка о внедрении от 18.12.2018), а также автоматизированная методика приготовления с помощью микрофлюидной системы внедрена в исследовательскую лабораторию филиала ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» (г. Челябинск, справка о внедрении от 25.12.2018).

Методология и методы исследования.

Согласно поставленным задачам выбраны общепринятые современные методические подходы, а именно: метод количественного определения с помощью УВЭЖХ (с диодно-матричным и флуориметрическим детекторами) активных веществ в различных растворах (в

водных и водно-спиртовых) с учётом их физико-химических свойств и подбора подходящих условий проведения анализа, метод малоуглового рассеяния лазерного света (Low-Angle Laser Light Scattering, LALLS) для определения распределения частиц по размеру, а также МТТ-тест в культуре клеток (скрининговый метод измерения выживаемости клеток) и метод твердофазного ИФА для оценки противовирусной активности исследуемых образцов в культуре клеток. Статистическая обработка результатов, полученных в ходе экспериментальной работы проводилась с использованием средств языка R, другие расчеты были выполнены с использованием программы Microsoft Office Excel.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработана автоматизированная микрофлюидная система приготовления последовательных разбавлений активной фармацевтической субстанции (АФС).
2. Разработана и валидирована УВЭЖХ-методика, применяемая для контроля качества приготовления с помощью автоматизированной микрофлюидной системы последовательных разбавлений водой модельного вещества азорубина.
3. Разработана и валидирована УВЭЖХ-методика, применяемая для контроля качества приготовления с помощью автоматизированной микрофлюидной системы последовательных разбавлений водно-спиртовыми растворами модельного вещества IgG человека.
4. Успешно проведена валидация разработанной автоматизированной микрофлюидной системы с использованием валидированных УВЭЖХ-методик.
5. Разработана методика контроля качества РА форм антител к ИФН гамма, приготовленных с использованием автоматизированной микрофлюидной системы и нанесенных на лактозу моногидрат, методом малоуглового светорассеяния лазерного света.
6. Разработанная автоматизированная микрофлюидная система позволяет приготовить растворы активной фармацевтической субстанции, обладающие биологической (противовирусной) активностью.

Степень достоверности и апробация результатов.

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов анализа. Оборудование, использованное в работе, было поверено и сертифицировано. Достоверность научных положений и выводов обеспечена валидацией аналитических методик, проведена статистическая обработка полученных результатов.

Основные положения диссертационной работы представлены и обсуждены на 2-ой Московской международной конференции «Имунофизиология. Естественный аутоиммунитет в норме и патологии» (Москва, 2008), на следующих международных научных конференциях:

«World Immune regulation meeting» (Швейцария, 2011), «Global Biotechnology Congress» (Бостон, США, 2015), «Eleventh Annual Conference on the Physics, Chemistry and Biology of Water» (София, Болгария, 2016), на XXIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2016), на VII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2017), на научном семинаре «Аналитические методы в фармации. Дзета-потенциал. Практическое значение и методы определения» (Москва, 2017).

Личный вклад автора.

Основные экспериментальные результаты, представленные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Вклад автора является определяющим на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и внедрения в практику. Автором выполнены разработка автоматизированной технологии многократного снижения концентрации активной субстанции, исследования по разработке и валидации методик количественного определения азорубина и IgG, проведены анализы исследуемых образцов методом малоуглового рассеяния лазерного света (LALLS), МТТ-тестом в культуре клеток и методом твердофазного ИФА, статистическая обработка результатов анализа, а также их обобщение и формулирование выводов.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 3 – в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК Минобрнауки РФ (включая одну публикацию в журнале, входящего в перечень журналов согласно приказу ректора РУДН («ректорский список») и 3 – в зарубежных рецензируемых журналах, входящих в международные базы данных: Web of Science, Scopus, PubMed и другие.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения и результаты проведенного исследования соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 3 паспорта специальности «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества ЛС на этапах их разработки, производства и потребления».

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста (основной текст на 126 страницах), состоит из 3 глав, включает 28 рисунков, 42 таблицы, 198 ссылок на литературные источники зарубежных и отечественных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1 Методика контроля качества приготовления последовательных разбавлений модельного вещества азорубина водой методом УВЭЖХ

Разработанная в настоящем исследовании методика используется для количественного определения азорубина в приготовленных водных растворах азорубина, расчетные концентрации которого соответствовали 50000, 5000, 50 и 0,5 мкг/мл, а также 5,0 нг/мл.

В работе использовалось следующее оборудование: хроматографическая система 1290 Infinity II Agilent Technologies, укомплектованная диодно-матричным детектором (США); колонка аналитическая 150 мм × 2,1 мм, заполненная октадецилсиланизированным силикагелем с размером частиц 1,8 мкм и размером пор 95 Å (Zorbax RRHD Eclipse Plus C18, Agilent; S/N: USDBB04796; P/N: 959759-902); предколонка 5 мм × 2,1 мм, заполненная октадецилсиланизированным силикагелем с размером частиц 1,8 мкм и размером пор 95 Å (Zorbax RRHD Eclipse Plus C18, Agilent S/N: USEDPO3528; P/N: 821725-901); насос вакуумно-нагнетательный, Millipore (Германия); ультразвуковая ванна УЗВ-12 ТТЦ, Сапфир (Россия); центрифуга FVL-2400N, BioSan (Латвия); поверенные аналитические весы Ohaus Discovery DV215CD (Швейцария).

Реактивы и растворители. В работе использовались следующие реактивы: вода бидистиллированная деионизированная, полученная на установке очистки воды Milli-Q Integral 5, Merck Millipore, Франция; ацетонитрил для ВЭЖХ, Panreac, каталожный номер 221881.1612; аммония ацетат ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), Panreac, каталожный номер 131114.1210; кислота ортофосфорная 85% (H_3PO_4), Panreac, каталожный номер A0989,1000; азорубин (кармуазин, кармазин, краситель E122), стандартный образец, Sigma, каталожный номер 52245, номер серии BCBW1928; азорубин, субстанция, Roha Dyechem Pvt. Ltd., каталожный номер RD-09.

