

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Туренко Владислав Николаевич

**Стандартизация и контроль качества миРНК-содержащего препарата для лечения новой
коронавирусной инфекции**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Смирнов Валерий Валерьевич

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Эпидемиология, патогенез и терапия COVID-19.....	14
1.2. Использование механизма интерференции рибонуклеиновых кислот в терапии различных заболеваний	15
1.2.1. Механизм интерференции рибонуклеиновых кислот	15
1.2.2. Дизайн, получение и химические модификации малых интерферирующих рибонуклеиновых кислот	16
1.2.3. Основные факторы, ограничивающие эффективность терапии малыми интерферирующими рибонуклеиновыми кислотами	18
1.2.4. Системы доставки	19
1.2.4.1. Липосомы и липидные наночастицы	22
1.2.4.2. Полимерные наночастицы.....	23
1.2.4.3. Системы доставки на основе пептидов	24
1.2.4.4. Неорганические наночастицы.....	26
1.2.4.5. Использование pH-чувствительных и радиосенсибилизирующих наночастиц	26
1.2.5. Нежелательные лекарственные реакции.....	27
1.2.6. Клинический успех препаратов малых интерферирующих рибонуклеиновых кислот	28
1.3. Подходы к стандартизации и контролю качества препаратов малых интерферирующих рибонуклеиновых кислот	31
1.3.1. Подходы к стандартизации и контролю качества малой интерферирующей рибонуклеиновой кислоты	31
1.3.2. Подходы к стандартизации и контролю качества систем доставки.....	32
1.4. Выводы к главе обзор литературы	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
2.1. Объекты исследования	35
2.2. Идентификация активной фармацевтической субстанции и вспомогательного вещества методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием	38
2.3. Идентификация вспомогательного вещества методом инфракрасной спектрометрии	38
2.4. Определение остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием	38

2.4.1. Приготовление растворов для проведения анализа и валидации методики определения ацетонитрила в полупродуктах активной фармацевтической субстанции и вспомогательного вещества	39
2.4.2. Приготовление растворов для проведения анализа и валидации методики определения N,N-диметилформамида в полупродукте вспомогательного вещества	40
2.5. Идентификация, количественное определение и анализ чистоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием	41
2.5.1. Идентификация, количественное определение и анализ чистоты активной фармацевтической субстанции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием	41
2.5.2. Приготовление растворов для проведения анализа и валидации методики для активной фармацевтической субстанции	42
2.5.3. Идентификация, количественное определение и анализ чистоты вспомогательного вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием	43
2.5.4. Приготовление растворов для проведения анализа и валидации методики для вспомогательного вещества	43
2.6. Идентификация активной фармацевтической субстанции методом электрофореза в агарозном геле	44
2.7. Определение содержания ионов натрия и калия в растворителе для приготовления раствора для ингаляций методом атомно-абсорбционной спектроскопии	45
2.7.1. Приготовление растворов для определения содержания ионов натрия	46
2.7.2. Приготовление растворов для определения содержания ионов калия	46
2.8. Определение содержания фосфат-ионов в растворителе для приготовления раствора для ингаляций методом спектрофотометрии в видимой области	47
2.9. Оценка степени мутности раствора для ингаляций методом турбидиметрии	48
2.10. Валидация аналитических методик	48
2.11. Выводы к главе материалы и методы	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	50
3.1. Стандартизация и контроль качества активной фармацевтической субстанции – малой интерферирующей рибонуклеиновой кислоты	50
3.1.1. Идентификация активной фармацевтической субстанции методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием и аттестация массовой доли основного вещества	50

3.1.2. Определение остаточных органических растворителей в полупродукте активной фармацевтической субстанции	54
3.1.2.1. Валидация методики определения остаточных органических растворителей в полупродукте активной фармацевтической субстанции.....	55
3.1.3. Разработка методики одновременного определения подлинности, родственных примесей и количественного определения активной фармацевтической субстанции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием	58
3.1.3.1. Валидация методики одновременного определения подлинности, родственных примесей и количественного определения активной фармацевтической субстанции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием	60
3.1.4. Определение подлинности активной фармацевтической субстанции методом электрофореза в агарозном геле	63
3.1.4.1. Валидация методики определения подлинности активной фармацевтической субстанции методом электрофореза в агарозном геле	64
3.2. Стандартизация и контроль качества вспомогательного вещества – катионного дендримерного пептида КК-46	65
3.2.1. Идентификация вспомогательного вещества методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием	65
3.2.2. Идентификация вспомогательного вещества методом инфракрасной спектроскопии и аттестация массовой доли основного вещества	67
3.2.3. Определение остаточных органических растворителей во вспомогательном веществе	68
3.2.3.1. Валидация методики определения ацетонитрила во вспомогательном веществе.....	69
3.2.3.2. Валидация методики определения N,N-диметилформамида во вспомогательном веществе	72
3.2.4. Разработка методики одновременного определения подлинности, родственных примесей и количественного определения вспомогательного вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием	77
3.2.4.1. Валидация методики одновременного определения подлинности, родственных примесей и количественного определения вспомогательного вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием	78
3.3. Контроль качества растворителя для приготовления раствора для ингаляций	83

3.3.1. Аналитическая методика испытания на катионы натрия и калия в растворителе для приготовления раствора для ингаляций методом атомно-абсорбционной спектрометрии	83
3.3.2. Аналитическая методика количественного определения фосфат-ионов	84
3.3.2.1. Валидация аналитической методики определения фосфат-ионов	85
3.4. Контроль качества раствора для ингаляций	88
3.4.1. Валидация аналитической методики определения степени мутности раствора для ингаляций	89
3.5. Выводы к главе результаты и обсуждение	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	94
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	95
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	98
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	99
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	102
ПРИЛОЖЕНИЕ А	114
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	116
ПРИЛОЖЕНИЕ В	118
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	122
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	123
ПРИЛОЖЕНИЕ Е	124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Семейство Coronaviridae включает ряд возбудителей, способных вызывать у человека тяжелые поражения органов дыхания, в том числе относящийся к роду β -коронавирусов SARS-CoV-2. Вирус восходит к энзоотическим коронавирусам рукокрылых, природный резервуар которых широко представлен в странах Азии, в том числе в Китае. Вспышка тяжелой острой респираторной инфекции, вызванная этим ранее неизученным вирусом, была зарегистрирована в декабре 2019 года в городе Ухань (КНР). Впоследствии заболевание, получившее название COVID-19, в короткие сроки распространилось далеко за пределы Китая и приобрело характер наиболее смертоносной пандемии со времен пандемии испанского гриппа 1918 года, жертвами которой стали более 50 млн человек.

Согласно данным Ресурсного центра по коронавирусу Университета Джонса Хопкинса (Johns Hopkins Coronavirus Resource Center), число подтвержденных случаев COVID-19 к марту 2021 года превысило 115 млн при более чем 2,5 млн смертей, а к 21 сентября 2022 года возросло до более чем 612 млн при свыше 6,5 млн летальных исходов. В ответ на распространение инфекции уже в первый год пандемии была развернута активная разработка профилактических вакцин и противовирусных лекарственных средств. Вместе с тем имевшиеся в тот период лекарственные препараты не давали требуемого терапевтического эффекта и (или) вызывали серьезные нежелательные лекарственные реакции (НЛР), что определяло острую потребность в специфических и безопасных лекарственных средствах для этиотропной терапии COVID-19.

Разработкой одного из таких препаратов в марте 2020 года занялось ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Исследования привели к созданию и последующей регистрации первого в Российской Федерации препарата, содержащего малые интерферирующие РНК (миРНК), получившего торговое название МИР 19® (МНН: Синтетическая малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота (миРНК) [двучепочечная]). Помимо действующего вещества в состав препарата входит катионный дендримерный пептид КК-46 – вспомогательное вещество, позволяющее молекулам миРНК проникать внутрь клетки и повышающее их стабильность в среде организма. Лекарственная форма препарата МИР 19® представляет собой лиофилизат для приготовления раствора для ингаляций. В качестве растворителя используется фосфатно-солевой буферный раствор. Благодаря высокой специфичности молекул миРНК к высококонсервативному участку генома вируса SARS-CoV-2 и отсутствию естественных мишеней в незараженном организме человека, препарат показал

высокую эффективность и безопасность по результатам клинических исследований. Вскоре после государственной регистрации препарат был добавлен во временные методические рекомендации по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции, версия 14 (27.12.2021), как средство для этиотропной терапии. В 2025 году были утверждены постоянные клинические рекомендации «Коронавирусная инфекция COVID-19», где также указан препарат МИР 19®, как средство этиотропной терапии. На данный момент препарат используется для применения в лечебно-профилактических учреждениях и амбулаторно. Продолжающиеся пострегистрационные исследования позволят осуществить более широкое внедрение в лечебную практику.

Создание препарата МИР 19® осуществлялось в сжатые сроки из-за острой необходимости в высокоспецифичной этиотропной противовирусной терапии, в связи с этим препарат был разработан и зарегистрирован в течение полутора лет. При этом при регистрации препарата МИР 19® были использованы методики контроля качества, хоть и обеспечивающие достоверную и надежную оценку соответствия продукции установленным требованиям, но не всегда достаточно подходящие для рутинной практики, что связано с острой нехваткой времени в условиях пандемии и сложностью объекта исследования – подобного рода препарат является первым зарегистрированным в РФ. В этой связи представляется актуальным совершенствование уже имеющихся методик контроля качества и проведение стандартизации компонентов препарата с последующей разработкой нормативной документации на активную фармацевтическую субстанцию и лекарственный препарат.

Степень разработанности темы исследования

Изучаемый в данной работе лекарственный препарат (ЛП) представляет собой первый в России миРНК-содержащий препарат, действующее вещество которого не имеет зарегистрированных структурных аналогов. Катионный дендримерный пептид КК-46, входящий в состав препарата в качестве вспомогательного вещества, также не был ранее использован в составе лекарственных препаратов. Разрабатываемые методики контроля качества и стандартизации активной фармацевтической субстанции миРНК, а также вспомогательного вещества – дендримерного пептида, и методики контроля качества лекарственного препарата МИР 19® вводятся впервые. Несмотря на первоначальное отсутствие на российском рынке препаратов на основе миРНК, на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Первого МГМУ им. И.М. Сеченова под руководством профессора Смирнова В.В. с 2014 года разрабатываются подходы к стандартизации и контролю качества препаратов на основе миРНК. Кроме того, для разработки

стандартных образцов (СО) АФС и ВВ были использованы методические подходы, также разработанные сотрудниками кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева (Г.В. Раменская, О.Ю. Щепочкина, В.И. Гегечкори).

Цель и задачи исследования

Цель исследования: разработка подходов к стандартизации и методик контроля качества компонентов первого в России миРНК-содержащего препарата МИР 19®, включая активную фармацевтическую субстанцию миРНК, вспомогательное вещество катионный дендримерный пептид КК-46, фосфатно-солевой буферный раствор, раствор для ингаляций, и составление нормативной документации на лекарственный препарат.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. На основе ретроспективного анализа данных регуляторных органов и литературных источников определить основные тенденции развития системы обеспечения качества РНК-содержащих препаратов и ЛС пептидной структуры с целью использования полученной информации для разработки методик контроля качества и стандартизации препарата.

2. Разработать методики определения подлинности миРНК, КК-46 и фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБР). Изучить основные спектральные характеристики миРНК и КК-46 (УФ-спектрометрия, ИК-спектрометрия, масс-спектрометрия).

3. Разработать и валидировать методики количественного определения миРНК, КК-46, фосфатно-солевого буферного раствора.

4. Разработать и валидировать методики определения чистоты миРНК и КК-46.

5. Разработать стандартные образцы миРНК и КК-46, охарактеризовать их качество, в том числе провести количественное определение стандартных образцов миРНК и КК-46 безэталонными методами анализа.

6. Разработать проект спецификации на лекарственный препарат МИР 19®, включая проекты спецификаций на миРНК, КК-46, фосфатно-солевой буферный раствор и восстановленный раствор для ингаляций.

Научная новизна

АФС препарата МИР 19® – синтетическая малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота (миРНК) [двухцепочечная] – не имеет зарегистрированных структурных аналогов. В отличие от ранее одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) миРНК-препаратов, в которых для таргетной доставки

преимущественно используется конъюгированный с последовательностью миРНК фрагмент GalNAc, обладающий высокой тропностью к гепатоцитам, в состав препарата МИР 19® в качестве вспомогательного вещества (ВВ) входит катионный дендримерный пептид КК-46, образующий с молекулами миРНК комплекс и способствующий улучшению фармакокинетического профиля АФС и её доставке внутрь клетки-мишени. Подобный подход к доставке молекул миРНК получил клиническое применение и одобрение регуляторным органом впервые. В связи с этим, методики стандартизации и контроля качества АФС и ВВ являются уникальными и разработаны впервые. Для контроля качества содержания остаточных органических растворителей в полупродуктах АФС и ВВ были разработаны и валидированы методики ГХ-ПИД. Количественное определение АФС и ВВ проводилось разработанными и валидированными методиками ВЭЖХ-УФ. Оценка качества ФСБР проводилась с использованием разработанных и валидированных методик ААС и СФМ. Контроль степени мутности раствора для ингаляций, получаемого при смешивании растворенных в ФСБР лиофилизатов АФС и ВВ осуществлялся разработанной и валидированной турбидиметрической методикой.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в развитии научно-методологических основ стандартизации и контроля качества для нового класса лекарственных средств – синтетических миРНК-препаратов. Исследование систематизирует и обосновывает использование современных аналитических методов для оценки подлинности и чистоты миРНК-субстанций с учетом их структурных особенностей и способа применения. При этом работа развивает теоретические представления о необходимости контроля не только АФС (миРНК), но и ВВ, катионного пептидного носителя, обеспечивающего доставку АФС в клетки.

Практическая значимость работы определяется ее непосредственной направленностью на обеспечение вывода препарата на рынок и его промышленного производства. В рамках исследования созданы и валидированы методики, включенные в нормативную документацию и спецификацию на лекарственный препарат, что обеспечило его регистрацию и серийный выпуск. Практическая ценность заключается в том, что эти методики пригодны для рутинного использования. Работа представляет собой практический пример успешной стандартизации и регистрации оригинального миРНК-препарата (МИР 19®) в Российской Федерации, что создает методологическую основу для разработки последующих препаратов данного класса. Результаты работы могут быть использованы при формировании национальных и отраслевых

рекомендаций по стандартизации РНК-содержащих препаратов, а также для обучения специалистов в области промышленной фармации и фармацевтической химии.

Методология и методы исследования

Охарактеризованные стандартные образцы активной фармацевтической субстанции и вспомогательного вещества препарата МИР 19®, а также разработанные с их использованием методики контроля качества компонентов препарата, удовлетворяют требованиям Решения Совета Евразийской экономической комиссии (ЕАЭС) от 03.11.2016 № 78 (ред. от 29.11.2024) «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Нормы содержания родственных примесей были установлены в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XV издания (ГФ РФ XV изд.) ОФС.1.1.0006. «Субстанции для фармацевтического применения» согласно пределам содержания, идентификации и квалификации родственных примесей в пептидах, полученных синтетическим путём. Количественная оценка содержания основного вещества при проведении стандартизации компонентов препарата проводилась методом внутренней нормализации в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0001. «Хроматография». Нормы содержания оставшихся после синтеза растворителей установлены в соответствии с ГФ РФ XV изд. ОФС.1.1.0008. «Остаточные органические растворители».

В работе были использованы современные физико-химические методы анализа, включая масс-спектрометрию, ИК-спектрометрию, газовую хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, атомно-абсорбционную спектрометрию, спектрофотометрию, турбидиметрию.

Расчет массовой доли основного вещества в СО проводился с помощью общепринятого метода баланса масс и включал в себя определение родственных примесей и остаточных органических растворителей.

Обработку первичных данных проводили с использованием программного обеспечения Agilent OpenLab ChemStation, Agilent Cary Win UV, Microsoft Excel.

Личный вклад автора

Автору принадлежит первостепенная роль в выборе направления исследования и методов контроля качества. Автором лично проведен информационный поиск и анализ соответствующих общих фармакопейных статей ГФ РФ, решений коллегии ЕАЭС и специализированных регуляторных руководств, включая руководства Европейского агентства

по лекарственным средствам (ЕМА) и Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), а также научных статей, посвященных стандартизации и контролю качества олигонуклеотидных препаратов, в том числе миРНК-препаратов. Выполнена разработка и оптимизация условий хроматографического разделения (ВЭЖХ) и масс-спектрометрических параметров для идентификации и оценки чистоты АФС и ВВ. Самостоятельно проведена валидация разработанных аналитических методик в соответствии с требованиями ГФ РФ XV. Проведена статистическая обработка полученных экспериментальных данных с использованием современного программного обеспечения Agilent OpenLab ChemStation, Agilent Cary Win UV, Microsoft Excel. При подготовке публикаций автору принадлежит ведущая роль в постановке цели, проведении эксперимента, анализе данных и написании текста.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты разработки методик определения подлинности миРНК, КК-46 и фосфатно-солевого буферного раствора методами электрофореза в агарозном геле, ВЭЖХ-УФ, ИК-спектрометрии, ААС и СФМ.
2. Результаты разработки и валидации методик определения чистоты, в том числе остаточных органических растворителей, и количественного определения миРНК, КК-46 и ФСБР методами ВЭЖХ-УФ, ГХ-ПИД, ААС и СФМ.
3. Комплекс разработанных научно обоснованных подходов к стандартизации и контролю качества СО миРНК и КК-46, в том числе включающий безэталоновые методы количественного определения.
4. Проекты спецификаций на миРНК, КК-46, фосфатно-солевой буферный раствор и восстановленный раствор для ингаляций, включающие идентификацию, количественное определение и определение чистоты.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует пунктам 2 и 3 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия: п. 2. «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; п. 3. «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность приведённых в диссертации данных обусловлена валидацией всех применённых аналитических методик в соответствии с требованиями ГФ РФ и решением Коллегии ЕАЭС от 17 июля 2018 года № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик для проведения испытаний лекарственных средств». Разработанные количественные методики контроля качества компонентов препарата МИР 19® методами газовой хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, атомно-абсорбционной спектрометрии, спектрофотометрии и турбидиметрии были валидированы по следующим валидационным параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость, промежуточная прецизионность), предел количественного определения, предел обнаружения, аналитическая область. При проведении валидации для определяемых количественных показателей были рассчитаны средние арифметические значения, стандартные отклонения (SD), относительные стандартные отклонения (RSD, %) и относительные погрешности (ϵ , %). Все измерения проводились с использованием современного оборудования, прошедшего своевременную поверку и зарегистрированного в Реестре средств измерений.

Основные положения и результаты исследований доложены на конгрессе IMAC 2025 (Международный конгресс по молекулярной иммунологии и аллергологии) (Москва, 2025), конгрессе IUIS 2025 (19th International Congress of Immunology) (Вена, 2025). Апробация работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 10 от 29 мая 2026 г.).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований внедрены в учебный процесс на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин «Методы фармакопейного анализа», «Специальная фармацевтическая химия», читаемых студентам по направлению подготовки 33.05.01 Фармация (акт внедрения № 868 от 20.02.2026, приложение Г), в работу НПК ФГБУ «ГНЦ Институт Иммунологии» ФМБА России (акт б/н от 05.05.2026, приложение Д) и используются в контроле качества при производстве препарата МИР 19® на базе федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-

исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов им. И.И. Мечникова» Федерального медико-биологического агентства (акт б/н от 12.05.2026, приложение Е).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена согласно тематике и плану научно-исследовательских работ кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (№ государственной регистрации: 01.2.011.68237).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 3 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science, Scopus, PubMed, 3 публикации в сборниках материалов международных научных конференций.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 124 страницах машинописного текста, содержит 37 таблиц и 22 рисунка. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной главы, выводов, списка литературы (134 наименования, из них 125 на иностранных языках).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпидемиология, патогенез и терапия COVID-19

Коронавирусная инфекция 2019 (COVID-19), – заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2, которое быстро переросло в глобальную пандемию, продемонстрировав высокую контагиозность [11,13]. Основной путь передачи — воздушно-капельный через респираторные капли и аэрозоли, образующиеся при кашле, чихании и разговоре инфицированного человека. Также возможна передача через контаминированные поверхности, хотя этот путь считается менее значимым. Вирус быстро распространялся среди населения, в том числе бессимптомными носителями, что значительно осложняло контроль над эпидемиологической ситуацией [27]. К ключевым факторам риска тяжелого течения и летального исхода относились пожилой возраст и наличие сопутствующих заболеваний, таких как сердечно-сосудистые патологии, диабет и ожирение [27].

Патогенез COVID-19 начинается с проникновения SARS-CoV-2 в клетки-мишени через рецептор ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), который широко представлен на клетках дыхательных путей, альвеолоцитах легких, эндотелии сосудов, а также клетках других органов [103]. После связывания вируса с рецептором происходит его вход в клетку, репликация и последующее высвобождение новых вирусных частиц, ведущее к гибели клетки. Основное повреждение легких связано не только с прямой вирусной цитопатией, но и с чрезмерным иммунным ответом организма, известным как "цитокиновый шторм" [60,124]. Увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО- α и др.) приводит к синдрому системной воспалительной реакции, повреждению эндотелия сосудов, нарушению микроциркуляции, тромбообразованию и развитию острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [60,124].

Терапия COVID-19 является комплексной и зависит от тяжести заболевания. При легких формах лечение симптоматическое. При среднетяжелом и тяжелом течении, особенно у пациентов из групп риска, применяются противовирусные препараты (например, ремдесивир [99], нирматрелвир/ритонавир [83]) для подавления репликации вируса. Ключевым элементом терапии тяжелых случаев, сопровождающихся гипоксией и системным воспалением, является применение глюкокортикостероидов (таких как дексаметазон [36]) для подавления воспаления. При развитии вторичных бактериальных инфекций назначаются антибиотики. Также важную роль играют антикоагулянты для профилактики и лечения тромбоэмболических осложнений [19]. Поддерживающая терапия, включая кислородную поддержку и, в критических случаях,

искусственную вентиляцию легких, остается краеугольным камнем лечения пациентов с дыхательной недостаточностью [27].

На протяжении пандемии SARS-CoV-2 непрерывно мутировал, что приводило к появлению новых вариантов (Variants of Concern, VOC). Такие штаммы, как Альфа (B.1.1.7) [45], Бета (B.1.351) [34], Гамма (P.1) [55], Дельта (B.1.617.2) [102] и, в особенности, Омикрон (B.1.1.529) и его субварианты [80,96], характеризовались повышенной трансмиссивностью и способностью частично ускользать от иммунного ответа, сформированного после предыдущей инфекции или вакцинации. Мутации в шиповидном (S) белке вируса, основном антигене, являлись основными драйверами этих изменений [80,102]. Они могли улучшать сродство вируса к рецептору ACE2, усиливая контагиозность, и изменять антигенные детерминанты, делая вирус менее "узнаваемым" нейтрализующими антителами [80]. Данный факт обуславливает необходимость постоянного эпидемиологического надзора и адаптации диагностических тестов, терапевтических стратегий и вакцин.

1.2. Использование механизма интерференции рибонуклеиновых кислот в терапии различных заболеваний

1.2.1. Механизм интерференции рибонуклеиновых кислот

В 2006 году Крейг Мелло и Эндрю Файр были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие механизма РНК-интерференции (РНКи) в 1998 году [120]. Учеными было доказано, что короткая двуцепочечная РНК (дцРНК), состоящая из порядка 20 пар нуклеотидов, в том числе малая интерферирующая РНК (миРНК), обладает способностью эффективно индуцировать сайленсинг генов на посттранскрипционном уровне в клетках млекопитающих [78,119]. С тех пор подавление активности генов, опосредованное механизмом РНКи, стало амбициозным подходом к лечению множества заболеваний за счёт таргетного нарушения экспрессии участвующих в патогенезе белков [78]. миРНК-терапия занимает центральное место в этой области благодаря унифицированности процесса разработки, высокой специфичности последовательности к целевой мРНК и хорошей переносимости [24].

Механизм РНКи начинается в цитозоле клетки с распознавания и расщепления эндогенной или экзогенной длинной дцРНК или короткой шпильковой РНК (шРНК) ферментом Dicer, что приводит к образованию молекул миРНК длиной 19-25 пар нуклеотидов [37]. Образовавшиеся молекулы миРНК активируют РНК-индуцированный сайленсинг-комплекс (RISC), который содержит эндонуклеазу Argonaute 2 (Ago2). Ago2 отщепляет смысловую (s) цепь миРНК, оставляя антисмысловую (направляющую цепь, as), присоединенную к RISC [42].

Активированный RISC присоединяется к целевой матричной РНК (мРНК) с помощью комплементарной ей антисмысловой цепи вследствие чего происходит расщепление мРНК и нарушение трансляции белка [101]. Схематически механизм РНКи представлен на рисунке 1.

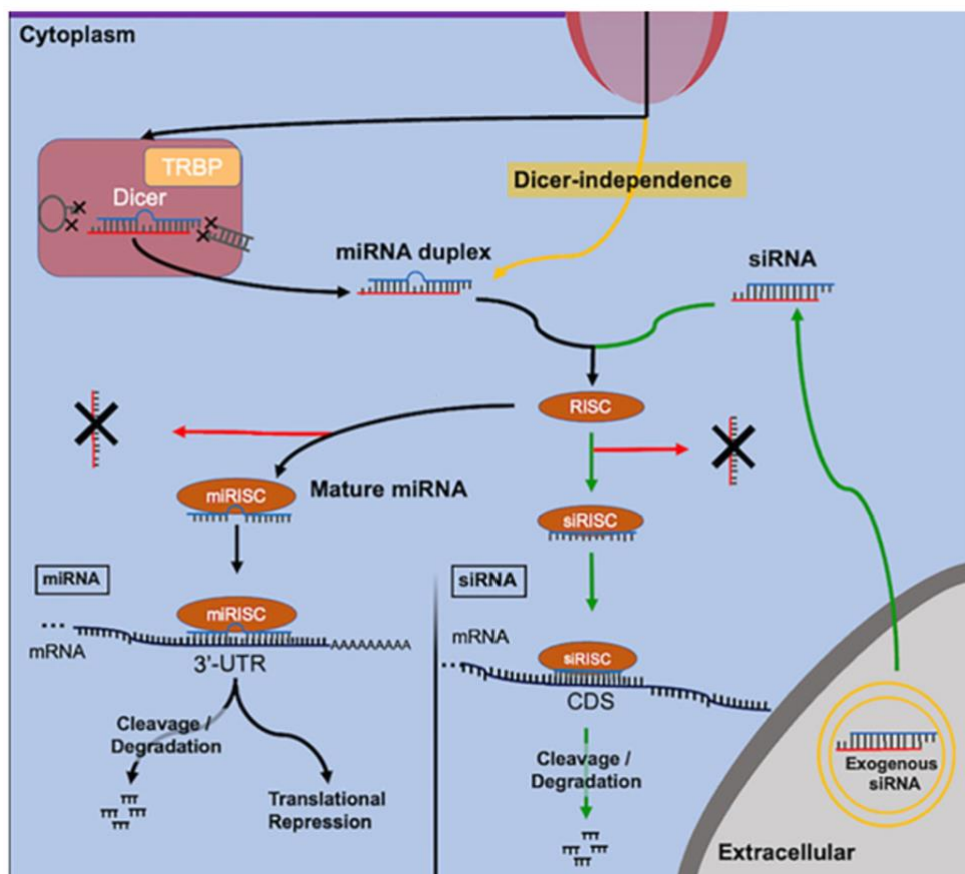


Рисунок 1 – Схематическое представление механизма РНКи [125]

1.2.2. Дизайн, получение и химические модификации малых интерферирующих рибонуклеиновых кислот

По результатам работ нескольких исследовательских групп по дизайну миРНК был сформирован ряд рекомендаций для их эффективного проектирования. Эльбашир и др. были первой группой исследователей, предложившей правила конструирования миРНК, показав, что миРНК длиной 19-21 нуклеотидов с двумя нуклеотидными выступами на 3' конце блокирует процесс трансляции. Практически все проектируемые на данный момент миРНК имеют такой размер [18,39,41,52]. Доступность для миРНК целевого участка молекулы мРНК-мишени – один из решающих факторов, определяющих ее эффективность [118]. Считается, что оптимальный сайт для нацеливания на мРНК располагается в кодирующей части мРНК (между старт и стоп кодонами), на расстоянии 50-100 нуклеотидов от стартового кодона, поскольку вблизи него связываются многие белки, регулирующие транскрипцию и трансляцию, тем

самым затрудняют взаимодействие миРНК с этим участком (вблизи старт-кодона) [32]. Вторичные структуры мРНК могут также влиять на эффективность миРНК [112].

В настоящее время доступно множество программных алгоритмов для проектирования структур миРНК онлайн. Эти алгоритмы основаны на нескольких правилах проектирования эффективного дуплекса миРНК. Существует два поколения программных инструментов для проектирования миРНК. Инструменты первого поколения позволяют конструировать миРНК согласно вышеуказанным правилам, в то время как инструменты второго поколения дополнительно могут предсказывать эффективность миРНК за счет учета вторичных структур целевых мРНК и термодинамической асимметрии миРНК [76].

Основным подходом к получению молекул миРНК является твердофазный синтез, представляющий собой циклический процесс, при котором нуклеотиды поочередно присоединяются к нерастворимой твердой матрице. Синтез смысловой и антисмысловой цепей миРНК (полупродуктов) происходит по отдельности. Каждый цикл синтеза включает три основных этапа: депротекция – снятие защиты с 5'-гидроксильной группы нуклеотида, связанного с твердой фазой, для последующего участия в реакции; конденсация – присоединение активированного 3'-фосфорного эфира (фосфита или фосфата) к освободившейся 5'-гидроксильной группе; кэпирование – химическая модификация непрореагировавших 5'-гидроксильных групп с целью предотвращения их участия в дальнейших циклах синтеза. В случае, если в качестве эфира используется фосфит, дополнительно проводится промежуточный этап окисления [38]. После завершения синтеза олигонуклеотид подвергается отщеплению от твердой фазы с использованием водного раствора аммиака или метиламина, а очистка полупродукта осуществляется методом препаративной анионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В настоящее время все этапы данного процесса могут выполняться с помощью автоматических синтезаторов олигонуклеотидов.

