

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-3-61-71>

Количественное определение N-гликозидного производного замещенного индола[2,3a]карбазола в инновационных лекарственных формах

Е.В. Игнатьева¹, И.В. Ярцева¹, З.С. Шпрах^{1,2}, А.П. Колпаксиди¹, М.В. Дмитриева¹, А.В. Ланцова¹, Л.Л. Николаева^{1,2}, И.Р. Просалкова¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Елена Владимировна Игнатьева chem_analysis@ronc.ru

Введение. Среди новых избирательно действующих на опухоли лекарственных веществ значительный научный интерес вызывает гликозидное производное индолакарбазола ЛХС-1269, впервые синтезированное в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Экспериментальные исследования свидетельствуют о мультитаргетном механизме действия этого соединения: ЛХС-1269 способно взаимодействовать с несколькими внутриклеточными мишенями и индуцировать разные пути клеточной гибели. Для наиболее эффективного проявления противоопухолевой активности ЛХС-1269 и его доклинического изучения получено несколько инновационных моделей лекарственной формы.

Цель исследования – разработка методик количественного определения ЛХС-1269 в фармацевтических композициях, предложенных в процессе поиска оптимальной лекарственной формы.

Материалы и методы. В работе использован метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях. Изучены спектральные характеристики растворов ЛХС-1269 в диметилформамиде, диметилсульфоксиде (ДМСО) и в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт, а также электронные спектры поглощения вспомогательных веществ в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Inc., Австралия) в диапазоне длин волн от 200 до 500 нм. Стандартный образец – субстанция ЛХС-1269 (ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России).

Результаты. Проведенные исследования показали, что растворы ЛХС-1269 в диметилформамиде, ДМСО и смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт пригодны для спектрофотометрических измерений. Разработаны варианты методики количественного определения ЛХС-1269 методом прямой спектрофотометрии в инновационных моделях лекарственной формы, отличающихся содержанием активного вещества и составом вспомогательных веществ: ЛХС-1269 концентрат для приготовления раствора для инъекций и инфузий, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, лиофилизат липосомальный для приготовления дисперсии для инъекций.

Заключение. Разработаны методики количественного определения ЛХС-1269 в моделях лекарственной формы. Показано, что предложенные методики применимы для определения ЛХС-1269 в инновационных лекарственных формах, содержащих в качестве вспомогательных веществ полимерные низкомолекулярные солюбилизаторы, липиды, холестерин, моно- или олигосахариды.

Ключевые слова: индолакарбазол, ЛХС-1269, растворимость, лекарственная форма, спектрофотометрия

Для цитирования: Игнатьева Е.В., Ярцева И.В., Шпрах З.С. и др. Количественное определение N-гликозидного производного замещенного индола[2,3a]карбазола в инновационных лекарственных формах. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):61–71. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-61-71

Quantitative determination of the N-glycoside derivative of substituted indolo[2,3a]carbazole in innovative dosage forms

Elena V. Ignatieva¹, Irina V. Yartseva¹, Zoya S. Shprakh^{1,2}, Alexander P. Kolpaksidi¹, Mariya V. Dmitrieva¹, Anna V. Lantsova¹, Lyudmila L. Nikolaeva^{1,2}, Irina R. Prosalkova¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991 Russia

Contacts: Elena Vladimirovna Ignatieva chem_analysis@ronc.ru

Background. A glycoside derivative of indolocarbazole LHS-1269, one of the new drugs selectively affecting tumors, which was first synthesized at the N.N. Blokhin National Medical-Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, is of particular scientific interest. Experimental studies demonstrated a multi-target mechanism of action of this compound. LHS-1269 interacts with several intracellular targets and induces various pathways of cell death. Several innovative models of the dosage forms were designed to achieve the highest anti-tumor activity of the compound and to perform further preclinical studies.

Aim. To develop the methods for the quantitative determination of LHS-1269 in pharmaceutical compositions proposed as a result of the search for the optimal dosage form.

Materials and methods. The study analyzed the spectrophotometric characteristics of LHS-1269 solutions in dimethylformamide, dimethylsulfoxide (DMSO) and in the mixture of solvents DMSO–ethyl alcohol, as well as electronic absorption spectra of the excipients in the mixture of solvents DMSO–ethyl alcohol. Spectrophotometric measurements were performed on a Cary 100 spectrophotometer (Varian, Inc., Australia) in the wavelength range from 200 to 500 nm. The standard sample is the substance LHS-1269 (N.N. Blokhin Oncology Research Center of the Ministry of Health of Russia).

Results. The carried out studies showed that LHS-1269 solutions in dimethylformamide, DMSO and mixture of DMSO–ethyl alcohol are suitable for spectrophotometric measurements. Several variants of the methodology for the assay of LHS-1269 in various dosage form models that differ in the content of the active substance and the excipients composition have been developed: LHS-1269 concentrate for solution for injection and infusion; lyophilisate for solution for injection; liposomal lyophilisate for dispersion for injection.

Conclusion. Techniques for the assay of LHS-1269 in dosage form models have been developed. It has been shown that the developed techniques are applicable for LHS-1269 quantitative determination in innovative dosage forms containing polymeric low molecular weight solubilizers, lipids, cholesterol, mono- or oligosaccharides as excipients.

