

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-73-82>

Разработка и валидация биоаналитической методики определения ЛХС-1269 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Д.А. Козин, Н.Ю. Кульбачевская, В.А. Балыков, З.С. Шпрах

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

Контакты: Дмитрий Андреевич Козин kozin1993@inbox.ru

Введение. Синтезированное в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина гликозилированное производное индоло-[2,3-а]карбазола ЛХС-1269 – интеркалятора дезоксирибонуклеиновой кислоты и ремодулятора хроматина – представляет большой интерес для терапии злокачественных новообразований. Для проведения фармакокинетических исследований лекарственных форм ЛХС-1269 *in vivo* необходимо разработать методику определения ЛХС-1269 в биологических образцах.

Цель исследования – разработка и валидация биоаналитической методики с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) для фармакокинетических исследований ЛХС-1269.

Материалы и методы. В исследовании использовали субстанцию ЛХС-1269 с содержанием действующего вещества 99,4 %, плазму крови и печень здоровых иммунокомпетентных лабораторных самок мышей-гибридов (C₅₇BL/6J×DBA2)F₁ разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Для подготовки биологических образцов применяли ацетонитрил и хлорид натрия. Определение проводили методом ВЭЖХ-УФ в обращенно-фазовом варианте в градиентном режиме. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли в программе Microsoft Office Excel 2010.

Результаты. Для подготовки образцов плазмы крови разработана методика на основе депротеинизации охлажденным ацетонитрилом; подготовку образцов печени проводили с использованием комбинированной депротеинизации охлажденным ацетонитрилом и хлоридом натрия. Валидация разработанной методики подтвердила ее специфичность, линейность ($r > 0,99$), правильность (отклик > 80 % на малых концентрациях) и прецизионность (относительное стандартное отклонение $\leq 3,5$ %) во всем аналитическом диапазоне; показано отсутствие эффекта переноса ЛХС-1269. Установлено, что образцы для анализа стабильны в течение 24 ч при комнатной температуре, а модельные смеси – в течение 1 мес при температуре не выше -18 °C.

Заключение. Разработана биоаналитическая методика для количественного определения ЛХС-1269 в плазме крови и печени животных с применением метода ВЭЖХ-УФ, соответствующая требованиям к валидации методик для анализа биологических образцов Евразийского экономического союза.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, фармакокинетика, пробоподготовка, депротеинизация, валидация

Для цитирования: Козин Д.А., Кульбачевская Н.Ю., Балыков В.А., Шпрах З.С. Разработка и валидация биоаналитической методики определения ЛХС-1269 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):73–82.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-73-82>

Development and validation of bioanalytical technique for the LCS-1269 assay by high-performance liquid chromatography

Dmitry A. Kozin, Natalya Yu. Kulbachevskaya, Vitaly A. Balykov, Zoya S. Shprakh

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

Contacts: Dmitry Andreevich Kozin kozin1993@inbox.ru

Background. The glycosylated derivative of indolo[2,3-a]carbazole LCS-1269, an DNA intercalator and a chromatin remodulator, synthesized in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (N.N. Blokhin NMRCO), is of great interest for the treatment of malignant tumors. To carry out pharmacokinetic studies of LCS-1269 dosage forms *in vivo*, it is necessary to develop a method for LCS-1269 assay in biological samples.

Aim. To develop and validate an analytical technique using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) for LCS-1269 pharmacokinetic studies.

Materials and methods. The study used the LCS-1269 substance containing 99.4 % of the active component, blood plasma and liver of healthy cyclic immunocompetent laboratory mice hybrid (C₅₇BL/6J×DBA2) F₁ of N.N. Blokhin NMRCO breeding. Acetonitrile and sodium chloride were used to prepare biological samples. Reversed-phase HPLC-UV method in the gradient regimen was used for LCS-1269 assay. Statistical processing of the obtained results was carried out in Microsoft Office Excel 2010 software.

Results. The technique based on cooled acetonitrile deproteinization was developed for blood plasma sample preparation; liver samples were prepared using combined cooled acetonitrile and sodium chloride deproteinization. The developed technique validation confirmed its specificity, linearity ($r > 0.99$), correctness (response > 80 % at low concentrations) and precision (relative standard deviation < 3.5 %) in the entire analytical range; LCS-1269 transfer effect wasn't observed. It was found that the analyzed samples are stable for 24 hours at room temperature, and the model mixtures are stable during a month when stored at temperatures less than -18 °C.

Conclusion. A bioanalytical technique for LCS-1269 assay in the blood plasma and liver of animals using HPLC-UV has been developed. Has been shown that the technique meets the requirements of the Eurasian Economic Union for the validation of biological samples analysis.

