

На правах рукописи



Козин Дмитрий Андреевич

**Разработка методов анализа и стандартизации производных
индоло[2,3-]карбазола, обладающих противоопухолевым действием**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном автономном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) и в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук, профессор

Решетняк Владимир Юрьевич

доктор фармацевтических наук

Шпрах Зоя Сергеевна

Официальные оппоненты:

Лякина Марина Николаевна – доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт Фармакопеи и стандартизации в сфере обращения лекарственных средств, заместитель директора

Малкова Тамара Леонидовна – доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии, заведующий кафедрой

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» сентября 2023 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, ул. Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « _____ » 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСУ 208.002.02
доктор фармацевтических наук, профессор



Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время в Российской Федерации злокачественными опухолями заболевают около 600 тысяч человек в год. Несмотря на большой выбор противоопухолевых препаратов и разнообразие механизмов действия, их эффективность продолжает оставаться недостаточной. Основными недостатками большинства противоопухолевых лекарственных средств являются возникновение устойчивости к ним у опухолевых клеток, ограниченный спектр действия и высокая токсичность. Поэтому создание эффективных оригинальных отечественных противоопухолевых препаратов по-прежнему сохраняет свою актуальность. Среди многочисленных соединений природного и синтетического происхождения с установленной противоопухолевой активностью все больший научный интерес для практической онкологии вызывают производные индолокарбазола. Столь высокий интерес к этой группе соединений во многом обуславливается их мультитаргетностью. В частности, индолокарбазолы являются ингибиторами ряда протеинкиназ и топоизомераз, играющих важную роль в реакциях фосфорилирования и репликации ДНК, инициируя нарушения клеточного метаболизма и механизма деления клетки. За счет ингибирующей активности эти соединения оказывают цитотоксическое действие, что делает индолокарбазолы перспективными кандидатами на роль противоопухолевых препаратов. На протяжении последних ряда лет сотрудниками лаборатории химического синтеза федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) синтезирован ряд *N*-гликозидов индоло[2,3-*a*]карбазола под лабораторным шифром ЛХС. В настоящий момент одними из наиболее перспективных соединений этого класса являются ЛХС-1208 и ЛХС-1269. В процессе исследований ЛХС-1208 и ЛХС-1269 показали выраженное цитотоксическое действие как *in vitro*, так и *in vivo*. ЛХС-1208 относится по механизму действия к ингибиторам топоизомеразы I и II, а ЛХС-1269 относится интеркаляторам ДНК и ремодуляторам хроматина.

Для дальнейшего продвижения ЛХС-1208 и ЛХС-1269 в практическую онкологию необходимо создание соответствующих нормативных документов для стандартизации новых субстанций. В связи с этим необходимо провести исследование их физико-химических свойств согласно требованиям Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV) с последующим выявлением наиболее значимых и необходимых параметров для стандартизации.

Степень разработанности темы исследования

Сотрудниками лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработан метод синтеза *N*-гликозидов индоло[2,3-*a*]карбазола, обладающих противоопухолевой активностью, и получен ряд соединений этой группы, содержащих различные углеводные остатки. Производные индоло[2,3-*a*]карбазола, получившие лабораторные шифры ЛХС-1208 и ЛХС-1269, показали наибольшую противоопухолевую активность и были отобраны для дальнейших исследований. Несмотря на то, что сотрудниками лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России под руководством профессора Н.А. Оборотовой проведен значительный объем исследований по разработке моделей лекарственных форм на основе производных индоло[2,3-*a*]карбазола, ЛХС-1208 и ЛХС-1269 по-прежнему остаются недостаточно изученными. В частности, не разработан комплекс методик для контроля качества и стандартизации ЛХС-1208 и ЛХС-1269 как фармацевтических субстанций, а известные данные о физико-химических свойствах ЛХС-1208 и ЛХС-1269 продолжали оставаться разрозненными и фрагментарными.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – разработка методик анализа и обоснование параметров качества для стандартизации фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить физико-химические свойства и спектральные характеристики фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.
2. Разработать аналитические методики для подтверждения подлинности фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.
3. Исследовать хроматографические характеристики для подтверждения подлинности, количественного определения действующего вещества и возможных примесей фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 методом ВЭЖХ.
4. Разработать методику количественного определения действующего вещества фармацевтической субстанции ЛХС-1208.
5. Идентифицировать примеси, разработать и валидировать методики количественного определения примесей и действующего вещества фармацевтической субстанции ЛХС-1269.
6. Изучить стабильность фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 при хранении в естественных условиях и установить сроки годности.

7. Обосновать нормы качества и разработать проекты нормативной документации по качеству на фармацевтические субстанции ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

Научная новизна

В диссертационном исследовании впервые проведено химико-фармацевтическое изучение фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Подтверждена их структура и определены физико-химические свойства и спектральные характеристики. Разработаны методики подтверждения подлинности фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 методами ИК-спектрометрии и УФ-спектрофотометрии. Подобраны оптимальные условия и разработаны методики количественного определения действующего вещества и примесей в фармацевтической субстанции ЛХС-1208 методом ВЭЖХ. Показана возможность использования метода ВЭЖХ для изучения фармакокинетики ЛХС-1208 и разработана методика подготовки проб для количественного определения ЛХС-1208 в биологическом материале (кровь и моча). Изучены хроматографические характеристики, разработана и валидирована методика количественного определения действующего вещества в субстанции ЛХС-1269. Идентифицированы примеси в субстанции ЛХС-1269, разработана и валидирована методика количественного определения примеси ЛХС-1269-У. Разработаны проекты нормативной документации по качеству на фармацевтические субстанции ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Установлены нормы качества, исследована стабильность и определены сроки годности для фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Выполненные исследования позволили изучить физико-химические свойства ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Обоснованы показатели качества для ЛХС-1208 и ЛХС-1269 как фармацевтических субстанций и проведена их стандартизация. Для выбранных показателей разработаны и внедрены методики анализа субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 и составлены проекты нормативной документации. Исследования примесей в фармацевтической субстанции ЛХС-1269 позволили провести оптимизацию синтеза и уменьшить их содержание в последующих образцах субстанции.

Полученные в ходе экспериментов результаты могут быть использованы в качестве основы для проведения стандартизации и разработки методик контроля качества других биологически активных соединений, относящихся по строению к производным индоло[2,3-а]карбазола как фармацевтических субстанций.

Методология и методы исследования

Работа выполнена в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, также были учтены рекомендации ряда зарубежных фармакопей и руководств по контролю качества и разработке аналитических методик. В работе применяли физико-химические (ИК-спектроскопия, УФ-спектрофотометрия, тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения, поляриметрия, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МСМС) и химические (определение тяжелых металлов, определение органически связанного хлора, определение воды по К. Фишеру). Статистическую обработку полученных результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV.

Основные положения, выносимые на защиту

- физико-химические свойства и основные показатели качества для фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269;
- аналитические методики подтверждения подлинности фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269;
- методики количественного определения ЛХС-1208 и ЛХС-1269 методом ВЭЖХ и результаты валидации методики количественного определения целевого вещества и примеси ЛХС-1269-У в субстанции ЛХС-1269;
- результаты идентификации примесей в субстанции ЛХС-1269; результаты разработки и валидации методики количественного определения примесей и действующего вещества фармацевтической субстанции ЛХС-1269;
- показатели стабильности субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 и результаты установления для них сроков годности;
- нормы качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность полученных результатов доказана статистической обработкой результатов эксперимента и валидацией в соответствии с требованием ГФ РФ XIV. Экспериментальные данные получены с применением современных инструментальных методов анализа: спектрометрия ядерного магнитного резонанса, инфракрасная спектрометрия, спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области, тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МСМС на поверенном оборудовании. Общие выводы отражают полученные результаты исследований и соответствуют поставленной цели и задачам, что позволяет считать полученные результаты достоверными.