Хроматографические условия. Подвижная фаза: компонент А – 20 мМ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ рН=5,00 в воде; компонент В – Ацетонитрил. Режим элюирования – изократический, компонент А : компонент В 75:25. Скорость потока – 1,0 мл/мин. Температура термостата колонки – $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Температура термостата образцов – $(5,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Детектор – Диодно-матричный детектор (DAD), длина волны поглощения 518 нм. Время хроматографирования – 2 мин.

Время удерживания азорубина при проведении анализа в данных условиях составляло около 0,75 мин. Параллельно анализировали стандартные растворы азорубина с концентрацией 10 мкг/мл и 1 мкг/мл в соответствующей среде. Хроматограмма представлена на рисунке 1.

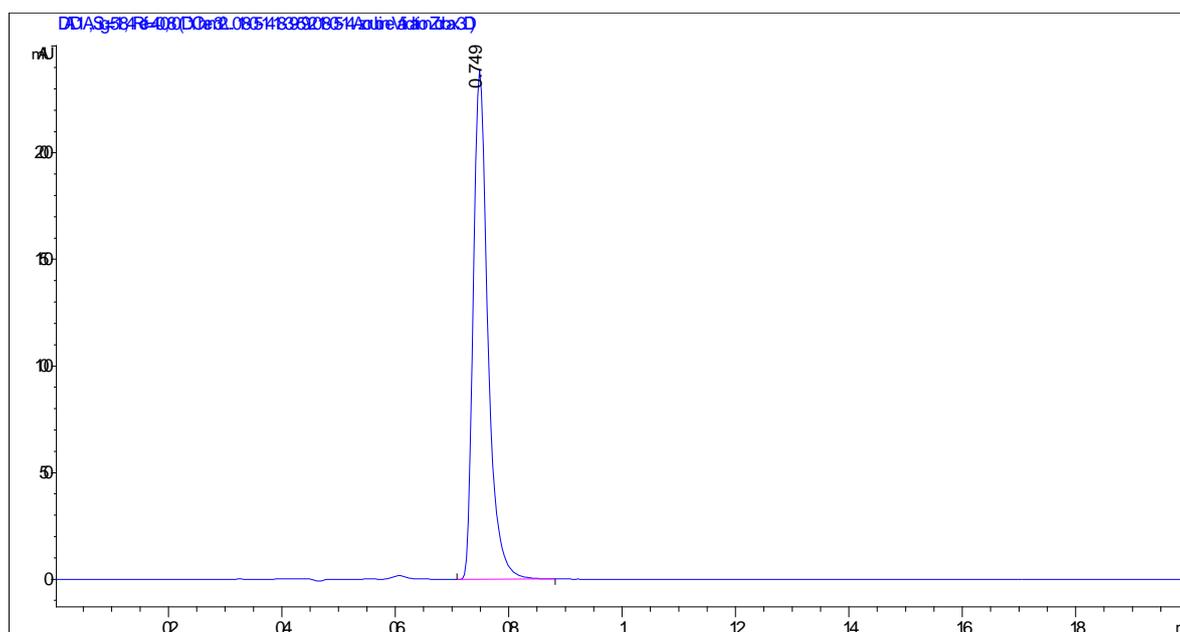


Рисунок 1. Типичная хроматограмма образца азорубина (УВЭЖХ, диодно-матричный детектор, длина волны поглощения 518 нм).

1.2 Методика контроля качества приготовления последовательных разбавлений иммуноглобулина G человека методом УВЭЖХ водными растворами этилового спирта

Разработанная в настоящем исследовании методика используется для количественного определения IgG в приготовленных водно-спиртовых (15% и 25% этилового спирта) растворах IgG, расчетная концентрация которого соответствовала 10000, 100 и 1 мкг/мл.

В работе использовалось следующее оборудование: хроматографическая система 1290 Infinity II Agilent Technologies, укомплектованная диодно-матричным и флуориметрическим детекторами (США); колонка аналитическая 150 мм × 2,1 мм, заполненная бутилсилилизированным силикагелем с размером частиц 1,7 мкм и размером пор 300 Å (ACQUITY UPLC Protein BEH C4, Waters Corporation, США); насос вакуумно-нагнетательный, Millipore (Германия); ультразвуковая ванна УЗВ-12 ТТЦ, Сапфир (Россия); центрифуга FVL-2400N, BioSan (Латвия); поверенные аналитические весы Ohaus Discovery DV215CD (Швейцария).

Реактивы и растворители. В работе использовались следующие реактивы: вода бидистиллированная деионизированная, полученная на установке очистки воды Milli-Q Integral 5, Merck Millipore, Франция; изопропанол для ВЭЖХ, Рангас, каталожный номер 221090.1612; кислота трифторуксусная (TFA), Рангас, каталожный номер A2038,0100; этиловый спирт, раствор для наружного применения и приготовления лекарственных форм 95 %, серия 040615, ЗАО «РФК»; иммуноглобулин человека нормальный (раствор для внутримышечного введения, ампулы 1,5 мл, 1 доза (1,5 мл) содержит 9,5-10,5% белка; стабилизатор – глицин (2,25±0,75%),

ФГУП «НПО «Микроген»; иммуноглобулин гамма, стандартный образец, MyBioSource, каталожный номер MBS173110.

Хроматографические условия. Подвижная фаза – Компонент А – 0,1% TFA в воде для ВЭЖХ. Компонент В – изопропанол для ВЭЖХ, содержащий 0,1% TFA. Скорость потока – 0,8 мл/мин. Режим элюирования – градиентный, условия представлены в таблице 1.

Таблица 1. Условия градиентного режима элюирования

Время, мин	Содержание компонента ПФ, %	
	А	В
0	80	20
0,5	80	20
1,5	65	35
2,5	65	35
2,51	80	20
5,5	80	20

Температура термостата колонки – $(80 \pm 2)^\circ\text{C}$. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Температура термостата образцов – $(5,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Детектор - диодно-матричный детектор (DAD), длина волны поглощения 220 нм; флуориметрический детектор (FLD), длина волны поглощения 280 нм, длина волны испускания 340 нм. Время хроматографирования – 5,5 мин.