Для стабилизации дуплекса миРНК и снижения возможности активации иммунного ответа проводятся такие модификации сахаров рибозы, как 2'-О-метил (2'-OMe) и 2'-фтор (2'-F), а также добавление в последовательность фосфоротиоатов (PS) и замкнутых нуклеиновых кислот (LNA) [98]. Ковалентное связывание с конъюгатами, в частности связывание миРНК с таргетными лигандами, такими как N-ацетилгалактозамин (GalNAc), рассматривается как одна из наиболее перспективных альтернатив более простым химическим модификациям [29]. Получаемые соединения спроектированы для таргетной доставки молекул миРНК в печень посредством механизма рецептор-опосредованной интернализации в гепатоциты через асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR), что позволяет повысить специфичность доставки [115]. Химическая однородность данных конъюгатов обеспечивает возможность

масштабируемого и воспроизводимого синтеза, одновременно снижая вариабельность между сериями [115]. Модифицированные конъюгацией с GalNAc молекулы миРНК обладают меньшей иммуногенностью по сравнению с более крупными системами доставки, такими как липидные наночастицы, а также возможностью оптимизации режима дозирования. Эти факторы сыграли ключевую роль в успехе большинства одобренных FDA миРНК-препаратов, а также повлияли на активную разработку ряда кандидатных миРНК-препаратов, находящихся в данный момент на поздних стадиях клинических исследований [29,95]. Тем не менее, выраженная специфичность в отношении гепатоцитов может рассматриваться как ограничение в случаях, когда миРНК-терапия направлена на патологии, выходящие за пределы печени [64].

1.2.3. Основные факторы, ограничивающие эффективность терапии малыми интерферирующими рибонуклеиновыми кислотами

При фармацевтической разработке препаратов на основе терапевтических олигонуклеотидов к основным факторам, ограничивающим эффективность терапии, относятся низкая стабильность олигонуклеотидов в биожидкостях из-за деградации под действием нуклеаз и быстрого почечного клиренса, практически полная неспособность нативных миРНК самостоятельно проникать внутрь клетки и выходить из эндосом в цитозоль, что выражается в низкой биодоступности и недостаточном для эффективной терапии фармакокинетическом профиле, основные особенности которого рассмотрены в таблице 1 [30,31,54]. По своей структуре молекулы миРНК – это крупные молекулы (~12 кДа) анионной природы (>40 фосфодиэфирных связей) с выраженным отрицательным зарядом, из-за чего миРНК неспособны проходить через фосфолипидный бислой без помощи специального переносчика – системы доставки [30,84]. Также, в редких случаях, немодифицированные миРНК способны вызывать нецелевые эффекты (off-target эффекты) и активацию врождённого иммунитета [59,84,89].

Таблица 1 – Особенности фармакокинетики миРНК

Свойство	Низкомолекулярные вещества (НМВ)	миРНК
Молекулярная масса	~ < 900 Да	~ 14000 Да (для дуплекса)
Сайт связывания	Ядерные, внутриклеточные и внеклеточные мишени	Внутриклеточные мишени (необходимость проникновения внутрь клетки, механизм РНКи)
Путь введения	Пероральный и парентеральный	В основном внутривенный, подкожный или интраназальный (низкая биодоступность)

Продолжение Таблицы 1

Всасывание и распределение	Сильно зависят от химического строения и способа введения	Кровеносная система, органы выведения (недостаточное распределение, неспособность преодоления гистологических барьеров)
Период полувыведения	В основном до 24 ч	Минуты
Клиренс	Печеночный, почечный	Экзо- (эндо-) нуклеазы для нативных молекул, печеночный и почечный для продуктов метаболизма

После попадания в системный кровоток молекулам миРНК необходимо распределиться по кровеносной системе, избегая активации врождённого иммунитета и опосредованного нуклеазами метаболизма, проникнуть в ткани и через клеточные мембраны в цитозоль, успешно выйти из эндосом и достигнуть RISC [31]. Основополагающая концепция, предложенная Гуо и соавторами, описывает связь фармакокинетики/фармакодинамики миРНК тремя тезисами, каждый из которых связан с определенными фармакокинетическими ограничениями: «вход» включает биораспределение и поглощение клетками, к «высвобождению» относится переход молекул из эндосомальных компартментов в цитозоль, «эффективность» связана с сохранением целостности миРНК, загрузкой в RISC и предотвращением off-target эффектов или иммунологических реакций [58]. Для улучшения фармакокинетического профиля миРНК-препаратов, в том числе повышения стабильности в физиологических средах и непосредственной доставки молекул в цитозоль клеток, используют как химические модификации молекул, так и различные системы доставки.

1.2.4. Системы доставки

Для увеличения биодоступности, $t_{1/2}$ и повышения эффективности миРНК-терапии были разработаны различные системы доставки, включающие как классические наночастицы на основе липидов (например, липосомы) так и гибридные липидные наночастицы, комплексы, а также совершенно новые платформы [7,8]. Сравнительная характеристика кандидатных платформ, а также их визуализация представлены в таблице 2 и на рисунке 2 соответственно. В общем виде разрабатываемые системы доставки должны удовлетворять следующим требованиям: защищать миРНК в системном кровотоке от деградации, способствовать проникновению наночастицы/комплекса внутрь клетки и высвобождению из эндосом, избирательно высвобождать терапевтические средства вблизи мРНК-мишени, быть биоразлагаемыми, неиммуногенными, безопасными для применения [71,73,84].

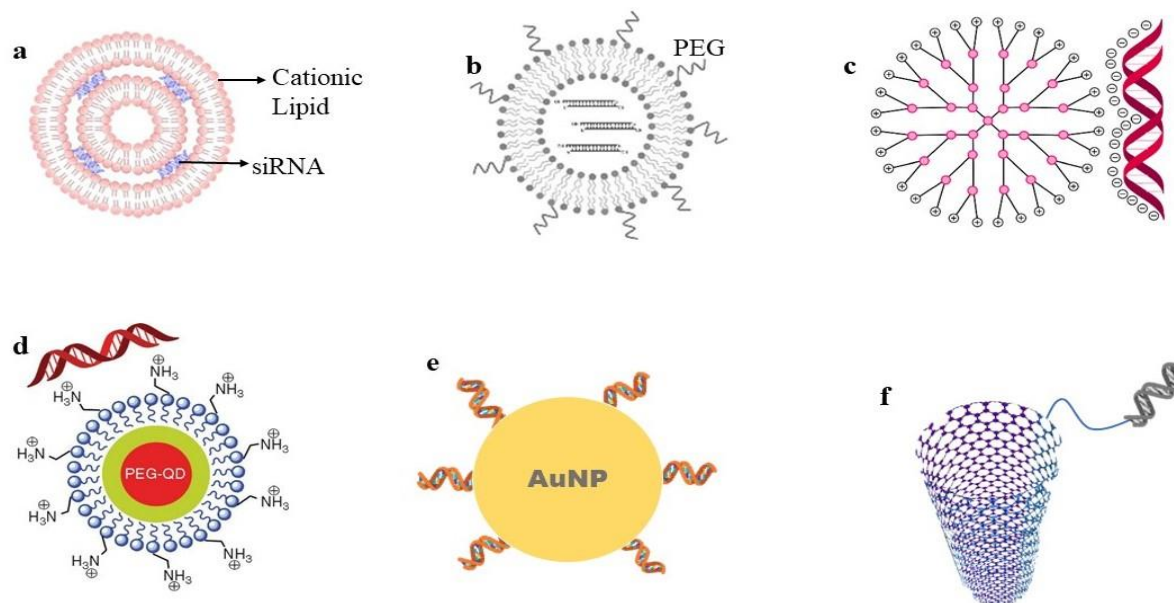


Рисунок 2 – Различные системы доставки миРНК-терапевтических средств: (а) липоплексы (катионные липидные комплексы с миРНК), (b) Модифицированные липидные наночастицы, (с) Комплекс дендример-миРНК, (d) Комплекс квантовая точка-миРНК, (е) Наночастицы золота, конъюгированные с миРНК (f) Углеродная нанотрубка, конъюгированная с миРНК [111]

Таблица 2 – Сравнительная характеристика разрабатываемых систем доставки миРНК

Система доставки	Размер частиц/комплекса	Преимущества	Недостатки	Ссылки
Липосомы	50 –200 нм	Хорошая биосовместимость и биоразлагаемость Высокая проницаемость для клеток Инкапсулируют гидрофильные, гидрофобные и амфифильные лекарственные препараты Возможность контролируемого высвобождения Модификация поверхности лигандами, такими как антитела, пептиды, аптамеры Повышают стабильность и период полувыведения лекарственных препаратов.	Умеренно нестабильны из-за возможного окисления ненасыщенных жирных кислот. Высокая стоимость производства Легко выводятся из крови моноклеарной фагоцитарной системой	[32,57,71]

Продолжение Таблицы 2

Катионные пептиды	10 – 200 нм	Легко синтезируются и модифицируются Быстро разлагаются ферментами в биологических жидкостях (хорошая биоразлагаемость) Четко выраженная молекулярная структура	Хорошая проницаемость клеточных мембран за счёт суммарного положительного заряда Биодоступность от низкой до умеренной из-за подверженности ферментативному разрушению и большой молекулярной массы	[88]
Хитозан	5 – 500 нм	Хорошая биосовместимость и биоразлагаемость Увеличенный клеточный захват Контролируемое высвобождение лекарственных средств Поверхность легко модифицируется лигандами	Потенциальная токсичность Высокая степень набухания Ограниченная стабильность Низкая биодоступность	[26]
ПЭИ	50 – 200 нм	Простота в наработке, очистке и модификации Высокая стабильность Контролируемое высвобождение лекарственного средства Поверхность может быть легко модифицирована лигандами Облегчает проникновение эндосом за счет эффекта «протонной губки»	Агрегация при высокой ионной силе Цитотоксичность	[85]
Нано-частицы золота	1 – 150 нм	Легко функционализируются лигандами Благодаря небольшому размеру хорошо усваиваются клетками	Цитотоксичность	[127]

Продолжение Таблицы 2

Углеродные нанотрубки	0.5 – 2 нм для одностенной углеродной нанотрубки 2-100 нм для многостенной углеродной нанотрубки	Способны конъюгировать большое количество разных молекул благодаря большой площади поверхности Высокая способность к загрузке лекарственного средства благодаря	Плохая растворимость, необходимость химических модификаций Потенциальная токсичность Могут привести к увеличению	[77]
		большому внутреннему объему и большой площади поверхности Возможность контролируемого высвобождения лекарственного средства Могут загружать более одного лекарственного средства Легко проникают в клетки	содержания активных форм кислорода Канцерогенный потенциал	

1.2.4.1. Липосомы и липидные наночастицы

Липосомы представляют собой пузырьки сферической формы, состоящие из одного или двух липидных слоев, с гидрофильной средой внутри [128]. Уникальные структурные свойства липосом сделали их отличным средством доставки лекарств, включая миРНК. Липосомы широко изучались в качестве системы доставки молекул миРНК из-за их способности инкапсулировать и защищать миРНК, что способствует увеличению $t_{1/2}$, а также делает доставку к мРНК-мишени более эффективной. Существует два основных типа липосом, которые широко используются для доставки миРНК; катионные и нейтральные липосомы, что определяется природой формирующих липосомы фосфолипидов [113]. Благодаря электростатическому взаимодействию между отрицательно заряженной молекулой миРНК и положительно заряженным липидом катионные липосомы могут легко соединяться с молекулами миРНК образуя единый комплекс, что повышает эффективность проникновения миРНК в клетку [22,69]. N-[1-(2,3-диолеилокси) пропил], 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан и другие катионные липиды в сочетании с нейтральными липидами, такими как холестерин, 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин и 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин, N,N,N-триметиламмоний хлорид были использованы для получения подобных комплексов. Однако, в связи с положительным зарядом катионных липосом, они легко взаимодействуют с различными клеточными структурами, что потенциально делает их

более цитотоксичными по сравнению с нейтральными липосомами [129]. Нейтральные липиды слабо связываются с клеточной мембраной из-за отсутствия суммарного положительного заряда, что снижает эффективность их усвоения клетками. Меньшая эффективность трансфекции нейтральных липидов делает их менее эффективными в доставке миРНК, чем катионные липосомы.

Липидные наночастицы относятся к одним из наиболее изученных систем доставки с подтверждённой клинической эффективностью. Первоначально разработанные для доставки антисмысловых олигонуклеотидов, липидные наночастицы в последнее время широко используются в других видах генной терапии, например, в терапии рака, а также в разработке вакцинных композиций, таких как вакцины против COVID-19 [21, 75]. Эти наночастицы состоят из липидов, как нейтральных, так и катионных, а также различных других молекул, позволяющих изменять сродство наночастиц к различным структурам в организме. Например, был предложен метод создания гибридных липидных наночастиц с использованием катионных липидов с возможностью модифицирования амфетамином для увеличения тропности к ткани мозга, а также добавления к композиции ПЭГ ко-липидов для увеличения периода полувыведения [17]. Как и в случае с липосомами, катионные липиды образуют комплексы с отрицательно заряженными молекулами миРНК, тем самым защищая их от деградации в биологической среде и обеспечивая трансфекцию в клетки [28].

Несмотря на высокий потенциал, липидные наночастицы обеспечивают доставку лишь около 2% молекул миРНК в цитоплазму, тогда как большая часть молекул остается в эндосомах и подвергается деградации. При этом ионизируемые/катионные липиды способны повреждать здоровые клетки и вызывать иммунные реакции, сопровождающиеся высвобождением цитокинов, что может привести к выраженным иммунным реакциям [97]. Кроме того, липидные наночастицы склонны к кумуляции преимущественно в печени (а также в селезёнке или почках), что ограничивает их функциональность в отношении других органов. Наконец, даже незначительные изменения размера частиц, поверхностного заряда или степени полиэтиленгликолирования (ПЭГ-илирования), возникающие при вариациях производственного процесса, существенно влияют на эффективность и профиль безопасности, что значительно осложняет масштабирование и воспроизводимость серий [110].

1.2.4.2. Полимерные наночастицы

Полимерные наночастицы получают как из природных, так и из синтетических полимеров. К данному классу можно отнести катионные полимеры, такие как циклодекстрин, хитозан, дендримеры и полиэтиленимин. Для повышения стабильности и обеспечения

направленной доставки поверхность наночастиц можно модифицировать различными лигандами.

Циклодекстрин — это природный циклический олигосахарид, состоящий из глюкозных колец, обладающий гидрофильной внешней поверхностью и гидрофобной внутренней областью [106]. Благодаря своим морфологическим особенностям и стабильности циклодекстрины привлекают большое внимание исследователей. Также, в ряде исследований циклодекстрины были использованы для доставки миРНК в сочетании с другими системами, такими как дендримеры, полиэтиленимин и наночастицы золота. Хитозан — это природный полисахарид, получаемый путем деацетилирования хитина, одного из наиболее распространённых природных полимеров [49]. Благодаря своей катионной природе, низкой токсичности и иммуногенности, а также биodeградируемости хитозан привлёк внимание исследователей как носитель для доставки миРНК в клетки [20, 72, 130]. К основным ограничениям применения хитозана можно отнести его низкую трансфекционную активность, которую можно повысить путём комбинирования с другими системами доставки, такими как полиэтиленимин [128].

Дендримеры – это симметричные, строго структурированные трёхмерные молекулы, построенные вокруг небольшого центрального ядра и содержащие функциональные группы на периферии. К наиболее часто используемым в научных исследованиях дендримерам относятся полиамидоаминовые и полипропилениминовые структуры [109]. Полиэтиленимин (ПЭИ) относится к одним из наиболее изученных катионных полимеров, применяемых для доставки фармакологически активных молекул [131]. Некоторые формы ПЭИ способствуют выходу миРНК из эндосом за счёт так называемого «эффекта протонной губки», вызывающего осмотическое набухание и разрыв эндосомальной мембраны. Благодаря высокой трансфекционной активности, ПЭИ часто комбинируют с другими полимерными наночастицами, характеризующимися низкой эффективностью трансфекции, что позволяет увеличить суммарную проникающую способность [109].

1.2.4.3. Системы доставки на основе пептидов

В качестве ещё одного подхода к доставке молекул миРНК была предложена система на основе синтетических пептидов различной структуры. При проектировании таких пептидов учитываются и используются уникальные свойства аминокислот для облегчения проникновения комплекса миРНК-пептид в клетку и последующего высвобождения миРНК из эндосом. Катионные аминокислоты, входящие в состав пептидов, электростатически связываются с отрицательно заряженными молекулами миРНК, что позволяет формировать

стабильные комплексы и способствует защите миРНК от ферментативной деградации. К основным типам пептидов, применяемых в доставке олигонуклеотидов, относятся клеточно-проникающие пептиды (КПП) и пептиды, нарушающие целостность эндосом.

КПП представляют собой короткие пептиды, состоящие из 4–40 аминокислотных остатков, способные проникать через клеточную мембрану [122]. В зависимости от аминокислотного состава КПП подразделяются на катионные и амфифильные пептиды. Катионные пептиды, содержащие остатки аргинина и лизина, обладают высокой проникающей способностью благодаря электростатическому притяжению между положительно заряженными пептидами и отрицательно заряженной клеточной мембраной. Первый катионный КПП — пептид ТАТ — был обнаружен в 1989 году в составе белка ТАТ вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [65]. С момента этого открытия исследователи спроектировали множество катионных пептидов, изменяя количество и соотношение входящих в состав катионных аминокислот — аргинина и лизина. Ряд исследований показал, что наличие аргининовых остатков повышает проницаемость КПП за счёт увеличения их сродства к клеточной мембране [89]. КПП проникают в клетки двумя основными путями — посредством эндоцитоза или прямого активного транспорта, при этом эндоцитоз считается основным механизмом проникновения. Молекулы миРНК могут связываться с КПП как ковалентно, так и нековалентно. Структура КПП может быть как линейной, так и разветвленной — дендримерной. Несмотря на высокую проникающую способность КПП, их ограниченная эффективность в обеспечении выхода из эндосом привела к разработке фузогенных пептидов или эндосом-разрушающих пептидов, идейно происходящих из белковых доменов, обладающих способностью нарушать целостность эндосомальной мембраны.

Эндосомальное высвобождение считается лимитирующим этапом в процессе доставки миРНК [50]. Поскольку большинство методов доставки основаны на механизме эндоцитоза, крайне важно, чтобы молекулы миРНК попали в цитозоль до момента их разрушения в эндосомах. Фузогенные пептиды, как правило, относятся к амфифильным пептидам, что обеспечивает им способность дестабилизировать эндосомы и способствовать высвобождению молекул миРНК [87]. Например, пептид KALA, относящийся к пептидам с эндосом-разрушающей активностью и обладающий свойствами, сходными с фузогенными пептидами, также исследуется в этом контексте. Таким образом, эндосом-разрушающие пептиды — перспективный инструмент для эффективной доставки миРНК, который, вероятно, при использовании в комбинации с другими системами доставки позволит достичь максимального эффекта.

1.2.4.4. Неорганические наночастицы

К неорганическим наночастицам относятся, в частности, металлические наночастицы (например, наночастицы золота и квантовые точки), а также углеродные нанотрубки. Особое внимание уделяется наночастицам золота благодаря их универсальности и простоте модификации поверхности. Помимо химической инертности также считается, что наночастицы золота обладают минимальной токсичностью и высокой биосовместимостью, из-за чего рассматриваются как наиболее перспективные носители для доставки миРНК из группы металлических наночастиц [43]. Квантовые точки – это полупроводниковые наночастицы с флуоресцентными свойствами, которые привлекли значительное внимание исследователей. Их уникальные оптические характеристики делают квантовые точки ценным инструментом для отслеживания доставки миРНК в режиме реального времени [42]. Подобно наночастицам золота, модификация поверхности квантовых точек с использованием тиольных групп способствует присоединению молекул миРНК.

Углеродные нанотрубки способны обеспечивать защиту и стабильность молекул миРНК. В исследовании Киркпатрика и соавт. было показано, что миРНК, связанные с одностенными углеродными нанотрубками, остаются защищёнными при воздействии рибонуклеаз: через 2 часа сохранялось около 80% исходного количества миРНК, а через 3 часа — около 70%, тогда как свободные молекулы миРНК деградировали почти полностью уже в течение одного часа [24]. Однако исходные немодифицированные углеродные нанотрубки обладают выраженной гидрофобностью, что способствует их агрегации при контакте с водными средами, приводя к низкой дисперсности и потенциальной цитотоксичности [53]. Для преодоления этих ограничений проводятся многочисленные исследования, направленные на функционализацию поверхности нанотрубок с использованием биосовместимых групп [86].

1.2.4.5. Использование pH-чувствительных и радиосенсибилизирующих наночастиц

Принцип функционирования pH-чувствительных наночастиц заключается в их способности реагировать на кислую среду эндосомально-лизосомального компартмента, где значения pH находятся в диапазоне ~6,5-4,5. При попадании в эндосомы pH-чувствительные фрагменты наночастиц подвергаются протонированию [33,40,92]. Протонирование индуцирует конформационные перестройки, в результате которых системы доставки переходят из ионизированной гидрофильной формы при физиологическом pH ($\approx 7,4$) в неионизированную гидрофобную. В результате чего происходит дестабилизация и последующее разрушение эндосомальной мембраны, что обеспечивает высвобождение миРНК в цитозоль. Важнейшим

свойством таких систем является их селективность: они остаются инертными по отношению к плазматической мембране при физиологическом pH ($\approx 7,4$), но активируются исключительно внутри эндосомальных везикул, что минимизирует цитотоксические эффекты и обеспечивает направленное высвобождение [33,40,91].

Учитывая возможность контролируемого высвобождения миРНК из наночастиц, при разработке препаратов для терапии заболеваний, сопровождающихся изменением pH представляется актуальным проводить модификации приведенных выше систем доставки, например липосом, pH-чувствительными лигандами и/или функциональными группами [90]. Например, было показано, что pH-чувствительная система на основе биоразлагаемого ПЭГ-основного геля с включением имидазола (с одновременным добавлением суперпарамагнитных наночастиц оксида железа для магнитно-резонансной визуализации) способна разлагаться при возникновении тканевого ацидоза (pH 6,7 – 7,0) за счёт ионизации имидазола, приводящей к увеличению скорости деградации гидрогеля и релизу действующего вещества [48].

Радиосенсибилизирующие системы доставки представляют собой нанотехнологическую платформу, направленную на повышение эффективности лучевой терапии (ЛТ) при лечении злокачественных новообразований [23,56]. Ограничения традиционной ЛТ связаны с ее недостаточной селективностью в отношении опухолевых клеток и развитием радиорезистентности, обусловленной активацией антиапоптотических путей [23,56]. Применение радиосенсибилизирующих препаратов в комбинации с миРНК позволяет преодолеть указанные механизмы устойчивости. Подавление через механизм РНКи экспрессии белков, например PD-L1, способствует блокированию механизмов иммунного уклонения опухоли, активируя Т-клеточный ответ и усиливая противоопухолевый иммунитет, который зачастую угнетается в ходе ЛТ [23]. Комплексное применение ЛТ с радиосенсибилизирующими препаратами и миРНК обеспечивает выраженный противоопухолевый эффект при сниженных дозах облучения, что способствует минимизации повреждения здоровых тканей и уменьшению побочных реакций [56].

1.2.5. Нежелательные лекарственные реакции

Разработка различных систем доставки помогла решить проблемы, связанные с низкой биодоступностью миРНК, и улучшить таргетную доставку. Несмотря на все преимущества миРНК-терапии, важно отметить, что применение миРНК в редких случаях может сопровождаться проявлением нежелательных лекарственных реакций. Например, миРНК могут распознаваться Toll-like рецепторами (TLRs), например TLR3 и TLR7/8, которые относятся к ключевым паттерн-распознающим рецепторам (PRRs) врожденного иммунитета [66,94].

Активация этих рецепторов запускает сигнальные каскады с участием факторов транскрипции NF- κ B и IRF, которые усиливают синтез провоспалительных цитокинов (например, IFN- α/β , TNF- α и IL-6), потенциально приводя к проявлению воспалительной реакции [10]. К другим причинам возникновения нежелательных лекарственных реакций относятся off-target эффекты, вызванные частичной комплементарностью последовательностей молекул миРНК к нецелевой мРНК, имеющей сходство с мРНК-мишенью [25]. Учитывая, что разрабатываемые на данный момент миРНК препараты представляют собой гепатонаправленные конъюгаты миРНК-GalNac, накопление препарата в печени при условии подавления нецелевых генов может привести к потенциальной гепатотоксичности [121,123].

Возможность возникновения перечисленных выше реакций подчеркивает необходимость усовершенствования подходов к проектированию молекул миРНК, включающих тщательный отбор участка целевой мРНК и дизайн последовательностей миРНК, добавление химических модификаций, например LNA или -OMe и проведение надлежащих доклинических испытаний *in vivo* для выявления потенциального off-target эффекта [79,107].

Химические модификации цепей миРНК уменьшают вероятность возникновения потенциального иммунного ответа без снижения способности к ингибированию активности целевой мРНК. Тщательно подобранные модификации «скелета» молекулы и сахаров имеют решающее значение, поскольку они не только сохраняют способность к снижению экспрессии белка и повышают стабильность миРНК в биожидкостях, но также ослабляют активацию рецепторов врожденного иммунитета, что повышает клиническую применимость терапии на основе миРНК.

1.2.6. Клинический успех препаратов малых интерферирующих рибонуклеиновых кислот

Терапевтический потенциал миРНК-препаратов подтверждается их одобрением для клинического применения регуляторными органами, главным образом FDA. Препараты продемонстрировали значительную эффективность в лечении заболеваний, для которых терапия существующими лекарственными средствами не давала необходимого терапевтического эффекта. Сводная информация по одобренным для медицинского применения миРНК-препаратам представлена в таблице 3.

По состоянию на середину 2025 года FDA зарегистрировало 7 миРНК-препаратов. Первым продуктом, получившим одобрение, был Патисиран в 2018 году. На коммерческой основе он продавался под торговой маркой ONPATTRO® компанией Alnylam. Препарат был одобрен для лечения наследственного транстиретинового амилоидоза, при этом уровень транстиретина в сыворотке крови снизился примерно на 81%, а показатели полинейропатии

значительно регрессировали в ходе исследования APOLLO, фаза III [51]. В 2019 году Гивосиран (GIVLAARI®, Alnylam) был одобрен для лечения острой печеночной порфирии, снизив частоту приступов порфирии на ~70% в ходе исследования ENVISION, фаза III и получив ускоренное одобрение FDA [93,104]. Люмасиран (OXLUMO®), одобренный в 2020 году, является средством лечения первичной гипероксалурии 1-го типа, и результаты рандомизированных контролируемых исследований подтвердили его значительную эффективность в снижении содержания оксалатов в моче [105]. Следующим на рынке в 2021 году появился Инклизиран (LEQVIO®, Novartis/Alnylam), когда он был одобрен FDA для снижения уровня ЛПНП у пациентов с семейной гиперхолестеринемией. В клиническом исследовании фазы I было отмечено расхождение между фармакокинетическими параметрами инклизирана и его фармакодинамическим воздействием на уровень ХС-ЛПНП. Благодаря избирательной доставке инклизирана в гепатоциты, где он включается в состав RISC, его действие сохраняется дольше, чем можно было бы ожидать исходя из периода полувыведения из плазмы, составляющего 9 часов [74]. Вутрисиран (AMVUTTRA®) получил одобрение FDA в 2022 году для лечения нейропатии и кардиомиопатии при амилоидозе ATTR [67]. Недосиран (РИВФЛОЗА®, Dicerna Pharmaceuticals) был одобрен для лечения первичной гипероксалурии в сентябре 2023 года и, таким образом, стал шестым миРНК-содержащим препаратом на американском рынке [117]. Последний на данный момент допущенный до клинического применения препарат Фитусиран был одобрен в 2025 году для терапии гемофилии А или В [68].

Таблица 3 – Зарегистрированные миРНК препараты в России и мире

миРНК-препарат	Год одобрения	Путь введения	Система доставки	Показание к применению
Патисиран	2018, FDA	в/в	Липидные наночастицы	Наследственный транстиретин-опосредованный амилоидоз [51]
Гивосиран	2019, FDA	п/к	GalNAc	Острая печеночная порфирия [104]
Люмасиран	2020, FDA	п/к	GalNAc	Первичная гипероксалурия 1-го типа [105]
Инклизиран	2021, FDA; Министерство здравоохранения Российской Федерации	п/к	GalNAc	Первичная гиперхолестеринемия [74]

Продолжение Таблицы 3

МИР 19®	2021, Министерство здравоохранения Российской Федерации	Ингаляционный	Катионный дендримерный пептид	COVID-19 [108, 126]
Вутрисиран	2022, FDA	п/к	GalNAc	Наследственный транстиретин- опосредованный амилоидоз [67]
Недосиран	2023, FDA	п/к	GalNAc	Первичная гипероксалурия 1-го типа [117]
Фитусиран	2025, FDA	п/к	GalNAc	Гемофилия А или Б [68]

Количество других миРНК-содержащих препаратов, находящихся на поздних стадиях клинических исследований, превышает 50. В качестве примеров можно привести Зилебесиран для лечения гипертензии (фаза 2: NCT06272487, NCT06423352) [15, 134], Олпасиран (фаза 3: NCT05581303)[123] и Зерласиран (SLN360) (фаза 2: NCT05537571) [47], нацеленные на снижение сердечно-сосудистого риска через контроль уровня липопротеина А и аполипопротеинов, RBD1016 для лечения гепатита В (фаза 2: NCT05961098) [14] и STP705 (фаза 2: NCT04669808), двойная миРНК против TGF- β 1 и ЦОГ-2 в пептидных наночастицах для лечения базально-клеточной карциномы [81]. В ходе исследования 2-й фазы препарат Леподисиран (LY3819469) (еще один препарат, снижающий уровень липопротеина А, модифицированный GalNAc), снижал показатели сердечно-сосудистого риска более чем на 94% при самой высокой испытанной дозе [70]. Недавно компания Arrowhead Pharmaceuticals опубликовала данные о других кандидатных миРНК-препаратах, например, ARO-INHBE и ARO-ALK7, разработанных для лечения метаболических заболеваний, а также о SRSD107, первом ингибиторе фактора XI (NCT06116617) [12]. Анализируя приведенную выше информацию, можно сделать вывод, что за последние годы спектр патологий, для которых была предложена миРНК-терапия, расширился и дополнился, в том числе, комплексными хроническими заболеваниями, чему способствовала разработка новых систем доставки (конъюгаты GalNAc, пептидные носители или гибридные наночастицы) и усовершенствованных химически модифицированных последовательностей миРНК.

Растущее с каждым годом количество зарегистрированных оригинальных миРНК препаратов, а также препаратов, находящихся на поздних стадиях клинических исследований, свидетельствует о большом интересе крупных фармацевтических и биофармацевтических компаний к разработке и дальнейшему продвижению миРНК-препаратов.