Результаты исследований диссертационной работы доложены на XV Международной (XXIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2020); X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2020); III Международной научно-практической конференции «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке» (Москва, 2020); XXIV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2021); Первой всероссийской школе для молодых ученых по медицинской химии «MEDCHEMSCHOOL 2021» (Новосибирск, 2021); 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2022» (Волгоград, 2022).

Апробация работы состоялась на учебно-методической межкафедральной конференции кафедр химии, аналитической, физической и коллоидной химии, фармацевтического естествознания, фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина, фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и лабораторий химико-фармацевтического анализа, химического синтеза, разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 28 февраля 2023 г (протокол №5 от 28 февраля 2023 г.).

Личный вклад автора

Личный вклад автора включает выбор и обоснование темы диссертации, публикации и выступления на научных конференциях. Автором интерпретированы ^1H -ЯМР, получены и интерпретированы ИК, УФ и МСМС-спектры, определены значения удельного угла вращения, содержание органически связанного хлора, воды, сульфатной золы и тяжелых металлов. Разработаны методики для подтверждения подлинности и количественного анализа фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 методами ИК-спектрометрии, УФ-спектрофотометрии, поляриметрии, ВЭЖХ и идентифицированы примеси в субстанции ЛХС-1269. При непосредственном участии автора разработана методика подготовки образцов для определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях с помощью разработанной ВЭЖХ-методики и встречный синтез образцов сравнения для идентификации примесей примесей в субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ-МСМС. Автором самостоятельно проведена статистическая обработка экспериментальных данных и валидация разработанных методик, составлены проекты нормативной документации (спецификации на фармацевтические

субстанции ЛХС-1208 и ЛХС-1269) и сформулированы выводы. Диссертация и автореферат подготовлены автором лично.

Внедрение результатов в практику

Результаты, полученные на основе экспериментальных данных, приведенных в диссертационной работе, нашли применение и внедрены в учебный процесс кафедры химии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Методы фармакопейного анализа», читаемых студентам по направлению подготовки (специальности) 33.05.01 «Фармация» (Акт внедрения №160 от 7 ноября 2022 г.).

Разработанные методики контроля качества субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 нашли практическое применение и внедрены в работу лабораторий химико-фармацевтического анализа, фармакологии и токсикологии и химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Акт внедрения от 9 ноября 2022 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту ВАК по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования научной специальности, конкретно пунктам 2,3,4 паспорта научной специальности.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ кафедры химии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 01.2.011.68237 «Новые знания и подходы в оценке качества и сертификации биологически активных соединений синтетического и природного происхождения, лекарственных препаратов, изделий медицинской техники (технологические и экологические аспекты)» и планом научно-исследовательских работ лабораторий химико-фармацевтического анализа, фармакологии и токсикологии и химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, АААА-А20-120031190013-9 «Фармацевтическая разработка и доклинические исследования оригинальных инновационных лекарственных средств с улучшенным профилем безопасности для лечения злокачественных новообразований».

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России – 1; статей в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus – 2; иных публикаций по результатам исследования – 7.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 142 страницах машинописного текста, иллюстрирована 33 таблицами и 57 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, двух глав собственных исследований, выводов, списка литературы (123 наименования, из которых 66 наименований на иностранных языках) и четырех приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектами диссертационного исследования стали образцы фармацевтических субстанций ЛХС-1208 (Рисунок 1) и ЛХС-1269 (Рисунок 2), полученные в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Определение физико-химических характеристик ЛХС-1208 и ЛХС-1269 проводили согласно требованиям соответствующих общих фармакопейных статей ГФ РФ XIV.

В исследованиях использовали сертифицированное аналитическое оборудование: жидкостные хроматографы Agilent 1200 и Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США), инфракрасный спектрометр Nicolet S 20 (Thermo Fisher Scientific Inc., США), тандемный масс-спектрометр SCIEX 500R (ABSciex Pte. Ltd., Сингапур), QTOF, ЯМР-спектрометр Bruker WH-500 (Bruker, Германия), спектрофотометр Cary-100 (Varian Inc., США), автоматический титратор VD-20 (Mettler-Toledo, Швейцария), весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius, Германия) и другое.

В ходе исследования применяли следующие реактивы: ацетонитрил gradient grade для ВЭЖХ (Merck, Германия), бромид калия IR grade (Piketchnologies, США), ДМСО d₆ (Sigma-Aldrich, США), ДМСО >99% (Acrosorganic, Бельгия), ДМФА х.ч. (Химмед, Россия), муравьиная кислота ≥98% (Acrosorganic, Бельгия), трифторуксусная кислота для ВЭЖХ ≥99,0%, (Sigma-Aldrich, США), этанол 96% (ООО Гиппократ, Россия) и прочие.

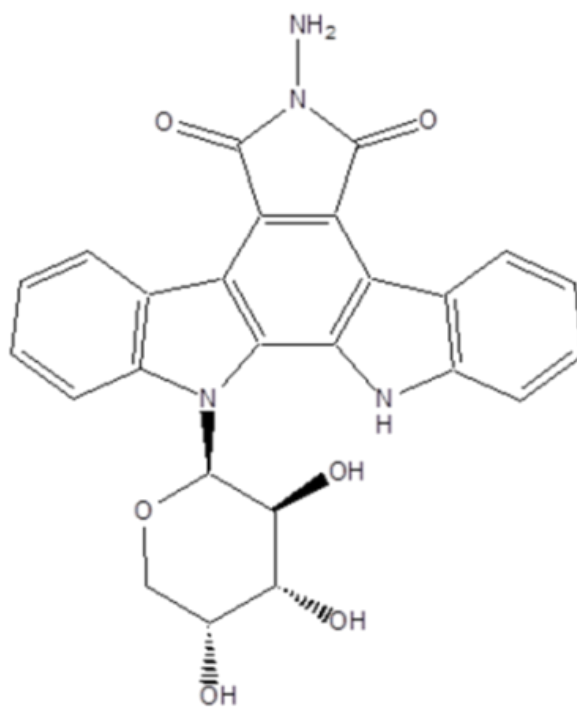


Рисунок 1 – 6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион (ЛХС-1208)

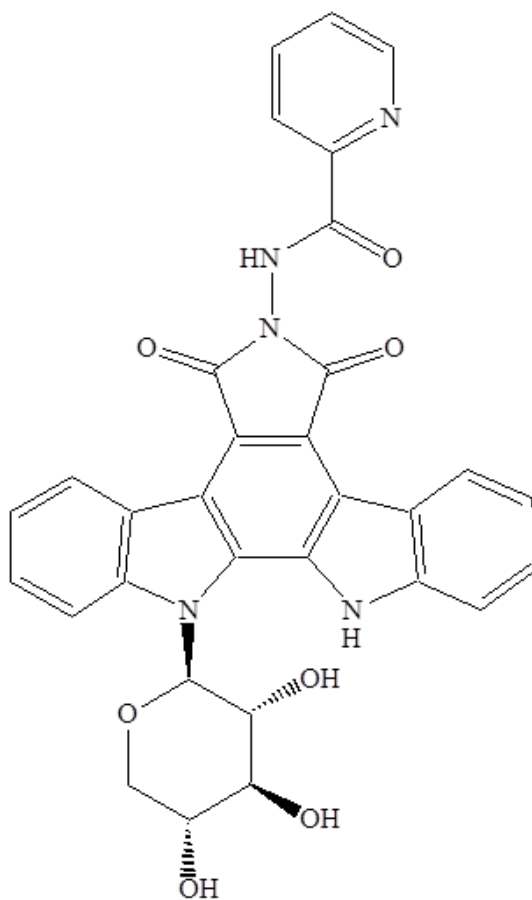


Рисунок 2 – N-[12-(1- β -D-ксилопиранозил)индоло-[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамид (ЛХС-1269)

Результаты исследования

Строение ЛХС-1208 и ЛХС-1269 подтверждено данными фармакопейных физико-химических методов анализа: ^1H -ЯМР, ИК-, УФ-спектрами и тандемными масс-спектрами высокого разрешения.