Время удерживания IgG при проведении анализа в данных условиях составляло около 2,5 мин. Параллельно анализировали стандартные растворы IgG с концентрацией 10 мкг/мл и 1 мкг/мл в соответствующей среде. Хроматограмма представлена на рисунке 2.

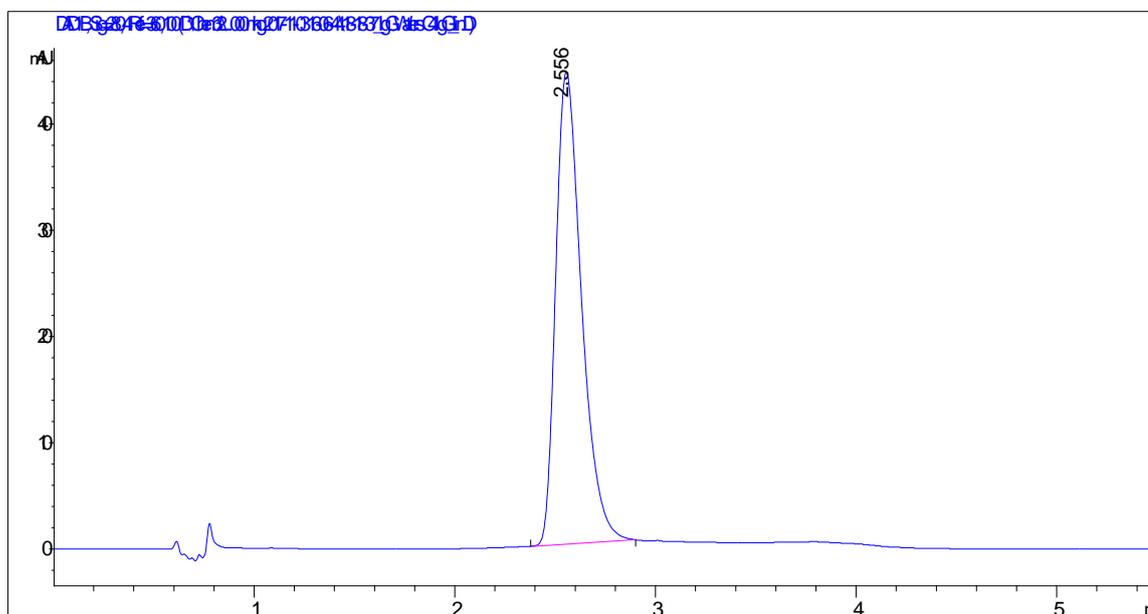


Рисунок 2. Типичная хроматограмма образца IgG (метод УВЭЖХ, диодно-матричный детектор, длина волны поглощения 220 нм).

1.3 Автоматизированная методика приготовления последовательных разбавлений активной фармацевтической субстанции с помощью микрофлюидной системы

Разработана в настоящем исследовании микрофлюидная система для автоматического приготовления последовательных разбавлений активных субстанций, состоящая из шприцевого насоса Atlas и чипа-микрореактора проточного, произведенного из инертного стекла (рис. 3). К шприцевому насосу подключен персональный компьютер со специально разработанной программой управления процессом приготовления последовательных разбавлений, разработанной на программной платформе Labview.

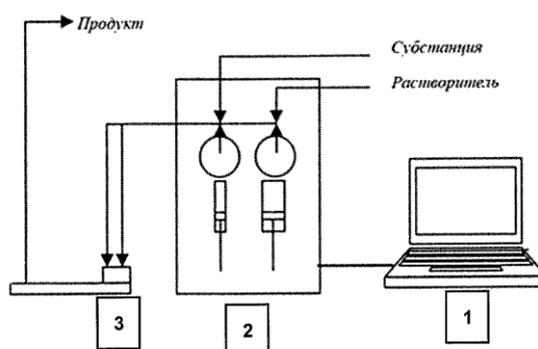


Рисунок 3. Принципиальная схема микрофлюидной системы для автоматического приготовления РА форм антител (1 – компьютер с программой управления потоками жидкостей, дозируемым шприцевым насосом, 2 – шприцевой насос Atlas (с двумя шприцами), 3 – стеклянный микрофлюидный чип-микрореактор).

С помощью шприцевого насоса точно дозируются: одним шприцем - исходный раствор (на первом этапе - субстанция антител), вторым шприцем - растворитель (для разбавления в 10 раз или в 100 раз исходного раствора в зависимости от этапа приготовления). Каждый шприц работает с установленной скоростью, чтобы направить два потока от каждого шприца до соответствующего входа микрофлюидного чипа-микрореактора, затем до точки смешения и затем по изогнутому микроканалу смешения, в котором происходит эффективное перемешивание. В результате прохождения смешиваемых веществ/растворов по изогнутым микроканалам чипа-микрореактора происходит эффективное быстрое перемешивание за счет образования турбулентных потоков, вихрей, больших площадей межфазных поверхностей, малого пути диффузии (рис. 4).



Рисунок 4. Конструктивная схема чипа-микрореактора.

1.4 Методика контроля качества РА форм антител к ИФН гамма методом малоуглового светорассеяния лазерного света

На разработанной автоматизированной микрофлюидной системе и стандартным способом (регламентированным соответствующей нормативно-технической документацией предприятия) были приготовлены 36% водно-спиртовые растворы РА форм антител к ИФН гамма (смеси трех активных водных разведений субстанции, разведенной соответственно в 100^{12} , 100^{30} , 100^{50} раз) из аффинно очищенных антител к ИФН гамма человека (концентрация 2,5 мг/мл, производства Ab Biotechnology, Великобритания). Приготовленные растворы использовались для получения исследуемых образцов порошков, а именно были исследованы порошки лактозы моногидрата (SuperTab[®] 30GR, DMV-Fonterra Excipients GmbH & Co. KG, Германия), насыщенные РА формами антител к ИФН гамма в установке псевдооживленного (кипящего) слоя (Hüttlin Pilotlab, Bosch Packaging Technology GmbH, Германия) - образцы двух серии: 1.1 (микрофлюидная система) и 2.1 (стандартный способ), и контроли: 1) образцы 1.2 и 2.2 – порошки лактозы моногидрата, насыщенные 36% водным раствором этилового спирта в тех же условиях, что и образцы препарата, и 2) образцы 1.3 и 2.3 – порошки лактозы моногидрата ненасыщенные (интактные) разных серий, которые были использованы для получения вышеописанных образцов, а именно для приготовления образцов 1.1 и 1.2 использовали интактную лактозу образец 1.3, а для приготовления образцов 2.1 и 2.2 использовали интактную лактозу образец 2.3. Перед измерениями порошки растворяли в воде с пониженным содержанием дейтерия ($D/H < 5$ ppm) при комнатной температуре.