1.3. Подходы к стандартизации и контролю качества препаратов малых интерферирующих рибонуклеиновых кислот

1.3.1. Подходы к стандартизации и контролю качества малой интерферирующей рибонуклеиновой кислоты

За последние годы в странах, в которых лекарственные препараты на основе терапевтических олигонуклеотидов становятся всё более востребованными, ведётся активная разработка регламентирующей качество нормативной документации. В 2024 году Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) опубликовало проект руководства по разработке и производству синтетических олигонуклеотидов, в котором в общем виде систематизированы основные подходы к контролю качества [46]. В то же время в документах FDA, посвящённых терапевтическим олигонуклеотидам, практически отсутствуют сведения о надлежащем контроле их качества [132,133]. Подлинность зарубежных препаратов подтверждают путем установления нуклеотидной последовательности, наличия химических модификаций и определения молекулярной массы для индивидуальной цепи миРНК с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения, в том числе времяпролетной масс-спектрометрии (ВП-МС) и tandemной масс-спектрометрии (МС/МС), а при необходимости – спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Для препаратов миРНК также рекомендуется проводить контроль полноты образования дуплекса миРНК методами гель-электрофореза, ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ (ИП-ОФ-ВЭЖХ) и определением характерной температуры плавления. Количественное содержание рекомендуется определять методом ВЭЖХ или капиллярного электрофореза. К родственным примесным соединениям молекул миРНК относятся укороченные или удлиненные олигонуклеотидные последовательности $n-1$ или $n+1$, продукты деградации, которые предлагается определять методом ИП-ОФ-ВЭЖХ. Поскольку молекулы миРНК получают преимущественно синтетическим путем, необходимо осуществлять контроль за содержанием остаточных органических растворителей методом ГХ, а также иных связанных с процессом синтеза неолigonуклеотидных примесей (фосфорамидиты, реагенты окисления, снятия защитных групп, противоионы) [46,133]. Стоит отметить, что приведенные выше подходы к стандартизации и контролю качества терапевтических олигонуклеотидов упоминаются в зарубежных руководствах без четкого и подробного описания соответствующих методологий, поэтому, для их воспроизведения необходима разработка и валидация методик контроля качества с использованием упомянутых методов.

Согласно публикациям, посвященным контролю качества терапевтических олигонуклеотидов, в том числе миРНК препаратов, применяемые методы для оценки

подлинности, чистоты и количественного определения АФС в основном включают ИП-ОФ-ВЭЖХ с использованием С18. В качестве ИП реагентов используют смеси ГФИП и различных органических аминов (диэтиламин, триэтиламин) для лучшего разделения АФС и родственных примесей. Однако, при использовании МС-детекторов с «мягкими» типами ионизации, ИП реагенты снижают эффективность ионизации, что делает метод менее чувствительным и не позволяет детектировать единичные примеси, нижний предел количественного определения для которых будет ниже предела чувствительности [82]. В качестве альтернативного метода разделения была предложена жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий, в которой в качестве неподвижной фазы используется полярный сорбент, и, в отличие от НФ хроматографии, полярная подвижная фаза, как и в случае ОФ хроматографии. К преимуществам данного подхода можно отнести более высокую чувствительность, чем при использовании ИП реагентов, но при этом разрешение между пиками примесей ухудшается [116].

В Российской Федерации контроль качества терапевтических олигонуклеотидов, в частности препаратов на основе малых интерферирующих РНК, регулируется общими нормами Государственной фармакопеи РФ (ГФ РФ) и Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Стоит отметить, что в нормативных документах РФ или ЕАЭС нет специализированного руководства или отдельных норм для терапевтических олигонуклеотидов, поэтому их контроль качества в общем виде должен удовлетворять требованиям 78 решения ЕАЭС "О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения", включая общие критерии идентификации, чистоты и количественного определения.

1.3.2. Подходы к стандартизации и контролю качества систем доставки

Учитывая, что спектр рассматриваемых на данный момент кандидатных систем очень широк (включая как органические, так и неорганические частицы), для каждой конкретной системы необходимы свои подходы как к стандартизации, так и к контролю качества [8]. Например, при использовании липидных наночастиц дополнительно определяют размер частиц и индекс полидисперсности методом динамического светорассеяния (ДСР), дзета-потенциал и эффективность инкапсуляции методом ВЭЖХ [114]. Полимерные наночастицы характеризуют по эффективности инкапсуляции миРНК, профилю её высвобождения и степени биodeградируемости. Эффективность высвобождения миРНК *in vitro* обычно оценивают методом диализа, при этом для pH-чувствительных систем ожидаемое высвобождение составляет более 50 % в течение 24 ч при pH 5,5. Биodeградируемость полимерного носителя определяют по изменению молекулярной массы методом гель-проникающей хроматографии

[44,100]. Неорганические наночастицы (на основе золота, оксида железа и углеродных нанотрубок) контролируют по размеру частиц с использованием сканирующей или просвечивающей электронной микроскопии (SEM/TEM), поверхностному заряду, степени загрузки миРНК и отсутствию агрегации в физиологических средах, которую оценивают методом динамического светорассеяния (DLS) в фосфатно-солевом буфере [16,35].

В связи с расширением применения синтетических пептидов в качестве лекарственных средств и систем адресной доставки терапевтических олигонуклеотидов вопросам нормативного регулирования в сфере контроля их качества уделяется все большее внимание. В Европейском союзе требования к контролю качества синтетических пептидов основаны на положениях руководств ЕМА и документами Международного совета по гармонизации (ICH), которые используются при разработке спецификаций на синтетические лекарственные вещества. FDA придерживается аналогичного подхода и рекомендует использовать указанные руководства ICH при разработке и регистрации синтетических пептидов, рассматривая их как химически синтезируемые лекарственные вещества. В отличие от терапевтических олигонуклеотидов специализированного руководства ЕМА или FDA, посвященного исключительно контролю качества синтетических пептидов, в настоящее время не разработано. Согласно рекомендациям ЕМА и FDA, подлинность синтетических пептидов подтверждают путем установления аминокислотной последовательности, определения молекулярной массы и, при необходимости, пространственной структуры с использованием ВЭЖХ, МС/МС. Количественное содержание и содержание основного компонента определяют преимущественно методом ВЭЖХ, при необходимости – капиллярным электрофорезом. Особое внимание уделяют контролю родственных примесей, включающих укороченные и удлиненные пептидные последовательности, продукты неполного синтеза, окисления, дезамидирования, гидролиза, рацемизации и агрегации, которые преимущественно определяют методом ОФ-ВЭЖХ [61, 62, 63].

Для катионного дендримерного пептида (система доставки в МИР 19®), рассматриваемого как субстанция синтетического пептида, требования по чистоте изложены в ОФС.1.1.0006 «Субстанции для фармацевтического применения», согласно которой порог контроля родственных примесей составляет 0,1 %, порог идентификации – 0,5 %, а порог квалификации – 1,0 %, что соответствует аналогичным требованиям Европейской фармакопеи, изложенным в главе 2034 "Substances for Pharmaceutical Use" [1].

1.4. Выводы к главе обзор литературы

Анализ литературы подтверждает актуальность применения механизма РНКи в клинической практике и тенденцию к увеличению числа терапевтических олигонуклеотидов, как в мире, так и в Российской Федерации, что свидетельствует о необходимости разработки методологических подходов к стандартизации и контролю качества компонентов препарата.

Проведенный анализ ключевых руководств, систематизация актуальных требований регуляторных органов Российской Федерации и Евразийского экономического союза, а также Европейского союза, предъявляемых к методам контроля качества миРНК-содержащих препаратов и терапевтических олигонуклеотидов, выявили ограниченность существующих подходов.

Выявлены несовершенства действующих регуляторных документов. На данный момент нормативная документация содержит, в основном, общее описание методов и подходов к контролю качества терапевтических олигонуклеотидов без учета возможной специфики препаратов, включая различные системы доставки и лекарственные формы. В связи с этим разработка специализированных методик, позволяющих всесторонне оценить качество конкретного препарата, является крайне актуальной.

Активная фармацевтическая субстанция (АФС) исследуемого препарата представлена лиофильно высушенной двуцепочечной (дуплекс) миРНК siRk 12. Дуплекс миРНК образован смысловой и антисмысловой цепями длиной 22 нуклеотида, взаимодействующими между собой посредством водородных связей между комплементарными основаниями и формирующими 19 пар нуклеотидов [7]. Индивидуальные цепи (полупродукты) для получения АФС синтезируются твердофазным методом с последовательным наращиванием смысловой и антисмысловой цепей. Последовательности смысловой (S) и антисмысловой (AS) цепей АФС представлены в однобуквенном коде в направлении 5'-3'. При этом заглавные буквы соответствуют РНК-нуклеотидам, строчные — ДНК-нуклеотидам, а LNA-нуклеотиды обозначены в скобках со знаком «+» (например, (+G)):

AS цепь: UUCAACAGAACUUCCUUCC(+T)(+T)t

Образующийся дуплекс миРНК характеризуется структурой с выступами на 3' концах цепей, приведенной на рисунке 3.

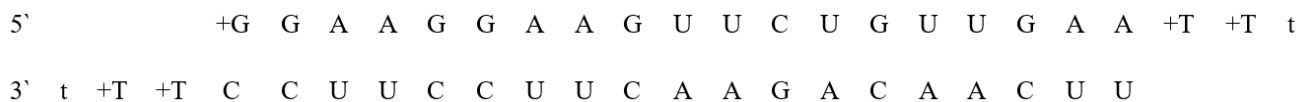


Рисунок 3 – Двухпочечная структура АФС в однобуквенном коде

В процессе получения АФС синтезированные и очищенные индивидуальные цепи объединяются в дуплекс на основе принципа комплементарности, в результате чего формируются двуцепочечные молекулы миРНК, представляющие собой АФС [7].

В процессе получения полупродуктов АФС могут образовываться различные группы примесей, в том числе «недостроенные» олигонуклеотидные фрагменты, фрагменты РНК с депурированными основаниями и фрагменты с частично сохранными защитными группами. «Недостроенные» олигонуклеотидные фрагменты формируются на стадии конденсации, вследствие чего образуются РНК-фрагменты с последовательностью меньшей длины ($n-1 \dots n-21$). Образование примесей, содержащих депурированные основания, обусловлено отщеплением пуриновых оснований от рибозного кольца нуклеотида, что приводит к снижению молекулярной массы соответствующих индивидуальных цепей относительно заданного значения [7]. Кроме того, на стадии деблокирования может

происходить неполное удаление защитных групп с азотистых оснований вследствие недостаточной эффективности реакции. В результате формируются олигонуклеотидные цепи с сохранившимися защитными группами, молекулярная масса которых превышает теоретическое значение для полупродуктов, и как следствие для АФС.

Для улучшения фармакокинетических характеристик АФС, увеличения периода ее полувыведения из организма и повышения эффективности доставки миРНК в пораженные клетки применяется вспомогательное вещество (ВВ). В качестве ВВ используется лиофильно высушенный синтетический катионный дендримерный пептид КК-46 [8]. Данный пептид синтезируется твердофазным методом путем наращивания аминокислотной цепи, структурная формула пептида изображена на рисунке 4.

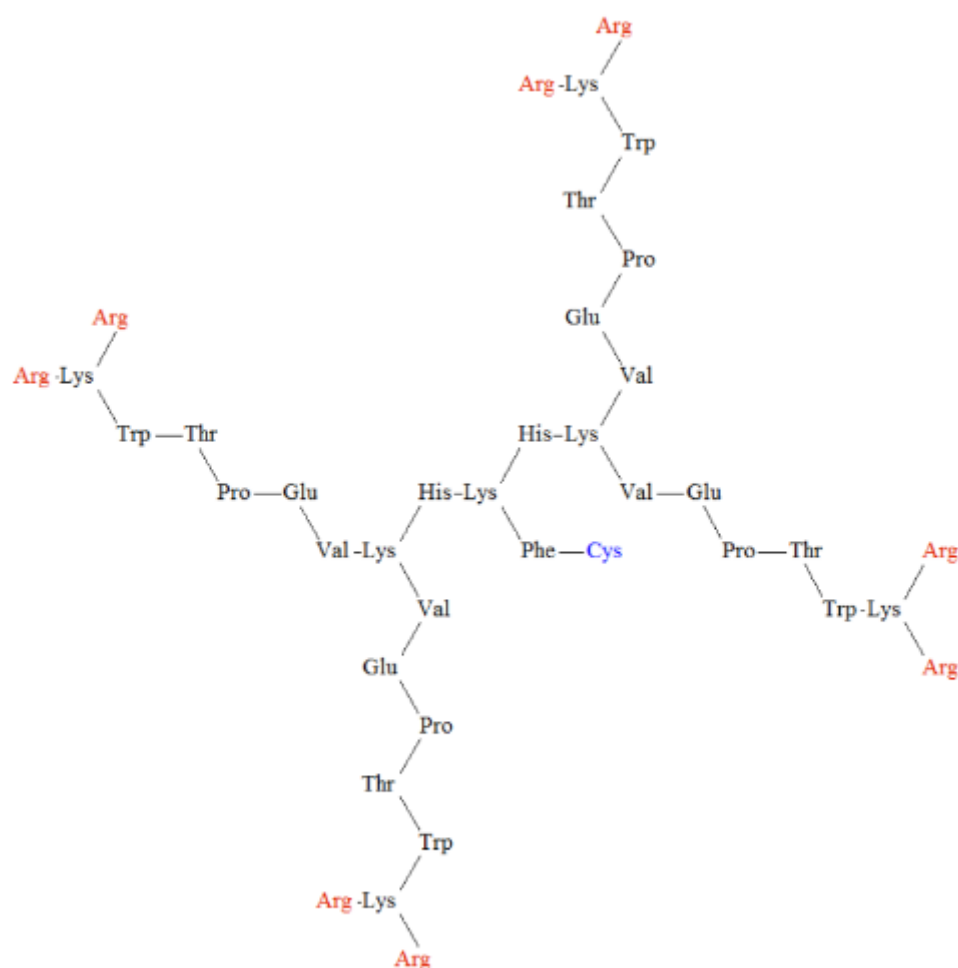


Рисунок 4 – Структурная формула катионного дендримерного пептида КК-46 в трехбуквенном формате

Как на стадии синтеза, так и в процессе хранения ВВ возможно образование пептидов, структура которых не полностью соответствует заданной структуре ВВ и которые относятся к родственным примесям. Наличие в структуре ВВ имидазольных, индольных, гидроксильных,

тиольных и гуанидиновых фрагментов обуславливает возможность протекания побочных реакций, приводящих к образованию продуктов замещения, присоединения и окисления.

Лекарственный препарат МИР 19® (МНН: Синтетическая малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота (миРНК) [двухцепочечная]) выпускается в виде лиофилизата, предназначенного для приготовления раствора для ингаляций. Препарат включает 4 флакона:

Флакон 1: лиофилизат АФС, белый аморфный порошок или пленка на флаконе, содержание миРНК 0,088 мг.

Флакон 3: лиофилизат ВВ, белый или желтоватый аморфный порошок или пористая масса в виде таблетки, содержание КК-46 1,762 мг.

Флаконы 2 и 4: растворитель для АФС и ВВ – ФСБР, прозрачный, бесцветный раствор. Содержание натрия хлорида – 8 мг, натрия фосфорнокислого двузамещенного додекагидрата и калия фосфорнокислого однозамещенного – 3,58 мг и 0,24 мг соответственно, калия хлорида – 0,2 мг, воды для инъекций – до 1 мл.

Для приготовления восстановленных растворов в каждый индивидуальный флакон с лиофилизатом добавляют растворитель из соответствующего флакона. Полученные бесцветные и прозрачные восстановленные растворы АФС и ВВ смешивают, в результате образуется опалесцирующий раствор для ингаляций. Степень опалесценции идентифицируется как качественный признак образования комплекса миРНК:ВВ. Структура образующегося комплекса схематически представлена на рисунке 5.



Рисунок 5 – Схематическое представление структуры комплекса миРНК:катионный дендримерный пептид

2.2. Идентификация активной фармацевтической субстанции и вспомогательного вещества методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием

Масс-спектрометрический анализ испытуемых образцов проводили методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием (МАЛДИ-ВП-МС) на спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Сбор и обработку полученных данных осуществляли с использованием программ FlexControl v3.0 и Bruker Compass v1.2. В качестве матрицы при МАЛДИ-масс-спектрометрическом анализе образцов АФС использовали 3-гидроксипиколиновую кислоту (3-НРА) в сочетании с диаммонийцитратом (DAC), для анализа образцов КК-46 использовали насыщенный раствор α -циано-оксикоричной кислоты (НССА) в смеси ацетонитрила и 0,1% водного раствора трифторуксусной кислоты (7/3) [7,8].

2.3. Идентификация вспомогательного вещества методом инфракрасной спектрометрии

Регистрацию ИК-спектров ВВ проводили в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) на ИК-Фурье-спектрометре. Образец пептида КК-46 массой 1 мг наносили на матрицу и фиксировали прижимным устройством. Однолучевой спектр регистрировали в диапазоне $4000\text{--}650\text{ см}^{-1}$ [8].

Идентификацию полос поглощения проводили с учетом их положения, ширины и относительной интенсивности с последующим отнесением к соответствующим структурным фрагментам молекулы на основании справочных данных.

2.4. Определение остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием

Определение содержания остаточных органических растворителей в испытуемых образцах АФС и ВВ выполняли методом газовой хроматографии. Исследование проводили на газовом хроматографе Agilent 7890B с пламенно-ионизационным детектором и парофазным пробоотборником Agilent 7697A (Agilent Technologies, США). В качестве подвижной фазы использовали азот. Разделение компонентов осуществляли на кварцевых капиллярных колонках DB-ALC1 и DB-ALC-2 (Agilent Technologies, США) размером $30\text{ м} \times 0,32\text{ мм} \times 1,80\text{ мкм}$ [7,8].

2.4.1. Приготовление растворов для проведения анализа и валидации методики определения ацетонитрила в полупродуктах активной фармацевтической субстанции и вспомогательного вещества

Приготовление ацетатного буферного раствора pH 5 (растворитель). В химический стакан вместимостью 100 мл помещали навеску натрия хлорида 0,87 г и натрия ацетата тригидрата 0,34 г, прибавляли 80 мл воды очищенной и перемешивали содержимое на магнитной мешалке до полного растворения. Уксусной кислотой корректировали pH полученного раствора до 5,0. Полученный раствор помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и водой очищенной доводили его объем до метки. Раствора фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм, собирая фильтрат во флакон вместимостью 100 мл, укупориваемый завинчивающейся крышкой.

Приготовление раствора СО ацетонитрила. Точную навеску ацетонитрила (400 мг) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, в которую предварительно вносили 10 мл ацетатного буферного раствора pH 5, после чего доводили объем тем же растворителем до метки и тщательно перемешивали. Аликвоту полученного раствора объемом 10,0 мл переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, разбавляли тем же растворителем до метки и тщательно перемешивали. Содержание ацетонитрила в приготовленном растворе СО составляло 0,04 %, что эквивалентно 400 ppm.

Для приготовления калибровочных растворов ацетонитрила 1; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,0 мл полученного раствора СО ацетонитрила помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводили объем содержимого растворителем до метки, перемешивали. Для проведения ГХ анализа 0,5 мл полученного раствора помещали во флакон Headspace вместимостью 20 мл, укупоривали. В качестве холостого раствора был использован ацетатный буферный раствор pH 5.

Приготовление испытуемого раствора. 100 мкл раствора (0,004 мг/мл для АФС и 0,1 мг/мл для ВВ) анализируемого образца переносили в пустой флакон на 20 мл, добавляли 400 мкл воды дистиллированной, закрывали и перемешивали.

Основные условия хроматографирования представлены в таблице 4.

Таблица 4 – ГХ-параметры для оценки содержания остаточных органических растворителей (ацетонитрила) в субстанциях АФС и ВВ

Газ-носитель	Азот ОСЧ, марка 6.0, 99,9999%
Скорость потока	7,6 мл/мин
Температура испарителя	110°C
Деление потока	1:10
Температуры термостата колонки	40°C

Продолжение Таблицы 4

Время термостатирования	4 мин
Инжектируемый объем	100 мкл
Детектор	ПВД
Температура детектора	250°C
Параметры Headspace	
Время инкубации	7 мин
Температура инкубации	70°C
Температура петли	70°C
Температура трансферной линии	90°C
Скорость перемешивания	18 встряхиваний/мин
Ускорение	60 см/с ²

2.4.2. Приготовление растворов для проведения анализа и валидации методики определения N,N-диметилформамида в полупродукте вспомогательного вещества

Приготовление раствора СО N,N-диметилформамида (СО ДМФА). ДМФА в количестве 440 мг (точная навеска) переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл с предварительно внесенными в нее 10 мл ацетатного буферного раствора pH 5. Объем раствора доводили тем же растворителем до метки и тщательно перемешивали. Из полученного раствора отбирали 10,0 мл, помещали их в мерную колбу вместимостью 100 мл, после чего разбавляли тем же растворителем до метки и тщательно перемешивали. Концентрация ДМФА в приготовленном стандартном растворе составила 0,044 %, что соответствует 440 ppm.

Для приготовления калибровочных стандартных растворов 1; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,0 мл полученного раствора СО ДМФА помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводили объем содержимого растворителем до метки, перемешивали. Для проведения ГХ анализа 0,5 мл полученного раствора помещали во флакон Headspace вместимостью 20 мл, укупоривали. В качестве холостого раствора был использован ацетатный буферный раствор pH 5.

Приготовление испытуемого раствора. 100 мкл раствора (0,004 мг/мл для АФС и 0,1 мг/мл для ВВ) анализируемого образца переносили в пустой флакон на 20 мл, добавляли 400 мкл воды дистиллированной, закрывали и перемешивали.

Основные условия хроматографирования представлены в таблице 5.

Таблица 5 – ГХ-параметры для оценки содержания остаточных органических растворителей (ДМФА) в субстанции ВВ

Газ-носитель	Азот ОСЧ, марка 6.0, 99,9999%
Скорость потока	7,3 мл/мин
Температура испарителя	140°C
Деление потока	1:5
Температуры термостата колонки	40°C
Время термостатирования	4 мин

Продолжение Таблицы 5

Инжектируемый объем	100 мкл
Детектор	ПВД
Температура детектора	250°C
Параметры Hsadspace	
Время инкубации	7 мин
Температура инкубации	70°C
Температура петли	70°C
Температура трансферной линии	90°C
Скорость перемешивания	18 встряхиваний/мин
Ускорение	60 см/с ²

2.5. Идентификация, количественное определение и анализ чистоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием

Разработку хроматографических методик и анализ проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC PROMINENCE-20 с УФ-детектором, включавшем модули СТО-20АС (кат. № 228-45010-58), SPD-20А (кат. № 228-45003-58), СМВ-20А (кат. № 228-45012-58), LC-20АD (кат. № 228-45000-58) и SIL-20АС (кат. № 228-45007-58) [7].

2.5.1. Идентификация, количественное определение и анализ чистоты активной фармацевтической субстанции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием

Хроматографическое разделение осуществляли на обращённо-фазовой колонке ODS C18 250 × 4,6 мм с размером частиц 5 мкм. В качестве элюентов использовали 0,05 М раствор ацетата аммония (фаза А) и 0,05 М раствор ацетата аммония в 50 % водном ацетонитриле (фаза В) [7]. Программа элюирования приведена в таблице 6.

Для приготовления подвижных фаз и исследуемых растворов применяли ацетонитрил качества «HPLC-grade» (Merck, кат. № 1.00030.2500), воду очищенную (ГФ РФ, ФС.2.2.0020.18) и ацетат аммония качества «х.ч.» (Panreac, кат. № 631-61-8). Подвижные фазы перед использованием фильтровали на вакуумной системе Supelco через нейлоновые фильтры ZarCar-CR с размером пор 0,45 мкм (кат. № 10443423). Оптимальными условиями разделения являлись температура колонки 30 °С, скорость потока 1,0 мл/мин и длина волны детектирования 254 нм. Температуру ячейки поддерживали на уровне 2–8 °С, объём вводимой пробы составлял 20 мкл [7].

Таблица 6 – Градиентный режим элюирования для АФС

Т, мин	А %	В %
0,00	100	0
5,00	100	0
7,00	80	20
20,00	40	60
21,00	40	60
23,00	100	0
25,00	100	0

2.5.2. Приготовление растворов для проведения анализа и валидации методики для активной фармацевтической субстанции

Приготовление 5 М ацетата аммония. В мерную колбу вместимостью 500 мл вносили 193,0 г ацетата аммония, доводили водой до метки и перемешивали.

Приготовление подвижной фазы А (0,05 М аммония ацетат, элюент А). Раствор 5 М аммония ацетата объемом 10 мл переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, разбавляли водой до метки и перемешивали. Фильтрование полученного элюента осуществляли с помощью системы вакуумной фильтрации через нейлоновую мембрану с размером пор 0,45 мкм, после чего его переносили в емкость. Срок хранения раствора при температуре $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$ не превышал 14 дней с момента приготовления.

Приготовление подвижной фазы В (0,05 М раствор аммония ацетата в 50 % водном ацетонитриле, элюент В). Для приготовления элюента 10 мл 5 М раствора аммония ацетата помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл и разбавляли до метки 50 % раствором ацетонитрила, представляющим собой смесь 500 мл воды и 500 мл ацетонитрила для ВЭЖХ. Полученный раствор пропускали через нейлоновую мембрану с размером пор 0,45 мкм с использованием системы вакуумной фильтрации, после чего переносили в емкость. Элюент допускалось хранить при температуре $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$ не дольше 14 дней с момента приготовления.

Приготовление растворов испытуемого образца АФС. Случайным способом от партии отбирали 30 флаконов. Из них отбирали 10 флаконов. К содержимому выбранных 10 флаконов АФС (0,088 мг) добавляли по 700 мкл подвижной фазы А и перемешивали до полного растворения.

Приготовление раствора СО миРНК. В каждую из трех пробирок, содержащих по 0,8 мг СО миРНК, вносили по 1,5 мл подвижной фазы А, после чего содержимое встряхивали в течение 10 с. Растворы из всех пробирок (по 1,5 мл) количественно объединяли в одной мерной колбе вместимостью 10 мл, разбавляли подвижной фазой А до метки и тщательно перемешивали. Концентрация СО миРНК в приготовленном стандартном растворе составила 0,24 мг/мл.

Калибровочные стандартные растворы готовили в пробирках вместимостью 2 мл, внося в каждую из них аликвоту полученного раствора СО миРНК и растворитель в следующих объемах (раствор СО миРНК + растворитель): 0,1 + 1,9 мл, 0,25 + 1,75 мл, 0,50 + 1,5 мл, 0,75 + 1,25 мл, 1,0 + 1,0 мл и 1,20 + 0,8 мл. Холостым раствором служил ФСБР из флакона № 2.

2.5.3. Идентификация, количественное определение и анализ чистоты вспомогательного вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием

Для одновременного определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания пептида КК-46 в качестве неподвижной фазы была использована колонка C18 Sunfire размером 150,0 мм × 4,6 мм с размером частиц 3,5 мкм и размером пор 100Å. В качестве подвижной фазы А применялся 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, в качестве подвижной фазы В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в метаноле, элюирование проводилось в градиентном режиме. Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин, температура колоночного отделения – 55°C, объем вводимой пробы – 10 мкл, длина волны детектирования – 214 нм [8].

2.5.4. Приготовление растворов для проведения анализа и валидации методики для вспомогательного вещества

Приготовление подвижной фазы А (0,1% водный раствор муравьиной кислоты, элюент А). Муравьиную кислоту объемом 1,0 мл переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводили до метки водой очищенной и перемешивали. Фильтрование полученного элюента осуществляли с помощью системы вакуумной фильтрации через нейлоновую мембрану с размером пор 0,45 мкм, после чего его переносили в емкость. Срок хранения раствора при температуре от 15 до 25 °C составлял один месяц.

Приготовление подвижной фазы В (0,1% раствор муравьиной кислоты в метаноле, элюент В). Муравьиную кислоту объемом 1,0 мл переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, разбавляли метанолом для ВЭЖХ до метки и перемешивали. Фильтрование полученного элюента осуществляли с помощью системы вакуумной фильтрации через нейлоновую мембрану с размером пор 0,45 мкм, после чего его переносили в емкость. Срок хранения раствора при температуре от 15 до 25 °C составлял один месяц.

Приготовление испытуемых растворов. Случайным способом от партии отбирали 30 флаконов. Из них отбирали 10 флаконов. К содержимому выбранных 10 флаконов пептида КК-46 (1,762 мг) добавляли по 1760 мкл воды очищенной и перемешивали до полного растворения.

Приготовление раствора СО ВВ с концентрацией 2,0 мг/мл. К 10,0 мг СО-КК-46, находящимся в пробирке, прибавляли 5,0 мл воды очищенной и встряхивали в течение 10 с. Концентрация СО ВВ в приготовленном стандартном растворе составила 2,0 мг/мл. Раствор применяли непосредственно после приготовления.

Приготовление раствора для теста пригодности системы (SST). В пробирку с 1,0 мг СО-КК-46 прибавляли 1,5 мл воды очищенной, после чего содержимое встряхивали в течение 10 с. Полученный раствор в объеме 1,5 мл количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, разбавляли водой до метки и перемешивали. Концентрация приготовленного стандартного раствора составила 0,1 мг/мл.

Калибровочные стандартные растворы готовили в пробирках вместимостью 2 мл, внося в каждую из них аликвоту полученного раствора СО ВВ и растворитель в следующих объемах (раствор СО ВВ + растворитель): 0,1 + 1,9 мл, 0,25 + 1,75 мл, 0,50 + 1,5 мл, 0,75 + 1,25 мл, 1,0 + 1,0 мл и 1,20 + 0,8 мл. Холостым раствором служил ФСБР из флакона № 2.

2.6. Идентификация активной фармацевтической субстанции методом электрофореза в агарозном геле

Электрофорез испытуемых образцов миРНК проводили в горизонтальной электрофоретической камере (Helicon). Для приготовления геля были использованы агароза (Sigma-Aldrich, кат. № 3643), вода деионизованная (ПанЭко) и 25× ТАЕ-буфер (ПанЭко), а для визуализации нуклеиновых кислот – раствор бромид этидия концентрацией 500 мкг/мл (Sigma). Подготовку образцов к нанесению проводили с использованием 5×буфера (ПанЭко). Регистрацию результатов электрофореза выполняли на системе Gel Doc XR (Bio-Rad) [7].

Приготовление раствора сравнения. В пробирку, содержащую 0,4 мг СО миРНК, добавляли 1,0 мл деионизированной воды, встряхивали в течение 10 секунд. Переносили полученный раствор с помощью пипетки в пробирку объемом 5 мл. Добавляли в пробирку 3,0 мл деионизированной воды, перемешивали.

Приготовление испытуемого раствора. К содержимому флакона АФС (0,088 мг) добавляли 1000 мкл деионизированной воды, перемешивали до полного растворения. В качестве холостого раствора был использован буфер из флакона №2.

Для получения 2%-ного агарозного геля 2,0 г агарозы растворяли в 100 мл 1× ТАЕ-буфера. Рабочий раствор ТАЕ-буфера предварительно готовили путем 25-кратного разбавления

исходного 25×ТАЕ-буфера деионизированной водой. Полученный раствор нагревали на водяной бане до температуры +70 °С до полного растворения агарозы. Добавляли в расплавленную агарозу раствор бромид атидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл (объем рассчитывали с учетом исходной концентрации реактива и объема трис-ацетатного буфера, используемого для приготовления агарозного геля) и перемешивали, после чего заливали расплавленную агарозу в заливочный столик на ровной поверхности. Устанавливали гребенку и остужали при комнатной температуре до полного застывания геля.