Keywords: indolocarbazole, LHS-1269, solubility, dosage form, spectrophotometry

For citation: Ignatieva E.V., Yartseva I.V., Shprakh Z.S. et al. Quantitative determination of the N-glycoside derivative of substituted indolo[2,3a]carbazole in innovative dosage forms. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2022;21(3):61–71. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-61-71

Введение

Одним из актуальных направлений повышения эффективности лекарственной терапии онкологических заболеваний является поиск новых избирательно действующих на опухоли лекарственных веществ, их рациональных лекарственных форм (ЛФ), позволяющих совершенствовать методы комплексного и комбинированного лечения злокачественных новообразований. Все больший научный интерес для практической онкологии представляют гликозидные производные индолокарбазолов. Соединения этого класса обладают способностью взаимодействовать с несколькими внутриклеточными мишенями и индуцировать разные пути клеточной гибели [1–3]. В лаборатории химического синтеза Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработан метод получения

производных индоло[2,3a]карбазолов [4]. Среди ряда представителей этого класса впервые синтезирован N-[12-(1-β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3a]пирроло-[3,4c]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамид (ЛХС-1269), структурная формула которого представлена на рис. 1 [4, 5].

Экспериментальные исследования свидетельствуют о мультитаргетном механизме действия ЛХС-1269: способность модулировать экспрессию генов, вовлеченных в неопластическую трансформацию и опухолевую прогрессию [2]; активировать интерферон-сигналинг, действуя на ДНК и структуру хроматина [6]; ингибировать васкулогенную мимикрию [7]. В исследованиях *in vivo* ЛХС-1269 показало высокий противоопухолевый эффект на асцитных моделях опухоли Эрлиха, раке толстого кишечника АКАТОЛ, раке шейки матки РШМ-5, лимфолейкозе Р-388 и, таким образом, представляет интерес для терапии злокачественных новообразований [8–10].

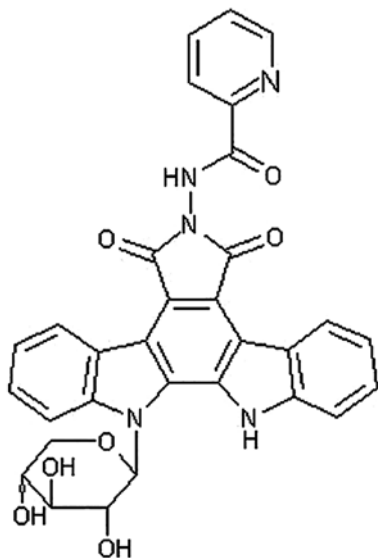


Рис. 1. Структурная формула ЛХС-1269

Fig. 1. The structural formula of LHS-1269

Для оптимального проявления противоопухолевой активности нового лекарственного средства ЛХС-1269 и его доклинического изучения следовало разработать экспериментальные модели ЛФ, обеспечивающие оптимальное содержание лекарственного вещества в ЛФ, устойчивость полученной ЛФ при хранении, предусмотреть путь введения лекарственного средства в организм и способ доставки его в опухоль. Важным этапом создания нового противоопухолевого средства является разработка методов контроля его качества.

Следует отметить, что к качеству противоопухолевых препаратов предъявляются повышенные требования, что объясняется особенностями их влияния на организм — наряду со специфическим действием на опухоль, противоопухолевые средства воздействуют на другие ткани и системы организма, что приводит к развитию серьезных побочных явлений [11, 12].

Цель исследования — разработка методик количественного определения ЛХС-1269 в фармацевтических композициях, предложенных в процессе поиска оптимальной ЛФ.

Материалы и методы

В работе использовали субстанцию ЛХС-1269 (ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), содержащую не менее 97 % действующего вещества (метод высокоэффективной жидкостной хроматографии) и соответствующую требованиям к фармацевтическим субстанциям, используемым в лекарственных препаратах; растворители: воду очищенную (ФС.2.2.0020.15), диметилсульфоксид (ДМСО) хч («Химмед», Россия), диметилформамид (ДМФА) хч («Химмед», Россия), спирт этиловый 96 % (ООО

«Константа-Фарм М», Россия); вспомогательные вещества (ВВ): повидон (Kollidon 17 PF) (BASF The Chemical Company, Германия), полисорбат 20 (MontanoxTM 20 PPI) (Seppic), яичный фосфатидилхолин Е РС S (Lipoid, Германия), холестерин ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, Япония), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтанолламин (Lipoid, Германия), сахарозу чда («Химмед», Россия).

Взвешивание образцов проводили на аналитических весах Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), спектрофотометрические измерения осуществляли на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Inc., Австралия).

Результаты

Для определения подлинности и количественного анализа производных индоло[2,3a]карбазола используются спектрометрические (инфракрасная и ультрафиолетовая спектрометрия) и хроматографические (тонкослойная хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография) методы [13]. При определении содержания активного вещества в ЛФ широко применяется надежный и относительно простой метод спектрофотометрии, отличающийся высокой достоверностью, воспроизводимостью и точностью [14, 15].

ЛХС-1269 представляет собой аморфный порошок желто-оранжевого цвета, без запаха. Отличительной особенностью этого соединения является низкая растворимость. Согласно принятой в Государственной фармакопее Российской Федерации (XIV издание) классификации растворимости ЛХС-1269 растворим в ДМСО, умеренно растворим в ДМФА, очень мало растворим в спирте этиловом 96 % и практически нерастворим в воде [16]. Низкая растворимость ЛХС-1269 значительно усложняла работу как в ходе исследований по поиску оптимальной ЛФ, так и при анализе предлагаемых моделей ЛФ, которые отличались по агрегатному состоянию [16], количественному содержанию активного вещества и составу ВВ.