Измеряли объемное распределение частиц методом LALLS с помощью Измерителя дисперсности лазерного (ИДЛ-1, модель «Кластер-1», аналог прибора МИД-5, «Институт коллоидной химии и химии воды» Украинской национальной академии наук). Данный метод основан на регистрации интенсивности рассеянного света, угловая зависимость которого определяется размером и оптическими свойствами частиц. С помощью ИДЛ-1 регистрировали интегральные характеристики дисперсности: объемную концентрацию W в %, оптическую плотность $\ln(I_0/I)$ (где I - интенсивность света, измеренная детектором в присутствии образца в ячейке, I_0 – интенсивность света, измеренная детектором при отсутствии образца). Объемная концентрация W представляет собой отношение объема всех частиц к единице объема раствора. Коэффициент экстинкции (ϵ) рассчитывался как отношение оптической плотности к объемной концентрации ($\ln(I_0/I)/W$) (для каждого образца проводилось три повтора измерений).

1.5 Методика исследования *in vitro* противовирусной активности раствора РА форм антител к ИФН гамма, произведенного с использованием разработанной автоматизированной микрофлюидной системы

С целью оценки биологической (противовирусной) активности раствора активного вещества, произведенного на автоматизированной микрофлюидной системе, было проведено

исследование с использованием культуры клеток MDCK (Madin Darby canine kidney) в отношении вируса гриппа A/California/04/09(H1N1)pdm09 водного раствора РА форм антител к ИФН гамма (смеси трех активных водных разведений субстанции, разведенной соответственно в 100^{12} , 100^{30} , 100^{50} раз), приготовленного из аффинно очищенных антител к ИФН гамма человека (концентрация 2,5 мг/мл, производства Ab Biotechnology, Великобритания), в сравнении с водой очищенной, прошедшей те же технологические процедуры в микрофлюидной системе и в тех же условиях, что и при получении раствора РА форм антител к ИФН гамма человека (данный образец использовался в качестве контроля). В качестве рабочей дозы для изучения противовирусной активности тестируемых образцов было выбрано разведения 1/8 и 1/16 (из расчета в объемных долях от общего объема среды на лунку). Данные дозы были выбраны как максимально переносимые для данной клеточной культуры, не оказывающие цитотоксического действия на клетки. В качестве препарата сравнения был использован Осельтамивир карбоксилат в концентрации 10 мкМ. Для мониторинга валидности экспериментальной модели в работе использовали клетки, зараженные вирусом без добавления экспериментальных образцов (контроль вируса), а также интактные клетки (клеточный контроль).

Количественную оценку цитотоксичности соединений проводили с использованием красителя МТТ (тетразолиевая соль тиазолил голубой). Для этого, в каждую лунку добавляли по 160 мкл среды DMEM без фенолового красного, а также 40 мкл раствора тетразолиевого красителя МТТ с концентрацией 4 мг/мл, интенсивность окраски отражает жизнеспособность клеток. Клетки инкубировали с красителем в течение 3 часов при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . После инкубации содержимое лунок удаляли и вносили по 200 мкл раствора ДМСО (диметилсульфоксид), с последующей инкубацией в течение 20 минут при комнатной температуре, в условиях покачивания на шейкере. Результаты учитывали с помощью автоматического колориметра при длинах волн 540 и 670 нм. Максимальная концентрация препарата, не изменяющая значение оптических плотностей по сравнению с контролем клеток, принималась за максимально не цитотоксическую концентрацию.

Изучение противовирусной активности образцов проводили методом ИФА, модифицированного для определения активности препаратов в культуре клеток. Клетки инкубировали с препаратами в течение 4 часов при 37°C , а затем заражали вирусом A/California/04/09(H1N1)pdm09 в дозе 0,1 и 1 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на клетку. Планшеты инкубировали в течение 24 часов (5% CO_2 , 37°C), отсутствие цитотоксических и цитопатических изменений фиксировали под инвертированным микроскопом. Затем удаляли инкубационную среду, клетки фиксировали 80% (в 0,01М растворе фосфатно-солевого буфера (ФСБ)) в течение 20 минут, высушивали и трижды отмывали раствором ФСБ с 0,05% Твин-20. К клеткам добавляли по 100 мкл раствора ФСБ с 1% фетальной сывороткой и 0,05% Твин-20 и

инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После удаления раствора к клеткам вносили моноклональные антитела к внутренним белкам вируса гриппа А (NP+M1), разведенным 1:1000 в ИФА-растворе. После инкубации с антителами (1 час, 37°C) и необходимой отмывки, в лунки вносили меченные пероксидазой хрена IgG козы против IgG мыши, в разведении 1:5000 и инкубировали (1 час, 37°C). Связанную пероксидазу выявляли добавлением в лунки раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, являющегося её субстратом и дающего при окислении цветной продукт. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ

2.1 Валидация методики количественного определения азорубина методом УВЭЖХ

Валидация разработанных методик количественного определения азорубина и IgG человека проводилась согласно действующим российским и зарубежным требованиям (согласно «ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик», а также соответствующих руководств US FDA, EMA и ICH) по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, повторяемость и устойчивость методик.

Для оценки пригодности хроматографической системы стандартный образец азорубина с концентрациями 10 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 5 нг/мл хроматографировали пятикратно. По полученным результатам оценки пригодности хроматографической системы было подтверждено соответствие рекомендованным нормам.