Застывший агарозный гель помещали в камеру для электрофореза, извлекали гребенку и заливали камеру трис-ацетатным буфером (1х буфер приготовлен из 25х ТАЕ буфера разбавлением деионизированной водой в 25 раз). Смешивали 5 мкл раствора стандартного образца с 2 мкл буфера для нанесения образцов (1х буфер приготовлен из 5х буфера для нанесения образцов разбавлением деионизированной водой в 5 раз) в одной микропробирке типа эппендорф, 5 мкл испытуемого образца смешивали с 2 мкл буфера для нанесения образцов (1х буфер приготовлен из 5х буфера для нанесения образцов разбавлением деионизированной водой в 5 раз) в другой микропробирке и вносили в разные лунки геля.

2.7. Определение содержания ионов натрия и калия в растворителе для приготовления раствора для ингаляций методом атомно-абсорбционной спектроскопии

Для определения содержания ионов натрия и калия в ФСБР был использован атомно-абсорбционный спектрометр (ААС) с пламенной атомизацией (ТОО «Кортэк» (Россия), «Квант-2А» (Спектральный диапазон 190-800 нм, разрешение 0,5 нм, диапазон измерения оптической плотности, Б 0-3)).

Определение проводили методом ААС в соответствии с требованиями ГФ РФ XV изд. ОФС.1.2.1.1.0005. «Атомно-абсорбционная спектроскопия» [5]. Условия проведения анализа приведены в таблице 7. Измерение интенсивности спектральной линии калибровочных и испытуемых растворов выполняли в режиме поглощения при длине волны 589,6 нм для натрия и 768 нм для калия.

Таблица 7 – Сравнительная таблица условий анализа для натрия и калия методом ААС

Характеристика	Натрий-ион	Калий-ион
Масса навески стандартного образца	0,5084 г (200 мг в пересчете на Na ⁺)	1,144 г (600 мг в пересчете на K ⁺)
Объем колбы для растворения навески	1000 мл	1000 мл
Концентрация эталонного раствора	200 мг/л	600 мг/л

Продолжение Таблицы 7

Аликвоты эталонного раствора	0,5 мл 1,0 мл 1,5 мл 2,0 мл 2,5 мл	0,5 мл 1,0 мл 1,5 мл 2,0 мл
Объем колбы для разбавления аликвоты	50 мл	100 мл
Концентрации калибровочных растворов	2,0 мг/л 4,0 мг/л 6,0 мг/л 8,0 мг/л 10,0 мг/л	3,0 мг/л 6,0 мг/л 9,0 мг/л 12,0 мг/л
Длина волны	589,6 нм	768 нм

2.7.1. Приготовление растворов для определения содержания ионов натрия

Приготовление испытуемого раствора. Испытуемый ФСБР объемом 1,0 мл количественно помещали в мерную колбу вместимостью 500 мл, доводили до метки водой очищенной и тщательно перемешивали. Полученный раствор применяли непосредственно после приготовления.

Приготовление эталонного раствора концентрацией натрий-ионов 200 мг/л. Стандартный образец натрия хлорида (точная навеска 0,5084 г) переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл и растворяли при тщательном перемешивании в 500 мл воды очищенной. По завершении растворения навески раствор доводили до метки водой очищенной и повторно тщательно перемешивали. Раствор использовали сразу после приготовления.

Приготовление растворов для построения калибровочного графика: по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мл эталонного раствора концентрацией натрий-ионов 200 мг/л переносили в мерные колбы вместимостью 50 мл, доводили до метки водой очищенной и перемешивали. Содержание натрий-иона в полученных растворах соответственно равнялось 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 и 10,0 мг/л. Растворы использовали свежеприготовленными.

2.7.2. Приготовление растворов для определения содержания ионов калия

Приготовление испытуемого раствора. Испытуемый ФСБР объемом 2,0 мл количественно помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки водой очищенной и тщательно перемешивали.

Приготовление эталонного раствора концентрацией калий-ионов 600 мг/л. Стандартный образец калия хлорида (точная навеска 1,144 г) переносили в мерную колбу вместимостью 1000

мл и растворяли при тщательном перемешивании в 500 мл воды очищенной. По завершении растворения навески раствор доводили до метки водой очищенной и повторно тщательно перемешивали. Раствор использовали сразу после приготовления.

Приготовление растворов для построения калибровочного графика: по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 эталонного раствора концентрацией калий-ионов 600 мг/л переносили в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводили до метки водой очищенной и перемешивали. Содержание калий-иона в полученных растворах соответственно равнялось 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 мг/л. Растворы использовали свежеприготовленными.

2.8. Определение содержания фосфат-ионов в растворителе для приготовления раствора для ингаляций методом спектрофотометрии в видимой области

Испытания на фосфат-ионы в ФСБР были проведены с использованием спектрофотометра с режимами работы в видимой и ультрафиолетовой областях спектра (UV-1800 (Shimadzu)).

Испытуемый раствор готовили в двух параллелях. Смешивали содержимое флаконов № 2 и № 4. Полученную смесь ФСБР объемом 1,4 мл помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 0,1 мл 0,05 М раствора серной кислоты, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали.

Приготовление аскорбиновой кислоты раствора 1 %. Аскорбиновую кислоту массой 1,0 г вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяли в воде, после чего объем раствора доводили водой до метки и перемешивали. Полученный раствор применяли на протяжении одного дня.

Приготовление ацетатного буферного раствора pH 3,9 – 4,1. Растворы уксусной кислоты 1 М (10 мл) и натрия ацетата 0,1 М (25 мл) вносили в мерную колбу вместимостью 200 мл, разбавляли водой до метки и перемешивали. Значение pH полученного раствора, определенное потенциометрическим методом, находилось в диапазоне от 3,9 до 4,1.

Приготовление 0,05 М раствора серной кислоты. Аликвоту 1 М раствора серной кислоты объемом 50 мл переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, разбавляли водой до метки и перемешивали.

Приготовление аммония молибдата раствора 1 % в растворе серной кислоты. Аммония молибдат массой 1 г растворяли в 50 мл воды непосредственно в мерной колбе вместимостью 100 мл, после чего вносили 0,11 мл серной кислоты разведенной (1 часть концентрированной серной кислоты на 5 частей воды) и доводили водой очищенной до метки. Срок хранения раствора при температуре от 15 до 25 °С составлял один месяц.

Приготовление холостого раствора. Точные навески натрия хлорида (8 г) и калия хлорида (0,2 г) вносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл и растворяли в воде очищенной, после чего объем раствора доводили тем же растворителем до метки.

Приготовление стандартного раствора калия фосфата однозамещенного. Калия фосфат однозамещенный, предварительно высушенный при температуре 105 °С до постоянной массы, в количестве 0,4395 г переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл. В колбу добавляли 800 мл воды очищенной и 20 мл 0,05 М раствора серной кислоты, доводили до метки водой очищенной и перемешивали. Полученный раствор был годен к применению в течение 1 мес. Аликвоту этого раствора объемом 10 мл вносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и разбавляли водой до метки.

Для приготовления калибровочных стандартных растворов 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,2 мл полученного стандартного раствора калия фосфата однозамещенного помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем содержимого растворителем до метки, перемешивали.

2.9. Оценка степени мутности раствора для ингаляций методом турбидиметрии

Для проведения испытания был использован турбидиметр «НАСН 2100Q» (Каталожный номер: 2100Q01). В качестве калибровочных стандартных растворов были использованы коммерческие стандартные растворы в запечатанных кюветах 20 NTU (Изготовитель: «Насч», каталожный номер: 2684801), 100 NTU (Изготовитель: «Насч», каталожный номер: 2684901), 180 NTU (Изготовитель: «Насч», каталожный номер: 2660501).

2.10. Валидация аналитических методик

Разработанные методики контроля качества АФС, ВВ, растворителя для приготовления раствора для ингаляций, а также раствора для ингаляций были валидированы в соответствии с решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. N 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств» [9]. Количественные методики были валидированы по следующим валидационным параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость, промежуточная прецизионность), предел количественного определения, предел обнаружения, аналитическая область.

Подтверждение специфичности проводили путем сравнения хроматограмм холостого раствора, стандартного раствора и испытуемого раствора. Специфичность аналитической

методики была доказана, если выполнялись следующие условия: используемый при испытании растворитель, вещества, входящие в состав анализируемого препарата (компоненты плацебо и действующее вещество), не искажали результат определения содержания определяемого вещества в анализируемом препарате.

Линейность определяли методом абсолютной калибровки. Калибровочная зависимость отношения площади пика определяемого вещества от его концентрации описывалась уравнением вида $y=kx+b$. Для подтверждения линейности проводили анализ 6 образцов калибровочных растворов с концентрациями, соответствующими 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 120% от максимально допустимого содержания определяемого вещества.

Для оценки точности (правильности) и прецизионности проводили анализ 4 образцов с содержанием определяемого вещества на уровне 10%, 25%, 75% и 120%. Анализ проводили в течение 1 рабочего дня одним аналитиком (сходимость) и 2 рабочих дней двумя аналитиками (промежуточная прецизионность). По полученным концентрациям рассчитывали значения стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %).

2.11. Выводы к главе материалы и методы

В главе приведено описание аналитических методик, использованных в процессе проведения стандартизации активной фармацевтической субстанции и вспомогательного вещества методами масс-спектрометрии и инфракрасной спектрометрии. Подробно изложено описание предназначенных для рутинного анализа разработанных методик контроля качества активной фармацевтической субстанции, вспомогательного вещества, растворителя для приготовления раствора для ингаляций и раствора для ингаляций, входящих в состав препарата МИР 19®, методами газовой хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, электрофореза в агарозном геле, атомно-абсорбционной спектрометрии, спектрофотометрии, турбидиметрии. Описан план проведения валидации разработанных количественных методик контроля качества с указанием основных валидационных параметров.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Стандартизация и контроль качества активной фармацевтической субстанции – малой интерферирующей рибонуклеиновой кислоты

3.1.1. Идентификация активной фармацевтической субстанции методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием и аттестация массовой доли основного вещества

В рамках фармацевтической разработки для контроля качества АФС применяли комплекс взаимодополняющих аналитических подходов, включавший масс-спектрометрический анализ, вертикальный электрофорез и УФ-спектрофотометрию. С целью объединения идентификации, контроля близкородственных примесей и количественного определения АФС с использованием одного аналитического метода была разработана методика ВЭЖХ-УФ. Вместе с тем ее применение в рутинном анализе требует использования стандартных образцов, достоверно охарактеризованных с помощью специфичных безэталонных аналитических методов. Для подтверждения структуры испытуемой субстанции в процессе разработки стандартного образца в качестве референтного метода использовали МАЛДИ-ВП-МС [7].

Масс-спектрометрический анализ, включающий регистрацию масс-спектров смысловой и антисмысловой цепей миРНК, проводили для трёх серий полупродуктов АФС. Во всех испытуемых образцах для каждой индивидуальной цепи регистрировали основной сигнал, соответствующий однозарядному иону $[M+H]^+$. Определенные экспериментально значения молекулярных масс находились в соответствии с расчетными значениями, полученными исходя из установленной структуры соответствующих олигонуклеотидных цепей и с учетом предусмотренных химических модификаций. Для смысловой и антисмысловой цепей расчетные значения составляли 7147 и 6871 г/моль соответственно, тогда как полученные при анализе значения соответствовали диапазонам 7147 ± 7 и 6871 ± 7 г/моль. Помимо сигналов, соответствующих молекулярным ионам исследуемых цепей, в спектрах выявляли пики, обусловленные образованием двухзарядных ионов $[M+2H]^{2+}$. При этом дополнительных воспроизводимых сигналов, которые могли бы свидетельствовать о присутствии олигонуклеотидных цепей с отличающейся от расчетной молекулярной массой, не обнаружено. Результаты масс-спектрометрического анализа приведены на рисунке 6 и в таблице 8.

Отсутствие дополнительных устойчивых сигналов позволяет сделать вывод о том, что содержание основных потенциально образующихся в процессе синтеза групп примесей

находится ниже предела количественного определения используемого метода. К ним относятся укороченные олигонуклеотидные фрагменты, образующиеся вследствие неполного наращивания цепи, продукты депуринизации с уменьшенной молекулярной массой, а также олигонуклеотидные цепи с остаточными защитными группами, характеризующиеся повышенной относительно расчетной молекулярной массой. С учетом аналитической погрешности МАЛДИ-ВП-МС, не превышающей 5%, содержание перечисленных примесей можно оценить как менее 5% от содержания соответствующего основного компонента.

При интерпретации полученных масс-спектров учитывали также возможность появления дополнительных сигналов, связанных не с примесями олигонуклеотидной природы, а с образованием аддуктов и солевых форм. В частности, присутствие ионов натрия и калия может приводить к появлению сигналов со смещением m/z относительно основного пика на +24 (−4) и +40 (+1) соответственно. Такие сигналы считали допустимыми при условии, что интенсивность каждого из них не превышает 50% интенсивности пика, соответствующего целевому иону. При интенсивности соответствующего сигнала 20% и более от уровня целевого пика дополнительно требовалось подтверждение наличия натрия и калия характерными реакциями либо методами элементного анализа. Одновременно наличие кальция должно быть исключено соответствующими качественными реакциями или отрицательным результатом элементного анализа.

Отдельно оценивали сигналы, возникающие при возможном присутствии других неорганических компонентов. Пики со смещением относительно целевого иона на +50 (+7) и +100 допускались при их интенсивности не более 25% от интенсивности основного сигнала. Если интенсивность сигнала со смещением +50 (+7) достигала 15% и более, отсутствие железа подтверждали качественной реакцией либо методом элементного анализа. Для сигналов со смещением m/z на +150 и +200 допустимой считалась интенсивность каждого отдельного пика не более 15% относительно целевого пика.

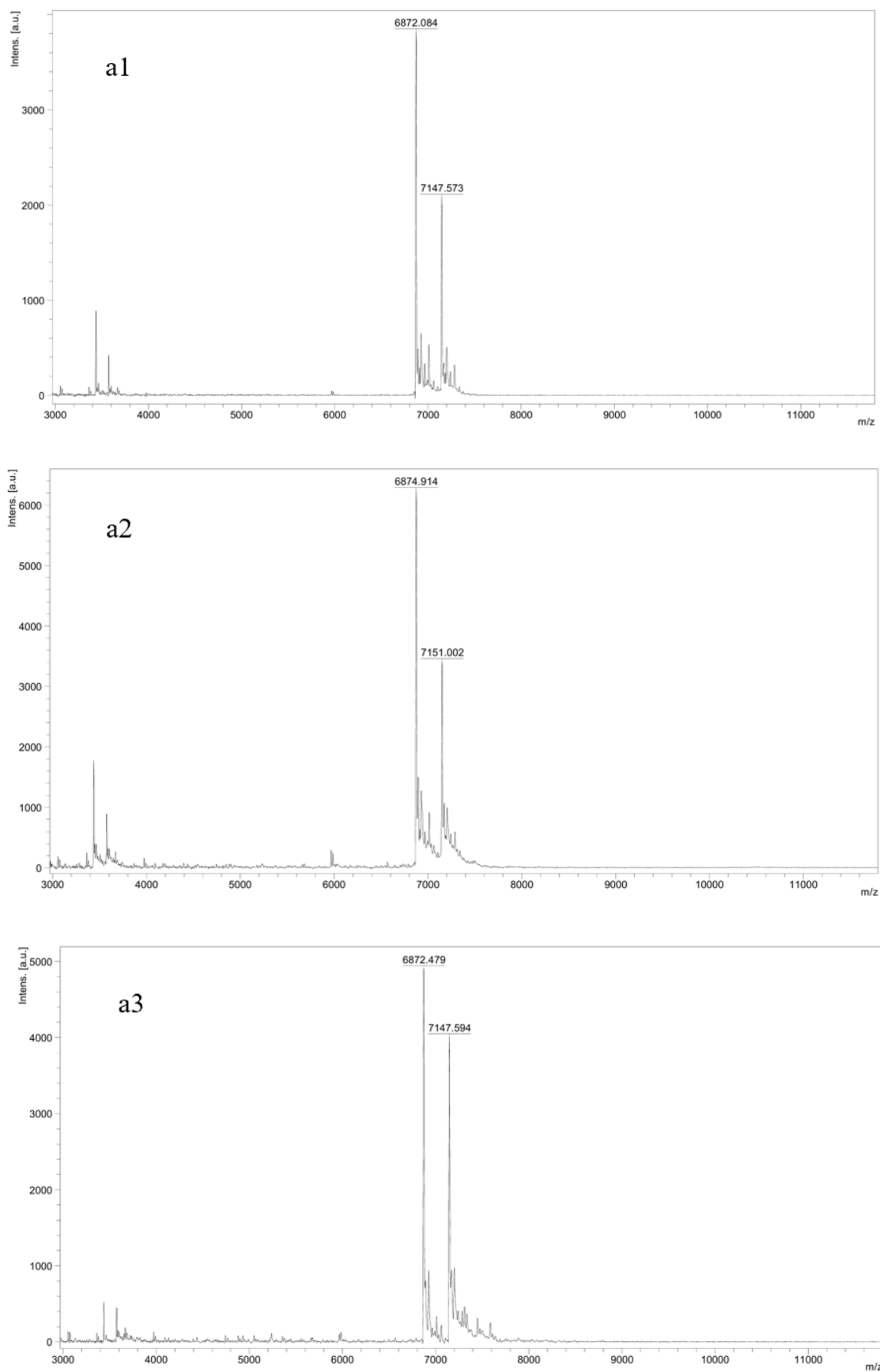


Рисунок 6 – МАЛДИ-ВП-МС масс-спектры трёх серий образцов смеси индивидуальных олигонуклеотидных цепей миРНК (a1-a3)

Таблица 8 – Результаты масс-спектрометрического анализа трёх серий образцов смысловых (S) и антисмысловых (AS) цепей миРНК (а1-а3), полученные методом МАЛДИ-ВП-МС

Серия	Теоретическая молекулярная масса, г/моль	Фактическая молекулярная масса, г/моль
1 (рисунок 6а1)	S 7147 AS 6871	S 7148 AS 6872
2 (рисунок 6а2)		S 7151 AS 6875
3 (рисунок 6а3)		S 7148 AS 6872

Учитывая тот факт, что процесс образования дуплексов не связан с химическими преобразованиями, родственные примеси, описанные выше, не могут образоваться на этом этапе [7]. Соответствующий масс-спектр АФС после получения дуплекса представлен на рисунке 7.

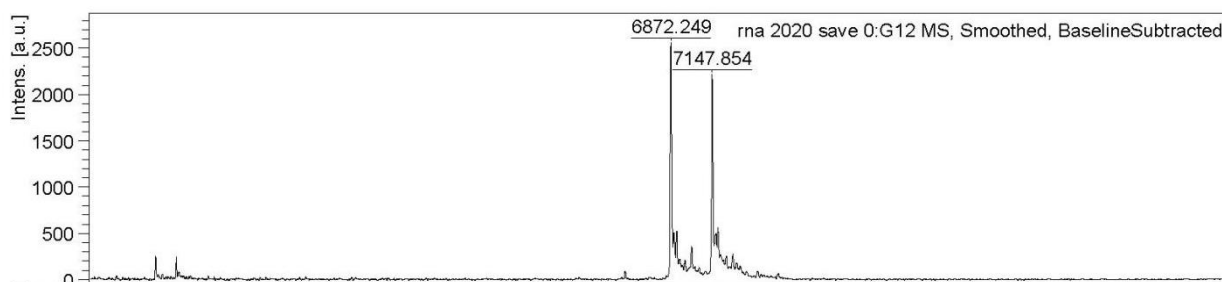


Рисунок 7 – МАЛДИ-ВП-МС масс-спектр дуплекса миРНК

Для аттестации массовой доли основного вещества охарактеризованных образцов АФС методом баланса масс был использован метод ВЭЖХ-УФ для определения содержания родственных примесей и количественного определения методом внутренней нормализации в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0001. «Хроматография» и метод ГХ-ПИД для определения остаточных органических растворителей [6]. Количественное содержание основного вещества устанавливалось путем вычитания суммы родственных примесей и остаточных органических растворителей.

Пример паспорта на полученный СО представлен в приложении А.

3.1.2. Определение остаточных органических растворителей в полупродукте активной фармацевтической субстанции

Технологический процесс получения полупродуктов АФС в виде индивидуальных цепей миРНК предусматривает стадии сушки, обессоливания и лиофилизации субстанции. Предполагается, что за счёт этих операций из лиофилизата практически полностью удаляются остаточные количества органических растворителей, используемых в процессе синтеза полупродуктов АФС. Оценку содержания остаточных органических растворителей выполняли по хроматографической методике, параметры которой приведены в разделе 2.4.1. Проведённый методом ГХ анализ трёх серий миРНК продемонстрировал, что содержание ацетонитрила – органического растворителя – в испытуемых образцах не превышало предела обнаружения методики. Результаты проведенного анализа представлены на рисунке 8.

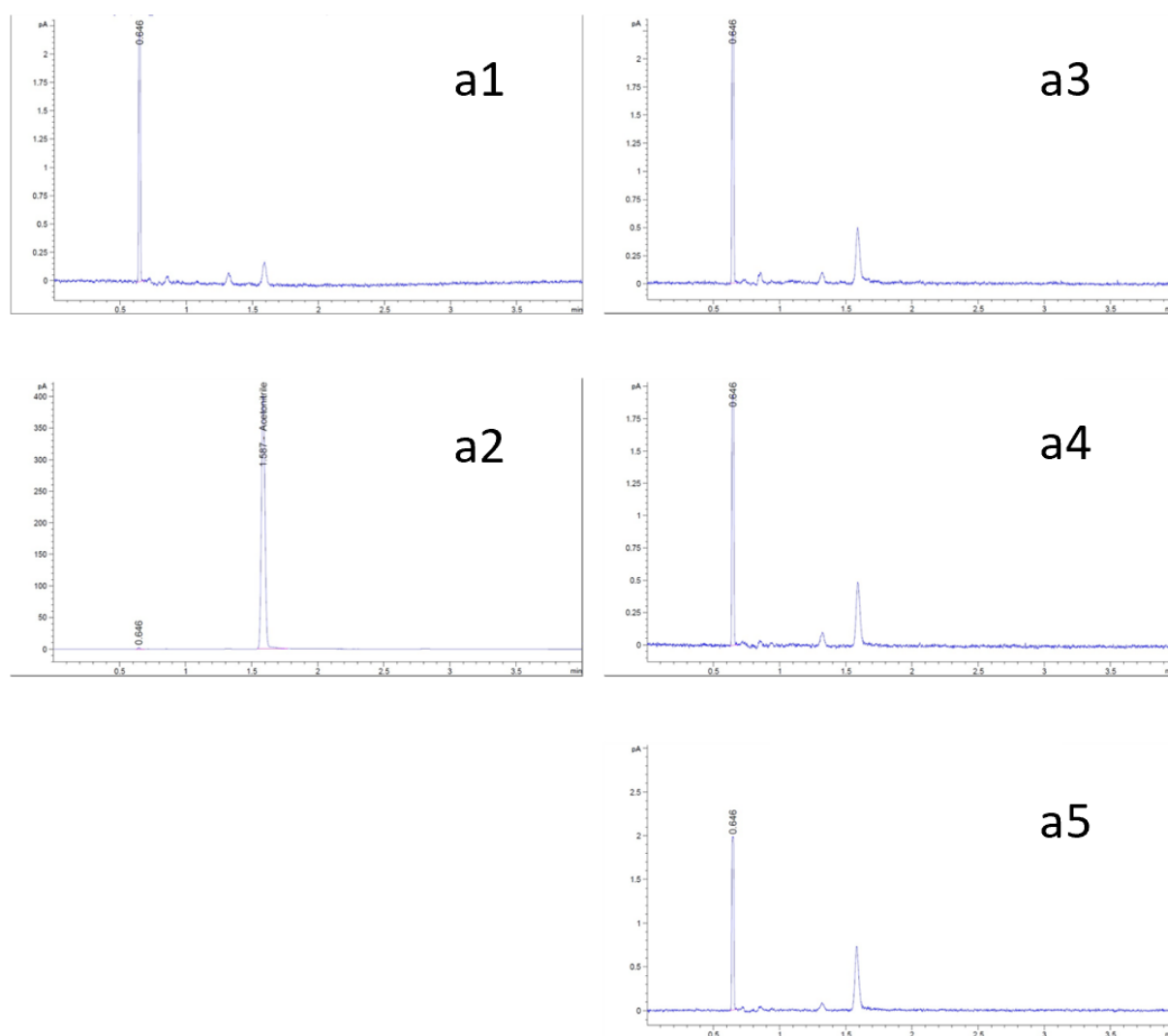


Рисунок 8 – Результаты определения остаточного количества ацетонитрила методом ГХ: 8a1 – холостой образец, 8a2 – ацетонитрил, 8a3-5 – три серии полупродукта миРНК

В соответствии с ОФС.1.1.0008. Остаточные органические растворители установлено предельное допустимое содержание ацетонитрила для индивидуальных цепей мРНК – полупродукта АФС, не более 400 ppm [2].

3.1.2.1. Валидация методики определения остаточных органических растворителей в полупродукте активной фармацевтической субстанции

Подтверждение специфичности проводили путем сравнения хроматограмм холостого раствора, стандартного раствора и испытуемого раствора. Специфичность аналитической методики считали доказанной, если выполнялись следующие условия: используемый при испытании растворитель, подвижная фаза, вещества, входящие в состав анализируемого препарата (компоненты плацебо и действующее вещество), не искажают результат определения содержания остаточных растворителей в анализируемом препарате.

Были проанализированы холостой раствор, стандартный раствор и испытуемый раствор. Не наблюдалось наложений на пик ацетонитрила на хроматограмме холостого раствора и испытуемого раствора.

Данные об отклонениях рассчитанных концентраций калибровочных растворов сведены в таблицу 9. На их основе был построен калибровочный график, пример которого приведён на рисунке 9. Значение полученного коэффициента корреляции укладывалось в нормируемый диапазон (не менее 0,99).

Таблица 9 – Расхождение между найденными и фактическими концентрациями ацетонитрила в калибровочных стандартах (ε, %)

Площадь пика ацетонитрила	Концентрация фактическая, %	Концентрация рассчитанная, %	ε, %	Норма не более %
99,76	10,0	10,17	1,7	5,0
248,28	25,0	24,65	-1,4	2,0
505,53	50,0	49,73	-0,5	
775,21	75,0	76,02	1,3	
1014,79	100,0	99,37	-0,6	
1227,01	120,0	120,06	0,05	

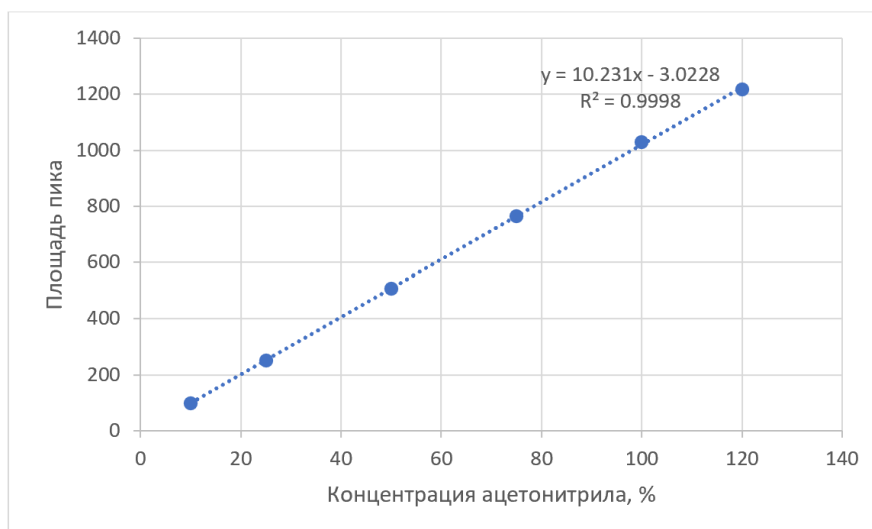


Рисунок 9 – Калибровочный график для ацетонитрила в нормализованных координатах «введено-найдено»

Рассчитанные величины RSD, % и ϵ , % представлены в таблицах 10-12.

Таблица 10 – Правильность и прецизионность методики определения ацетонитрила в полупродукте АФС (день 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	$\pm\epsilon$, %
10,0	10,07	10,11	0,1	0,5	1,1
	10,08				
	10,18				
	10,14				
	10,10				
25,0	24,88	24,94	0,5	0,4	0,2
	25,02				
	24,83				
	24,89				
	25,09				
75	76,40	75,93	0,4	0,5	1,2
	76,05				
	76,17				
	75,39				
	75,63				
120,0	119,38	120,06	1,3	1,1	0,1
	119,52				
	120,08				
	119,04				
	122,27				

Таблица 11 – Правильность и прецизионность методики определения ацетонитрила в полупродукте АФС (день 2, аналитик 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	$\pm \varepsilon$, %
10,0	9,84	9,90	0,04	0,4	1
	9,90				
	9,93				
	10,03				
	9,93				
25,0	24,92	24,59	0,3	1,0	1,6
	24,64				
	24,63				
	24,55				
	24,20				
75	74,46	74,65	0,8	1,1	0,5
	74,11				
	74,15				
	76,07				
	74,44				
120,0	119,97	118,98	1,6	1,3	0,9
	116,70				
	118,49				
	118,79				
	120,95				

Таблица 12 – Правильность и прецизионность методики определения ацетонитрила в полупродукте АФС (день 2, аналитик 2)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	$\pm \varepsilon$, %
10,0	9,89	9,926	0,07	0,74	0,88
	9,93				
	9,90				
	10,05				
	9,86				
25,0	24,90	24,58	0,24	0,98	1,21
	24,66				
	24,61				
	24,54				
	24,23				
	74,45				
	74,13				

Продолжение Таблицы 12

75	74,14	74,63	0,73	0,98	1,21
	75,90				
	74,54				
120,0	119,99	118,94	1,59	1,33	1,66
	116,75				
	118,44				
	118,65				
	120,91				

Предел обнаружения методики устанавливали по соотношению «сигнал/шум», принимая за предел обнаружения минимальное разведение, при котором это соотношение достигает значения не менее 3. Для ацетонитрила предел обнаружения составил 0,5 %, при этом соотношение сигнал/шум на данном уровне содержания составило 1 к 67.

Полученные значения RSD, % и ε , % укладывались в нормируемые пределы – не более 5 % для нижней границы диапазона линейности и не более 2 % для остальных точек. Опираясь на результаты оценки линейности, правильности и прецизионности, для методики определения остаточных органических растворителей в полупродукте АФС была установлена аналитическая область в диапазоне 10–120 % от допустимого содержания, регламентированного НД для ацетонитрила.

3.1.3. Разработка методики одновременного определения подлинности, родственных примесей и количественного определения активной фармацевтической субстанции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием

Для проведения анализа готовили раствор АФС концентрацией 0,12 мг/мл на основе внутреннего стандартного образца, охарактеризованного на предыдущем этапе исследования (СО миРНК) – этот же раствор был использован для оценки пригодности хроматографической системы [7].