На 1-м этапе исследований нами были получены электронные спектры поглощения (ЭСП) разбавленных растворов (0,004 мг/мл) ЛХС-1269 в апротонных полярных растворителях ДМФА и ДМСО. Растворы ЛХС-1269 в этих растворителях устойчивы при комнатной температуре, их спектры идентичны и содержат в области от 200 до 500 нм максимумы поглощения при длинах волн 286 ± 2 нм (удельный показатель поглощения $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 516$) и 317 ± 2 нм ($E_{1\text{ см}}^{1\%} = 1079$); слабо интенсивный максимум при длине волны 413 ± 2 нм ($E_{1\text{ см}}^{1\%} = 92$); плечо при 308 ± 2 нм; плечо при 337 ± 2 нм и минимумы при 278 ± 2 нм, 295 ± 2 нм и 375 ± 2 нм (рис. 2). Отношение значений оптической плотности в максимумах D_{319}/D_{286} для изученных образцов составляло $1,9 \pm 0,1$.

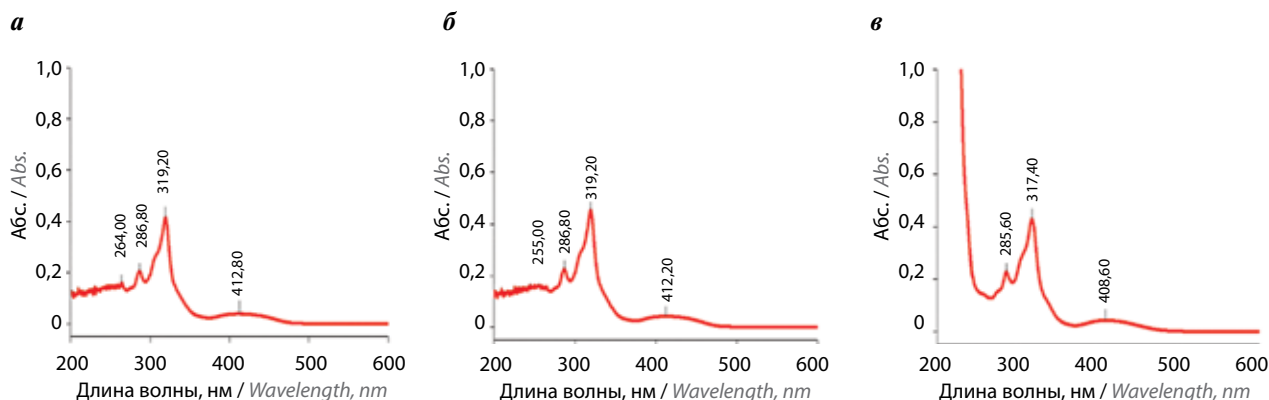


Рис. 2. Электронные спектры поглощения 0,004 мг/мл растворов ЛХС-1269: в диметилформамиде (а); в ДМСО (б); в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт 1:1250 (в). Здесь и на рис. 3–6: ДМСО–диметилсульфоксид

Fig. 2. Electronic absorption spectra of 0.004 mg/ml of solutions of LXS-1269: in dimethylformamide (a); in DMSO (b); in a mixture of solvents DMSO–ethyl alcohol 1:1250 (c). Here and in figures 3–6: DMSO – dimethylsulfoxide

Нами показано, что даже при разбавлении растворов ЛХС-1269 в ДМСО этиловым спиртом более чем в 1000 раз растворы остаются прозрачными и их спектральные характеристики не изменяются по сравнению с растворами в ДМФА или в ДМСО (см. рис. 2). Это позволило использовать в дальнейших исследованиях более доступную и удобную в работе смесь растворителей ДМСО–этиловый спирт.

Нами также показано, что ЭСП растворов ЛХС-1269 в любом из перечисленных растворителей и в смеси ДМСО–этиловый спирт в диапазоне концентраций от 0,003 до 0,010 мг/мл подчиняются закону Бугера–Ламберта–Бера, и наиболее интенсивный максимум поглощения при 317 ± 2 нм может служить аналитическим сигналом. Ниже приведен график, отражающий зависимость оптической плотности раствора ЛХС-1269 от концентрации в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт при длине волны 317 нм (рис. 3).

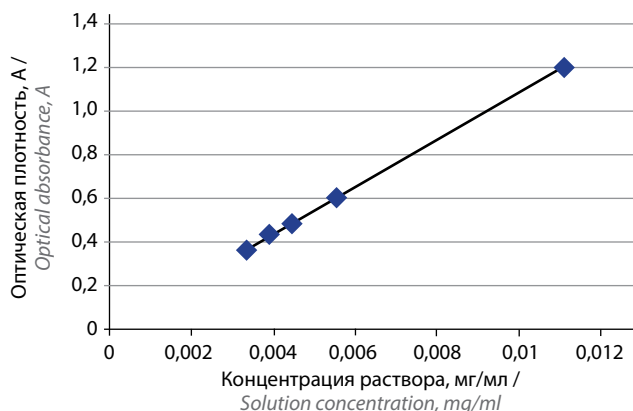


Рис. 3. Зависимость оптической плотности растворов ЛХС-1269 в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт 1:1250 от концентрации

Fig. 3. Optical density of LXS-1269 solutions in the mixture of solvents DMSO–ethyl alcohol 1:1250 in relation to the concentrations

Таким образом, на основании полученных спектральных характеристик растворов ЛХС-1269 в ДМФА, ДМСО и в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт мы показали, что для количественного определения ЛХС-1269 в моделях ЛФ можно применять метод спектрофотометрии [17].

Разработку методики количественного определения ЛХС-1269 в ЛФ проводили на 3 моделях: модель 1 – ЛХС-1269 концентрат для приготовления раствора для инъекций и инфузий 25 мг; модель 2 – ЛХС-1269 лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 10 мг; модель 3 – ЛХС-1269 лиофилизат липосомальный для приготовления дисперсии для инъекций 1,2 мг.

Модель 1 представляла собой вязкую жидкость желтого цвета во флаконах вместимостью 20 мл.