Результаты оценки специфичности методики представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты оценки специфичности методики

	Стандартный образец	Испытуемый раствор	Совпадение, %
Rt ₁ , мин	0,749	0,743	99,20%
Rt ₂ , мин	0,746	0,743	99,60%
Rt ₃ , мин	0,745	0,741	99,46%

При измерениях линейной зависимости на диодно-матричном детекторе значения коэффициентов корреляции составили 0,999 (диапазон концентраций от 0,4 мкг/мл до 12 мкг/мл) и 0,998 (диапазон концентраций от 4 до 6 нг/мл), что соответствовало требованию не менее 0,998, и значения у-intercept в процентах на 100% рабочей концентрации составили соответственно 0% и 0,99%, что соответствовало требованию $\leq 2\%$, следовательно можно сделать заключение о том, что аналитическая методика количественного определения азорубина является линейной в диапазоне применения аналитической методики.

Правильность количественного определения азорубина для средней величины каждого из трех определений (для рабочих концентраций 5,0 нг/мл; 0,5 или 10,0 мкг/мл) находилось в диапазоне от 100±2%. Теоретическое значение соотношения «найдено/введено» (100%) укладывалось в рассчитанный 95%-доверительный интервал. RSD значений соотношения «найдено/введено» при n=9 не превышало 2,0 %.

Аналитическая область валидируемой методики составила от 80 до 120% от соответствующей ожидаемой концентрации азорубина (5,0 нг/мл; 0,5 или 10,0 мкг/мл).

Статистические характеристики, полученные при определении линейности, правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности соответствовали установленным критериям приемлемости аналитической методики определения азорубина. Результаты испытаний по оценке повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Оценка повторяемости методики

Растворы с ожидаемой концентрацией азорубина	Среднее значение измеренной концентрации азорубина (n=6)	SD	RSD, %	ε, %	95%-доверительный интервал
10 мкг/мл	10,00 мкг/мл	0,04	0,41%	0,02%	(9,97-10,03)
0,5 мкг/мл	0,50 мкг/мл	0,00	0,28%	0,85%	(0,499-0,501)
5 нг/мл	4,98 нг/мл	0,05	0,94%	0,42%	(4,94-5,02)

Таблица 4. Оценка внутрилабораторной прецизионности методики

Растворы с ожидаемой концентрацией азорубина	Аналитик 1, среднее значение измеренной концентрации азорубина (n=6)	Аналитик 2, среднее значение измеренной концентрации азорубина (n=6)	Общее среднее значение, %	SD	RSD, %	ε, %	95%-доверительный интервал
10 мкг/мл	10,00 мкг/мл	10,00 мкг/мл	10,00	0,05	0,47%	0,01%	(9,973-10,027)
0,5 мкг/мл	0,50 мкг/мл	0,50 мкг/мл	0,50	0,00	0,61%	0,82%	(0,498-0,502)
5 нг/мл	4,98 нг/мл	5,03 нг/мл	5,00	0,06	1,13%	0,04%	(4,968-5,032)

Для проверки устойчивости/робастности методики хроматографировали свежеприготовленный стандартный раствор азорубина и после его хранения в стеклянной колбе, в защищенном от света месте в течение суток при температуре $5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Стабильность вышеупомянутых растворов оценивали путем сравнения площадей пиков азорубина после их хроматографирования. Согласно полученным результатам испытываемые растворы и стандартные образцы азорубина были стабильны в течение 7 суток при вышеописанных условиях.

2.2 Валидация методики количественного определения IgG человека методом УВЭЖХ

Для оценки пригодности хроматографической системы стандартный образец IgG с концентрацией 10 мкг/мл и 1 мкг/мл хроматографировали пятикратно. По полученным результатам оценки пригодности хроматографической системы было подтверждено соответствие рекомендованным нормам.

Результаты оценки специфичности методики представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты оценки специфичности методики

	Стандартный образец	Испытуемый раствор	Совпадение, %
Rt ₁ , мин	2,306	2,305	99,96%
Rt ₂ , мин	2,307	2,303	99,83%
Rt ₃ , мин	2,307	2,304	99,87%

При измерениях линейной зависимости на флуориметрическом и диодно-матричном детекторах значения коэффициентов корреляции составили $r=0,999$ (диапазон концентраций от 0,8 мкг/мл до 12 мкг/мл), что соответствовало требованию не менее 0,998, и значения у-intercept в процентах на 100% рабочей концентрации составили соответственно 0,55% и 0,12%, что соответствовало требованию $\leq 2\%$. Можно сделать вывод о том, что аналитическая методика количественного определения IgG является линейной в диапазоне применения аналитической методики.

Правильность количественного определения IgG для средней величины каждого из трех определений (для рабочих концентраций 1,0 и 10 мкг/мл) находилось в диапазоне от $100\pm 2\%$. Теоретическое значение соотношения «найдено/введено» (100%) укладывалось в рассчитанный 95%-доверительный интервал. RSD значений соотношения «найдено/введено» при $n=9$ не превышало 2,0 %.

Аналитическая область валидируемой методики составила от 80 до 120% от рабочей концентрации IgG (1,0 и 10 мкг/мл).

Статистические характеристики, полученные при определении линейности, правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности соответствуют установленным критериям приемлемости аналитической методики определения IgG. Результаты испытаний по оценке повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики представлены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6. Оценка повторяемости методики

Растворы с ожидаемой концентрацией IgG	Среднее значение измеренной концентрации IgG (n=6), мкг/мл	SD	RSD, %	ϵ , %	95%-доверительный интервал
Флуориметрический детектор					
10 мкг/мл	10,02	0,13	1,33	0,20	(9,91-10,13)
1 мкг/мл	1,00	0,02	1,68	0,25	(0,99-1,01)
Диодно-матричный детектор					
10 мкг/мл	9,96	0,05	0,46	0,39	(9,92-10,00)
1 мкг/мл	0,99	0,01	0,64	0,74	(0,98-1,00)