Keywords: high performance liquid chromatography, pharmacokinetics, sample preparation, deproteinization, validation

For citation: Kozin D.A., Kulbachevskaya N.Yu., Balykov V.A., Shprakh Z.S. Development and validation of bioanalytical technique for the LCS-1269 assay by high-performance liquid chromatography. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(2):73–82. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-73-82>

Введение

Среди многочисленных биологически активных веществ природного и синтетического происхождения с подтвержденной противоопухолевой активностью большой интерес вызывает группа гликозилированных производных индолюкарбазола. Отличительной особенностью данной группы соединений является их способность взаимодействовать с несколькими внутриклеточными мишенями и тем самым вызывать различные пути гибели опухолевых клеток. Это позволяет расширить диапазон противоопухолевого действия производных индолюкарбазола и влияет на избирательность (специфичность) воздействия, исключая или отсрочивая возникновение устойчивости опухоли к проводимому лечению [1, 2].

Синтезированное в лаборатории химического синтеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина производное индолю[2,3-а]карбазола ЛХС-1269 (*N*-[12-(1-β-D-ксилопиранозил)индолю-[2,3-а]пирролю[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамид [3] (рис. 1) эффективно влияет на васкулогенную мимикрию, подавляет механизм ангиогенеза, связанный с фактором роста эндотелия сосудов, приводит к снижению васкуляризации и угнетению роста опухоли [4]. Кроме того, ЛХС-1269 вызывает изменение экспрессии генов, вовлеченных в апоптоз,

клеточное старение, способствуя регуляции метаболизма в условиях гипоксии, ответу на повреждение ДНК и активации ее репарации [5]. На культуре клеток HeLa обнаружено влияние ЛХС-1269 на метилирование ДНК, локализацию гистона H1, ремоделирование хроматина и реактивацию эпигенетически молчащих генов [6]. В исследовании [7] описана методика количественного определения действующего вещества методом высокоскоростной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) детектированием, разработанная для стандартизации и контроля качества ЛХС-1269.

Цель данной работы – разработка и валидация биоаналитической методики с применением метода ВЭЖХ-УФ для фармакокинетических исследований ЛХС-1269.

Материалы и методы

Отбор и транспортировку крови проводили в пробирках Vacuette объемом 2 мл, содержащих в качестве антикоагулянта дикалиевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Greiner Bio-One, Австрия). Для пробоподготовки биологических образцов использовали стеклянные гомогенизаторы Поттера–Эльвейма с электрическим приводом, Glas-Col (США), вортекс (Heidolph ReaxTop, Германия), центрифужные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 и 2 мл

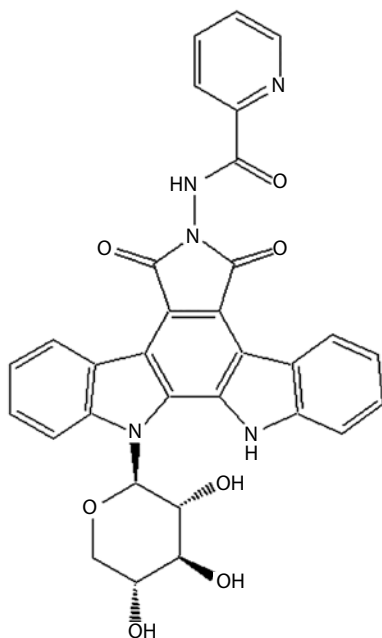


Рис. 1. ЛХС-1269

Fig. 1. LCS-1269

(«МиниМед», Россия) и центрифуги Eppendorf 5415R (Eppendorf, Германия) и Hettich Rotanta 460R (Hettich, Германия).

Содержание ЛХС-1269 определяли методом ВЭЖХ на аналитическом жидкостном хроматографе Agilent 1200 (Agilent, США) с диодно-матричным детектором, оснащенный предколонкой с защитным картриджем C184 × 3 мм (Phenomenex, США) и аналитической колонкой Zorbax SB C18, 50,0 × 4,6 мм, 1,8 мкм (Agilent, США). Для приготовления подвижной фазы и подготовки проб использовали ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ (Merck, Германия), деионизированную воду (18,2 МОм «Аквалаб S18+ (Supreme)», «Аквалаб», Россия) и хлорид натрия чистый для анализа («Химмед», Россия). Жидкие образцы отбирали автоматическими одноканальными дозаторами переменного объема Gilson Pipetman и Microman (Gilson, Франция). Для приготовления стандартных растворов использовали лабораторную мерную стеклянную посуду (ГОСТ 29227–91). Реактивы и биологические образцы взвешивали на аналитических весах Sartorius R200D 1-го класса точности и Sartorius L420S 2-го класса точности (Sartorius, Германия). Статистическую обработку полученных результатов

проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США).