Помимо действующего вещества композиция содержала ДМСО, этиловый спирт и Kollidon 17 PF. При добавлении к содержимому флакона этилового спирта получали прозрачный раствор, ЭСП которого по форме, положению максимумов и их интенсивности соответствовал спектру раствора ЛХС-1269 в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт. ВВ, использованные в данной модели ЛФ, не имеют собственного поглощения в аналитической области от 270 до 500 нм и не влияют на спектральные характеристики ЛХС-1269 в растворе. Незначительное поглощение (около 0,06–0,08 единиц оптической плотности) отмечали лишь в спектре раствора Kollidon 17 PF при 264 ± 2 нм, но оно не мешало определению активного вещества в аналитическом максимуме (рис. 4).

В методику анализа введен способ расчета по стандартному образцу (СО), в качестве которого использовали субстанцию ЛХС-1269, из которой была получена ЛФ. При расчетах учитывали содержание активного вещества в субстанции.

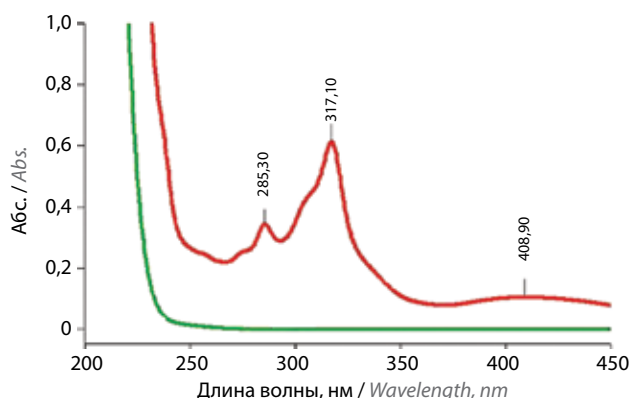


Рис. 4. Электронный спектр поглощения растворов модели 1 (красная линия) и вспомогательных веществ (зеленая линия) в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт

Fig. 4. Electronic absorption spectrum of Model 1 solutions (red line) and excipients (green line) in a mixture of DMSO–ethyl alcohol solvents

Методика анализа. Испытуемый раствор: к содержимому флакона добавляют около 10 мл спирта этилового 96 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки тем же растворителем, перемешивают; 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор СО: около 6 мг (точная навеска) ЛХС-1269 растворяют в 1 мл ДМСО, добавляют около 10 мл спирта этилового 96 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают; 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор сравнения — спирт этиловый 96 %.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора относительно раствора сравнения на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 317 ± 2 нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО относительно раствора сравнения.

Содержание ЛХС-1269 во флаконе (X, мг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 100 \times 50}{A_0 \times 50 \times 25} = \frac{A \times a_0 \times 4}{A_0},$$

где: A — оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 — оптическая плотность раствора СО; a_0 — навеска СО, мг.

Содержание ЛХС-1269 во флаконе должно быть в пределах от 22,5 до 27,5 мг.

Результаты 9 параллельных определений ЛХС-1269 в модели 1 приведены в табл. 1, 2. Численное значение коэффициента нормированных отклонений (коэффициента Стьюдента, $t(p, f)$), рассчитанное по результатам анализа, составило 1,14, что значительно ниже табличного значения (2,31). Относительная ошибка среднего результата ($\bar{\epsilon}$, %) была меньше 2 % и равнялась 0,75 %, т. е. результаты, полученные при использовании методики, не содержат систематических ошибок.

Правильность методики подтверждали анализом серии модельных смесей. Поскольку содержание ЛХС-1269 в единице ЛФ составляет 25 мг и методика может быть использована для определения однородности дозирования, диапазон ее применения расширен от 70 до 130 % от номинальной дозы. Модельные смеси готовили из ВВ с добавлением навески, соответствующей 70, 100 и 130 % от номинального содержания ЛХС-1269 в препарате. На каждом уровне проводили по 3 определения, всего было выполнено 9 определений. Результаты анализа оценивали, сравнивая полученные результаты с ожидаемым значением величины (содержание ЛХС-1269 в модельной смеси в мг). Полученные данные представлены в табл. 3, 4.

Спектрофотометрическая методика определения содержания основного действующего вещества ЛХС-1269 в ЛФ может быть признана правильной, так как относительная погрешность среднего результата измеряемой величины $\bar{\epsilon}$ не превышает 2 %; полученные результаты приближаются к истинному значению и лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ($\bar{x} \pm \Delta x$), который составил $99,87 \pm 1,55$ %, а относительная погрешность среднего результата ($\bar{\epsilon}$) не превышает 1,55 %.

При изучении противоопухолевой активности модель 1 показала хорошие результаты. Однако в ходе исследования проявился ряд недостатков, связанных, прежде всего, с собственной фармакологической активностью ДМСО. Кроме того, из-за образования комплекса между ДМСО и этиловым спиртом модель 1 не удалось лиофилизировать.

Модель 2. В ходе дальнейшей работы как прототип ЛФ, не содержащей ДМСО, предложена композиция, в состав которой включили комплекс солюбилизаторов (повидон (Kollidon 17 PF) и полисорбат 20 (MontanoxTM20)), — модель 2. Для стабилизации модели 2 применили лиофилизацию [18, 19].