Таблица 7. Оценка внутрिलाбораторной прецизионности методики

Растворы с ожидаемой концентрацией IgG	Аналитик 1, среднее значение измеренной концентрации IgG (n=6), мкг/мл	Аналитик 2, среднее значение измеренной концентрации IgG (n=6), мкг/мл	Общее среднее значение, мкг/мл	SD	RSD, %	ε, %	95%-доверительный интервал
Флуориметрический детектор							
10 мкг/мл	10,02	9,89	9,95	0,12	1,17	0,47	(9,88-10,02)
1 мкг/мл	1,00	0,99	0,99	0,02	1,53	0,51	(0,98-1,00)
Диодно-матричный детектор							
10 мкг/мл	10,03	10,00	9,98	0,04	0,38	0,18	(9,95-10,01)
1 мкг/мл	0,99	0,99	0,99	0,01	0,88	0,63	(0,98-1,00)

Для проверки робастности методики определяли стабильность испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения IgG. Хроматографировали свежеприготовленные растворы и после хранения в стеклянной колбе, в защищенном от света месте в течение суток при температуре $5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Согласно полученным результатам испытуемые растворы были стабильны в течение 7 суток хранения при температуре $5 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Для проверки устойчивости/робастности методики также исследовали полноту экстракции. В испытании рассматривали 9 типов картриджей с различными материалами фильтров и центрифугирование. Согласно полученным результатам было сделано заключение о том, что для пробоподготовки образцов необходимо использовать только центрифугирование со скоростью не менее 2800 об/мин в течение 15 мин, фильтрация через шприцевые фильтры неприменима вследствие сорбции IgG на материале фильтра и несоответствия критериям приемлемости.

2.3 Результаты валидации процесса приготовления растворов азорубина и IgG с помощью разработанной микрофлюидной системы

Валидация разработанного автоматизированного технологического процесса получения последовательных разбавлений веществ с помощью микрофлюидной системы проводилась с использованием образцов трех серий модельной смеси №1 - водных растворов азорубина и модельной смеси №2 - водно-спиртовых растворов IgG человека, приготовленных в разные дни, с целью доказательства, что процесс (в пределах установленных параметров) обладает повторяемостью и приводит к ожидаемым результатам при получении растворов требуемой концентрации. Критерием приемлемости для приготовленных растворов является отклонение концентрации определяемого вещества, не превышающее 5% (согласующееся с критерием однородности дозирования лекарственных форм по ГФ 13). Полученные результаты представлены ниже (табл. 8-11).

Таблица 8. Результаты количественного определения азорубина методом УВЭЖХ в последовательных разбавлениях (день приготовления 1).

Наименование образцов водных растворов азорубина (расчетная концентрация)	Измеренная концентрация, мкг/мл	Среднее значение концентрации, мкг/мл	SD	RSD, %	Кратность последовательного разбавления вещества (практическая)
исходный раствор азорубина (50000 мкг/мл)	49607	не применимо			
раствор 1 азорубина (5000 мкг/мл)	4839	4942	91	1,8	10
	4979				10
	5009				10
раствор 2 азорубина (50 мкг/мл)	48,56	49,4	0,7	1,5	100
	50,00				100
	49,58				101
раствор 3 азорубина (0,5 мкг/мл)	0,491	0,490	0,002	0,4	99
	0,488				102
	0,492				101
раствор 4 азорубина (0,005 мкг/мл)	0,00492	0,005	0,00005	1,1	100
	0,00484				101
	0,00482				102

Таблица 9. Результаты количественного определения азорубина методом УВЭЖХ в последовательных разбавлениях (день приготовления 2).

Наименование образцов водных растворов азорубина (расчетная концентрация)	Измеренная концентрация, мкг/мл	Среднее значение концентрации, мкг/мл	SD	RSD, %	Кратность последовательного разбавления вещества (практическая)
исходный раствор азорубина (50000 мкг/мл)	50175	не применимо			
раствор 1 азорубина (5000 мкг/мл)	5078	5112	34	0,7	10
	5111				10
	5146				10
раствор 2 азорубина (50 мкг/мл)	50,50	51,2	0,7	1,3	101
	51,76				99
	51,41				100
раствор 3 азорубина (0,5 мкг/мл)	0,50	0,51	0,01	1,1	101
	0,51				101
	0,51				101
раствор 4 азорубина (0,005 мкг/мл)	0,00496	0,005	0,0002	2,9	101
	0,00526				97
	0,00514				99

Таблица 10. Результаты количественного определения IgG человека методом УВЭЖХ в последовательных разбавлениях (день приготовления 1).

Наименование образцов водно-спиртовых растворов IgG (расчетная концентрация)	Измеренная концентрация, мкг/мл	Среднее значение концентрации, мкг/мл	SD	RSD, %	Кратность последовательного разбавления вещества (практическая)
раствор 1 IgG (1000 мкг/мл IgG)	1010	1022	43	4,2	10
	986				10
	1069				9
раствор 2 IgG (10 мкг/мл)	10,2	10,2	0,4	3,5	99
	9,8				101
	10,5				102
раствор 3 IgG (0,1 мкг/мл)	0,100	0,101	0,005	4,5	102
	0,097				101
	0,106				99

Таблица 11. Результаты количественного определения IgG человека методом УВЭЖХ в последовательных разбавлениях (день приготовления 2).

Наименование образцов водно-спиртовых растворов IgG (расчетная концентрация)	Измеренная концентрация, мкг/мл	Среднее значение концентрации, мкг/мл	SD	RSD, %	Кратность последовательного разбавления вещества (практическая)
раствор 1 IgG (1000 мкг/мл)	975	1016	47	4,6	10
	1067				9
	1007				10
раствор 2 IgG (10 мкг/мл)	9,8	10,2	0,4	3,5	100
	10,5				102
	10,2				99
раствор 3 IgG (0,1 мкг/мл)	0,099	0,101	0,003	2,5	99
	0,104				101
	0,101				101

Полученные результаты измерений трех серий последовательных десятикратного и стократных разбавлений азурбина и IgG (приготовлено по три серии в один день и по три серии в другой день) соответствовали критерию приемлемости – отклонения концентраций веществ в каждом растворе не более 5%. Таким образом, при проведении валидации процесса приготовления последовательных водных разведений азурбина (низкомолекулярного вещества) и водно-спиртовых разведений IgG (высокомолекулярного вещества) были получены данные, доказывающие возможность получения воспроизводимых результатов (приготовление растворов с необходимой концентрацией) на автоматизированной микрофлюидной системе.