^1H -ЯМР спектры ЛХС-1208 в ДМСО- d_6 имеют сигналы, соответствующие по положению и форме протонам как углеводного остатка, так и агликона: 12.15 (с, 1Н, NH-индол), 9.23 (д, 1Н, Ar), 9.14(д, 1Н, Ar), 7.94 (д, 1Н, Ar), 7.70 (д, 1Н, Ar), 7.62 (т, 1Н, Ar), 7.59 (т, 1Н, Ar), 7.41(т, 1Н, Ar), 7.37 (т, 1Н, Ar), 6.11(д, 1Н, H1', J1'2' 9.1), 6.86, 5.38, 5.24 (3 ушир. с, 3Н, 2',3',4'-ОН), 4.99 (2Н, с, NH₂), 4.20-4.05 (м, 3Н, H2', H3', H5''), 4,25 (м, 1Н, H5'), 3.85 (м, 1Н, H4'), что полностью подтверждает структуру молекулы ЛХС-1208.

^1H -ЯМР спектры ЛХС-1269 имеют сигналы: (δ м.д., JHz): 11,44 (с, 1Н, NH-индол), 9,18 (д 1Н. Ar), 9,16 (д, 1Н, Ar), 8,84 (с, 1Н, NH), 8,15-7,39 (м, 10Н, Ar), 6,24 (ушир. д. 1Н, H1'), 4,70-3,75 (м, 5-Н, H2', H3', H4', H5', H5'').

ИК-спектры ЛХС-1208 в диске из бромида калия содержат набор характеристических полос поглощения с максимумами в интервалах частот: 3560; 3432; 3317 cm^{-1} (ν ОН, NH, NH₂as и s), 1758; 1696 cm^{-1} (ν C=O), 1576 cm^{-1} (ν C_{ar}-C_{ar}), 1475 cm^{-1} (δ N-H), 1396; 1332 cm^{-1} (δ C-N при sp^3 гибридизации), 1276 cm^{-1} (δ O-H, ν C-N), 1237; 1088 cm^{-1} (ν C-OH, ν C -N амин), 788; 741 cm^{-1} (δ C-NAr.) (Рисунок 3).

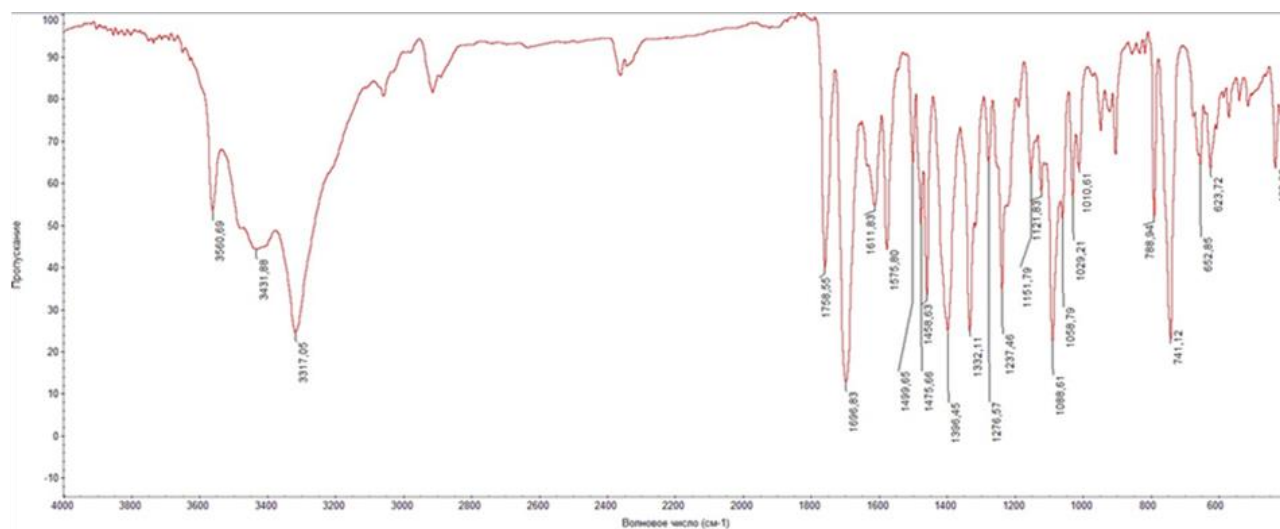


Рисунок 3 – ИК-спектр ЛХС-1208 (2мг в 200 мг KBr)

ИК-спектры ЛХС-1269 (Рисунок 4) содержат набор характеристических полос, соответствующих функциональным группам, входящим в состав молекулы ЛХС-1269: 3371 cm^{-1} (ν ОН, NH, NH₂as и s), 1769; 1712 cm^{-1} (ν C=O), 1573 cm^{-1} (ν C_{ar}-C_{ar}), 1497; 1459 cm^{-1} (δ N-H), 1238 cm^{-1} (δ O-H, ν C-N), 1120; 1045 cm^{-1} (ν C-OH, ν C -N амин), 748; 615 cm^{-1} (δ C-NAr).

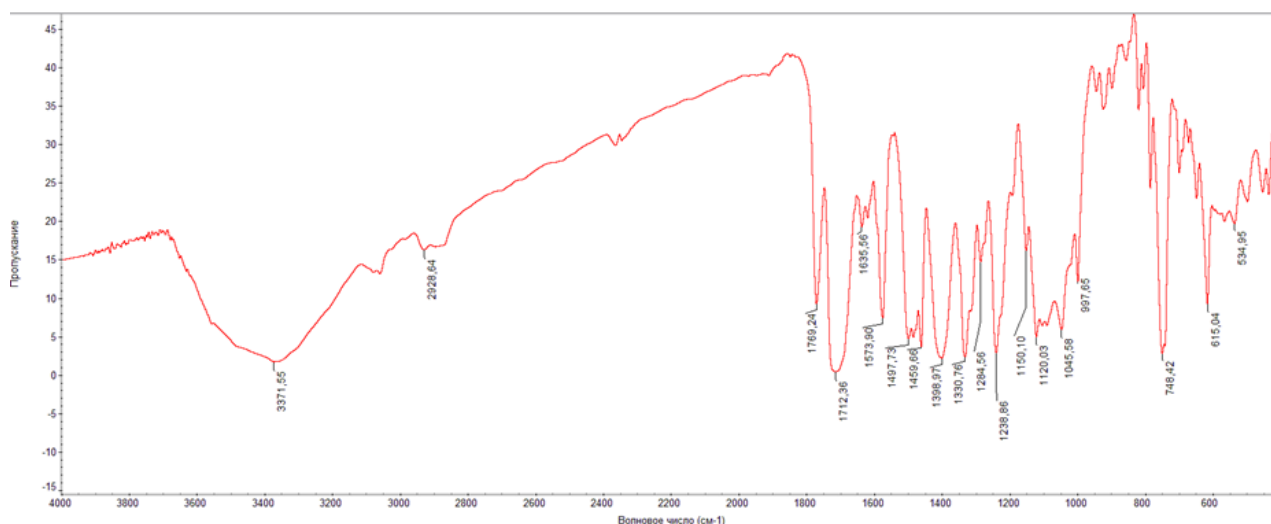


Рисунок 4 – ИК-спектр ЛХС-1269 (2мг в 200 мг KBr)

На УФ-спектрах ЛХС-1208 (Рисунок 5) присутствуют максимумы при длинах волн (287 ± 2) нм и (320 ± 2) нм, плечо при (306 ± 2) нм и при (343 ± 2) нм. Наиболее интенсивными сигналами являются максимумы при длинах волн 287 и 320 нм. Отношение значений оптической плотности (A_{320}/A_{287}) для изученных образцов составило $1,42 \pm 0,05$, а удельный показатель поглощения в максимуме при длине волны 320 нм укладывался в пределы от 1037 до 1052.