Подбор ступеней градиента при разработке хроматографической методики с использованием колонки Thermo Scientific ODS C18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм) для одновременного определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания АФС велся так, чтобы обеспечить как полное разделение целевой молекулы миРНК и родственных примесей, так и сохранение приемлемой эффективности для основного пика АФС. Анализ предшествовало 90-минутное уравнивание колонки подвижной фазой А. Полученные

хроматограммы представлены на рисунке 10, время удерживания целевого пика, соответствующего АФС, составило около 11 минут [7].

Для проверки пригодности хроматографической системы были изучены следующие параметры: для 6 последовательных инъекций раствора СО миРНК относительное стандартное отклонение (RSD, %) времени удерживания пика миРНК не превышало 3% и относительное стандартное отклонение площадей пиков миРНК – не более 5 %.

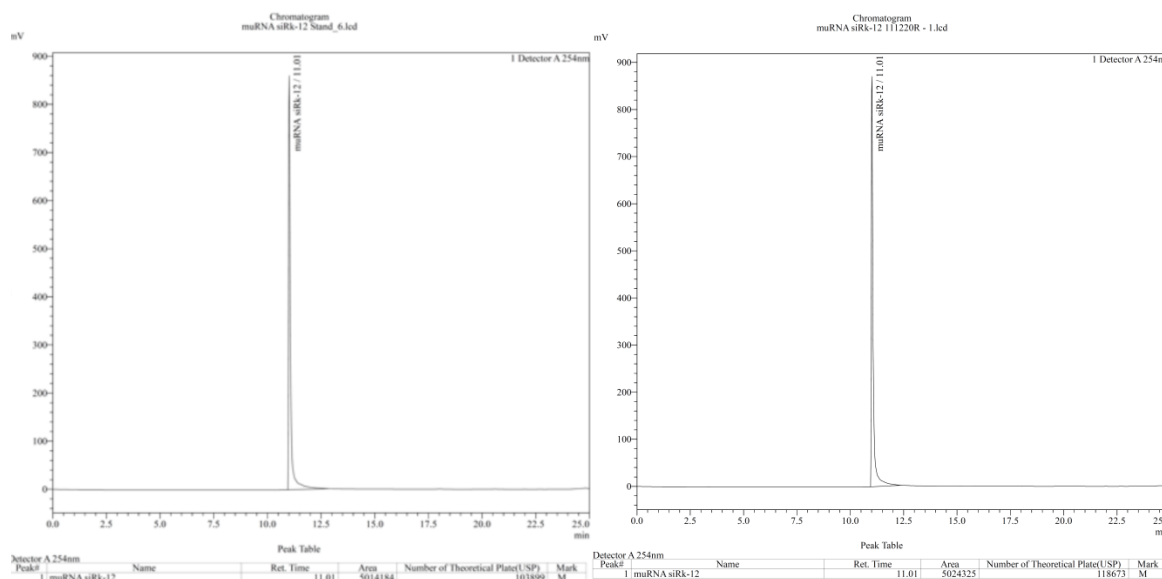


Рисунок 10 – Характерные хроматограммы стандартного и испытуемого растворов АФС

Для идентификации АФС в испытуемом образце вычисляли значение τ – разность между средним временем удерживания пика миРНК, рассчитанным по 6 хроматограммам стандартного раствора (ТСтанд), и средним временем удерживания пика миРНК, рассчитанным по 10 хроматограммам испытуемого раствора (Тпробы) [7].

$$\tau = | \text{ТСтанд} - \text{Тпробы} |$$

Значение $\tau \leq 0,20$ было принято в качестве критерия подлинности фармацевтической субстанции. Содержание неидентифицированных примесей для миРНК по результатам анализа чистоты не превышало 5%.

Количественное определение проводили по площадям пиков миРНК на хроматограммах испытуемых растворов и раствора СО миРНК: содержание миРНК в испытуемом образце (Хобр), в мг/флакон, вычисляли по формуле:

$$\text{Хобр} = C \times (\text{Собр} / \text{Сст}) \times R \times P / 100$$

Где

C – концентрация миРНК в растворе СО миРНК, мг/мл. C= 0,12 мг/мл;

Собр, Сст – средние значения площадей пиков миРНК на хроматограммах испытуемых растворов и раствора СО миРНК соответственно;

R – коэффициент разведения испытуемого образца, равный 0,7.

P – количественное содержание малой интерферирующей РНК в СО миРНК, %.

Установлена норма содержания АФС – 95-105% от номинального значения (0,084 – 0,092 мг/флакон).

3.1.3.1. Валидация методики одновременного определения подлинности, родственных примесей и количественного определения активной фармацевтической субстанции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием

Были проанализированы холостой раствор, стандартный раствор и испытуемый раствор. Не наблюдалось наложений на пик АФС на хроматограмме холостого раствора и испытуемого раствора.

Результаты по отклонениям концентраций калибровочных растворов представлены в таблице 13. Линейность определяли методом абсолютной калибровки. По полученным значениям был построен калибровочный график. Пример калибровочного графика приведен на рисунке 11.

Полученный коэффициент корреляции соответствует нормам (не менее 0,99).

Таблица 13 – Расхождение между найденными и фактическими концентрациями калибровочных стандартных растворов АФС методики определения родственных примесей и количественного определения (ε, %)

Площадь пика миРНК	Концентрация, фактическая, %	Концентрация, рассчитанная, %	±ε, %	Норма, не более %
248,10	10	9,69	-3,01	5,0
645,19	25	25,51	1,97	2,0
1261,67	50	50,07	0,15	
1827,52	75	72,62	-1,99	
2463,36	100	97,95	-1,94	
3064,40	120	121,89	1,58	

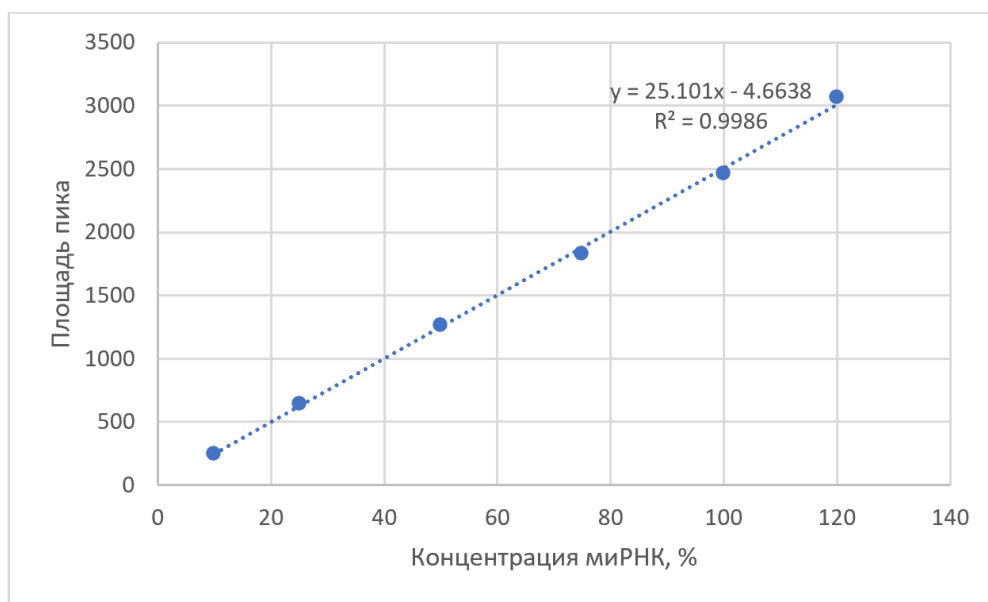


Рисунок 11 – Калибровочный график для АФС в нормализованных координатах «введено-найдено»

Полученные при оценке правильности и прецизионности значения концентраций были использованы для расчета RSD, % и ϵ , %, приведенные в таблицах 14-16.

Таблица 14 – Правильность и прецизионность методики определения родственных примесей и количественного определения АФС (день 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	$\pm\epsilon$, %
10,0	10,08	10,03	0,15	1,47	0,26
	10,10				
	9,84				
	9,91				
	10,20				
25,0	25,05	25,13	0,09	0,36	0,54
	25,28				
	25,15				
	25,08				
	25,11				
75	75,54	75,17	0,31	0,41	0,23
	74,89				
	75,25				
	75,36				
	74,81				
120,0	121,00	120,64	0,92	0,77	0,54
	121,47				

Продолжение Таблицы 14

	119,85				
	121,42				
	119,47				

Таблица 15 – Правильность и прецизионность методики определения родственных примесей и количественного определения АФС (день 2, аналитик 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	9,95	10,03	0,10	0,96	0,34
	10,19				
	10,04				
	10,03				
	9,96				
25,0	25,09	25,17	0,12	0,47	0,66
	25,29				
	25,21				
	25,24				
	25,00				
75	75,09	75,30	0,17	0,22	0,39
	75,54				
	75,27				
	75,23				
	75,35				
120,0	121,77	120,69	0,89	0,73	0,58
	120,87				
	121,17				
	119,50				
	120,15				

Таблица 16 – Правильность и прецизионность методики определения родственных примесей и количественного определения АФС (день 2, аналитик 2)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	9,83	9,94	0,14	1,38	-0,58
	9,87				
	10,17				
	9,87				
	9,97				

Продолжение Таблицы 16

25,0	25,18	25,16	0,12	0,50	0,65
	25,30				
	24,96				
	25,16				
	25,21				
75	74,87	75,08	0,19	0,26	0,10
	75,24				
	75,24				
	74,86				
	75,17				
120,0	121,32	120,27	0,63	0,52	0,22
	119,81				
	120,35				
	119,84				
	120,01				

Предел обнаружения методики устанавливали по соотношению «сигнал/шум», принимая за предел обнаружения минимальное разведение, при котором это соотношение достигает значения не менее 3. Для АФС предел обнаружения составил 0,5 %, при этом соотношение сигнал/шум на данном уровне содержания составило 1 к 62.

Полученные значения RSD, % и ϵ , % укладывались в нормируемые пределы – не более 5 % для нижней границы диапазона линейности и не более 2 % для остальных точек. Опираясь на результаты оценки линейности, правильности и прецизионности, для методики определения АФС была установлена аналитическая область в диапазоне 10–120 % от номинального содержания АФС.

В соответствии с ОФС.1.1.0012. «Валидация аналитических методик» предел количественного определения – это наименьшее количество вещества в образце, которое может быть количественно оценено с использованием валидируемой методики с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью. В соответствии с данным способом определения ПКО составил 0,5% от нормы, приведенной в НД для АФС [3].

3.1.4. Определение подлинности активной фармацевтической субстанции методом электрофореза в агарозном геле

Электрофорез в агарозном геле был выбран в качестве второго метода определения подлинности АФС для более надёжной идентификации молекул миРНК. Анализ проводили при

напряжении 35 В на протяжении 90 минут, фиксируя результат системой документирования гелей. За критерий подлинности принималось совпадение полосы испытуемого образца на электрофореграмме с полосой стандартного образца АФС [7]. На рисунке 12 показан характерный вид получаемых электрофореграмм.

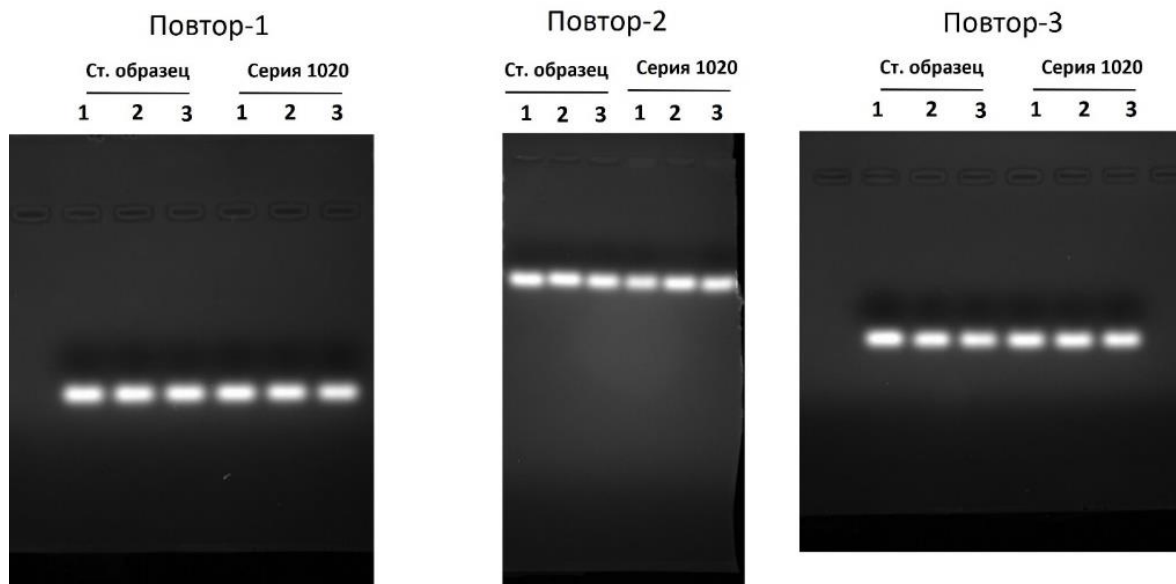


Рисунок 12 – Характерные электрофореграммы, полученные при подтверждении подлинности АФС в трёх повторах

3.1.4.1. Валидация методики определения подлинности активной фармацевтической субстанции методом электрофореза в агарозном геле

Подтверждение специфичности проводили путем сравнения фореграмм холостого раствора, стандартного раствора и испытуемого раствора. Специфичность аналитической методики была доказана, если выполнялись следующие условия: используемые при испытании растворитель и реагенты, а также вещества, входящие в состав анализируемого препарата, не искажали результат качественного определения АФС в анализируемом препарате.

Были проанализированы холостой раствор, стандартный раствор и испытуемый раствор. Не наблюдалось наложений на полосу миРНК на фореграмме холостого раствора и испытуемого раствора.

Разработанная методика была валидирована по параметру специфичность.

3.2. Стандартизация и контроль качества вспомогательного вещества – катионного дендримерного пептида КК-46

3.2.1. Идентификация вспомогательного вещества методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием

Пептид КК-46 – вспомогательное вещество в составе препарата МИР 19®, выступающее в качестве системы доставки молекул миРНК, имеет расчётную усреднённую молекулярную массу 5140 г/моль. Получаемые масс-спектры должны содержать один пик, соответствующий положительно заряженному однозарядному иону в диапазоне m/z от 5126 до 5154 (идентифицируется как целевой) [8]. Измеренные для трёх серий ВВ молекулярные массы оказались близки к заявленному значению 5140 г/моль – усреднённой теоретической массе, рассчитанной на основании заданной структуры пептида. Полученные результаты представлены в таблице 17. В результате проведенного анализа трех серий ВВ показано наличие одного основного пика, соответствующего испытываемому пептиду, масс-спектры приведены на рисунке 13.

Таблица 17 – Результаты масс-спектрометрического анализа трёх серий образцов пептида КК-46 (b1-b3), полученные методом МАЛДИ-ВП-МС

Серия КК-46	Теоретическая молекулярная масса, г/моль	Фактическая молекулярная масса, г/моль
1 (рисунок 13, b1)	5140	5135
2 (рисунок 13, b2)		5135
3 (рисунок 13, b3)		5133

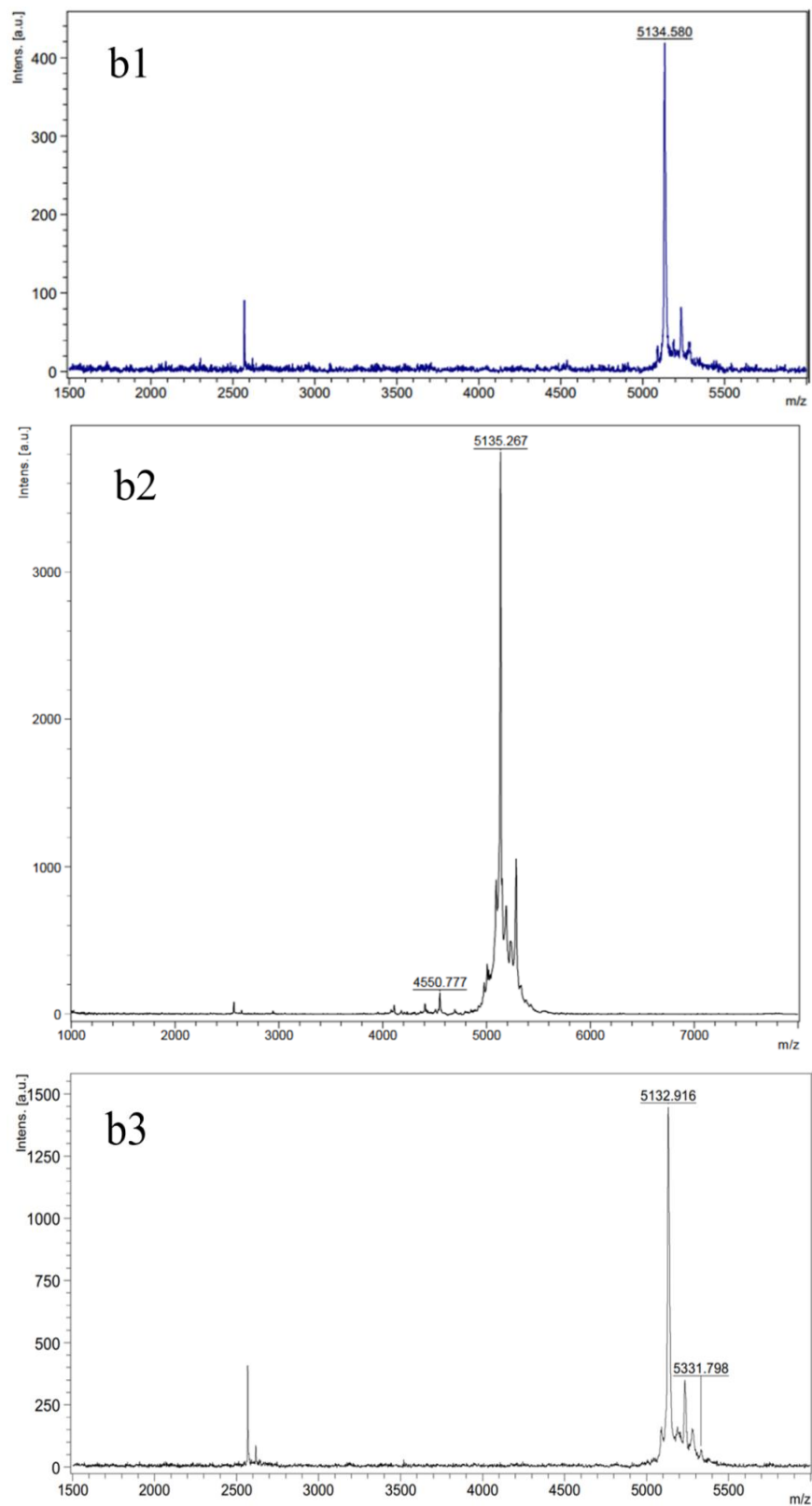


Рисунок 13 – МАЛДИ-ВП-МС масс-спектры трёх серий образцов ВВ (b1-b3)

3.2.2. Идентификация вспомогательного вещества методом инфракрасной спектроскопии и аттестация массовой доли основного вещества

Структурные характеристики катионного дендримерного пептида устанавливали методом ИК-спектроскопии. В спектре наблюдались полосы поглощения, отвечающие колебаниям связей N-H в области $3540\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, C-H в виде двух полос в областях $2995\text{--}2905\text{ см}^{-1}$ и $2905\text{--}2736\text{ см}^{-1}$, Ar-C-C в областях $1645\text{--}1575\text{ см}^{-1}$ и $1484\text{--}1404\text{ см}^{-1}$, C=O (амид I) и C=N в области $1730\text{--}1645\text{ см}^{-1}$, NH (амид II) в области $1670\text{--}1590\text{ см}^{-1}$, а также C-O(H) в области $1158\text{--}1030\text{ см}^{-1}$ [8]. Полученный ИК-спектр представлен на рисунке 14.

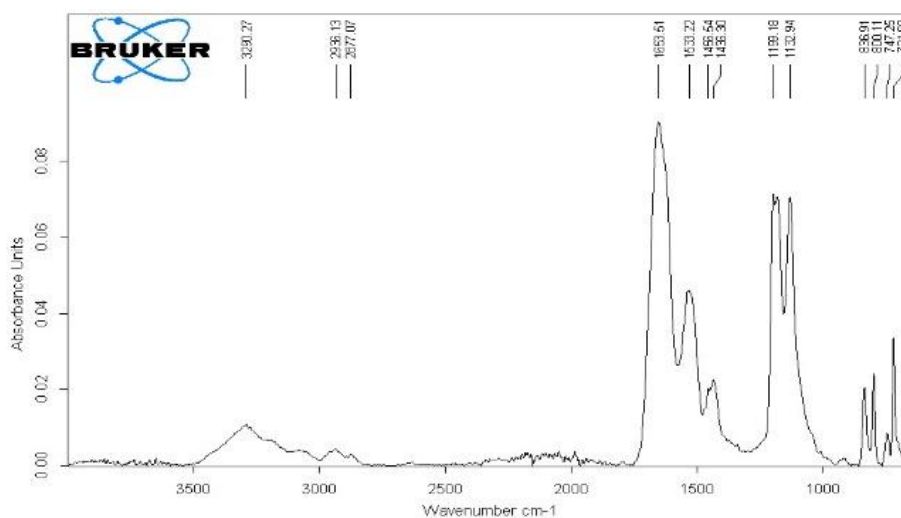


Рисунок 14 – Характерный ИК-спектр КК-46

В дальнейшем метод ИК-спектроскопии был добавлен в спецификацию в качестве метода подтверждения подлинности ВВ.

Для аттестации массовой доли основного вещества охарактеризованных образцов ВВ методом баланса масс был использован метод ВЭЖХ-УФ для определения содержания родственных примесей и количественного определения методом внутренней нормализации в соответствии с ОФС ОФС.1.2.1.2.0001. «Хроматография» и метод ГХ-ПИД для определения остаточных органических растворителей. Количественное содержание основного вещества устанавливалось путем вычитания суммы родственных примесей и остаточных органических растворителей [6].

Пример паспорта на полученный СО представлен в приложении Б.

3.2.3. Определение остаточных органических растворителей в вспомогательном веществе

После окончания синтеза субстанция пептида КК-46 последовательно подвергается высушиванию, обессоливанию и лиофильной сушке, что должно обеспечивать полное удаление из лиофилизата возможных остаточных количеств органических растворителей. При проведении анализа применялись хроматографические методики, описанные ранее (см. 2.4.1 и 2.4.2).

Хроматограммы проведенного анализа для ацетонитрила и ДМФА представлены на рисунках 15 и 16 соответственно. В соответствии с ОФС.1.1.0008. Остаточные органические растворители установлено предельное допустимое содержание ацетонитрила и ДМФА в субстанции ВВ – не более 400 и 440 ppm для каждого растворителя соответственно [2].

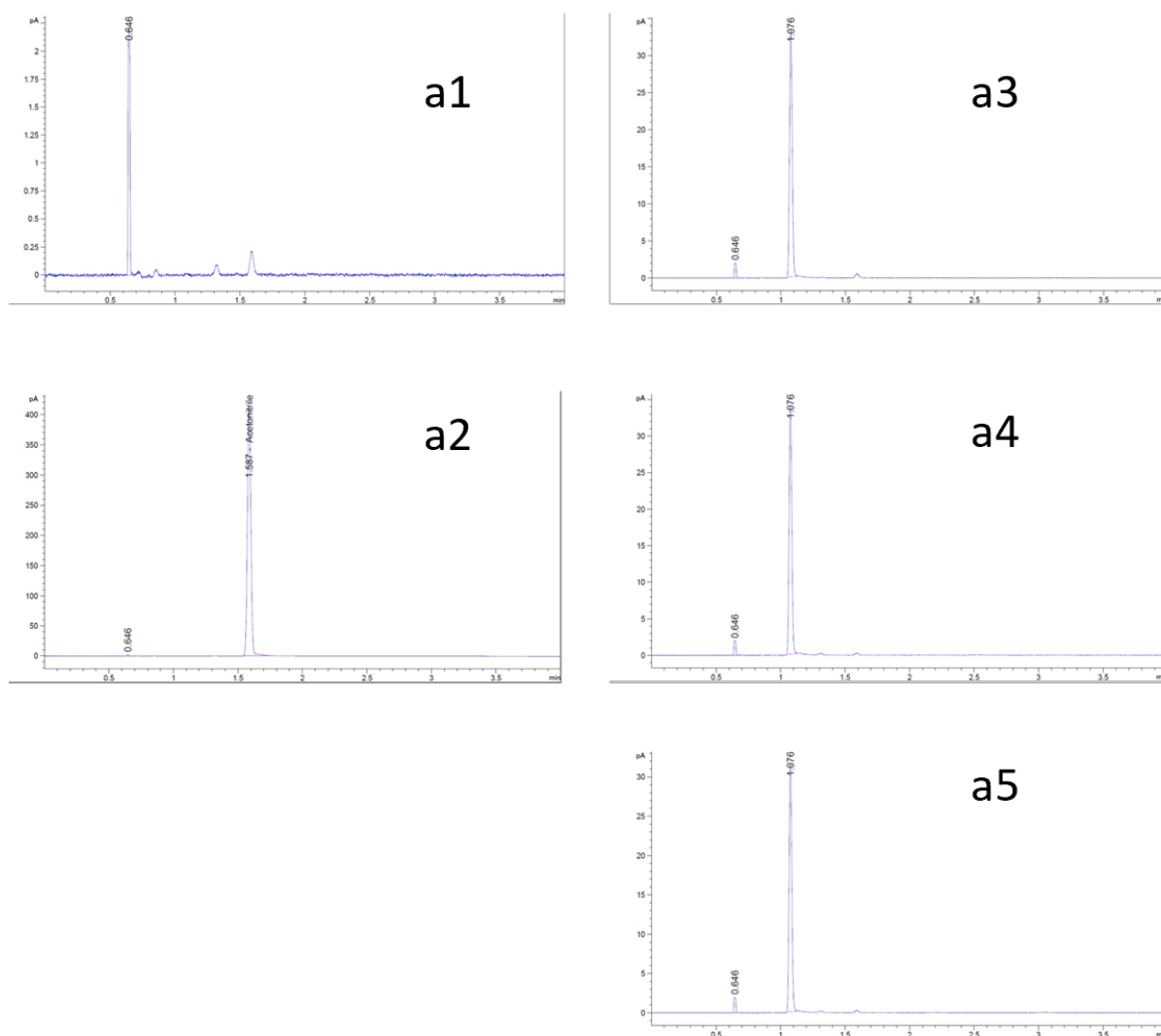


Рисунок 15 – Результаты определения остаточного количества органического растворителя (ацетонитрила): a1 – холостой образец, a2 – ацетонитрил, a3-5 – три серии ВВ

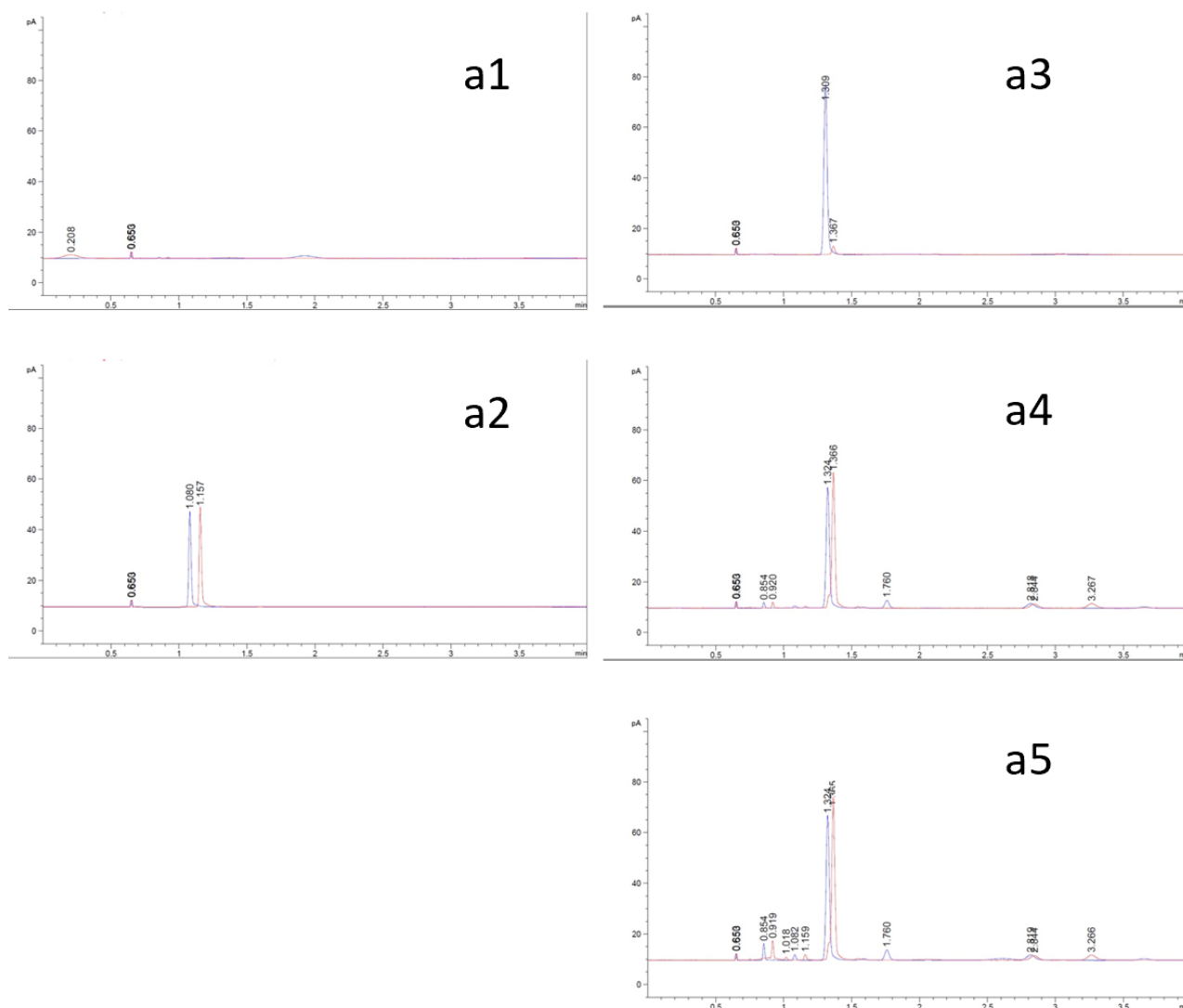


Рисунок 16 – Результаты определения остаточного количества органического растворителя (ДМФА): а1 – холостой образец, а2 – ДМФА, а3-5 – различные серии ВВ

3.2.3.1. Валидация методики определения ацетонитрила в вспомогательном веществе

Подтверждение специфичности проводили путем сравнения хроматограмм холостого раствора, стандартного раствора и испытуемого раствора.

Были проанализированы холостой раствор, стандартный раствор и испытуемый раствор. Не наблюдалось наложений на пик ацетонитрила на хроматограмме холостого раствора и испытуемого раствора.