2.5 Результаты измерений методикой контроля качества РА форм антител к ИФН гамма методом малоуглового светорассеяния лазерного света

Результаты измерений представляли собой спектры распределения доли (в процентах) дисперсных фаз (плотностных неоднородностей), детектируемых в образцах лактозы моногидрата, растворенных в воде с пониженным содержанием дейтерия, от их общего количества по размерам в интервале 0,5–140 мкм. Все результаты для исследуемых растворов были получены с учетом вычитания исходного фонового сигнала (фильтрованного н-гексана). Измерения проводились в трех повторах (n=3). Было выявлено, что во всех исследуемых растворах преобладали размеры частиц дисперсной фазы от 12 до 50 мкм, но значения коэффициентов экстинкции (ϵ) разных исследуемых образцов отличались. Причем значения коэффициентов экстинкции (ϵ) для каждого исследуемого образца не менялись со временем в течение 7 минут детектирования, то есть растворы были стабильны.

Были рассчитаны проценты отличий коэффициентов экстинкции (ϵ) РА форм антител к ИФН гамма от ϵ соответствующих контролей (табл. 12), которые варьировали от 4,4% до 10,5%.

Таблица 12. Отличия (в процентах) коэффициентов экстинкции (ϵ) препарата (двух серий) от ϵ контролей, измеренных в разные дни.

Серии образцов препарата	Отличие (в %) ϵ препарата от ϵ контролей:	
	интактной лактозы	лактозы, насыщенной растворителем, используемом в приготовлении препарата
1.1	8,7	4,4
	10,5	8,1
2.1	6,3	4,4
	7,6	4,5

Отличия между группами препаратов двух серий и соответствующих контролей в значениях коэффициентов экстинкции были показаны по результатам статистической обработки данных (различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$).

Таким образом, было подтверждено, что данная аналитическая методика позволяет идентифицировать образцы лактозы моногидрата, насыщенные раствором РА антител к ИФН гамма, так как выявляет отличие данных образцов от всех других вспомогательных веществ/технологических примесей – лактозы моногидрата, насыщенной в тех же условиях растворителем, используемом для приготовления раствора РА антител к ИФН гамма, и от лактозы моногидрата, используемой при их производстве. Причем данная зависимость сохраняется при смене в производственном процессе серии исходной интактной (сырьевой) лактозы моногидрата, а также при смене способа приготовления РА форм антител к ИФН гамма для насыщения моногидрата лактозы: традиционного (регламентированного действующей нормативно-технической документацией) или с использованием автоматизированной микрофлюидной системы.

2.6 Результаты исследования *in vitro* противовирусной активности раствора РА форм антител к ИФН гамма человека, произведенного с использованием автоматизированной микрофлюидной системы

Исследована противовирусная активность раствора РА форм антител к ИФН гамма, приготовленного с помощью микрофлюидной системы, и зафиксирован высокий уровень ингибирования репродукции вируса гриппа под действием тестируемого препарата, сравнимый с таковым для Осельтамивира карбоксилата (табл. 13).

Таблица 13. Противовирусная активность образцов в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа A/California/04/09(H1N1)pdm09

Экспериментальная группа	% ингибирования вирусной репродукции (от клеточного контроля)	
	Доза вируса 1 БОЕ/кл	Доза вируса 0,1 БОЕ/кл
Раствор РА форм антител к ИФН гамма	100% **	100% *
Плацебо	9,8%	27,7%
Осельтамивир карбоксилат	100% **	100% *
Вирусный контроль	0%	0%

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой плацебо; ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой плацебо; результаты представлены в виде % и нормированы на соответствующие клеточные контроли.

Так были продемонстрированы статистически значимые отличия между раствором РА форм антител к ИФН гамма и плацебо (** $p < 0,001$ для множественности инфицирования 1 БОЭ/кл; * $p < 0,05$ для 0,1 БОЭ/кл). Значения 9,8% и 27,7%, полученные для плацебо (по сравнению с вирусным контролем), были статистически не значимы и лежали ниже 30%, считающимися порогом для выявления противовирусной активности. Получение таких значений для плацебо было обусловлено фактором разбавления питательной среды, определяющей жизнеспособность клеток MDCK.

Практические рекомендации.

Разработанная автоматизированная микрофлюидная система может применяться для приготовления последовательных разбавлений активных субстанций химического и биологического происхождения в водных и водно-спиртовых растворах, а также использоваться (при небольшой корректировке алгоритмов работы системы) для автоматической пробоподготовки водных и водно-спиртовых растворов необходимой концентрации хорошо растворимых органических или неорганических веществ (для более вязких растворов нужна дополнительная корректировка алгоритмов работы установки).

Перспективы дальнейшей разработки темы.

Разработанная автоматизированная методика приготовления последовательных разбавлений антител к ИФН гамма для получения РА форм антител к ИФН-гамма с помощью микрофлюидной системы в перспективе может быть использована для получения других РА

препаратов, а также производства других препаратов, содержащих малые и сверхмалые концентрации веществ.