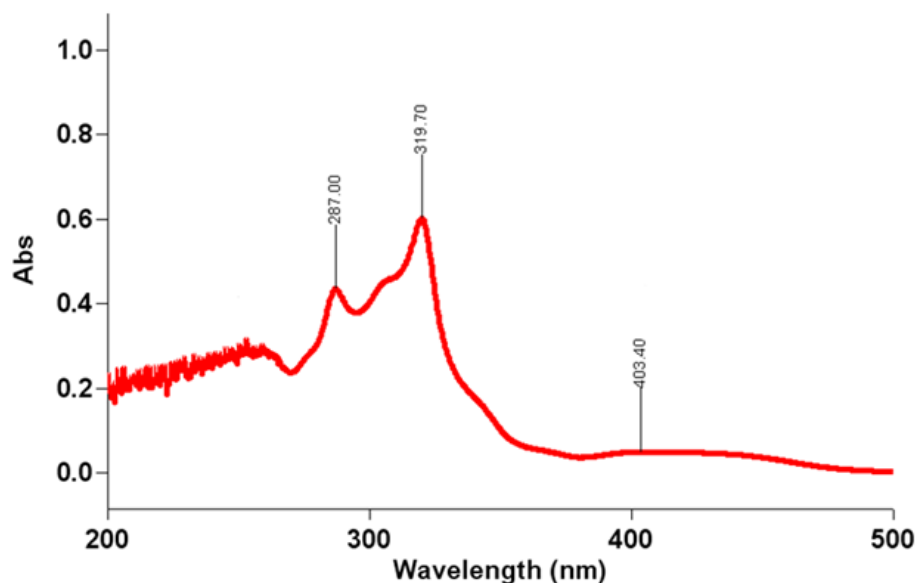


Рисунок 5 –УФ-спектр ЛХС-1208 (0,0006% раствор в ДМФА)

УФ-спектр ЛХС-1269 (Рисунок 6) демонстрирует максимумы поглощения при длинах волн (286 ± 2) нм и (319 ± 2) нм, слабоинтенсивный максимум при (413 ± 2) нм; плечо при (308 ± 2) нм; плечо при (337 ± 2) нм и минимумы при (278 ± 2) нм, (295 ± 2) нм и (375 ± 2) нм. Отношение значений A_{319}/A_{286} составляет $2,02 \pm 0,05$, что объясняется наличием в структуре ЛХС-1269

дополнительного ароматического гетероцикла. Значение удельного показателя поглощения при 319 ± 2 нм лежит в диапазоне от 1040 до 1100.

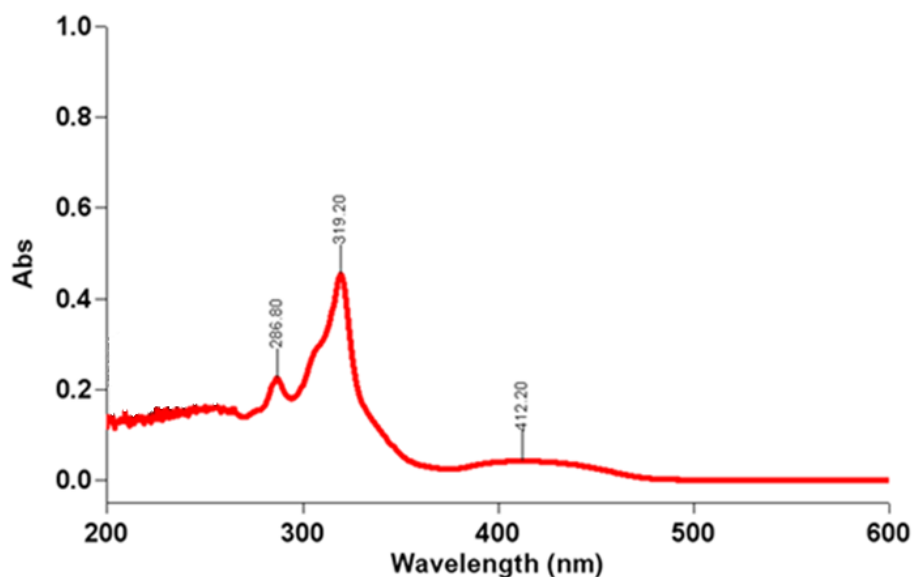


Рисунок 6 – УФ-спектр ЛХС-1269 (0,0004% раствор в ДМФА)

На МСМС-спектрах высокого разрешения ЛХС-1208 (брутто-формула $C_{25}H_{20}N_4O_6$, молекулярная масса 472,1382 Да) присутствует ион, соответствующий по молекулярной массе протонированному иону-прекурзору со значением $m/z [M+H^+]$ – 473,1482 Да (Рисунок 7).

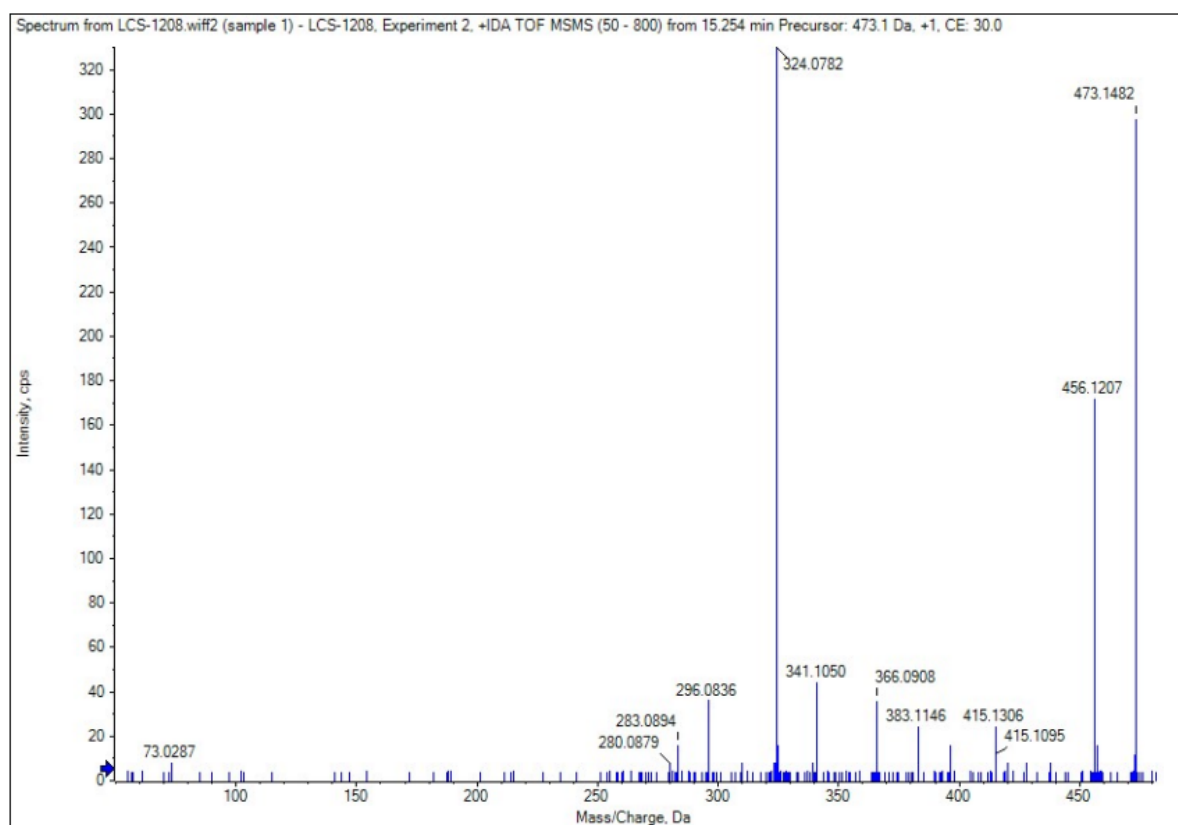


Рисунок 7 – МСМС-спектр [M+H⁺] ЛХС-1208

Масса протонированного иона-прекурсора (Рисунок 8) ЛХС-1269 m/z $[M+H^+]$ – 578,1672. Да при вычитании массы одного протона соответствует молекулярной массе молекулы ЛХС-1269 (брутто-формулы $C_{31}H_{23}N_5O_7$, равной 577,1597 Да). При сравнении МСМС-спектров ЛХС-1208 и ЛХС-1269 выявлен ряд дочерних ионов с одинаковыми значениями m/z , что объясняется сходным строением данных соединений.