Образцы лиофилизированной модели 2 представляли собой сухую пористую массу желтого цвета во флаконах вместимостью 10 мл. При добавлении к содержимому флакона 2 мл воды с последующим встряхиванием в течение 5 мин получали растворы,

Таблица 1. Результаты количественного определения ЛХС-1269 в концентрате для приготовления раствора для инъекций и инфузий 25 мг (модель 1)

Table 1. The results of quantitative determination of LHS-1269 in the concentrate for the preparation of the solution for injections and infusions, 25 mg (model 1)

Показатель Parameter	Определение Test								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Оптическая плотность испытуемого раствора (А) Optical density of the tested solution (A)	0,469	0,473	0,477	0,479	0,472	0,480	0,471	0,467	0,470
Найдено ЛХС-1269, мг LHS-1269, mg	24,870	25,098	25,280	25,052	25,417	25,462	24,961	24,779	24,916

Примечание. Использовали навеску стандартного образца $a_0 = 6,774$ мг (в пересчете на активное вещество); оптическая плотность раствора стандартного образца: $A_0 = 0,511$.

Note. The weight of the used standard sample $a_0 = 6.774$ mg (in terms of the active substance); optical density of standard sample solution: $A_0 = 0.511$.

Таблица 2. Метрологические характеристики среднего результата анализа (модель 1)

Table 2. Metrological characteristics of the average analysis result (model 1)

Число тестов, n Number of tests, n	f	$\bar{X}$, мг $\bar{X}$, mg	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P, %	t (p, f) табличное t (p, f) reference value	t (p, f) вычисленное t (p, f) calculated value	Δx	$\bar{e}$, %
9	8	25,093	0,059	0,244	0,081	95	2,306	1,142	0,187	0,75

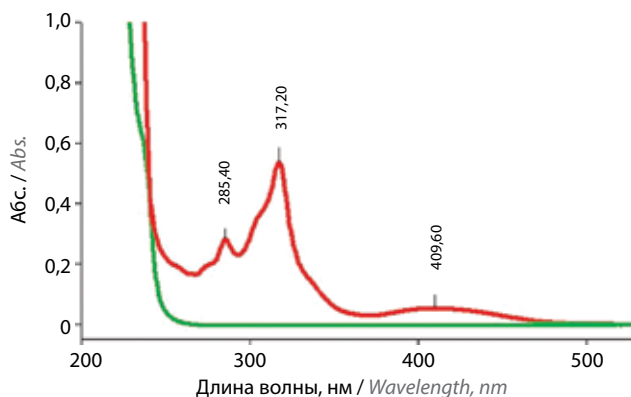


Рис. 5. Электронный спектр поглощения растворов модели 2 (красная линия) и вспомогательных веществ (зеленая линия) в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт

Fig. 5. Electronic absorption spectrum of model-2 solutions (red line) and excipients (green line) in a mixture of DMSO–ethyl alcohol solvents

которые оставались прозрачными при разведении этиловым спиртом и имели ЭСП, характерный для ЛХС-1269. Было показано также, что спиртовые растворы ВВ, входящих в состав модели 2, не имеют собственного поглощения в области аналитического максимума (рис. 5). Количественное определение ЛХС-1269 проводили в соответствии со спектрофотометрической методикой, описанной выше, используя в качестве основного растворителя этиловый

спирт и модифицировав приготовление испытуемого раствора.

Испытуемый раствор: к содержимому флакона добавляют 2 мл воды, 2 мл ДМСО, около 10 мл спирта этилового 96 %, полученный прозрачный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают; 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят до метки спиртом этиловым 96 % и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора СО и определение выполняют по методике, разработанной для модели 1.

Содержание ЛХС-1269 во флаконе (X, мг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 50 \times 50}{A_0 \times 50 \times 25} = \frac{A \times a_0 \times 2}{A_0},$$

где: A — оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 — оптическая плотность раствора СО; a_0 — навеска СО, мг.

Содержание ЛХС-1269 в одном флаконе должно находиться в пределах от 9,0 мг до 11,0 мг.

Результаты количественного определения ЛХС-1269 в модели 2 представлены в табл. 5.

Таблица 3. Результаты оценки правильности методики количественного определения ЛХС-1269 в модели лекарственной формы ЛХС-1269 концентрат для приготовления раствора для инъекций и инфузий 25 мг

Table 3. Results of determining the correctness of the method of quantitative determination of LHS-1269 in the model of dosage form LHS-1269 concentrate for the preparation of a solution for injections and infusions of 25 mg

Содержание ЛХС-1269 от номинального, % The content of LHS-1269 from the nominal, %	№ теста Test No.	Содержание ЛХС-1269 в анализируемой пробе, мг The content of LHS-1269 in the analyzed sample, mg	Найдено ЛХС-1269, мг LHS-1269, mg	Степень обнаружения, % Degree of detection, %	Среднее значение в трипликате, % Average value in triplicate, %
70	1	17,68	18,09	102,32	99,31
	2	17,38	16,93	97,41	
	3	17,71	17,39	98,19	
100	4	25,47	25,36	99,57	99,78
	5	25,12	25,45	101,31	
	6	25,83	25,43	98,45	
130	7	32,59	31,86	97,76	100,52
	8	32,38	33,21	102,56	
	9	32,63	33,04	101,26	

Таблица 4. Метрологические характеристики среднего результата анализа (оценка правильности методики для модели 1)

Table 4. Metrological characteristics of the average analysis result (determining the correctness of the method for model 1)

Число тестов, n Number of tests, n	f	$\bar{x}$, % $\bar{x}$, %	S ²	S	S $\bar{x}$	P, %	t (p, f) табличное t (p, f) reference value	t (p, f) вычисленное t (p, f) calculated value	Δx	$\bar{e}$, %
9	8	99,87	4,08460	2,02104	0,67368	95	2,306	0,193	1,554	1,55

Модель 3. В качестве еще одной модели ЛФ ЛХС-1269 для внутривенного введения, не содержащей ДМСО, предложена липосомальная ЛФ. В состав липосомальной ЛФ, помимо активного вещества, включили яичный фосфатидилхолин, холестерин и полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтанолламин [20].