Результаты по отклонениям концентраций калибровочных растворов представлены в таблице 18. Пример калибровочного графика приведен на рисунке 17. Полученный коэффициент корреляции соответствует нормам (не менее 0,99).

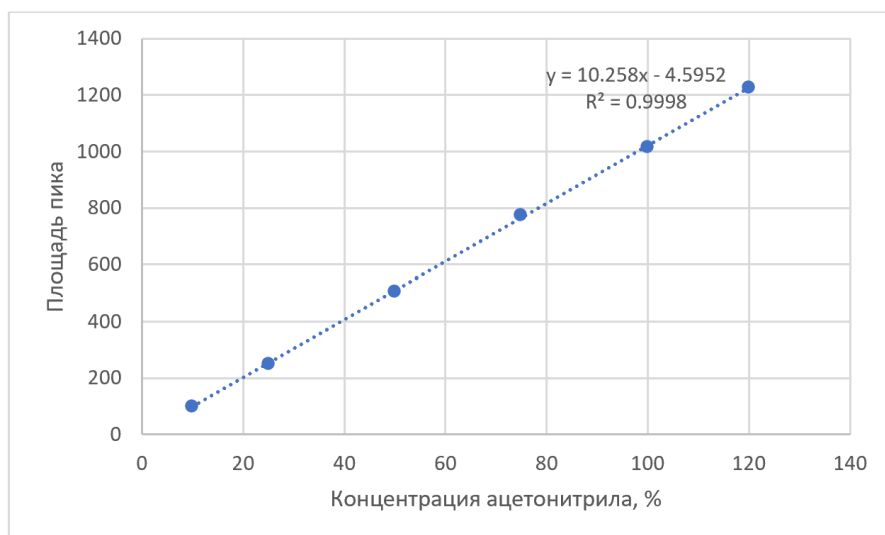


Рисунок 17 – Калибровочный график для ацетонитрила в нормализованных координатах «введено-найденно»

Таблица 18 – Расхождение между найденными и фактическими концентрациями калибровочных стандартных растворов ацетонитрила (ε, %)

Площадь пика ацетонитрила	Концентрация, фактическая, %	Концентрация, рассчитанная, %	±ε, %	Норма, не более %
99,76	10,0	10,17	1,7	5,0
248,28	25,0	24,65	-1,4	2,0
505,53	50,0	49,73	-0,5	
775,21	75,0	76,02	1,3	
1014,79	100,0	99,37	-0,6	
1227,01	120,0	120,06	0,05	

Для полученных при оценке правильности и прецизионности значений концентраций были рассчитаны величины RSD, % и ε, %, приведенные в таблицах 19-21.

Таблица 19 – Правильность и прецизионность методики определения ацетонитрила в продукте ВВ (день 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	10,07	10,11	0,1	0,5	1,1
	10,08				
	10,18				
	10,14				
	10,10				
	24,88				

Продолжение Таблицы 19

25,0	25,02	24,94	0,5	0,4	0,2
	24,83				
	24,89				
	25,09				
75	76,40	75,93	0,4	0,5	1,2
	76,05				
	76,17				
	75,39				
	75,63				
120,0	119,38	120,06	1,3	1,1	0,1
	119,52				
	120,08				
	119,04				
	122,27				

Таблица 20 – Правильность и прецизионность методики определения ацетонитрила в продукте ВВ (день 2, аналитик 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	9,84	9,90	0,04	0,4	1
	9,90				
	9,93				
	10,03				
	9,93				
25,0	24,92	24,59	0,3	1,0	1,6
	24,64				
	24,63				
	24,55				
	24,20				
75	74,46	74,65	0,8	1,1	0,5
	74,11				
	74,15				
	76,07				
	74,44				
120,0	119,97	118,98	1,6	1,3	0,9
	116,70				
	118,49				
	118,79				
	120,95				

Таблица 21 – Правильность и прецизионность методики определения ацетонитрила в продукте ВВ (день 2, аналитик 2)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	9,89	9,926	0,07	0,74	0,88
	9,93				
	9,90				
	10,05				
	9,86				
25,0	24,90	24,58	0,24	0,98	1,21
	24,66				
	24,61				
	24,54				
	24,23				
75	74,45	74,63	0,73	0,98	1,21
	74,13				
	74,14				
	75,90				
	74,54				
120,0	119,99	118,94	1,59	1,33	1,66
	116,75				
	118,44				
	118,65				
	120,91				

Предел обнаружения методики составил 0,5% для ацетонитрила. Соотношение сигнал/шум составило: для раствора с содержанием ацетонитрила на уровне 0,5% - 1 к 67.

На основании данных по оценке линейности, правильности и прецизионности была установлена аналитическая область методики определения остаточных органических растворителей, которая составила 10 – 120 % от нормы, приведенной в НД для ацетонитрила.

3.2.3.2. Валидация методики определения N,N-диметилформамида в вспомогательном веществе

Подтверждение специфичности проводили путем сравнения хроматограмм холостого раствора, стандартного раствора и испытуемого раствора.

Были проанализированы холостой раствор, стандартный раствор и испытуемый раствор. Не наблюдалось наложений на пик ДМФА на хроматограмме холостого раствора и испытуемого раствора.

Результаты по отклонениям концентраций калибровочных растворов представлены в таблице 22. Пример калибровочного графика приведен на рисунке 18. Полученный коэффициент корреляции соответствует нормам (не менее 0,99).

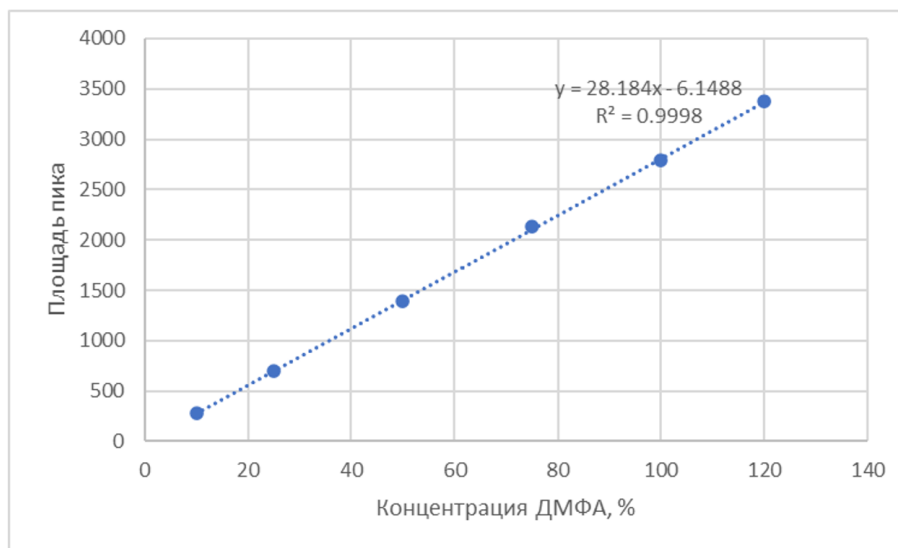


Рисунок 18 – Калибровочный график для ДМФА в нормализованных координатах «введено-найденно»

Таблица 22 – Расхождение между найденными и фактическими концентрациями калибровочных стандартных растворов ДМФА (ε, %)

Площадь пика ДМФА	Концентрация фактическая, %	Концентрация рассчитанная, %	ε, %	Норма, не более %
278,01	10	9,64	- 3,53	5,0
694,71	25	24,43	- 1,99	2,0
1392,10	50	49,17	- 1,65	
2134,73	75	75,52	0,70	
2794,48	100	98,93	- 1,07	
3378,88	120	119,66	- 0,28	

Для полученных при оценке правильности и прецизионности значений концентраций были рассчитаны величины RSD, % и ε, %, приведенные в таблицах 23-25.

Таблица 23 – Правильность и прецизионность методики определения ДМФА в продукте ВВ (день 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	10,11	10,06	0,09	0,85	0,56
	10,05				
	10,11				
	10,10				
	9,91				
25,0	25,01	25,20	0,13	0,50	0,78
	25,12				
	25,30				
	25,29				
	25,26				
75	75,60	75,15	0,32	0,42	0,21
	75,17				
	74,87				
	75,30				
	74,83				
120,0	121,07	121,15	0,60	0,50	0,96
	120,14				
	121,61				
	121,56				
	121,35				

Таблица 24 – Правильность и прецизионность методики определения ДМФА в продукте ВВ (день 2, аналитик 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	9,96	10,02	0,11	1,09	0,16

Продолжение Таблицы 24

	10,03				
	10,00				
	9,90				
	10,19				
25,0	24,84	24,93	0,13	0,51	-0,26
	25,14				
	24,84				
	24,97				
	24,88				
75	75,53	75,27	0,28	0,37	0,36
	75,44				
	74,99				
	75,45				
	74,94				
120,0	120,23	121,26	0,62	0,51	1,05
	121,30				
	121,51				
	121,36				
	121,88				

Таблица 25 – Правильность и прецизионность методики определения ДМФА в продукте ВВ (день 2, аналитик 2)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	9,82	9,96	0,14	1,44	-0,42
	10,15				
	10,04				
	9,82				
	9,96				
25,0	25,02	24,90	0,08	0,33	-0,41

Продолжение Таблицы 25

	24,84				
	24,82				
	24,87				
	24,94				
75	75,04	75,08	0,11	0,15	0,11
	74,92				
	75,17				
	75,21				
	75,07				
120,0	119,92	120,76	0,65	0,54	0,63
	120,45				
	120,94				
	121,68				
	120,82				

Результаты оценки прецизионности и правильности подтверждают соответствие методики предъявляемым требованиям: значения RSD, % и ϵ , % не превышали 5 % для нижней границы диапазона линейности и 2 % для остальных уровней концентраций.

Предел обнаружения методики определяли на основании данных по соотношению «сигнал/шум». За предел обнаружения принимали минимальное разведение, для которого соотношение сигнал/шум принимает значение не меньше 3. Предел обнаружения методики составил 0,5% для ДМФА. Соотношение сигнал/шум составило: для раствора с содержанием ДМФА на уровне 0,5% - 1 к 58 [8].

На основании данных по оценке линейности, правильности и прецизионности была установлена аналитическая область методики определения остаточных органических растворителей, которая составила 10 – 120 % от нормы, приведенной в НД для ДМФА.

3.2.4. Разработка методики одновременного определения подлинности, родственных примесей и количественного определения вспомогательного вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием

В качестве стандартного образца ВВ был использован охарактеризованный ранее внутренний стандартный образец ВВ (СО-КК-46). Для проведения анализа готовился стандартный раствор СО-КК-46 с концентрацией 1,0 мг/мл. В качестве раствора для проверки пригодности хроматографической системы использовали раствор для теста пригодности системы (SST) с концентрацией ВВ 0,1 мг/мл. Протокол градиентного режима элюирования приведен в таблице 26. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин, температура колоночного отделения 55, инжестируемый объем 10 мкл и длина волны детектирования 214 нм [8]. Типичные хроматограммы представлены на рисунке 19.

Таблица 26 – Градиентный режим элюирования для КК-46

Т, мин	А %	В %
0,00	95	5
2,49	95	5
2,50	80	20
25,00	65	35
26,00	30	70
28,00	30	70
29,00	95	5
35,00	95	5

Пригодность хроматографической системы подтверждали по результатам шести последовательных вводов раствора СО-ВВ. Система признавалась пригодной при условии, что относительное стандартное отклонение времени удерживания пика ВВ не превышало 3 %, а относительное стандартное отклонение площадей пиков ВВ составляло не более 5 %.

Для раствора для теста пригодности системы были выдвинуты следующие требования: число теоретических тарелок пика ВВ > 5000, коэффициент асимметрии пика < 1,6 и отношение сигнал/шум (S/N) – не менее 20 [8].

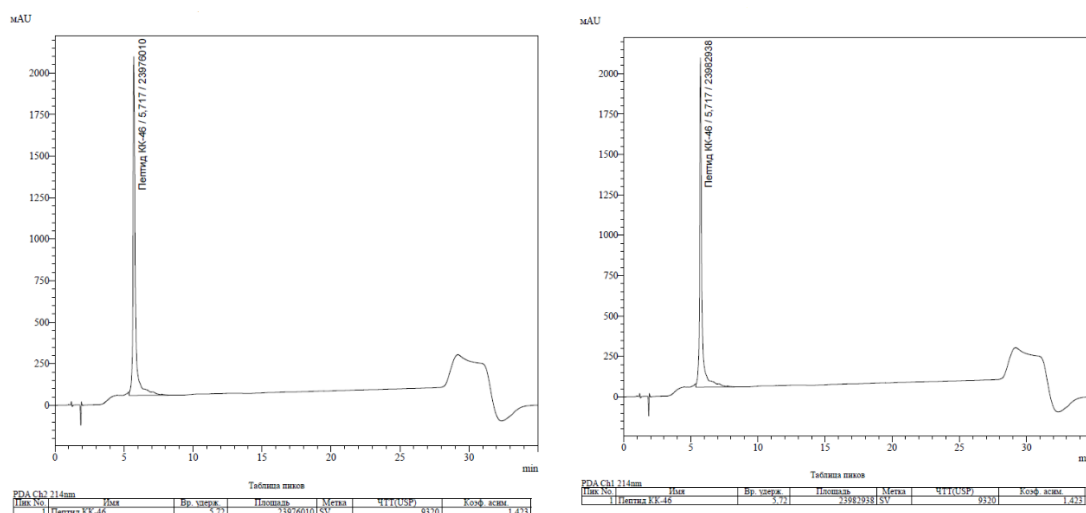


Рисунок 19 – Типичные хроматограммы стандартного и испытуемого растворов ВВ

Идентификация пептида КК-46 в испытуемом образце выполнялась путём вычисления значения τ по формуле $\tau = |T_{\text{Станд}} - T_{\text{Пробы}}|$. $T_{\text{Станд}}$ - среднее значение времени удерживания пика ВВ, рассчитанного по 6 хроматограммам стандартного раствора, $T_{\text{Пробы}}$ - среднее значение времени удерживания пика пептида КК-46, рассчитанного по 10-ти хроматограммам испытуемых растворов. Подтверждением идентификации пика ВВ в испытуемом образце является значение $\tau \leq 0,20$ [8].

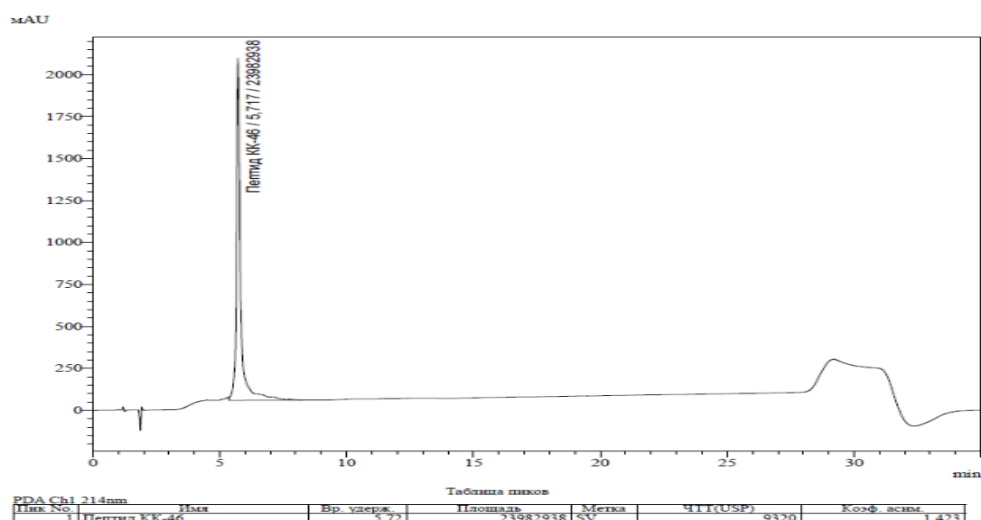
По результатам анализа чистоты содержание неидентифицированных примесей в субстанции ВВ не превышало 0,5%. Установлена норма содержания ВВ – 95–105% от номинального значения (1,674–1,850 мг/флакон).

3.2.4.1. Валидация методики одновременного определения подлинности, родственных примесей и количественного определения вспомогательного вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием

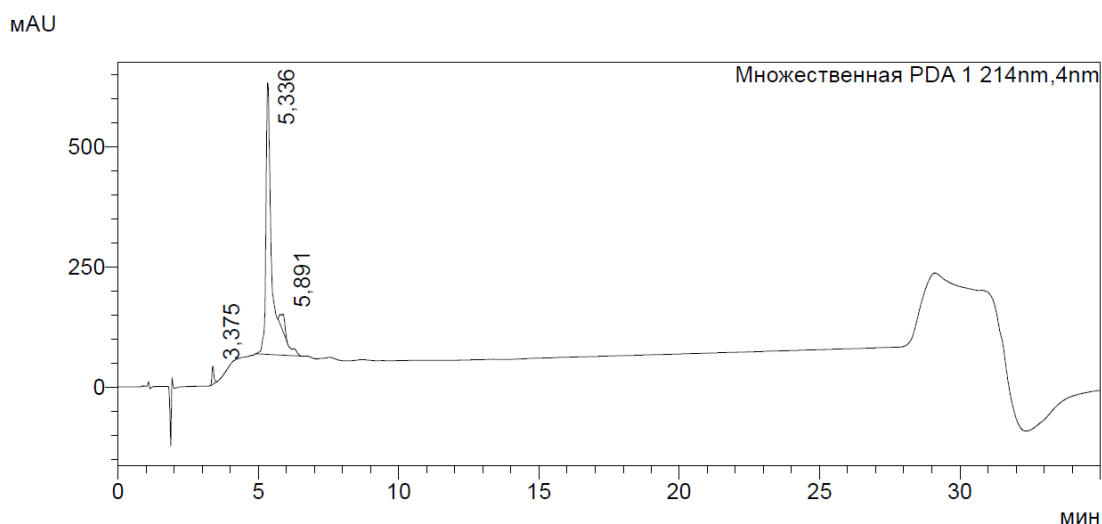
Подтверждение специфичности проводили путем сравнения хроматограмм стандартного раствора и раствора пептида КК-46, который не подвергался очистке (КК-46 сырец). В растворе КК-46-сырца содержатся все возможные неидентифицируемые примеси. Так как примеси пептида не идентифицированы, для более подробного анализа специфичности был использован масс-спектрометр (Shimadzu 8050, Япония) с ионизацией электроспреем в режиме положительной поляризации.

Были проанализированы стандартный раствор и раствор КК-46 сырца. Результаты приведены на рисунке 20.

А



В



<Таблица пиков>

PDA Ch1 214nm							
Пик No.	Имя	Вр. удерж.	Площадь	Высота	Метка	Кэф. асим.	ЧТТ(USP)
1		3,375	181751	37143	M	1,314	10626
2	Пептид КК-46	5,336	8471807	563664	S M	2,306	5698
3		5,891	385749	37963	T M	0,819	6670
Сумма			9039307	638770			

Рисунок 20 – Хроматограмма стандартного раствора (А) и хроматограмма раствора КК-46 сырка (В)

В случае примеси со временем выхода 3,375 мин не наблюдалось наложений на пик ВВ на хроматограмме стандартного раствора и раствора КК-46 сырка. В случае с примесью со временем выхода 5,891 наблюдалось наложение пиков. Пик с временем удерживания 5,7 на хроматограмме стандартного раствора имеет пики на масс-спектрограмме со следующими m/z – 1028,7818($z=5$), 1285,7343($z=4$), 857,4827($z=6$), 734,9854($z=7$) и 643,3650($z=8$). Эти же m/z

присутствуют у пика со временем удерживания 5,336 на хроматограмме КК-46 сырца. На хроматограмме КК-46 сырца у пика со временем удерживания 5,891 присутствуют пики с m/z – 1480,5 ($z=3$), 1110,0 ($z=4$), 891,5 ($z=5$). При этом данных m/z нет на масс-спектрограмме стандартного раствора ВВ. Данные результаты указывают на специфичность валидируемой методики.

Результаты по отклонениям найденных концентраций калибровочных растворов представлены в таблице 27. По полученным значениям был построен калибровочный график, приведенный на рисунке 21. Полученный коэффициент корреляции соответствует нормам (не менее 0,99).

Таблица 27 – Расхождение между найденными и фактическими концентрациями калибровочных стандартных растворов ВВ (ε, %)

Площадь пика ВВ	Концентрация, фактическая, %	Концентрация, рассчитанная, %	ε, %	Норма, не более %
10530	10	9,73	-2,65	5,0
24645	25	25,14	0,57	2,0
46934	50	49,47	-1,05	
70924	75	75,66	0,89	
94229	100	101,11	1,11	
110498	120	118,87	-0,94	

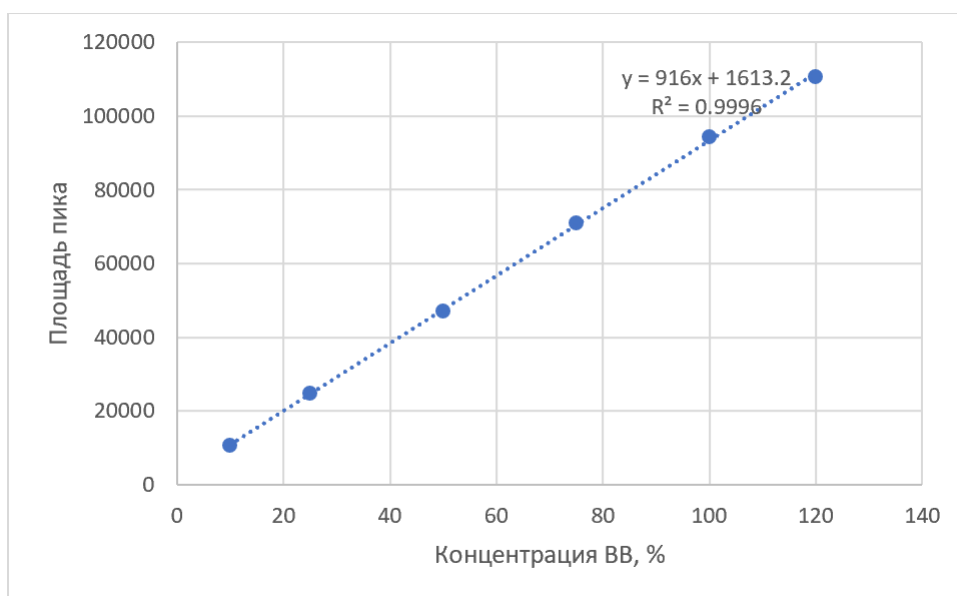


Рисунок 21 – Калибровочный график для ВВ в нормализованных координатах «введено-найденно»

Для полученных при оценке правильности и прецизионности значений концентраций были рассчитаны величины RSD, % и ε, %, приведенные в таблицах 28-30.

Таблица 28 – Правильность и прецизионность методики определения родственных примесей и количественного определения ВВ (день 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	9,11	10,40	0,71	6,79	4,00
	10,72				
	10,89				
	10,39				
	10,89				
25,0	23,4	25,00	1,05	4,22	0,01
	24,83				
	26,52				
	25,32				
	24,94				
75	74,92	74,89	0,81	1,08	-0,14
	75,52				
	74,42				
	73,73				
	75,88				
120,0	115,36	117,05	8,28	7,07	-2,46
	113,62				
	106,12				
	120,33				
	129,83				

Таблица 29 – Правильность и прецизионность методики определения родственных примесей и количественного определения ВВ (день 2, аналитик 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	9,75	10,27	0,35	3,44	2,70
	10,46				
	10,76				
	10,21				
	10,17				
25,0	25,39	24,31	0,98	4,04	-2,77
	23,31				
	24,55				
	25,16				
	23,13				

Продолжение Таблицы 29

75	76,34	75,71	0,88	1,17	0,95
	74,92				
	76,54				
	76,28				
	74,49				
120,0	134,3	130,84	7,64	5,84	9,03
	133,2				
	128,55				
	139,88				
	118,27				

Таблица 30 – Правильность и прецизионность методики определения родственных примесей и количественного определения ВВ (день 2, аналитик 2)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	9,28	9,65	0,43	4,42	-3,48
	9,06				
	9,98				
	9,87				
	10,07				
25,0	26,21	24,89	1,02	4,11	-0,46
	25,4				
	23,5				
	24,08				
	25,24				
75	74,48	74,93	0,44	0,59	-0,09
	74,47				
	74,95				
	75,52				
	75,25				
120,0	131,7	114,54	9,44	8,25	-4,55
	105,99				
	109,23				
	112,57				
	113,21				

Результаты оценки прецизионности и правильности подтверждают соответствие методики предъявляемым требованиям: значения RSD, % и ε, % не превышали 5 % для нижней границы

диапазона линейности и 2 % для остальных уровней концентраций, а предел обнаружения методики, определенный по соотношению «сигнал/шум» как минимальное разведение с величиной этого соотношения не менее 3, составил для ВВ 0,5 % при фактически найденном соотношении 1 к 26.

Совокупность данных по линейности, точности и прецизионности позволила установить аналитическую область методики количественного определения ВВ на уровне от 10 до 120 % нормы, регламентированной НД для ВВ.

В соответствии с ОФС.1.1.0012. «Валидация аналитических методик» предел количественного определения – это наименьшее количество вещества в образце, которое может быть количественно оценено с используемой валидируемой методики с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью. В соответствии с данным способом определения ПКО составил 0,5% от нормы, приведенной в НД для ВВ [3].

3.3. Контроль качества растворителя для приготовления раствора для ингаляций

Растворитель – фосфатно-солевой буферный раствор, используется для приготовления растворов АФС и ВВ в индивидуальных флаконах. Растворитель должен быть прозрачным и бесцветным. Также, контролируется содержание ионов натрия, калия и фосфатов.

3.3.1. Аналитическая методика испытания на катионы натрия и калия в растворителе для приготовления раствора для ингаляций методом атомно-абсорбционной спектроскопии

Для определения количества катионов натрия измерение интенсивности спектральной линии выполняли в режиме эмиссии при длине волны 589,6 нм.

Измеряли значения интенсивности спектральной линии для каждого стандартного раствора и строили калибровочную кривую. На оси абсцисс откладывали концентрацию натрий-иона, на оси ординат – измеренные значения интенсивности спектральной линии.

Измеряли интенсивность спектральной линии испытуемого раствора в 3-х повторностях и рассчитывали среднее значение. Полученное значение использовали для определения концентрации натрий-ионов в испытуемом фосфатно-солевом буферном растворе с помощью калибровочной кривой.

Рассчитывали содержание натрий-иона в фосфатно-солевом буферном растворе (X), в мг, по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 500}{1 \cdot 1000} = \frac{C}{2}$$

C – концентрация натрий-иона в испытуемом растворе, мг/л;

1 – разведение;

500 – разведение;

1000 – коэффициент пересчёта л в мл.

Содержание натрия в испытуемом фосфатно-солевом буферном растворе должно быть $3,61 \pm 0,36$ мг/мл.

Для определения количества катионов калия измерение интенсивности спектральной линии выполняли в режиме эмиссии при длине волны 768 нм или ином близком значении, рекомендованном производителем альтернативного оборудования.

Измеряли значения интенсивности спектральной линии для каждого стандартного раствора и строили калибровочную кривую. На оси абсцисс откладывали концентрацию калий-иона, на оси ординат – измеренные значения интенсивности спектральной линии;

Измеряли интенсивность спектральной линии испытуемого раствора в 3-х повторностях и рассчитывали среднее значение. Полученное значение использовали для определения концентрации калий-ионов в испытуемом фосфатно-солевом буферном растворе с помощью калибровочной кривой.

Рассчитывали содержание калий-иона в фосфатно-солевом буферном растворе (X), в мг, по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 50}{2 \cdot 1000} = \frac{C}{40}$$

C – концентрация калий-иона в испытуемом растворе, мг/л;

2 – разведение;

50 – разведение;

1000 – коэффициент пересчёта л в мл.

Содержание калия в испытуемом фосфатно-солевом буферном растворе должно быть $0,225 \pm 0,03$ мг/мл.

3.3.2. Аналитическая методика количественного определения фосфат-ионов

Метод определения фосфатов основан на реакции с молибдат-ионами, которая в присутствии восстановителя приводит к образованию окрашенного в синий цвет продукта – молибденовой сини.

В отдельные мерные колбы вместимостью 25 мл вносили по 2,0 мл испытуемого раствора, стандартного раствора и воды. В каждую колбу последовательно добавляли 10 мл ацетатного буферного раствора с рН от 3,9 до 4,1, 2,5 мл 1 % раствора аммония молибдата в растворе серной кислоты и 2,5 мл свежеприготовленного 1 % раствора аскорбиновой кислоты, после чего объемы растворов доводили тем же ацетатным буферным раствором до метки и перемешивали. Спустя ровно 10 мин с момента внесения 1 % раствора аскорбиновой кислоты проводили спектрофотометрическое измерение оптической плотности испытуемых и стандартного растворов при длине волны, отвечающей максимуму поглощения (740 нм), в кювете с толщиной слоя 1 см, используя в качестве раствора сравнения контрольный раствор.

Содержание фосфатов в препарате в мг/мл (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m \cdot 95 \cdot 10 \cdot 25}{A_0 \cdot 1000 \cdot 136 \cdot 50 \cdot 1,4}$$

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность стандартного раствора;

m – масса навески калия фосфата однозамещенного, взятой для приготовления основного стандартного раствора, мг;

95 – молярная масса фосфат иона, г/моль;

136 – молярная масса калия фосфата однозамещенного, г/моль;

1000 – объем мерной колбы для растворения навески калия фосфата однозамещенного, мл;

10 – объем аликвоты СО, взятой для приготовления стандартного раствора, мл;

50 – объем мерной колбы, взятой для приготовления стандартного раствора, мл;

1,4 – объем аликвоты фосфатно-солевого буферного раствора, мл;

25 – объем мерной колбы, взятой для приготовления испытуемого раствора, мл.

За результат принимали среднее значение из двух измерений.

Содержание фосфат-ионов в испытуемом фосфатно-солевом буферном растворе должно быть $1,14 \pm 0,22$ мг/мл.

3.3.2.1. Валидация аналитической методики определения фосфат-ионов

Подтверждение специфичности проводили сравнением окраски у холостого, стандартного и испытуемого растворов. Специфичность подтверждена, если растворитель и компоненты препарата не искажают результаты. Анализ показал, что у холостого раствора окраска не

наблюдалась. Таким образом, методика селективна, величина сигнала зависит только от концентрации фосфат-ионов, другие компоненты не влияют на определение.

Результаты по отклонениям концентраций калибровочных растворов представлены в таблице 31. По полученным значениям был построен калибровочный график, приведенный на рисунке 22.