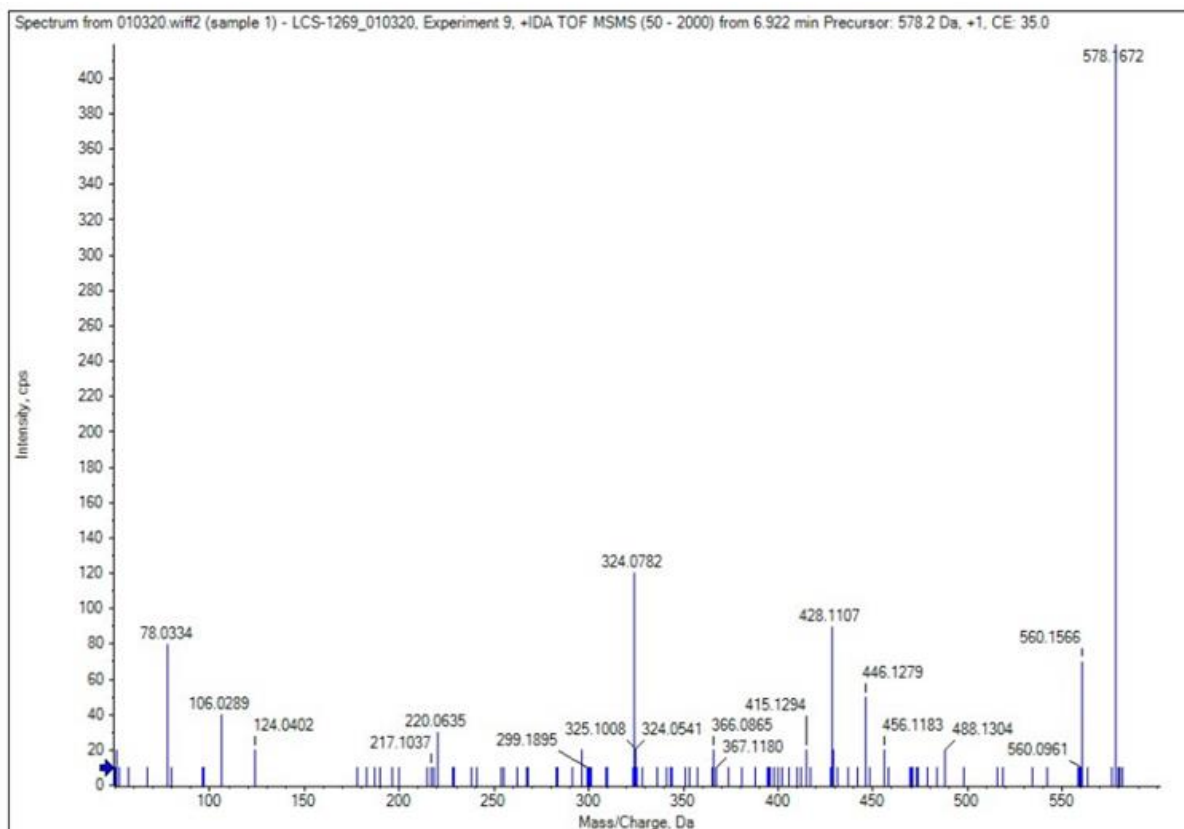


Рисунок 8 – МСМС-спектр $[M+H^+]$ ЛХС-1269

В соответствии с требованиями ГФ РФ XIV к стандартизации фармацевтических субстанций для лабораторных образцов ЛХС-1208 и ЛХС-1269 определен ряд физико-химических показателей качества для их последующего нормирования. Результаты представлены в Таблице 1.

Количественный анализ и определение примесей в субстанции ЛХС-1208 проводили методом ВЭЖХ при градиентном режиме элюирования, используя диодно-матричный детектор. Были определены условия проведения анализа: колонка Zorbax SB-C18 длиной 150 мм, диаметром 3 мм, диаметр зерна сорбента – 5 мкм. Подвижная фаза – вода - ацетонитрил - трифторуксусная кислота 900:100:1 (А) и ацетонитрил - вода - трифторуксусная кислота 750:250:1 (Б), скорость потока подвижной фазы – 0,6 мл/мин, длина волны детектирования – (315 ± 5) нм. Температура колонки – 40°C. Элюирование проводили в течение 15 мин с

градиентом от 100% подвижной фазы А на 0 минуте до 100% подвижной фазы Б на 15 мин. Расчет содержания действующего вещества и примесей в анализируемых образцах проводили методом внутренней нормализации.

Таблица 1 – Физико-химические характеристики фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269

ПОКАЗАТЕЛЬ	ЛХС-1208	ЛХС-1269
Внешний вид	Аморфный порошок оранжевого цвета, без запаха	Аморфный порошок желтого цвета, без запаха
Растворимость	Растворим в ДМСО (1:20); умеренно растворим в ДМФА (1:40); очень мало растворим в 95% этаноле (1:9000); практически нерастворим в воде (>1:10000)	Растворим в ДМСО (1: 15); умеренно растворим в ДМФА (1:40); очень мало растворим в 95% этаноле (1:9000); практически нерастворим в воде (1:<10000)
Удельное вращение (1% раствор в ДМФА)	От +58° до +61°	От +59° до +60°
Прозрачность раствора	Раствор 0,006г препарата в 100 мл ДМФА должен быть прозрачен	Раствор 0,004г препарата в 100 мл ДМФА должен быть прозрачен
Органически связанный хлор	Не обнаружен	Не обнаружен
Сульфатная зола и тяжелые металлы	Сульфатная зола - не более 0,10%; тяжелые металлы - не более 0,001%	Сульфатная зола - не более 0,05%; тяжелые металлы - не более 0,001%
Вода (по методу К.Фишера)	Не более 1,0%	Не более 2,5%

На хроматограмме (Рисунок 9) наблюдали основной пик действующего вещества со временем удерживания (RT) 12,00-12,20 мин и четыре мало интенсивных пика примесей неустановленного строения с RT 0,76; 0,84, 0,90 и 1,08 мин.

Разрешение между пиком примеси с RT около 0,95 мин и пиком ЛХС-1208 составляло не менее 2,5, а разрешение между пиком примеси с RT около 1,08 и пиком ЛХС-1208 – не менее 4 мин. Полученные данные свидетельствуют о пригодности хроматографической системы для количественного анализа субстанции ЛХС-1208.

Проведенные исследования показали, что содержание действующего вещества в образцах субстанции составляло не менее 97,0%, содержание каждой единичной примеси в образцах не превышало 1,0%, а общая сумма примесей – не более 3,0%.

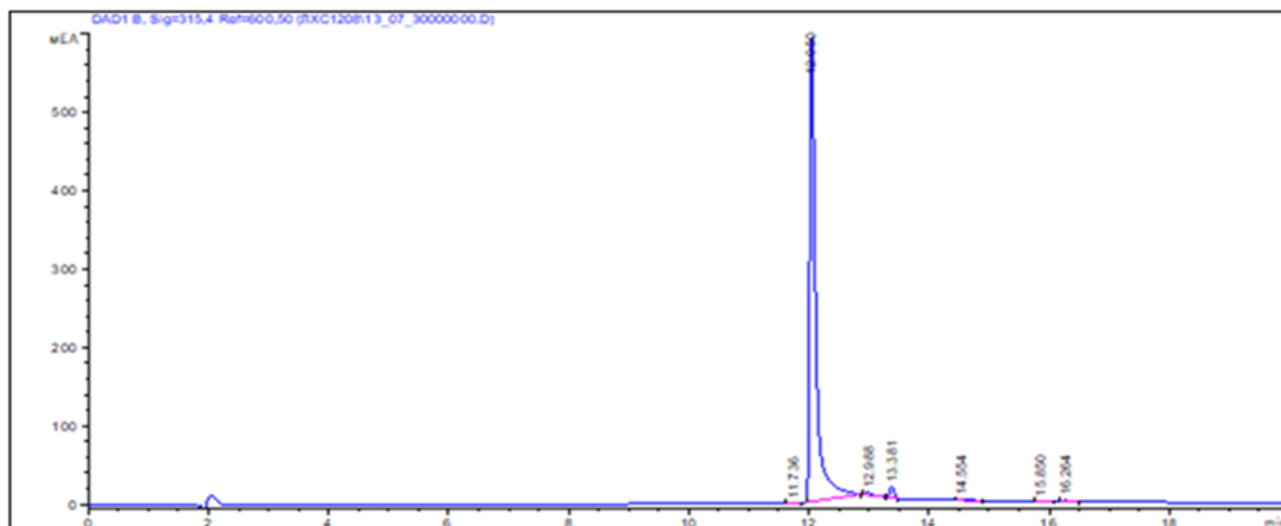


Рисунок 9 – Хроматограмма ЛХС-1208

За счет возможности разделения смесей со сложным составом метод ВЭЖХ нашел широкое применение в фармакокинетических исследованиях, была изучена возможность применения разработанной методики ВЭЖХ для определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях (кровь, моча) и разработана методика выделения ЛХС-1208 из анализируемых образцов и удаления веществ, мешающих анализу.