Липосомальная ЛФ представляла собой дисперсию желтого цвета, содержащую 0,3 мг/мл ЛХС-1269. При добавлении к липосомальной дисперсии ДМСО и этилового спирта получали прозрачный раствор, ЭСП которого по форме и положению максимумов соответствовал спектру раствора ЛХС-1269. Для изучения влияния ВВ, входящих в состав липосомальной ЛФ, на количественные характеристики ЛХС-1269 получен ЭСП раствора липосом, не нагруженных активным веществом. ЭСП ненагруженных липосом в области от 200 до 500 нм содержал 2 пика низкой интенсивности (менее 0,1 единицы оптической плотности) при 268 ± 2 нм и 279 ± 2 нм. На рис. 2, в представлен ЭСП СО, а на рис. 6 – испытуемого раствора и раствора ВВ в концентрациях, соответствующих

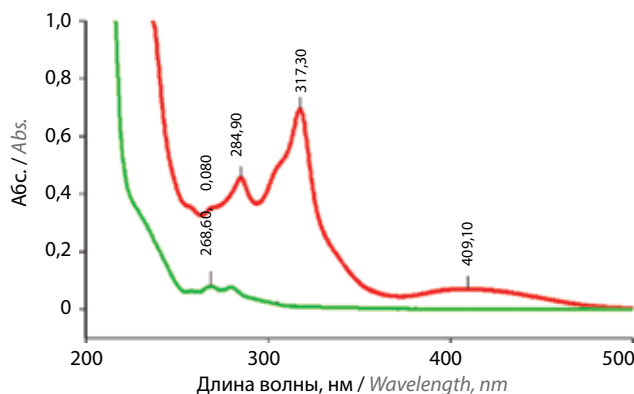


Рис. 6. Электронный спектр поглощения растворов модели 3 (красная линия) и вспомогательных веществ (зеленая линия) в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт

Fig. 6. Electronic absorption spectrum of model 3 solutions (red line) and excipients (green line) in a mixture of DMSO–ethyl alcohol solvents

разбавлению испытуемого раствора данной ЛФ. Из рисунков видно, что при рабочей длине волны 317 нм максимумы растворов СО и испытуемого раствора совпадают, а поглощение раствора ВВ стремится

Таблица 5. Результаты количественного определения ЛХС-1269 в лиофилизате для приготовления раствора для инъекций 10 мг (модель 2)
Table 5. Results of quantitative determination of LHS-1269 in lyophilisate for solution for injection 10 mg (model 2)

Испытуемый образец Test sample	Стандартный образец Standard sample		Оптическая плотность испытуемого раствора (A) Optical density of test solution (A)	Найдено ЛХС-1269, мг LHS-1269, mg
	Навеска (a ₀)*, мг Weight (a ₀)*, mg	Оптическая плотность (A ₀) Optical density (A ₀)		
1	6,776	0,511	0,354	9,39
			0,363	9,63
2	6,776	0,511	0,370	9,81
			0,375	9,94
3	6,776	0,511	0,406	10,77
			0,394	10,45
4	4,820	0,411	0,451	10,58
			0,445	10,44
5	4,548	0,384	0,442	10,47
			0,429	10,16
6	4,548	0,384	0,446	10,56
			0,442	10,47

*Навеска стандартного образца (a₀) приведена в пересчете на активное вещество.

*The weight of the standard sample (a₀) is given in terms of active substance.

Примечание. Здесь и в табл. 6 для каждого образца приведены результаты анализа 2 единиц (флаконов) лекарственной формы.

Note. Here and in table 6, for each sample, the results of the analysis of two units (vials) of the dosage form are presented.

к нулю и не оказывает влияния на величину оптической плотности в рассматриваемом максимуме.

В ходе изучения липосомальной дисперсии ЛХС-1269 установлено, что она неустойчива при хранении. Для получения стабильной ЛФ липосомальную дисперсию лиофилизировали, используя в качестве криопротектора сахарозу [21]. Этот олигосахарид не имеет хромофора, его водные растворы прозрачны в используемой нами аналитической области. Однако сахара очень мало растворима в этиловом спирте. Поэтому при анализе ЛФ для регидратации лиофилизата и растворения сахарозы на стадии приготовления испытуемого раствора к содержимому флакона добавляли воду. При этом получали прозрачный раствор, пригодный для спектрофотометрических измерений, а входящие в состав модели 3 ВВ не мешали определению основного вещества.

Испытуемый раствор: к содержимому флакона добавляют 4 мл воды, 0,2 мл ДМСО и около 10 мл спирта этилового 96 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают; 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки спиртом

этиловым 96 % и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление *раствора СО* и определение выполняют по методике, разработанной для модели 1.

Содержание ЛХС-1269 во флаконе (X, мг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 50 \times 25}{A_0 \times 50 \times 25 \times 5} = \frac{A \times a_0}{A_0 \times 5},$$

где: A — оптическая плотность испытуемого раствора; A₀ — оптическая плотность раствора СО; a₀ — навеска СО, мг.

Содержание ЛХС-1269 во флаконе должно быть в пределах от 1,08 до 1,32 мг.

Результаты количественного определения ЛХС-1269 в лиофилизированной липосомальной модели приведены в табл. 6.