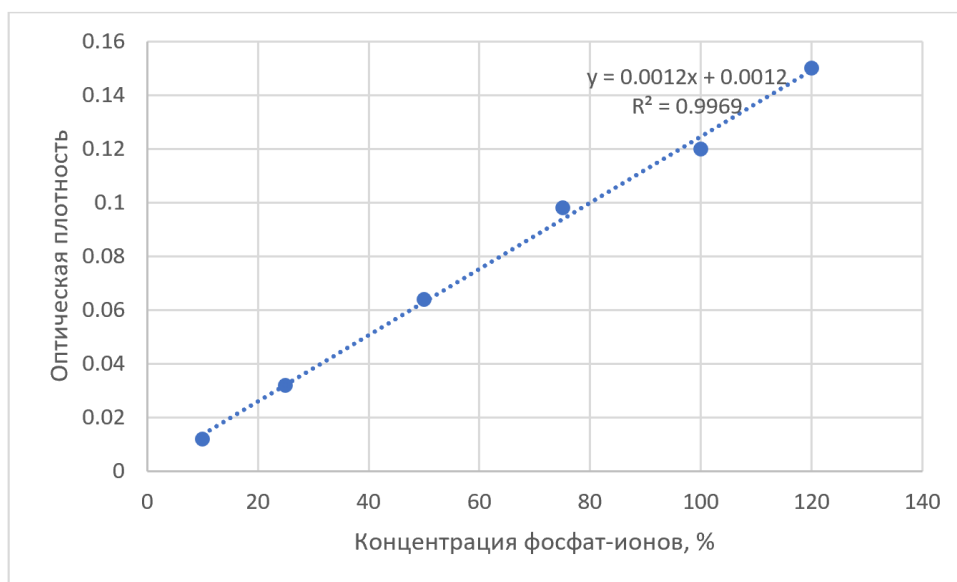


Рисунок 22 – Калибровочный график для фосфатов в нормализованных координатах «введено-найденно»

Линейность калибровочной зависимости в интервале 10–120 % была оценена значением квадрата коэффициента линейной корреляции (R^2) между аналитическим сигналом и концентрацией аналита, составляющий 0,9969, что соответствует критерию приемлемости.

Таблица 31 – Расхождение между найденными и фактическими концентрациями калибровочных стандартных растворов фосфатов (ϵ , %)

Оптическая плотность	Концентрация, фактическая, %	Концентрация, рассчитанная, %	ϵ , %	Норма, не более %
0,012	10	9,67	-3,32	5,0
0,032	25	24,50	-1,98	2,0
0,064	50	49,33	-1,33	
0,098	75	75,77	1,03	
0,12	100	99,26	-0,74	
0,15	120	120,07	0,06	

Для полученных при оценке правильности и прецизионности значений концентраций были рассчитаны величины RSD, % и ϵ , %, приведенные в таблицах 32-34.

Таблица 32 – Правильность и прецизионность методики определения фосфатов в ФСБР (день 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	10,00	10,00	0,15	1,47	-0,04
	10,09				
	9,90				
	9,81				
	10,18				
25,0	25,03	24,93	0,15	0,60	-0,27
	25,14				
	24,89				
	24,80				
	24,80				
75,0	75,54	75,20	0,24	0,32	0,27
	75,21				
	74,87				
	75,14				
	75,24				
120,0	120,55	120,31	0,81	0,68	0,25
	121,17				
	119,52				
	119,38				
	120,91				

Таблица 33 – Правильность и прецизионность методики определения фосфатов в ФСБР (день 2, аналитик 1)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	10,00	9,94	0,08	0,85	-0,58
	9,95				
	9,89				
	9,83				
	10,04				
25,0	25,04	24,93	0,09	0,36	-0,30
	24,94				
	24,87				
	24,81				
	24,97				
75,0	74,87	75,22	0,25	0,33	0,30
	75,56				
	75,15				
	75,24				
	75,29				
120,0	121,45	120,40	0,70	0,58	0,33
	119,65				
	119,87				
	120,59				

Продолжение Таблицы 33

	120,42				
--	--------	--	--	--	--

Таблица 34 – Правильность и прецизионность методики определения фосфатов в ФСБР (день 2, аналитик 2)

Введено (%)	Найдено (%)	Найдено (%), среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	±ε, %
10,0	10,08	10,01	0,10	0,99	0,10
	10,13				
	9,90				
	9,92				
	10,02				
25,0	25,00	24,99	0,14	0,56	-0,02
	25,23				
	24,86				
	24,95				
	24,93				
75,0	74,84	75,25	0,33	0,44	0,33
	74,96				
	75,60				
	75,40				
	75,44				
120,0	119,81	120,93	0,77	0,64	0,77
	121,43				
	120,45				
	121,30				
	121,64				

Результаты оценки прецизионности и правильности подтверждают соответствие методики предъявляемым требованиям: значения RSD, % и ε, % не превышали 5 % для нижней границы диапазона линейности и 2 % для остальных уровней концентраций. Совокупность данных по линейности, правильности и прецизионности позволила установить аналитическую область методики на уровне от 10 до 120 % нормы, регламентированной НД для фосфатов.

Предел обнаружения методики устанавливали по соотношению «сигнал/шум», принимая за него минимальное разведение, при котором данное соотношение составляет не менее 3. Для фосфатов предел обнаружения оказался равен 0,5 %, при этом для раствора с содержанием фосфатов на указанном уровне соотношение «сигнал/шум» составило 1 к 73.

3.4. Контроль качества раствора для ингаляций

При растворении АФС и ВВ в ФСБР в индивидуальных флаконах наблюдалось образование прозрачных растворов. При их смешивании образовывался комплекс

миРНК:пептид в соотношении 1:20, для которого характерно появление опалесценции, служащее аналитическим признаком формирования комплекса.

Для выполнения анализа во флакон 1, содержащий АФС, вносили ФСБР из флакона 2 и встряхивали содержимое вплоть до полного растворения порошка. Таким же способом готовили раствор ВВ, добавляя во флакон 3 ФСБР из флакона 4. Полученный во флаконе 3 раствор далее вносили во флакон 1, осторожно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 30 мин.

Определение проводили турбидиметрическим методом в соответствии с требованиями ГФ РФ XV, ОФС.1.2.1.0007. «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей» [4].

Методика выполнения измерений:

1. Выполняли калибровку турбидиметра с помощью стандартных растворов;
2. Выполняли измерение степени мутности эталона IV;

Свежеприготовленный эталон IV переносили в измерительную кювету, закрывали её, устанавливали в ячейку для кювет турбидиметра и выполняли измерение. Фиксировали значение результата.

3. Выполняли измерение степени мутности испытуемого раствора.

Испытуемый раствор переносили в измерительную кювету, закрывали её, устанавливали в ячейку для кювет турбидиметра и выполняли измерение № 1. Фиксировали значение результата № 1.

Не извлекая кювету из турбидиметра, по истечении 20 минут выполняли измерение № 2 и фиксировали измеренное значение.

Мутность раствора при измерении 1 должна была быть не менее 150 NTU.

Мутность раствора при измерении 2 должна была быть не менее 100 NTU.

3.4.1. Валидация аналитической методики определения степени мутности раствора для ингаляций

Подтверждение специфичности проводили путем сравнения растворов миРНК в фосфатном буфере, ВВ в фосфатном буфере и испытуемого раствора относительно эталона мутности IV. Специфичность аналитической методики доказана, если выполняются следующие условия: раствор миРНК в фосфатном буфере и раствор ВВ в фосфатном буфере не должны быть мутными. Их мутность должна быть меньше мутности эталона IV. В то время как мутность испытуемого раствора должна быть выше эталона мутности IV.

При измерении мутности с помощью вышеуказанного метода мутность растворов миРНК в фосфатном буфере и ВВ в фосфатном буфере была меньше мутности эталона IV, а мутность испытуемого раствора была выше мутности эталона IV.

Для анализа точности и прецизионности проводили анализ 3 стандартных образцов мутности 20 NTU; 100 NTU; 180 NTU с заявленным уровнем мутности. Для полученных значений мутности были рассчитаны величины RSD, % и ϵ , %, приведенные в таблицах 35 и 36.

Таблица 35 – Прецизионность методики турбидиметрического определения мутности раствора для ингаляций

Введено, NTU	Найдено, NTU	Найдено, NTU; среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	$\pm\epsilon$, %
20,0	20	20,00	0,63	3,16	0,00
	20				
	21				
	19				
	20				
100,0	98	99,60	1,03	1,04	-0,40
	99				
	100				
	101				
	100				
180,0	179	180,00	0,63	0,35	0,00
	180				
	180				
	181				
	180				

Таблица 36 – Правильность методики турбидиметрического определения мутности раствора для ингаляций

Введено, NTU	Найдено, NTU	Найдено, NTU; среднее значение (n=5)	SD (n=5)	RSD, % (n=5)	$\pm\epsilon$, %
20,0	20	19,80	0,79	3,98	-1,00
	20				
	21				
	19				
	19				
100,0	98	99,80	1,23	1,23	-0,20
	99				
	101				
	101				
	100				
180,0	179	180,20	0,79	0,44	0,11
	180				
	181				

Продолжение Таблицы 36

	181				
	180				

Результаты оценки прецизионности и правильности подтверждают соответствие методики предъявляемым требованиям: значения RSD, % и ϵ , % не превышали 5 % для нижней границы диапазона линейности и 2 % для остальных уровней концентраций.

Для оценки робастности методики проводили анализ 3 образцов эталона IV. Исследования проводили на двух приборах турбидиметрах LANGE модели 2100Q и модели 2100Qis. Результаты приведены в таблице 37.

Таблица 37 – Робастность методики турбидиметрического определения мутности раствора для ингаляций

Прибор	Введено, NTU	Найдено, NTU	Найдено, среднее (n=5)	NTU; значение	SD (n=5)	RSD, % (n=5)
HACH 2100Q	Эталон IV (30,0)	30	29,60		0,55	1,85
		29				
		30				
		30				
		29				
LANGE 2100Q	20,0	20	20,00		0,63	3,13
		19				
		21				
		20				
		20				
LANGE 2100Qis	20,0	20	20,40			
		21				
		21				
		20				
		20				

Методика определения степени мутности раствора для ингаляций методом турбидиметрии была валидирована по валидационным параметрам специфичность, правильность, прецизионность и робастность.

3.5. Выводы к главе результаты и обсуждение

1. Методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием подтверждена структура активной фармацевтической субстанции и вспомогательного вещества: для трёх серий полупродукта миРНК экспериментально определённые молекулярные массы смысловой и антисмысловой

цепей 7148-7151 и 6872-6875 г/моль соответствовали расчётным значениям 7147 ± 7 и 6871 ± 7 г/моль. Для пептида КК-46 измеренные значения 5133–5135 г/моль соответствовали теоретической массе 5140 г/моль при допустимом диапазоне 5126–5154 г/моль. Дополнительных воспроизводимых сигналов примесей не выявлено.

2. Методом инфракрасной спектроскопии подтверждена структура катионного дендримерного пептида КК-46 по характеристическим полосам поглощения связей N-H, C-H, Ar-C-C, C=O, C=N, NH и C-O(H). Метод включён в спецификацию в качестве дополнительного способа подтверждения подлинности вспомогательного вещества.

3. Разработаны стандартные образцы активной фармацевтической субстанции и вспомогательного вещества. Аттестацию массовой доли основного вещества проводили методом баланса масс с использованием разработанных методик высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием для определения содержания родственных примесей и количественного определения методом внутренней нормализации в соответствии с общей фармакопейной статьёй ОФС.1.2.1.2.0001. «Хроматография», а также методик определения остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационной детекцией. Примеры паспортов на полученные стандартные образцы приведены в приложениях А и Б.

4. Проведена разработка и валидация методики газовой хроматографии с пламенно-ионизационной детекцией для определения остаточных органических растворителей: предел обнаружения для ацетонитрила в полупродукте активной фармацевтической субстанции и вспомогательного вещества, а также для ДМФА во вспомогательном веществе составил 0,5% (соотношение сигнал/шум 1:67 и 1:58 соответственно), аналитическая область методик – 10–120% от нормы, величины RSD, % и ϵ , % не превышали 5% для нижней границы линейности и 2% для остальных точек. Во всех испытанных сериях содержание остаточных растворителей было ниже предела обнаружения.

5. Для активной фармацевтической субстанции и вспомогательного вещества разработаны и валидированы методики высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием в ультрафиолетовой области спектра, позволяющие одновременно устанавливать подлинность, определять родственные примеси и оценивать количественное содержание: коэффициенты корреляции калибровочных кривых составили не менее 0,99, аналитическая область – 10–120% от номинального значения, критерий подтверждения подлинности $\tau \leq 0,20$, содержание неидентифицированных примесей не превышало 5% для миРНК и 0,5% для КК-46. Установлены нормы содержания активной фармацевтической субстанции – 0,084–0,092 мг/флакон (95-105%) и вспомогательного вещества – 1,674 – 1,850 мг/флакон (95-105%).

6. Проведена валидация методик определения катионов натрия и калия методом атомно-абсорбционной спектроскопии, а также разработана и валидирована методика спектрофотометрии для количественного определения фосфат-ионов в фосфатно-солевом буферном растворе. Норма содержания ионов в растворителе составила $3,61 \pm 0,36$ мг/мл, $0,225 \pm 0,03$ мг/мл для натрия и калия соответственно, и $1,14 \pm 0,22$ мг/мл для фосфатов. Коэффициент корреляции калибровочной кривой методики определения фосфат-ионов составил 0,9969 при аналитической области 10–120% и пределе обнаружения 0,5% (соотношение сигнал/шум 1:73).

7. Разработана и валидирована турбидиметрическая методика определения степени мутности раствора для ингаляций: установлены критерии приемлемости – не менее 150 NTU при первом измерении и не менее 100 NTU при повторном измерении через 20 минут. Погрешность определения на трёх уровнях мутности (20, 100 и 180 NTU) не превышала нормируемых пределов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования достигнуты благодаря использованному комплексному подходу к стандартизации и контролю качества миРНК-препаратов на примере лекарственного препарата МИР 19®. Теоретическая значимость работы заключается в обосновании комплексного подхода к стандартизации синтетических миРНК-препаратов, предусматривающего оценку качества как активной фармацевтической субстанции – малой интерферирующей РНК, так и вспомогательных компонентов, в том числе катионного дендримерного пептида, обеспечивающего ее доставку в клетки.

Стандартизация субстанций малой интерферирующей РНК и катионного дендримерного пептида проведена с применением безэталонных физико-химических методов – масс-спектрометрии и ИК-спектрометрии, количественная оценка содержания основного компонента в субстанциях осуществлялась методом массового баланса.

Практическая реализация результатов исследования непосредственно отражена в системе контроля качества лекарственного препарата: разработанный на основе охарактеризованных стандартных образцов комплекс аналитических методик прошел валидацию и был включен в нормативную документацию на лекарственный препарат, что обеспечило возможность регистрации и последующего серийного производства препарата. Сформированный подход может быть использован как методологическая основа при проведении стандартизации и разработке методик контроля качества новых лекарственных препаратов на основе миРНК.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. По результатам ретроспективного анализа регуляторных данных и данных научной литературы выявлены ключевые направления развития системы обеспечения качества РНК-содержащих препаратов и лекарственных средств пептидной структуры с целью использования полученной информации для разработки методик контроля качества и стандартизации препарата. Проведен обзор требований действующих нормативных документов Российской Федерации и ЕАЭС, регламентирующих подходы к оценке качества терапевтических олигонуклеотидов и лекарственных средств пептидной структуры. Систематизированные актуальные регуляторные требования и данные научной литературы были взяты за основу в процессе разработки стандартных образцов и методик контроля качества компонентов миРНК-препарата. Научно обоснован комплекс подходов к стандартизации и контролю качества оригинального РНК-содержащего препарата МИР 19®, включающий использование методов масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием, инфракрасной спектрометрии, газовой хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, электрофореза в агарозном геле, атомно-абсорбционной спектрометрии, спектрофотометрии, турбидиметрии.

2. Проведены разработка и валидация по показателю «специфичность» методик подтверждения подлинности синтетической малой интерферирующей РНК, катионного дендримерного пептида и компонентов фосфатно-солевого буферного раствора, включая методики высокоэффективной жидкостной хроматографии, электрофореза в агарозном геле, атомно-абсорбционной спектрометрии и спектрофотометрии. Изучены основные спектральные характеристики малой интерферирующей РНК и катионного дендримерного пептида используя инструментальные методы анализа, включая инфракрасную спектрометрию и масс-спектрометрию. Полученные спектральные данные были интерпретированы с последующим использованием для подтверждения структуры изучаемых субстанций. Экспериментально определенные методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием молекулярные массы смысловой и антисмысловой цепей активной фармацевтической субстанции (7148-7151 и 6872-6875 г/моль) и вспомогательного вещества (5133–5135 г/моль) во всех проанализированных сериях соответствовали расчетным значениям, что обеспечило подтверждение химической структуры объектов исследования.

3. Для количественного определения субстанций малой интерферирующей РНК и катионного дендримерного пептида разработаны и валидированы методики на основе

обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией. Разработаны и валидированы методики количественного определения компонентов фосфатно-солевого буферного раствора методами атомно-абсорбционной спектрометрии и спектрофотометрии. Установлены нормы содержания активной фармацевтической субстанции – 0,084–0,092 мг/флакон (95–105%) и вспомогательного вещества – 1,674–1,850 мг/флакон (95–105%), а также нормы содержания ионов в растворителе: натрия – $3,61 \pm 0,36$ мг/мл, калия – $0,225 \pm 0,03$ мг/мл, фосфатов – $1,14 \pm 0,22$ мг/мл.

4. Разработаны и валидированы методики определения остаточных органических растворителей в субстанциях малой интерферирующей РНК и катионного дендримерного пептида методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационной детекцией и определения чистоты субстанций методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией. Установлены нормы чистоты для малой интерферирующей РНК и катионного дендримерного пептида 95,0% и 99,5% соответственно, что удовлетворяет требованиям актуальной регуляторной нормативной документации.

5. Охарактеризовано качество разработанных стандартных образцов малой интерферирующей РНК и катионного дендримерного пептида на основании спектральных характеристик, полученных с использованием инструментальных безэталоных методов масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием и инфракрасной спектрометрии. Определение доли основного вещества в разработанных стандартных образцах малой интерферирующей РНК и катионного дендримерного пептида проводили с использованием общепринятого метода массового баланса, включающего количественное определение остаточных органических растворителей и родственных примесей, которое проводили методами газовой хроматографии с пламенно-ионизационной детекцией и высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией соответственно. Установлены необходимые для оценки качества критерии подлинности изучаемых субстанций, вошедшие в паспорта на внутренние стандартные образцы: соответствие молекулярных масс смысловой (7147 ± 7 г/моль) и антисмысловой (6871 ± 7 г/моль) цепей активной фармацевтической субстанции, молекулярной массы вспомогательного вещества (5126–5154 г/моль), и соответствие полос поглощения связей вспомогательного вещества установленным характерным полосам поглощения (N-H (3540–3000 см⁻¹), C-H (две полосы: 2995–2905 см⁻¹, 2905–2736 см⁻¹), Ar-C-C (1645–1575, 1484–1404), C=O (I амид), C=N (1730–1645 см⁻¹), NH (II амид, 1670–1590 см⁻¹), C-O(H) (1158–1030 см⁻¹)).

6. Разработан проект спецификации на лекарственный препарат МИР 19®: проекты спецификаций на синтетическую малую интерферирующую РНК, катионный дендримерный

пептид, фосфатно-солевой буферный раствор, а также на восстановленный раствор для ингаляций. В утвержденный проект спецификации вошли разработанные и валидированные методики идентификации, определения примесей и количественного определения содержания активной фармацевтической субстанции и вспомогательных веществ – катионного дендримерного пептида и компонентов фосфатно-солевого буферного раствора, а также анализ мутности раствора для ингаляций.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанные нормативные документы, позволяющие осуществить контроль качества активной фармацевтической субстанции (миРНК), вспомогательного вещества, фосфатно-солевого буферного раствора и восстановленного раствора для ингаляций могут быть использованы при производстве препарата МИР 19®. Их использование позволит получить стандартизованный лекарственный препарат надлежащего фармацевтического качества, что повысит безопасность и эффективность его применения. Кроме того, разработанные подходы к стандартизации и контролю качества могут быть применены к другим препаратам, созданным на основе миРНК. Унифицированность аналитических подходов возможна благодаря схожести физико-химических свойств лекарственных препаратов данной группы между собой. В результате чего, разработанный подход можно считать платформенным и применять его к новым миРНК-препаратам после соответствующих изменений в методологии, которые могут быть обусловлены химическими модификациями самих молекул миРНК и использованием различных вспомогательных веществ, включая соответствующие системы доставки.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Представляется перспективным дальнейшее развитие подходов к контролю стабильности олигонуклеотидных препаратов, включая разработку и валидацию методов для выявления новых модификаций миРНК (например, LNA-, ДНК-модифицированных олигонуклеотидов), обладающих повышенной устойчивостью к нуклеазной деградации. Также целесообразно продолжить работу по созданию и оптимизации клеточных моделей для количественной оценки биологической активности миРНК-содержащих препаратов. Кроме того, дальнейшего совершенствования требует контроль продуктов деградации РНК и родственных пептидных примесей. Перспективным является внедрение высокочувствительных методов (ВЭЖХ-МС/МС, капиллярный электрофорез с масс-спектрометрической детекцией) для идентификации и количественного определения минорных примесей, что особенно актуально для биоаналогов и воспроизведенных препаратов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ААС	Атомно-абсорбционная спектрометрия
АФС	Активная фармацевтическая субстанция
ВВ	Вспомогательное вещество
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-УФ	Высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием
ГФ РФ	Государственная фармакопея Российской Федерации
ГХ	Газовая хроматография
ГХ-ПИД	Газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием
ДМФА	N,N-Диметилформамид
ЕАЭС	Евразийский экономический союз
ИК	Инфракрасный (ИК-спектр, ИК-спектрометрия)
ИП-ОФ-ВЭЖХ	Ион-парная обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
КПП	Клеточно-проникающие пептиды
МАЛДИ-ВП-МС	Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным детектированием
миРНК	Малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота
НД	Нормативная документация
ОФС	Общая фармакопейная статья
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
ПЭИ	Полиэтиленимин
РНК	Рибонуклеиновая кислота
РНКи	РНК-интерференция
СО	Стандартный образец
СФМ	Спектрофотометрия
ФСБР	Фосфатно-солевой буферный раствор
Ago2	Argonaute 2 (белок Аргонавт-2, эндонуклеаза в составе комплекса RISC)
AS	Antisense strand (антисмысловая цепь миРНК)
COVID-19	Coronavirus disease 2019 (коронавирусная инфекция 2019 года)

EMA	European Medicines Agency (Европейское агентство по лекарственным средствам)
FDA	Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США)
GalNAc	N-Acetylgalactosamine (N-ацетилгалактозамин)
LNA	Locked nucleic acid (замкнутая нуклеиновая кислота)
NTU	Nephelometric Turbidity Unit (нефелометрическая единица мутности)
RISC	RNA-induced silencing complex (РНК-индуцированный сайленсинг-комплекс)
RSD	Relative standard deviation (относительное стандартное отклонение)
S	Sense strand (смысловая цепь мРНК)
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2)
SD	Standard deviation (стандартное отклонение)
TAE	Tris-acetate-EDTA (трис-ацетатный буферный раствор с этилендиаминтетрауксусной кислотой)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. ОФС.1.1.0006 Субстанции для фармацевтического применения: общая фармакопейная статья: утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 11.04.2025 № 188 // Государственная фармакопея Российской Федерации, XV издание: [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. ОФС.1.1.0008 Остаточные органические растворители: общая фармакопейная статья: утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 11.04.2025 № 188 // Государственная фармакопея Российской Федерации, XV издание: [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик: общая фармакопейная статья: утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20.07.2023 № 377 // Государственная фармакопея Российской Федерации, XV издание: [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. ОФС.1.2.1.0007 Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей: общая фармакопейная статья: утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20.07.2023 № 377 // Государственная фармакопея Российской Федерации, XV издание: [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации. ОФС.1.2.1.1.0005 Атомно-абсорбционная спектрометрия: общая фармакопейная статья // Государственная фармакопея Российской Федерации, XV издание: [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации. ОФС.1.2.1.2.0001 Хроматография: общая фармакопейная статья // Государственная фармакопея Российской Федерации, XV издание: [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
7. Подходы к стандартизации и контролю качества активной фармацевтической субстанции препарата синтетической малой интерферирующей рибонуклеиновой кислоты (миРНК) для лечения COVID-19 / В. Н. Туренко, В. В. Смирнов, Д. Э. Багаев, М. А. Евсеев, А. А. Власов, М. В. Ходжава, М. Р. Хайтов // Химико-фармацевтический журнал. – 2026. – Т. 60. – № 3. – С. 57–64.

8. Подходы к стандартизации и контролю качества катионного дендримерного пептида — вспомогательного вещества, входящего в состав препарата синтетической малой интерферирующей рибонуклеиновой кислоты (миРНК) для лечения COVID-19 / В. Н. Туренко, В. В. Смирнов, Д. Э. Багаев, М. А. Евсеев, А. А. Власов, М. В. Ходжава, М. Р. Хаитов // Химико-фармацевтический журнал. – 2026. – Т. 60. – № 5. – С. 39–46.
9. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств». – URL: <https://docs.eaeunion.org/documents/253/3777/> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
10. A holistic analysis of the intrinsic and delivery-mediated toxicity of siRNA therapeutics / S. Ranjbar, X. B. Zhong, J. Manautou [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2023. – Vol. 201. – P. 1–38.
11. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China / F. Wu, S. Zhao, B. Yu [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 579. – № 7798. – P. 265–269.
12. A phase 1 study to evaluate the safety, tolerability, PK/PD of SRSD107 in healthy participants: NCT06116617 // ClinicalTrials.gov: [сайт]. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06116617> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
13. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin / P. Zhou, X. L. Yang, X. G. Wang [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 579. – № 7798. – P. 270–273.
14. A study of RBD1016 in CHB participants: NCT05961098 // ClinicalTrials.gov: [сайт]. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05961098> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
15. A study to evaluate zilebesiran: NCT06423352 // ClinicalTrials.gov: [сайт]. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06423352> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
16. Advanced in developmental organic and inorganic nanomaterial: a review / K. Khalid, X. Tan, H. F. Mohd Zaid [et al.] // Bioengineered. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 328–355.
17. Amphetamine decorated cationic lipid nanoparticles cross the blood-brain barrier: therapeutic promise for combating glioblastoma / S. Saha, V. Yakati, G. Shankar [et al.] // Journal of Materials Chemistry B. – 2020. – Vol. 8. – № 19. – P. 4318–4330.
18. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs / S. M. Elbashir, J. Harborth, K. Weber [et al.] // Methods. – 2002. – Vol. 26. – № 2. – P. 199–213.
19. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy / N. Tang, H. Bai, X. Chen [et al.] // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2020. – Vol. 18. – № 5. – P. 1094–1099.

20. Antitumor effect of hyaluronic-acid-modified chitosan nanoparticles loaded with siRNA for targeted therapy for non-small cell lung cancer / W. Zhang, W. Xu, Y. Lan [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2019. – Vol. 14. – P. 5287–5301.
21. Applications of liposomes and lipid nanoparticles in cancer therapy: current advances and prospects / Z. Cheng, H. Huang, M. Yin [et al.] // *Experimental Hematology and Oncology*. – 2025. – Vol. 14. – № 1. – P. 1–21.
22. Barriers and Strategies of Cationic Liposomes for Cancer Gene Therapy / C. Liu, L. Zhang, W. Zhu [et al.] // *Molecular Therapy – Methods and Clinical Development*. – 2020. – Vol. 18. – P. 751–764.
23. Cancer cell membrane-coated siRNA-Decorated Au/MnO₂ nanosensitizers for synergistically enhanced radio-immunotherapy of breast cancer / D. Wang, S. Lin, T. Li [et al.] // *Materials Today Bio*. – 2024. – Vol. 29. – Art. 101275.
24. Carbon Nanotubes: Solution for the Therapeutic Delivery of siRNA? / D. L. Kirkpatrick, M. Weiss, A. Naumov [et al.] // *Materials*. – 2012. – Vol. 5. – № 2. – P. 278–301.
25. Challenges and opportunities for siRNA-based cancer treatment / T. Wang, S. Shigdar, H. A. Shamaileh [et al.] // *Cancer Letters*. – 2017. – Vol. 387. – P. 77–83.
26. Chitosan-Based Nanoparticles as Effective Drug Delivery Systems—A review / K. Jaferník, A. Ładniak, E. Blicharska [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 4. – Art. 1963.
27. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li [et al.] // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395. – № 10223. – P. 497–506.
28. Delivery materials for siRNA therapeutics / R. Kanasty, J. R. Dorkin, A. Vegas [et al.] // *Nature Materials*. – 2013. – Vol. 12. – № 11. – P. 967–977.
29. Delivery of Oligonucleotides to the Liver with GalNAc: From Research to Registered Therapeutic Drug / A. J. Debacker, J. Voutila, M. Catley [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2020. – Vol. 28. – № 8. – P. 1759–1771.
30. Delivery of RNA Therapeutics: The Great Endosomal Escape! / S. F. Dowdy, R. L. Setten, X. S. Cui [et al.] // *Nucleic Acid Therapeutics*. – 2022. – Vol. 32. – № 5. – P. 361–368.
31. Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers / J. Wang, Z. Lu, M. G. Wientjes [et al.] // *The AAPS Journal*. – 2010. – Vol. 12. – № 4. – P. 492–503.
32. Design and Delivery of Therapeutic siRNAs: Application to MERS-Coronavirus / S. S. Sohrab, S. A. El-Kafrawy, Z. Mirza [et al.] // *Current Pharmaceutical Design*. – 2018. – Vol. 24. – № 1. – P. 62–77.

33. Design and evaluation of new pH-sensitive amphiphilic cationic lipids for siRNA delivery / A. S. Malamas, M. Gujrati, C. M. Kummitha [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2013. – Vol. 171. – № 3. – P. 296–307.
34. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa / H. Tegally, E. Wilkinson, M. Giovanetti [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 592. – № 7854. – P. 438–443.
35. Developments in nanotechnology approaches for the treatment of solid tumors / J. Venturini, A. Chakraborty, M. A. Baysal [et al.] // *Experimental Hematology & Oncology*. – 2025. – Vol. 14. – № 1. – Art. 76.
36. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19 / RECOVERY Collaborative Group // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384. – № 8. – P. 693–704.
37. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans* / R. F. Ketting, S. E. Fischer, E. Bernstein [et al.] // *Genes and Development*. – 2001. – Vol. 15. – № 20. – P. 2654–2659.
38. Dong, Y. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems / Y. Dong, D. J. Siegwart, D. G. Anderson // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2019. – Vol. 144. – P. 133–147.
39. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells / S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel [et al.] // *Nature*. – 2001. – Vol. 411. – № 6836.
40. Efficient ocular delivery of siRNA via pH-sensitive vehicles for corneal neovascularization inhibition / X. Cao, C. Wang, Z. Deng [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*: X. – 2023. – Vol. 5. – Art. 100183.
41. Elbashir, S. M. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs / S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl // *Genes and Development*. – 2001. – Vol. 15. – № 2. – P. 188–200.
42. Engineering functional inorganic-organic hybrid systems: Advances in siRNA therapeutics / J. Shen, W. Zhang, R. Qi [et al.] // *Chemical Society Reviews*. – 2018. – Vol. 47. – № 6. – P. 1969–1995.
43. Enhanced delivery of therapeutic siRNA into glioblastoma cells using dendrimer-entrapped gold nanoparticles conjugated with β -cyclodextrin / J. Qiu, L. Kong, X. Cao [et al.] // *Nanomaterials*. – 2018. – Vol. 8. – № 3. – Art. 131.
44. Enhancing siRNA cancer therapy: Multifaceted strategies with lipid and polymer-based carrier systems / N. K. Dastgerdi, N. K. Dastgerdi, H. Bayraktutan [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 663. – Art. 124545.
45. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England / N. G. Davies, S. Abbott, R. C. Barnard [et al.] // *Science*. – 2021. – Vol. 372. – № 6538. – Art. eabg3055.