В качестве оптимальной методики пробоподготовки проведено выделение ЛХС-1208 из биологических жидкостей путем осаждения белков с последующим центрифугированием образца и отделением супернатанта для анализа с использованием ацетонитрила в качестве растворителя.

Для проверки применимости разработанной методики определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях в исследованиях *in vivo* проведено пилотное исследование фармакокинетики модели лекарственной формы ЛХС-1208, которую вводили мышам внутривенно однократно в дозе 25 мг/кг с последующим отбором крови через 0,083, 15, 30, 60, 120, 180 и 300 мин после введения.

На хроматограммах модельных смесей, содержавших ЛХС-1208, и биологических жидкостей, взятых у лабораторных мышей, получивших ЛХС-1208, присутствовали пики с RT, соответствующими ЛХС-1208 (около 12 мин). Установлено, что УФ-спектры пиков соответствовали спектру ЛХС-1208, а их площадь находилась в линейной зависимости от

концентрации ЛХС-1208 в анализе, что указывает на возможность применения ВЭЖХ-методики для фармакокинетических исследований.

Количественный анализ субстанции ЛХС-1269 также проводили методом ВЭЖХ с использованием диодно-матричного детектора и указанной выше колонки. Подвижная фаза – вода - ацетонитрил - трифторуксусная кислота 900:100:1 (А); ацетонитрил - вода - трифторуксусная кислота 950:50:1 (Б), скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин, длины волны детектирования – (315±5) нм. Температура колонки – 40°C. Общее время анализа – 7 мин при градиенте от 100% содержания подвижной фазы А на старте до 100% подвижной фазы Б на 6,4 мин и сохранении этой концентрации до окончания анализа. Расчет содержания действующего вещества и примесей проводили методом внутренней нормализации.

На полученной хроматограмме (Рисунок 10) RT основного пика действующего вещества ЛХС-1269 составило 3,9-4,0 мин. УФ-спектр данного пика совпадал с УФ-спектром субстанции ЛХС-1269. На хроматограммах присутствовали также два пика примесей с RT 2,11 мин и 6,56 мин, ряд пиков примесей с RT около 4,66 мин, 5,05 мин и 5,29 мин.

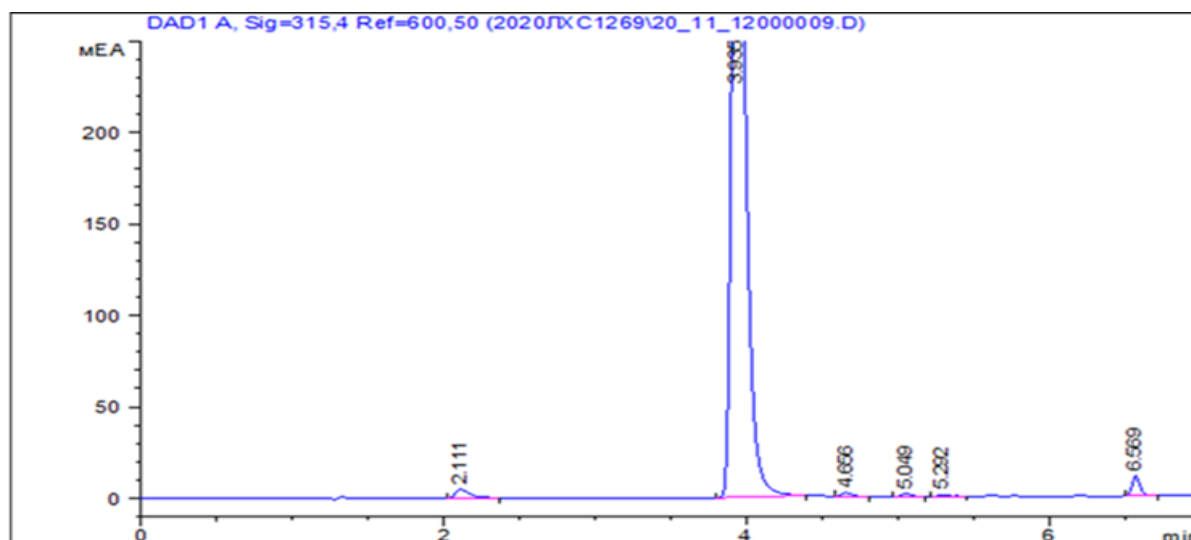


Рисунок 10 – Хроматограмма субстанции ЛХС-1269

УФ-спектры пиков примесей показали, что их структуры являются родственными ЛХС-1269, а спектр примеси со временем удерживания 2,11 мин совпал с ЭСП ЛХС-1208. Примеси со временами удерживания 2,11 мин и 6,56 мин получили названия ЛХС-1269-Х и ЛХС-1269-У, соответственно. Так как ЛХС-1208 является арабинозидом, а ЛХС-1269 – ксилозидом, наличие ЛХС-1208 в субстанции ЛХС-1269 невозможно из-за разных исходных соединений на первой стадии синтеза. Это позволило предположить, что ЛХС-1269-Х является по своей структуре 6-амино-12-(β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионом.

Данное соединение может образовываться в ходе синтеза за счет наличия остатков гидразина в гидразиде пиколиновой кислоты. Для подтверждения данного предположения направленным встречным синтезом получили ЛХС-1269-Х, который использовали в качестве образца сравнения при идентификации примесей в субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ-МСМС. Разделение проводили на предколонке Zorbax длиной 4,6 мм, диаметром 12,5 мм, заполненной сорбентом CB-C18 5-Micron и колонке Poroshell 120 длиной 150 мм диаметром 3 мм, заполненной сорбентом EC-C18 2,7 мкм. Подвижная фаза – вода - ацетонитрил – муравьиная кислота 900:100:1 (А); ацетонитрил - вода – муравьиная кислота 950:50:1 (Б). Температура колонки – 40°C, при градиенте от 100% подвижной фазы А до 100% содержания подвижной фазы Б от 6,4 до 7 мин, и возвращением на 7,5-15 мин к 100% содержанию подвижной фазы А.

Первичное детектирование проводили на диодно-матричном детекторе при длине волны (315±5)нм. Вторичное детектирование осуществляли на квадрупольно-времяпролетном масс-спектрометре в скрининговом режиме.

На экстрагированной ионной хроматограмме RT ЛХС-1269 составило около 6,61 мин, а RT примеси ЛХС-1269-Х – около 5,67 мин, RT примеси ЛХС-1269-У составило 8,12 мин (Рисунок 11). RT и МСМС-спектры иона-прекурсора образца сравнения совпадали со временем удерживания и МСМС-спектром примеси ЛХС-1269-Х, что позволяет идентифицировать примесь ЛХС-1269-Х, как 6-амино-12-(β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион.