Закключение

Проведенные исследования показали, что ЛХС-1269 имеет характерный ЭСП в апротонных полярных растворителях ДМФА и ДМСО. При сильном

Таблица 6. Результаты количественного определения ЛХС-1269 в лиофилизате липосомальном для приготовления дисперсии для инъекций 1,2 мг (модель 3)

Table 6. Results of quantitative determination of LHS-1269 in liposomal lyophilisate for dispersion for injection 1.2 mg (model 3)

Испытуемый образец Test sample	Стандартный образец Standard sample		Оптическая плотность испытуемого раствора (A) Optical density of test solution (A)	Найдено ЛХС-1269, мг LHS-1269, mg
	Навеска (a_0)*, мг Weight (a_0)*, mg	Оптическая плотность (A_0) Optical density (A_0)		
1	6,305	0,515	0,479	1,173
			0,481	1,178
2	6,305	0,515	0,495	1,212
			0,497	1,217

*Навеска стандартного образца (a_0) приведена в пересчете на активное вещество.

*The weight of the standard sample (a_0) is given in terms of active substance.

разведении растворов ЛХС-1269 в ДМСО спиртом этиловым 96 % растворы остаются прозрачными и характеристики спектра при этом не изменяются; растворы остаются пригодными для спектрофотометрических измерений.

На основании полученных данных разработана спектрофотометрическая методика количественного определения ЛХС-1269 в модели ЛФ ЛХС-1269 концентрат для приготовления раствора для инъекций и инфузий 25 мг. Показано, что данная методика в аналитическом диапазоне от 70 до 130 % от номинального содержания основного действующего вещества в единице ЛФ обеспечена приемлемой правильностью и не содержит систематических ошибок. Полученные

результаты соответствуют критериям, рекомендуемым Государственной фармакопеей Российской Федерации.

Показано, что с учетом особенностей приготовления испытуемых растворов (в зависимости от состава ЛФ) разработанная методика применима для определения содержания ЛХС-1269 в ЛФ ЛХС-1269 лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 10 мг и ЛХС-1269 лиофилизат липосомальный для приготовления дисперсии для инъекций 1,2 мг.

Предложенная методика может быть применима для определения содержания ЛХС-1269 в инновационных ЛФ, включающих в качестве ингредиентов полимерные низкомолекулярные солюбилизаторы, липиды, холестерин, моно- или олигосахариды.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Janosik T., Rannug A., Rannug U. et al. Chemistry and properties of indolocarbazoles. Chem Rev 2018;118(18):9058–128. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00186
- Zenkov R.G., Ektova L.V., Vlasova O.A. et al. Indolo[2,3-a]carbazoles: diversity, biological properties, application in antitumor therapy. Chem Heterocycl Compd 2020;56(6):644–58. DOI: 10.1007/s10593-020-02714-4
- Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазола ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(3):25–32. Lantsova A.V., Sanarova E.V., Oborotova N.A. et al. Development of technology for injectable dosage form based on the national substance from the class of indolocarbazoles – LHS-1208. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(3):25–32. (In Russ.).
- Голубева И.С., Еремина В.А., Моисеева Н.И. и др. Производное класса N-гликозидов индоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-5,7-дионов-N-{2-(β-d-ксило-пиранозил)-5,7-диоксо-индоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-6-ил}пиридин-2-карбоксамид, обладающее цитотоксической и противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2667906 от 11.09.2017. Golubeva I.S., Eremina V.A., Moiseeva N.I. et al. A derivative of the class of N-glycosides indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-diones-N-{2-(β-d-xylo-pyranosyl)-5,7-dioxo-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-6-yl}pyridine-2-carboxamide with cytotoxic and antitumor activity. Patent RU No. 2667906 dated 11.09.2017. (In Russ.).
- Эктова Л.В., Еремина В.А., Тихонова Н.И. и др. Синтез и цитотоксическая активность N-гликозидов индоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-5,7-дионов, замещенных по малеимидному атому азота. Химико-фармацевтический журнал 2020;54(5):26–9. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-5-26-29 Ektova L.V., Eremina V.A., Tikhonova N.I. et al. Synthesis and cytotoxicity of N-glycosides of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-diones substituted at the maleimide nitrogen atom. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Chemical and Pharmaceutical Journal 2020;54(5):26–9. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-5-26-29
- Zenkov R.G., Vlasova O.A., Maksimova V.P. et al. Molecular mechanisms of anticancer activity of N-glycosides