46. European Medicines Agency. Guideline on the development and manufacture of oligonucleotides: draft / European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use, Committee for Veterinary Medicinal Products. – Amsterdam: EMA, 2024. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-development-manufacture-oligonucleotides_en.pdf (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
47. Evaluate SLN360 in participants with elevated lipoprotein(a) at high risk of atherosclerotic cardiovascular disease events: NCT05537571 // ClinicalTrials.gov: [сайт]. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05537571> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
48. Extracellular delivery of modified oligonucleotide and superparamagnetic iron oxide nanoparticles from a degradable hydrogel triggered by tumor acidosis / C. W. Lin, S. J. Tseng, I. M. Kempson [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – № 17. – P. 4387–4393.
49. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan / H. El Knidri, R. Belaabed, A. Addaou [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – Vol. 120, pt A. – P. 1181–1189.
50. Falato, L. Cell-penetrating peptides delivering siRNAs: An overview / L. Falato, M. Gestin, Ü. Langel // *Methods in Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 2282. – P. 329–352.
51. Friedrich, M. Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives / M. Friedrich, A. Aigner // *BioDrugs*. – 2022. – Vol. 36. – № 5. – P. 549–571.
52. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate / S. M. Elbashir, J. Martinez, A. Patkaniowska [et al.] // *The EMBO Journal*. – 2001. – Vol. 20. – № 23. – P. 6877–6888.
53. Functionalized carbon nanotubes: Biomedical applications / S. Vardharajula, S. Z. Ali, P. M. Tiwari [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2012. – Vol. 7. – P. 5361–5374.
54. Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications / N. Sayed, P. Allawadhi, A. Khurana [et al.] // *Life Sciences*. – 2022. – Vol. 294. – Art. 120375.
55. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil / N. R. Faria, T. A. Mellan, C. Whittaker [et al.] // *Science*. – 2021. – Vol. 372. – № 6544. – P. 815–821.
56. Gold nanorod-sphingosine kinase siRNA nanocomplexes: A novel therapeutic tool for potent radiosensitization of head and neck cancer / R. Masood, I. Roy, S. Zu [et al.] // *Integrative Biology*. – 2012. – Vol. 4. – № 2. – P. 132–141.
57. Guimarães, D. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications / D. Guimarães, A. Cavaco-Paulo, E. Nogueira // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 601. – Art. 120571.

58. Guo, S. Three "E" challenges for siRNA drug development / S. Guo, M. Zhang, Y. Huang // Trends in Molecular Medicine. – 2024. – Vol. 30. – № 1. – P. 13–24.
59. Huang, J. Nanoparticles-Based Strategies to Improve the Delivery of Therapeutic Small Interfering RNA in Precision Oncology / J. Huang, K. Xiao // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14. – № 8. – Art. 1586.
60. Immunology of COVID-19: Current State of the Science / N. Vabret, G. J. Britton, C. Gruber [et al.] // Immunity. – 2020. – Vol. 52. – № 6. – P. 910–941.
61. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised guideline Q14: analytical procedure development: step 4 version, 14 November 2023. – Geneva: ICH, 2023. – URL: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q14_Guideline_2023_1116.pdf (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
62. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline Q3B(R2): impurities in new drug products: step 4 version, 2 June 2006. – Geneva: ICH, 2006. – URL: [https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B\(R2\)%20Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B(R2)%20Guideline.pdf) (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
63. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline Q6A: specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances: step 4 version, 6 October 1999. – Geneva: ICH, 1999. – URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q6A%20Guideline.pdf> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
64. Investigating the pharmacodynamic durability of GalNAc-siRNA conjugates / C. R. Brown, S. Gupta, J. Qin [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2021. – Vol. 48. – № 21. – P. 11827–11844.
65. Kardani, K. Exploring novel and potent cell penetrating peptides in the proteome of SARS-COV-2 using bioinformatics approaches / K. Kardani, A. Bolhassani // PLoS ONE. – 2021. – Vol. 16. – № 2. – Art. e0247396.
66. Kaushal, A. Innate immune regulations and various siRNA modalities / A. Kaushal // Drug Delivery and Translational Research. – 2023. – Vol. 13. – № 11. – P. 2704–2718.
67. Keam, S. J. Vutrisiran: First Approval / S. J. Keam // Drugs. – 2022. – Vol. 82. – № 13. – P. 1419–1425.
68. Lee, A. Fitusiran: First Approval / A. Lee // Drugs. – 2025. – Vol. 85. – № 8. – P. 1073–1077.

69. Lee, J. PEGylated DC-Chol/DOPE cationic liposomes containing KSP siRNA as a systemic siRNA delivery Carrier for ovarian cancer therapy / J. Lee, H. J. Ahn // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Vol. 503. – № 3. – P. 1716–1722.
70. Lepodisiran – a long-duration small interfering RNA targeting lipoprotein(a) / S. E. Nissen, W. Ni, X. Shen [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2025. – Vol. 392. – № 17. – P. 1673–1683.
71. Lipoplex-based therapeutics for effective oligonucleotide delivery: a compendious review / P. Pal Singh, V. Vithalapuram, S. Metre [et al.] // *Journal of Liposome Research*. – 2020. – Vol. 30. – № 4. – P. 313–335.
72. Liu, C. Co-delivery of doxorubicin and siRNA by all-trans retinoic acid conjugated chitosan-based nanocarriers for multiple synergistic antitumor efficacy / C. Liu, C. Tang, C. Yin // *Carbohydrate Polymers*. – 2022. – Vol. 283. – Art. 119097.
73. Marquez, A. R. An Overview of Various Carriers for siRNA Delivery / A. R. Marquez, C. O. Madu, Y. Lu // *Oncomedicine*. – 2018. – Vol. 3. – P. 48–58.
74. Marrs, J. C. Inclisiran for the treatment of hypercholesterolaemia / J. C. Marrs, S. L. Anderson // *Drugs in Context*. – 2024. – Vol. 13.
75. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability / L. Schoenmaker, D. Witzigmann, J. A. Kulkarni [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 601. – Art. 120586.
76. Mysara, M. Mysirna-Designer: A workflow for efficient siRNA design / M. Mysara, J. M. Garibaldi, M. Elhefnawi // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – № 10. – Art. e25642.
77. Nanoparticles as drug delivery systems: a review of the implication of nanoparticles physicochemical properties on responses in biological systems / A. Yusuf, A. R. Z. Almotairy, H. Henidi [et al.] // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – № 7. – Art. 1596.
78. Nanoparticles for siRNA-based gene silencing in tumor therapy / A. Babu, R. Muralidharan, N. Amreddy [et al.] // *IEEE Transactions on Nanobioscience*. – 2016. – Vol. 15. – № 8. – P. 849–863.
79. New paradigm in combination therapy of siRNA with chemotherapeutic drugs for effective cancer therapy / K. Kumar, V. Rani, M. Mishra [et al.] // *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. – 2022. – Vol. 3. – Art. 100103.
80. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies / Y. Cao, J. Wang, F. Jian [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 602. – № 7898. – P. 657–663.

81. Open label, dose escalation study for the safety and efficacy of STP705 in adult patients with basal cell carcinoma: NCT04669808 // ClinicalTrials.gov: [сайт]. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04669808> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
82. Optimization of elution conditions and comparison of emerging biocompatible columns on the resolving power and detection sensitivity of oligonucleotides by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography mass spectrometry / Q. D. Bui, T. Deschrijver, B. Noten [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2024. – Vol. 1720. – Art. 464793.
83. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19 / J. Hammond, H. Leister-Tebbe, A. Gardner [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 386. – № 15. – P. 1397–1408.
84. Overcoming barriers for siRNA therapeutics: From bench to bedside / M. I. Sajid, M. Moazzam, S. Kato [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2020. – Vol. 13. – № 10. – Art. 294.
85. Pandey, A. P. Polyethylenimine: A versatile, multifunctional non-viral vector for nucleic acid delivery / A. P. Pandey, K. K. Sawant // *Materials Science and Engineering: C*. – 2016. – Vol. 68. – P. 904–918.
86. PEG branched polymer for functionalization of nanomaterials with ultralong blood circulation / G. Prencipe, S. M. Tabakman, K. Welsher [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2009. – Vol. 131. – № 13. – P. 4783–4787.
87. Pei, D. Overcoming Endosomal Entrapment in Drug Delivery / D. Pei, M. Buyanova // *Bioconjugate Chemistry*. – 2019. – Vol. 30. – № 2. – P. 273–283.
88. Peptide-based drug delivery systems / D. Berillo, A. Yeskendir, Z. Zharkinbekov [et al.] // *Medicina*. – 2021. – Vol. 57. – № 11. – Art. 1209.
89. Perspective chapter: Mastering RNA interference (RNAi) delivery – strategies for effective targeting and gene silencing / A. Kh. Abosalha, S. Makhoulf, P. Islam [et al.] // *Beyond the Blueprint – Decoding the Elegance of Gene Expression* / ed. by M. Seifi. – London: IntechOpen, 2024.
90. pH-responsive drug delivery systems as intelligent carriers for targeted drug therapy: brief history, properties, synthesis, mechanism and application / M. S. Bami, M. A. Raeisi Estabragh, P. Khazaeli [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2022. – Vol. 70. – Art. 102987.
91. pH-Responsive polymer boosts cytosolic siRNA release for retinal neovascularization therapy / S. Guo, C. Li, C. Wang [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2024. – Vol. 14. – № 2. – P. 781–794.
92. pH-responsive polymeric micelle carriers for siRNA drugs / A. J. Convertine, C. Diab, M. Prieve [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2010. – Vol. 11. – № 11. – P. 2904–2911.

93. Phase 3 Trial of RNAi Therapeutic Givosiran for Acute Intermittent Porphyria / M. Balwani, E. Sardh, P. Ventura [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382. – № 24. – P. 2289–2301.
94. Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity / S. Carpenter, E. P. Ricci, B. C. Mercier [et al.] // *Nature Reviews Immunology*. – 2014. – Vol. 14. – № 6. – P. 361–376.
95. Principle, application and challenges of development siRNA-based therapeutics against bacterial and viral infections: a comprehensive review / H. Motamedi, M. M. Ari, A. Alvandi [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2024. – Vol. 15. – Art. 1393646.
96. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa / R. Viana, S. Moyo, D. G. Amoako [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 603. – № 7902. – P. 679–686.
97. Recent Advances in Lipid Nanoparticles and Their Safety Concerns for mRNA Delivery / J. Wang, Y. Ding, K. Chong [et al.] // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12. – № 10. – Art. 1148.
98. Recent Update on siRNA Therapeutics / O. Ebenezer, A. K. Oyebamiji, J. O. Olanlokun [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – Vol. 26. – № 8. – Art. 3456.
99. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report / J. H. Beigel, K. M. Tomashek, L. E. Dodd [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383. – № 19. – P. 1813–1826.
100. Research Progress on Polymer-Based Nanocarriers for Tumor-Targeted Delivery of Survivin siRNA / L. Ren, S. Wang, B. C. Li [et al.] // *Polymers*. – 2025. – Vol. 17. – № 17. – Art. 2279.
101. RNA-Targeted Therapeutics / S. T. Crooke, J. L. Witztum, C. F. Bennett [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2018. – Vol. 27. – № 4. – P. 714–739.
102. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion / P. Mlcochova, S. A. Kemp, M. S. Dhar [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 599. – № 7883. – P. 114–119.
103. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder [et al.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 181. – № 2. – P. 271–280.e8.
104. Scott, L. J. Givosiran: first approval / L. J. Scott // *Drugs*. – 2020. – Vol. 80. – № 3. – P. 335–339.
105. Scott, L. J. Lumasiran: First Approval / L. J. Scott, S. J. Keam // *Drugs*. – 2021. – Vol. 81. – № 2. – P. 277–282.
106. Self-assembly of cyclic hexamers of γ -cyclodextrin in a metallosupramolecular framework with d-penicillamine / S. Somsri, N. Kuwamura, T. Kojima [et al.] // *Chemical Science*. – 2020. – Vol. 11. – № 34. – P. 9246–9253.

107. Sequence-dependent off-target inhibition of TLR7/8 sensing by synthetic microRNA inhibitors / S. T. Sarvestani, H. J. Stunden, M. A. Behlke [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43. – № 2. – P. 1177–1188.
108. Silencing of SARS-CoV-2 with modified siRNA-peptide dendrimer formulation / M. Khaitov, A. Nikonova, I. Shilovskiy [et al.] // *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2021. – Vol. 76. – № 9. – P. 2840–2854.
109. Singh, V. Poly(propylene imine) dendrimer as an emerging polymeric nanocarrier for anticancer drug and gene delivery / V. Singh, A. Sahebkar, P. Kesharwani // *European Polymer Journal*. – 2021. – Vol. 158. – Art. 110683.
110. siRNA Functionalized Lipid Nanoparticles (LNPs) in Management of Diseases / T. Kalita, S. A. Dezfouli, L. M. Pandey [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 11. – Art. 2520.
111. siRNA therapeutics in lymphoma: gene targets, delivery strategies and synergy with chemotherapy / O. Ikebunwa, V. Turenko, I. Uchendu [et al.] // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2026. – Vol. 27. – P. 944–962.
112. Small interfering ribonucleic acid design strategies for effective targeting and gene silencing / M. Malhotra, S. Nambiar, V. Rengaswamy [et al.] // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2011. – Vol. 6. – № 3. – P. 269–289.
113. Song, H. Assembly strategy of liposome and polymer systems for siRNA delivery / H. Song, S. L. Hart, Z. Du // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 592. – Art. 120033.
114. Spotlighting the criticality of lipid quality control through a mechanistic investigation of mRNA activity loss in lipid nanoparticles / R. S. Kang, Z. Wang, H. Sapa [et al.] // *Communications Chemistry*. – 2025. – Vol. 8. – № 1. – Art. 313.
115. Springer, A. D. GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics / A. D. Springer, S. F. Dowdy // *Nucleic Acid Therapeutics*. – 2018. – Vol. 28. – № 3. – P. 109–118.
116. Studzińska, S. Review on investigations of antisense oligonucleotides with the use of mass spectrometry / S. Studzińska // *Talanta*. – 2018. – Vol. 176. – P. 329–343.
117. Syed, Y. Y. Nedosiran: First Approval / Y. Y. Syed // *Drugs*. – 2023. – Vol. 83. – № 18. – P. 1729–1733.
118. The design and exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing / I. R. Gilmore, S. P. Fox, A. J. Hollins [et al.] // *Journal of Drug Targeting*. – 2004. – Vol. 12. – № 6. – P. 315–340.

119. The landscape of nanoparticle-based siRNA delivery and therapeutic development / M. Moazzam, M. Zhang, A. Hussain [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2024. – Vol. 32. – № 2. – P. 284–312.
120. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006: illustrated information // NobelPrize.org: [сайт]. – URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/illustrated-information/> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.
121. The Nonclinical Safety Profile of GalNAc-conjugated RNAi Therapeutics in Subacute Studies / M. M. Janas, C. E. Harbison, V. K. Perry [et al.] // *Toxicologic Pathology*. – 2018. – Vol. 46. – № 7. – P. 735–745.
122. The role of cell-penetrating peptides in potential anti-cancer therapy / M. Zhou, X. Zou, K. Cheng [et al.] // *Clinical and Translational Medicine*. – 2022. – Vol. 12. – № 5. – Art. e822.
123. The therapeutic prospects of N-acetylgalactosamine-siRNA conjugates / L. Zhang, Y. Liang, G. Liang [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – Vol. 13. – Art. 1090237.
124. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention / M. Z. Tay, C. M. Poh, L. Rénia [et al.] // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20. – № 6. – P. 363–374.
125. Traber, G. M. RNAi-based therapeutics and novel RNA bioengineering technologies / G. M. Traber, A. M. Yu // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2023. – Vol. 384. – № 1. – P. 133–154.
126. Treatment of COVID-19 patients with a SARS-CoV-2-specific siRNA-peptide dendrimer formulation / M. Khaitov, A. Nikonova, I. Kofiadi [et al.] // *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2023. – Vol. 78. – № 6. – P. 1639–1653.
127. Trends of gold nanoparticle-based drug delivery system in cancer therapy / G. Ajnai, A. Chiu, T. Kan [et al.] // *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. – 2014. – Vol. 6. – № 6. – P. 172–178.
128. Trucillo, P. Liposomes: from Bangham to supercritical fluids / P. Trucillo, R. Campardelli, E. Reverchon // *Processes*. – 2020. – Vol. 8. – № 9. – Art. 1022.
129. Tseu, G. Y. W. A Review of Different Types of Liposomes and Their Advancements as a Form of Gene Therapy Treatment for Breast Cancer / G. Y. W. Tseu, K. A. Kamaruzaman // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 3. – Art. 1498.
130. Tumor-homing glycol chitosan/polyethylenimine nanoparticles for the systemic delivery of siRNA in tumor-bearing mice / M. S. Huh, S. Y. Lee, S. Park [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2010. – Vol. 144. – № 2. – P. 134–143.

131. Tyrosine-modification of polypropylenimine (PPI) and polyethylenimine (PEI) strongly improves efficacy of sirna-mediated gene knockdown / S. Noske, M. Karimov, A. Aigner [et al.] // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10. – № 9. – Art. 1809.

132. U.S. Food and Drug Administration. Clinical pharmacology considerations for the development of oligonucleotide therapeutics: guidance for industry / U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. – Silver Spring: FDA, 2024. – URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clinical-pharmacology-considerations-development-oligonucleotide-therapeutics> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.

133. U.S. Food and Drug Administration. Nonclinical safety assessment of oligonucleotide-based therapeutics: draft guidance for industry / U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. – Silver Spring: FDA, 2024. – URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/nonclinical-safety-assessment-oligonucleotide-based-therapeutics> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.

134. Zilebesiran as add-on therapy in patients with high cardiovascular risk and hypertension not adequately controlled by standard of care antihypertensive medications (KARDIA-3): NCT06272487 // *ClinicalTrials.gov*: [сайт]. – URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06272487> (дата обращения: 10.03.2026). – Текст: электронный.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ПАСПОРТ
Стандартный образец
 миРНК siRk-12

Нормативная документация		Спецификация СП-3-33/20	
Серия		0821	
Описание		10 флаконов с лиофильно-высушенным белым порошком по 0,4 мг миРНК siRk-12.	
Хранение		При температуре +2°C - +8°C	
Транспортировка		При температуре +2°C - +8°C	
Характеристика СО:			
Информация о продукте			
Название дуплекса	siRk-12-EM	Очистка	ВЭЖХ
Продукт	dsRNA	MW дуплекса, Da	14018
Дата производства	12.03.2021	Кол-во дуплекса, мг	1000
Серия производства	0321	Кол-во пробирок	100
Последовательность №1		Последовательность №2	
Название	siRk-12-Ems	Название	siRk-12-EMas
MW, Da	7147	MW, Da	6871
Кэкст	4,4	Кэкст	4,91
GC состав, %	42	GC состав, %	42
Модификации последовательности №1		Модификации последовательности №2	
Наименование	Кол-во	Наименование	Кол-во
Химерные ДНК нуклеотиды	1	Химерные ДНК нуклеотиды	1
РНК нуклеотиды	18	РНК нуклеотиды	19
LNA нуклеотиды	3	LNA нуклеотиды	2
Результаты испытаний:			
Контролируемые показатели	Требования спецификации	Методы контроля	Результаты испытаний
Описание	Белый аморфный порошок	Визуальный	Соответствует
Подлинность	Молекулярная масса 7147 и 6871 г/моль, определяемая m/z 7147±7 и 6871±7 г/моль	MALDI-масс-спектрометрия	m/z 7145 6864 Соответствует
Чистота	Сумма неидентифицированных примесей не должна превышать 5%	ВЭЖХ (частная методика) ОФС.1.2.1.2.0005.	Сумма неидентифицированных примесей 4,5 %
Количественное содержание	95-105 %	ВЭЖХ (частная методика)	95,5 %

		ОФС.1.2.1.2.0005.	
Маркировка	На этикетке указывают наименование сырья, количество сырья в упаковке, серию, дату изготовления, условия хранения от 2 до 8 °С	Визуальный	Соответствует
Упаковка	Флаконы пластиковые типа «эппендорф» вместимостью 1,5-2 мл,	Визуальный	Соответствует

Заключение: серия соответствует требованиям нормативной документации на Стандартный образец миРНК siRk-12 по всем показателям качества.

Главный эксперт группы контроля качества	/	/ Смирнов В.В.
Аналитик	/	/ Туренко В.Н.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ПАСПОРТ
Стандартный образец
 Пептид КК-46

Полное название		Пептид КК-46	
Нормативная документация		Спецификация СП-4-72/20	
Серия		0821	
Описание		10 флаконов с лиофильно-высушенным белым порошком по 1 мг пептида КК-46.	
Хранение		При температуре +2°С - +8°С	
Транспортировка		При температуре +2°С - +8°С	
Результаты испытаний:			
Контролируемые показатели	Требования спецификации	Методы контроля	Результаты испытаний
Описание	Белый или желтоватый аморфный порошок	Визуальный	Соответствует
Подлинность	Полосы поглощения N-H (3540-3000 см ⁻¹), C-H (две полосы: 2995-2905 см ⁻¹ , 2905-2736 см ⁻¹), Ar-C-C (1645-1575, 1484-1404), C=O (I амид), C=N (1730-1645 см ⁻¹), NH (II амид, 1670-1590 см ⁻¹), C-O(H) (1158-1030 см ⁻¹).	ИК-спектроскопия	Соответствует
	Молекулярная масса 5140 г/моль, определяемая m/z 5126–5154 г/моль	MALDI-масс-спектрометрия	m/z 5148,37 Соответствует
Чистота	Сумма неидентифицированных примесей не более 1 %, любой неидентифицированной примеси не более 0,5 %	ВЭЖХ (частная методика) ОФС.1.2.1.2.0005.	Сумма неидентифицированных примесей 0,39 %
Количественное содержание	95-105 %	ВЭЖХ (частная методика) ОФС.1.2.1.2.0005.	99,61 %
Маркировка	На этикетке	Визуальный	Соответствует

	указывают наименование сырья, количество сырья в упаковке, серию, дату изготовления, условия хранения от 2 до 8 °С		
Упаковка	Флаконы пластиковые типа «эппендорф» емкостью 1,5-2 мл	Визуальный	Соответствует

Заключение: серия соответствует требованиям нормативной документации на Стандартный образец пептида КК-46 по всем показателям качества.

Главный эксперт группы контроля качества / / Смирнов В.В.

Аналитик / / Туренко В.Н.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

ПРОЕКТ СПЕЦИФИКАЦИИ

МИР 19®

Синтетическая малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота (миРНК) [двухпочечная]

Лиофилизат для приготовления раствора для ингаляций, 0,088 мг

Флакон-1: синтетическая малая интерферирующая РНК siRk-12 (миРНК)

Показатели	Методы	Нормы
Описание Описание восстановленного раствора	Визуальный, ГФ РФ ¹	Белый аморфный порошок или пленка на флаконе Прозрачный, бесцветный раствор
Прозрачность восстановленного раствора	Визуальный ГФ РФ	Должен быть прозрачным
Цветность восстановленного раствора	Визуальный ГФ РФ	Должен быть бесцветным
рН восстановленного раствора	Потенциометрический метод, ГФ РФ	От 6,5 до 7,5
Время растворения	Визуальный, ГФ РФ	Лиофилизат должен полностью растворяться за 30 секунд
Подлинность	ВЭЖХ, частная методика	Время удерживания основного пика раствора исследуемого вещества совпадает с временем удерживания основного пика раствора стандартного образца
	Электрофорез в агарозном геле, частная методика	На электрофореграмме испытуемого образца должна присутствовать полоса, совпадающая по подвижности и интенсивности с полосой стандартного образца
Чистота	ВЭЖХ, частная методика	Сумма неидентифицированных примесей не должна превышать 5 %
Количественное определение	ВЭЖХ, частная методика	0,084 – 0,092 мг/флакон
Однородность дозирования	ГФ РФ Способ 1	$AV \leq 15,0 \% (L1)$ $ M-xi \leq 0,01 \cdot L2 \cdot M$

Флакон-3: пептид КК-46

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный, ГФ РФ	Белый или желтоватый аморфный порошок или

Описание восстановленного раствора		пористая масса в виде таблетки Прозрачный, бесцветный раствор
Прозрачность восстановленного раствора	Визуальный, ГФ РФ	Должен быть прозрачным
Цветность восстановленного раствора	Визуальный, ГФ РФ	Должен быть бесцветным
рН восстановленного раствора	Потенциометрический метод, ГФ РФ	От 6,5 до 7,5
Время растворения	Визуальный, ГФ РФ	Лиофилизат должен полностью растворяться за 30 секунд
Подлинность	ИК-спектрометрия, ГФ РФ	Спектр поглощения испытуемого образца должен совпадать со спектром поглощения стандартного образца
	ВЭЖХ, частная методика	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно совпадать с временем удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца
Чистота	ВЭЖХ, частная методика	Сумма неидентифицированных примесей не должна превышать 0,5 %
Количественное определение	ВЭЖХ, частная методика	1,674 – 1,850 мг/флакон
Однородность дозирования	ГФ РФ Способ 1	$AV \leq 15,0 \% (L1)$ $ M-xi \leq 0,01 \cdot L2 \cdot M$

Флакон 2: растворитель для синтетической малой интерферирующей РНК siRk-12 (миРНК),

**Флакон 4: растворитель для пептида КК-46
– фосфатно-солевой буферный раствор**

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный, ГФ РФ	Прозрачный, бесцветный раствор
Прозрачность	Визуальный, ГФ РФ	Должен быть прозрачным
Цветность	Визуальный, ГФ РФ	Должен быть бесцветным
рН	Потенциометрический метод, ГФ РФ	От 6,5 до 7,5
Масса (объем) содержимого	Измерение объема,	В соответствии с

упаковки	ГФ РФ	требованиями
Натрий	Атомно-абсорбционная спектрометрия, ГФ РФ	$3,61 \pm 0,36$ мг/мл
Калий	Атомно-абсорбционная спектрометрия, ГФ РФ	$0,225 \pm 0,03$ мг/мл
Хлориды	Хлориды, ГФ РФ	$5,1 \pm 0,5$ мг/мл
Фосфаты	Фосфаты, частная методика	$1,14 \pm 0,22$ мг/мл

Раствор для ингаляций

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный, частная методика	Опалесцирующая жидкость от бесцветного до светло-желтого цвета
pH	Потенциометрический метод, ГФ РФ	От 6,5 до 7,5
Мутность	Турбидиметрия ГФ РФ	Мутность раствора при измерении 1 должна быть не менее 150 NTU Мутность раствора при измерении 2 должна быть не менее 100 NTU
Микробиологическая чистота	Микробиологический метод, ГФ РФ, категория 2	Общее число аэробных микроорганизмов не более 10^2 КОЕ в 1 мл Общее число дрожжевых и плесневых грибов не более 10^1 КОЕ в 1 мл Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 мл Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 мл Отсутствие энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 мл
Упаковка	Первичная упаковка: Флакон-1: по 0,088 мг миРНК siRk-12 во флакон из прозрачного стекла. Флакон-3: по 1,762 мг пептида КК-46 во флакон из прозрачного стекла. Флакон-2 и флакон-4: по 2,5 мл фосфатно-солевого буферного раствора во флаконы из прозрачного стекла. Вторичная упаковка: На флакон наклеивают этикетку самоклеящуюся. По 4 флакона (флакон-1 с миРНК siRk-12, флакон-2 с фосфатно-солевым буферным раствором, флакон-3 с пептидом КК-46, флакон-4 с фосфатно-солевым буферным раствором) в контурной ячейковой упаковке из картона	

	упаковочного. По 1 контурной ячейковой упаковке в пачку из картона для потребительской тары, вместе с инструкцией по применению.
Маркировка	В соответствии с НД
Транспортирование	При температуре от 2 до 8 °С. Не замораживать
Хранение	При температуре от 2 до 8 °С. Не замораживать
Срок годности	7 месяцев

¹ГФ РФ – здесь и далее действующее издание Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Главный эксперт группы контроля качества / / Смирнов В.В.

Аналитик / / Туренко В.Н.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г



20 ФЕВ 2026

АКТ 8 6 8

о внедрении результатов диссертации Туренко Владислава Николаевича в учебный процесс Института Фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Туренко Владислава Николаевича

на тему «Стандартизация и контроль качества мРНК-содержащего препарата для лечения новой коронавирусной инфекции»

внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармации им. А.П. Нелюбина

при изучении дисциплин «Методы фармакопейного анализа», «Специальная фармацевтическая химия», читаемых студентам по направлению подготовки 33.05.01 Фармация.

Директор Института Фармации
им. А.П. Нелюбина,
д.фарм.н., профессор



(Подпись)

Раменская Г.В.

Заведующий учебной частью
кафедры фармацевтической и
токсикологической химии им.
А.П. Арзамасцева,
к.фарм.н., доцент



(Подпись)

Кузина В.Н.

Начальник Учебного
управления
к.м.н.



(Подпись)

Юдина Л.Ю.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «ГНИИ Институт Иммунологии»
ФМБА России, акад. РАН, д.м.н., профессор
Хаитов Муса Рахимович
«05» _____ 2026 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертации Туренко Владислава Николаевича в научно-производственный процесс лаборатории №52 «Пептидных иммуногенов».

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Туренко Владислава Николаевича

на тему «Стандартизация и контроль качества миРНК-содержащего препарата для лечения новой коронавирусной инфекции» внедрены в научно-производственный процесс лаборатории №52 «Пептидных иммуногенов» при производстве компонентов препарата «МИР 19®».

Заведующий лабораторией,
к.фарм.н.


(Подпись)

Шатилов А.А.

Ученый секретарь, к.м.н.


(Подпись)

Темнова В.В.

ПРИЛОЖЕНИЕ Е



о внедрении результатов диссертации Туренко Владислава Николаевича в производственный процесс Федерального государственного унитарного предприятия «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства России (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России).

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Туренко Владислава Николаевича

на тему «Стандартизация и контроль качества миРНК-содержащего препарата для лечения новой коронавирусной инфекции»
внедрены в процесс контроля качества лекарственного препарата «МИР 19®».

Руководитель департамента
контроля качества ФГУП
СПбНИИВС ФМБА России

Бабкина
(Подпись)

Бабкина О.С.