На основе МСМС-спектров примеси ЛХС-1269-У выявлено, что по строению она имеет общие дочерние ионы с ЛХС-1269. Основываясь на схеме синтеза ЛХС-1269 высказано предположение, что данная примесь является N-[12-(2,3,4-три-О-ацетил-β-D-ксилопиранозил)индоло-[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамидом, промежуточным продуктом химического синтеза ЛХС-1269 с брутто-формулой C₃₇H₂₉N₅O₁₀ и молекулярной массой 703,191. Для подтверждения этого предположения был также проведен направленный встречный синтез N-[12-(2,3,4-три-О-ацетил-β-D-ксилопиранозил)индоло-[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамиды, который использовали в качестве образца сравнения.

Время удерживания образца сравнения совпадало со временем удерживания ЛХС-1269-У, дочерние ионы на МСМС-спектрах также совпадали с дочерними ионами примеси, что подтвердило предположение о строении и происхождении примеси ЛХС-1269-У.

В дальнейшем полученные данные о строении и происхождении примеси ЛХС-1269-Х и ЛХС-1269-У позволили провести оптимизацию технологии синтеза и очистки субстанции ЛХС-

1269, благодаря чему содержание данных примесей в последующих образцах значительно снизилось.

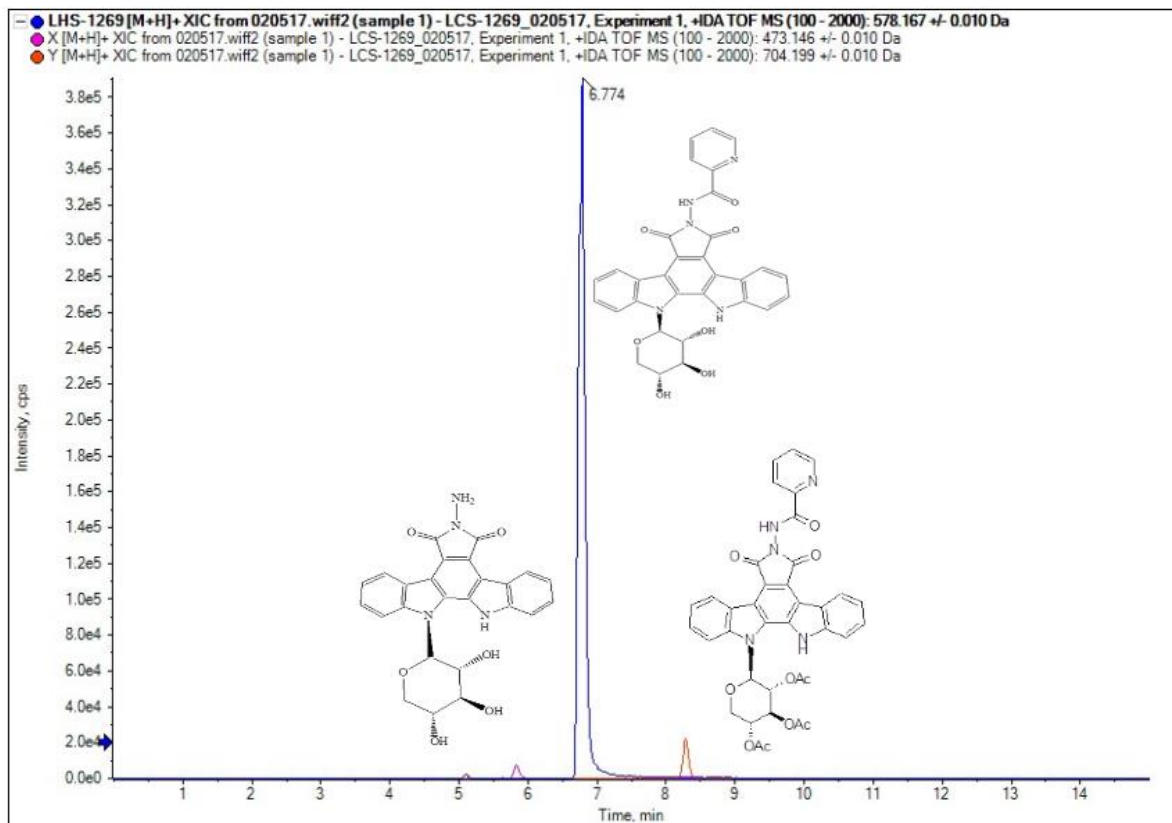


Рисунок 11 –Экстрагированная ионная хроматограмма субстанции ЛХС-1269 по ионам-прекурсорам ЛХС-1269 и примесей ЛХС-1269-Х, ЛХС-1269-У

Для методики определения содержания действующего вещества в субстанции ЛХС-1269 проведена валидация. По результатам валидации доказано, что растворители и подвижная фаза, применяемые в методике, не создают помех для детектора и не влияют на точность результатов. Максимальный коэффициент разрешения, между пиками составил 12,15, а минимальный 2,25. В диапазоне 80 - 120% от рабочей концентрации выявлена линейная зависимость площади пика действующего вещества от его концентрации в растворе, описываемая уравнением $y=49,229x-35,512$. Коэффициент корреляции - 0,999. Коэффициент вариации составил 0,64%, что менее 1,50% и свидетельствует о сходимости методики анализа в условиях повторяемости. Критерий Стьюдента t , вычисленный на основе двух выборок, составил 1,69, что меньше табличного $t(95\%, 16)=2,12$ и подтверждает отсутствие систематической ошибки определения промежуточной прецизионности. Разработанная методика считается правильной, поскольку среднее значение относительной погрешности у полученных результатов в трипликатах с диапазоном концентраций ЛХС-1269 80 - 120%, составило 0,70%, а рассчитанное значение коэффициента Стьюдента $t=1,15$ меньше табличного значения $t(95\%, 8)=2,31$. Вычисленные

пределы обнаружения и количественного определения составили 3,15 мкг/мл и 9,57 мкг/мл, соответственно. Поскольку полученные в ходе валидации результаты не отягощены систематическими ошибками и соответствуют критериям, рекомендуемым ГФ, разработанная методика может считаться валидной.

Так как содержание примеси ЛХС-1269-У превышает 1,0%, проведена валидация методики ее количественного определения. Полученные результаты показали, что используемые растворители и подвижная фаза не искажают результаты определения примеси ЛХС-1269-У, при коэффициенте разрешения 2,73. В аналитическом диапазоне от 80 до 120% от рабочей концентрации наблюдают линейную зависимость, описываемую уравнением $y=53,88x-1,16$ ($r=0,999$). При определении промежуточной прецизионности коэффициент вариации для примеси ЛХС-1269-У составил 0,68%, а рассчитанный критерий Стьюдента – 0,67. Среднее значение относительной погрешности в трипликатах 1,58% и коэффициент Стьюдента, равный 1,54 (менее табличного значения) свидетельствуют о правильности методики. Вычисленные пределы обнаружения и количественного определения для примеси ЛХС-1269-У составили 0,04 мкг/мл и 0,12 мкг/мл. Полученные результаты позволяют считать разработанную методику валидной для количественного определения примеси ЛХС-1269-У.

На основе полученных данных обоснованы нормы качества и разработаны проекты нормативной документации для контроля качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

Исследование стабильности и определение сроков годности для фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 проводили при хранении образцов субстанций в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C (холодильная камера). Образцы хранили в пластиковых банках, укупоренных навинчиваемыми пластиковыми крышками. На основе полученных данных установлено, что при хранении образцов ЛХС-1208 и ЛХС-1269 в течение 2,5 лет в указанных выше условиях значимых изменений показателей качества субстанций не происходит. Это позволяет установить для них сроки годности в 2 года.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено комплексное исследование основных физико-химических свойств фармацевтических субстанций производных *N*-гликозидовиндоло[2,3-*a*]карбазола ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Получены и интерпретированы ¹H-ЯМР, ИК-, УФ- и тандемные масс-спектры высокого разрешения, подтвердившие строение впервые синтезированных соединений.