- of indolocarbazoles LCS-1208 and LCS-1269. *Molecules* 2021;26(23):7329. DOI: 10.3390/molecules26237329
7. Vartanian A., Baryshnikova M., Burova O. et al. Inhibitor of vasculogenic mimicry restores sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-damaging agents. *Melanoma Res* 2017;27(1):8–16. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000308
 8. Kiseleva M.P., Borisova L.M., Smirnova G.B. et al. Antiproliferative activity of new derivative from the class of N-glycoside of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles. *Research Result Pharmacol* 2021;8(2):49–57. DOI: 10.3897/rpharmacology.8.79424
 9. Яворская Н.П., Голубева И.С., Эктова Л.В. и др. Противоопухолевая активность индолокарбазола ЛХС-1269. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(1):125. Yavorskaya N.P., Golubeva I.S., Ektova L.V. et al. Antitumor activity of indolocarbazole LHS-1269. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(1):125. (In Russ.).
 10. Голубева И.С., Яворская Н.П., Эктова Л.В. и др. Противоопухолевая активность некоторых производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов с углеводным остатком ксилозой. *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(4):86–93. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-86-93 Golubeva I.S., Yavorskaya N.P., Ektova L.V. et al. Antitumor activity of some derivatives of indolo[2,3-a]carbazoles N-glycosides with xylose carbohydrate residue. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(4):86–93. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-86-93
 11. Basak D., Arrighi S., Darwiche Y., Deb S. Comparison of anticancer drug toxicities: paradigm shift in adverse effect profile. *Life (Basel)* 2022;12(1):48. DOI: 10.3390/life12010048
 12. Savelli M., Roche M., Curti C. et al. Methods to control anticancer chemotherapy preparations ranked by risk analysis. *Pharmazie* 2018;73(5):251–9. DOI: 10.1691/ph.2018.7205.
 13. Козин Д.А., Шпрах З.С., Решетняк В.Ю. и др. Производные индоло[2,3-а]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их исследования (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств* 2020;9(4):128–35. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135 Kozin D.A., Shprakh Z.S., Reshetnyak V.Yu. et al. Indolo[2,3-a]carbazole derivatives with antitumor activity and instrumental methods for their investigation (review). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration* 2020;9(4):128–35. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135
 14. Шпрах З.С., Игнатова Е.В., Ярцева И.В. и др. Разработка и валидация методики количественного определения ципетрилина в таблетках. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(3):55–61. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61 Shprakh Z.S., Ignateva E.V., Yartseva I.V. et al. Development and validation of cyphetrylin assay in tablets. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(3):55–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61
 15. Игнатова Е.В., Ярцева И.В., Шпрах З.С. и др. Разработка и валидация методики количественного определения димерного макроциклического танина в лекарственной форме. *Разработка и регистрация лекарственных средств* 2020;9(4):93–8. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98 Ignateva E.V., Yartseva I.V., Shprakh Z.S. et al. Development and validation of dimeric macrocyclic tannin assay method in dosage forms. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration* 2020;9(4):93–8. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98
 16. Государственная фармакопея РФ XIV изд., т. 1, ОФС.1.2.1.1.0003.15; ОФС.1.2.1.0005.15; т. 2, ОФС.1.4.1.0001.15. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV Ed., Vol. 1, General Monograph. 1.2.1.1.0003.15; General Monograph. 1.2.1.0005.15; Vol. 2, General Monograph. 1.4.1.0001.15. (In Russ.).
 17. Ignateva E.V., Yartseva I.V., Shprakh Z.S. Spectrophotometry for quantitative determination of LHS-1269 in the dosage form for injection. *Materials of the 4th Russian conference on medicinal chemistry with international participants: report abstract*. Ekaterinburg, 2019. 356 p.
 18. Оборотова Н.А., Николаева Л.Л., Король Л.А. Особенности создания лиофилизированных противоопухолевых препаратов (обзор). *Биофармацевтический журнал* 2020;12(3):3–13. DOI: 10.30906/2073-8099-2020-12-3-3-13 Oborotova N.A., Nikolaeva L.L., Korol L.A. et al. Features of the creation of lyophilized anticancer drugs (review). *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal* 2020;12(3):3–13. (In Russ.). DOI: 10.30906/2073-8099-2020-12-3-3-13
 19. Oborotova N.A., Shprakh Z.S., Bagirova V.L. et al. Development of a new injection form of cytostatics using poly(vinyl pyrrolidone). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2001;35(5):274–8. DOI: 10.1023/A:1011973524048
 20. Лугань Б., Дмитриева М.В., Орлова О.Л. и др. Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индолокарбазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств* 2020;9(3):21–6. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26 Lugen B., Dmitrieva M.V., Orlova O.L. et al. Development of the composition of a liposomal dosage form of a hydrophobic derivative of indolocarbazole. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration* 2020;9(3):21–6. (In Russ.).
 21. Дмитриева М.В., Лугань Б., Полозкова А.П. и др. Выбор криопротектора для получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1269. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(1):74–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-74-79 Dmitrieva M.V., Lugen B., Polozkova A.P. et al. Selection of a cryoprotector for production a lyophilized liposomal dosage form of the indolocarbazole derivative LHS-1269. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(1):74–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-74-79

Вклад авторов

Е.В. Игнатова, И.В. Ярцева, З.С. Шпрах, А.П. Колпаксиди, М.В. Дмитриева, А.В. Ланцова, Л.Л. Николаева, И.Р. Просалкова: разработка эксперимента, анализ полученных данных, написание текста статьи и ее обсуждение.

Author's contribution

E.V. Ignatieva, I.V. Yartseva, Z.S. Shprakh, A.P. Kolpaksidi, M.V. Dmitrieva, A.V. Lantsova, L.L. Nikolaeva, I.R. Prosalkova: development of the experiment, analysis of the data obtained, writing the text of the article and its discussion.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.В. Игнатова / E.V. Ignatieva: <https://orcid.org/0000-0002-9200-4492>

И.В. Ярцева / I.V. Yartseva: <https://orcid.org/0000-0002-8818-7812>

З.С. Шпрах / Z.S. Shprakh: <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>
А.П. Колпаксиди / A.P. Kolpaksidi: <https://orcid.org/0000-0001-9388-1019>
М.В. Дмитриева / M.V. Dmitrieva: <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>
А.В. Ланцова / A.V. Lantsova: <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>
Л.Л. Николаева / L.L. Nikolaeva: <https://orcid.org/0000-0001-8003-8241>
И.Р. Просалкова / I.R. Prosalkova: <https://orcid.org/0000-0001-8367-7284>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-366.2022.3 «Создание инновационного отечественного лекарственного препарата из класса производных индокарбазола, обладающего мультитаргетным противоопухолевым и антиангиогенным действием».

Funding. This work was financial supported by the grant of the President of the Russian Federation МК-366.2022.3 “Creation of an innovative domestic drug from the class of indolocarbazole derivatives with multi-target antitumor and antiangiogenic effect”.

Статья поступила: 19.07.2022. Принята к печати: 09.09.2022.
Article submitted: 19.07.2022. Accepted for publication: 09.09.2022.