Разработанная методика контроля качества РА форм антител к ИФН гамма методом LALLS служит основой для более расширенных исследований оценки пригодности данного метода для определения подлинности РА форм антител к ИФН гамма, а также АФИ других препаратов, содержащих РА формы различных антител, и возможности в перспективе внедрения вышеописанного метода в систему контроля качества данных препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Разработана автоматизированная микрофлюидная система приготовления последовательных разбавлений активной фармацевтической субстанции (АФС).
2. Разработана и валидирована методика контроля качества автоматизированной микрофлюидной системы приготовления АФС на модельной субстанции – азорубине (метод УВЭЖХ). Достоверность результатов доказана путем установления специфичности, линейности, правильности, повторяемости и устойчивости методики.
3. Разработана и валидирована методика контроля качества автоматизированной микрофлюидной системы приготовления АФС на модельной субстанции – IgG человека (метод УВЭЖХ). Результаты валидационных испытаний (специфичность, линейность, правильность, повторяемость, устойчивость методики), соответствовали требуемым критериям приемлемости.
4. С помощью валидированных аналитических методик количественного определения азорубина и IgG была успешно валидирована разработанная автоматизированная микрофлюидная система приготовления РА форм антител к ИФН гамма.
5. Разработана LALLS (малоугловое светорассеяние лазерного света) методика контроля качества РА форм антител к ИФН гамма, приготовленных с использованием автоматизированной микрофлюидной системы и нанесенных на лактозу моногидрат. В исследуемых образцах зарегистрированы самоорганизующиеся дисперсные фазы (плотностные неоднородности) определенных размеров и выявлены отличия размерных распределений в препарате и контролях.
6. Проведено исследование *in vitro* противовирусной активности раствора РА форм антител к ИФН гамма человека, приготовленного с использованием разработанной автоматизированной микрофлюидной системы. Раствор РА форм антител к ИФН гамма человека обладал противовирусной активностью, что подтвердило правильность и эффективность процедуры приготовления РА форм антител к ИФН гамма с помощью автоматизированной микрофлюидной системы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Изучение возможности применения метода малоуглового рассеяния лазерного света для определения подлинности активного фармацевтического ингредиента анаферона детского / **М.В. Никифорова**, Е.В. Успенская, А.В. Сыроешкин // Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – Т.20, № 5 – С. 107-112.
2. Результаты исследования влияния анаферона детского на жизненный цикл вируса гриппа А/Н1N1 in vitro / А.Г. Емельянова, **М.В. Никифорова**, Е.С. Дон, Н.Р. Махмудова, И.Н. Фалынскова, Е.А. Глубокова, Н.В. Петрова, Е.А. Горбунов, С.А. Тарасов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т.62, №3. – С. 87-94.
3. Разработка и валидация методики кинетической оценки растворения лекарственной субстанции топирамат методом лазерной дифракции света / Е.В. Успенская, А.А. Кешишян, **М.В. Никифорова**, Т.В. Плетенева, А.В. Сыроешкин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – Т.23, №2. – С. 38-42.
4. Polarimetric research of pharmaceutical substances in aqueous solutions with different water isotopologues ratio / A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva, E.V. Uspenskaya, O.V. Levitskaya, M.A. Tribot-laspierre, I.A. Zlatsky, N.A. Khodorovich, **M.V. Nikiforova**, S.A. Zaytseva // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2018. – V.10, №5. – P. 243-248.
5. Mechanical Transformation of Compounds Leading to Physical, Chemical, and Biological Changes in Pharmaceutical Substances / A.V. Syroeshkin, E.V. Uspenskaya, T.V. Pleteneva, M.A. Morozova, I.A. Zlatsky, A.M. Koldina, **M.V. Nikiforova** // The Scientific World Journal. – 2018. – V.2018. – P. 1-8.
6. Use of Piezoelectric Immunosensors for Detection of Interferon-Gamma Interaction with Specific Antibodies in the Presence of Released-Active Forms of Antibodies to Interferon-Gamma / E. Don, O. Farafonova, S. Pokhil, D. Barykina, **M. Nikiforova**, D. Shulga, A. Borshcheva, S. Tarasov, T. Ermolaeva, O. Epstein // Sensors. – 2016. – V.96, №16. – P. 1-10.
7. Исследование растворимости фармацевтических субстанций после механической активации методом лазерной дифракции / А.Д. Кузнецова, Е.В. Анфимова, **М.В. Никифорова** // VII Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего»: сб. статей. – Санкт-Петербург. – 2017. – С. 701-704.
8. Лекарственные препараты на основе релиз-активных антител / А.В. Сыроешкин, **М.В. Никифорова**, А.М. Колдина, А.А. Горнак, И.В. Тарабрина // Справочник поликлинического врача – 2018. – №3. – С. 25-30.
9. Control of water solutions properties through the isotope ratio D/H [Электронный ресурс] / E.V. Uspenskaya, A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva, **M.V. Nikiforova**, D.P. Shulga, D.V. Barykina, E.V. Anfimova // Eleventh Annual Conference on the Physics, Chemistry and Biology of Water: сайт. –

Sofia, Bulgaria. – 2016. – URL: <http://www.waterconf.org/participants-materials/2016/posters/> (дата обращения: 21.01.2019). – Текст: электронный.

10. Исследование активного фармацевтического ингредиента в препарате анаферон детский спектральными методами / Д.В. Барыкина, Д.П. Шульга, **М.В. Никифорова** Е.С. Дон, А.В. Тарасов, А.А. Борщева, Е.С. Алинкина, С.А. Тарасов // XXIII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: сб. статей. – Москва. – 2016. – С. 218.

11. Разработка иммуноферментного анализа для количественного определения естественных аутоантител – потенциальной эндогенной мишени влияния сверхмалых доз антител / С.А. Тарасов, **М.В. Машкина (Никифорова)**, Ю.О. Акиндинова и др. // Иммунофизиология. Естественный аутоиммунитет в норме и патологии: сб. статей. – Москва. – 2008. – С. 203-205.

12. Release-active antibodies are innovative antibodies-based drugs: new way to quality assessment / E.S. Don, V.V. Grechenko, S.E. Pokhil, A.A. Borsheva, D.V. Barykina, **M.V. Nikiforova** et al. // Global Biotechnology Congress. – Boston, MA, USA. – 2015. – P. 60.

13. Masked anti-interferon (IFN) gamma autoantibodies in human plasma samples / W. van der Meide, S. Tarasov, **M. Mashkina (Nikiforova)** et al. // World Immune regulation meeting. – Davos, Switzerland. – 2011. – P. 156.

Список используемых сокращений:

АФИ – активный фармацевтический ингредиент

БОЕ – бляшкообразующая единица

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФН – интерферон

ЛС – лекарственное средство

РА – релиз-активный

УВЭЖХ – ультра высокоэффективная жидкостная хроматография

ФСБ - фосфатно-солевой буфер

IgG – иммуноглобулин G человека

LALLS – Low-Angle Laser Light Scattering, метод малоуглового рассеяния лазерного света

MDCK – Madin Darby canine kidney, перевиваемая культура клеток почки собаки

RSD – относительное стандартное отклонение

SD – стандартное отклонение

TFA – Trifluoroacetic acid, трифторуксусная кислота

ϵ - относительная погрешность