2. Для подтверждения подлинности и контроля качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 разработаны аналитические методики с применением спектральных методов анализа (ИК-спектрометрия, УФ-спектрофотометрии). Установлено, что величина

удельного вращения составляет от $+58^\circ$ до $+61^\circ$ для ЛХС-1208 и от $+58^\circ$ до $+60^\circ$ для ЛХС-1269. Показано, что содержание сульфатной золы в субстанции ЛХС-1208 не превышает 0,10%, а ЛХС-1269 – не более 0,05%, содержание тяжелых металлов в обеих субстанциях – менее 0,001%. Методом К. Фишера установлено, что ЛХС-1208 содержит не более 1,0%, а субстанция ЛХС-1269 – не более 2,5% воды.

3. Для подтверждения подлинности и количественного определения действующего вещества и возможных примесей использовали метод ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования: в качестве подвижной фазы применяли смеси воды и ацетонитрила с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты; оптимальная концентрация ЛХС-1208 и ЛХС-1269 в анализируемых растворах составила 200 мкг/мл и 50 мкг/мл соответственно. Подобранные условия обеспечили высокие значения коэффициентов разрешения между пиками действующего вещества и примесей (не менее 2,50 для ЛХС-1208 и не менее 2,25 для ЛХС-1269) при температуре хроматографической колонки 40°C . Длина волны (315 ± 5) нм выбрана, как подходящая для одновременного детектирования действующих веществ и примесей.

4. На основе определенных хроматографических характеристик разработана методика количественного определения действующего вещества в субстанции ЛХС-1208 методом ВЭЖХ. Содержание действующего вещества в анализируемых образцах составляло не менее 97%. Показана возможность использования разработанной методики для определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях в фармакокинетических исследованиях. Установлено, что ЛХС-1208 в неизменном виде определяется в плазме крови и моче мышей.

5. С применением методов ВЭЖХ-МСМС и направленного встречного синтеза в субстанции ЛХС-1269 идентифицированы две примеси, являющиеся родственными ЛХС-1269 соединениями. Разработана методика количественного определения действующего вещества и родственной примеси ЛХС-1269-У в фармацевтической субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ. Чистота субстанции ЛХС-1269 составляла не менее 97%, а содержание примесей ЛХС-1269-Х и ЛХС-1269-У 0,8 и 1,5%, соответственно. Высокая чувствительность (не менее 2,9757 мкг/мл для ЛХС-1269 и не менее 0,04 мкг/мл для примеси ЛХС-1269-У) и селективность разработанной методики подтверждена валидацией.

6. По результатам изучения стабильности фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 при хранении образцов в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C (в холодильной камере) доказано, что при хранении в течение 2,5 лет значимых изменений показателей качества не происходит. Это позволяет установить и обосновать срок их годности – 2 года.

7. Определены нормы качества для ЛХС-1208 и ЛХС-1269 как фармацевтических субстанций и разработаны проекты нормативной документации (спецификации по качеству) для фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенных исследований рекомендуется применять при контроле качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269, а также при разработке и производстве лекарственных форм на их основе.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанные проекты нормативной документации по контролю качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 могут быть использованы как основа для разработки методик контроля качества других соединений – производных индоло[2,3-а]карбазола. Образцы примесей субстанции ЛХС-1269, полученные направленным встречным синтезом, и образцы субстанции, полученные после оптимизации синтеза, в дальнейшем могут быть охарактеризованы в качестве стандартных образцов и применены при контроле качества фармацевтической субстанции ЛХС-1269.

Методика выделения ЛХС-1208 из биологических жидкостей может быть применена для исследований доклинической фармакокинетики других производных индоло[2,3-а]карбазола.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Козин, Д.А.** Производные индоло[2,3-а]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их исследования (обзор) / **Д.А.Козин, З.С. Шпрах, В.Ю. Решетняк, О.В.Нестерова, И.Н. Аверцева, Г.М. Родионова // Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2020. –Т.9. – №4. –С. 128-135. DOI 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135.[Scopus]
2. Shprakh, Z.Development and Validation of HPLC Method for Analysis of Indolocarbazole Derivative LCS-1269 / Z. Shprakh, A. Budko, **D. Kozin**, L. Ektova, D. Gusev, V. Reshetnyak, O. Nesterova // **Farmatsija.** – 2021. – Vol.68. – No.2. – P.427-431. DOI 10.3897/PHARMACIA.68.E63457.[Scopus]
3. Игнатьева, Е.В. Стандартизация фармацевтической субстанции препарата ЛХС-1208 / Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева, З.С. Шпрах, А.П. Будько, Л.В. Эктова, **Д.А. Козин**, В.Ю. Решетняк, О.В. Нестерова, Е.А. Панкратова // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2021. – Т.10. – №3. – С. 88-94. DOI 10.33380/2305-2066-2021-10-3-88-94. [Scopus]

4. **Козин, Д.А.** Идентификация примесей в фармацевтической субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ-МСМС / **Д.А. Козин**, З.С. Шпрах, А.П. Будько, Р.Б. Пугачева, Л.В. Эктова, В.А. Еремина, Д.В. Гусев, В.Ю. Решетняк, О.В. Нестерова // **Медико-фармацевтический журнал "Пульс"**. 2023. – Т. 25. – №1. – С. 78-82. DOI:10.26787/nydha-2686-6838-2023-25-1-78-82.
5. **Козин, Д.А.** Определение содержания действующего вещества в субстанции препарата ЛХС-1269 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / **Д.А. Козин** // Сборник тезисов XV Международной (XXIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Москва: ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. 2020. – С. 124.
6. **Козин, Д.А.** Стандартизация субстанции ЛХС-1269, обладающей противоопухолевой активностью / **Д.А. Козин** // Сборник материалов X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 2020 г. – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2020. – С. 185-186.
7. **Козин, Д. А.** Определение ЛХС-1208 в биологических жидкостях методом ВЭЖХ для изучения доклинической фармакокинетики / **Д.А. Козин**, З.С. Шпрах, А.П. Будько, В.Ю. Решетняк // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке: сборник тезисов III Международной научно-практической конференции, Москва, 25 ноября 2020 года Российский университет дружбы народов. – Москва: Российский университет дружбы народов (РУДН), 2020. – С. 195–198.
8. **Козин, Д.А.** Валидация методики определения действующего вещества в фармацевтической субстанции препарата ЛХС-1269 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/ **Д.А.Козин**, М.В. Миронова // Фундаментальная наука и клиническая медицина: XXIV Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей, Санкт-Петербург, 24 апреля 2021 года. – Санкт-Петербург: Общество с ограниченной ответственностью Издательский дом «Сциентиа», 2021. – С. 667-668.
9. **Козин, Д.А.** Анализ производных индоло[2,3-а]карбазола, обладающих противоопухолевым действием методом ИК-спектроскопии. / **Д.А. Козин**, М.В. Миронова, О.В. Горюнова, Л.В. Эктова, Н.И. Тихонова, В.А. Еремина, Д.В. Гусев, З.С. Шпрах, В.Ю. Решетняк, О.В. Нестерова // Первая всероссийская школа по медицинской химии для молодых ученых MEDCHEMSCHOOL2021: Тезисы докладов, Новосибирск, 04–09 июля 2021 года. – Новосибирск: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН). 2021. – С. 87.

10. **Козин, Д.А.** Идентификация примеси в фармацевтической субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ-МСМС / **Д.А. Козин, З.С. Шпрах, А.П. Будько, Р.Б. Пугачева, Л.В. Эктова, В.А. Еремина, Д.В. Гусев, В.Ю. Решетняк, О.В. Нестерова** // MedChem-Russia 2021. 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021»: Сборник тезисов 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием. – Т. 2. – Волгоград: Волгоград, 2022 – С. 35. DOI: 10.19163/MedChemRussia2021-2022-35.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВАК – Высшая аттестационная комиссия

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ РФ XIV – Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания

Да – дальтон

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИК – инфракрасный

МСМС-спектр – tandemный масс-спектр

УФ – ультрафиолетовый

ЯМР – протонный ядерный магнитный резонанс

Ас – ацетильная группа

As–асимметричные колебания

Ar – ароматическая группа

¹H- протон

KBr – калия бромид

RT – время удерживания

S– симметричные колебания