Образцы крови и печени для приготовления модельных смесей брали у половозрелых иммунокомпетентных самок мышей-гибридов (C₅₇Bl/6J×DBA2)F₁ возрастом 10 нед массой 20–22 г, полученных из разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Все животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Работу с животными проводили в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств¹. Эвтаназию проводили путем дислокации шейных позвонков с последующим полным обескровливанием.

Образцы крови помещали в пробирки с антикоагулянтом, центрифугировали в течение 10 мин при скорости вращения ротора 3500 об/мин при комнатной температуре и отбирали плазму. Печень извлекали сверху вниз с осушением на подложке (при необходимости). Образцы плазмы крови и печени переносили в предварительно пронумерованные криопробирки (Wuxi NEST Biotechnology, КНР), которые герметично укупоривали и помещали на хранение в низкотемпературную морозильную камеру МНТ-80 (Россия) при температуре –80 °С. Перед приготовлением модельных смесей образцы размораживали не более 2 ч при температуре не выше 6 °С.

В качестве стандартного образца использовали субстанцию ЛХС-1269, полученную в лаборатории химического синтеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, содержащую 99,4 % действующего вещества (величина определена методом вычитания примесей из 100 %).

Для разработки и валидации биоаналитической методики готовили модельные смеси, прибавляя растворы стандартного образца ЛХС-1269 известной концентрации к образцам плазмы крови или гомогенизата печени. На основании ранее проведенных исследований в качестве аналитического выбран диапазон концентраций от 0,5 до 150,0 мкг/мл плазмы крови и от 0,5 до 150,0 мкг/г печени [7].

Валидацию биоаналитической методики проводили в соответствии с Приложением 6 Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов)².

¹Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 №81 (ред. от 12.04.2024). URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026101?ysclid=mbhuoqzbm9774626223>

²Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Приложение 6. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 (ред. от 12.04.2024). URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026107?ysclid=mbhnuvld4n756166354>

Результаты и обсуждение

Хроматографические условия, указанные в табл. 1, выбраны на основании проведенных ранее исследований по разработке методики количественного определения ЛХС-1269 в субстанции и лекарственной форме [7, 8].

Таблица 1. Хроматографические условия определения ЛХС-1269

Table 1. Chromatographic conditions of LCS-1269 assay

Параметр Parameter	Показатель Score	
Подвижная фаза А Mobile phase A	Вода Water	
Подвижная фаза Б Mobile phase B	9:1 ацетонитрил: вода, по объему 9:1 acetonitrile: water, by volume	
Градиент Gradient		
Время, мин Time, min	А, % A, %	Б, % B, %
0,0	55	45
4,0	27,5	72,5
4,2	0	100
5,0	Остановка Stopping	
Время после, мин Posttime, min	3	
Объем вводимой пробы, мкл Sample volume, µl	10 – для плазмы крови 10 for blood plasma; 5 – для печени 5 for liver	
Скорость потока, мл/мин Flow rate, ml/min	0,7	
Температура автосампле- ра, °С Autosampler temperature, °C	7	
Температура колонки, °С Column temperature, °C	40	
Длина волны детектора, нм Detector wavelength, nm	315 ± 4	

Для сокращения расхода растворителя и продолжительности анализа для разработки биоаналитической методики выбрали колонку с геометрическими параметрами 50 × 4,6 мм, наполненную сорбентом с размером частиц 1,8 мкм. Поскольку методика предназначена для анализа большого количества биопроб в рамках изучения доклинической фармакокинетики, для хроматографирования использовали градиентный режим, включающий линейное изме-

нение содержания элюента Б (прежде всего ацетонитрила). Градиентный режим, соотношение подвижных фаз на старте и плато 100 % подвижной фазы Б на финише (4,2–5,0 мин) обусловлены сложным составом анализируемых биологических образцов. Режим элюирования подобрали таким образом, чтобы время удерживания (RT) ЛХС-1269 находилось в интервале от 3 до 4 мин, а общее время анализа не превышало 5,5 мин (в использованных хроматографических условиях RT ЛХС-1269 составило примерно 3,5 мин) (рис. 2). Длина волны детектирования (315 ± 4 нм) выбрана в соответствии с положением аналитического максимума поглощения целевого аналита [8].

При введении 10 мкл образцов плазмы крови на хроматограммах получали пик ЛХС-1269 с фактором симметрии примерно 1,1 (см. рис. 2, а). При введении такого же объема образцов печени пик аналита имел уширенную и несимметричную форму с фактором асимметрии более 1,5 (см. рис. 2, б). Для получения симметричных пиков аналита объем вводимой пробы образцов печени уменьшили в 2 раза — до 5 мкл (см. рис. 2, в). Параллельно хроматографировали холостые образцы (рис. 3).

Одним из основных этапов разработки аналитических методик для таких сложных комплексных матриц, как плазма крови и печень, является выбор оптимального способа подготовки анализируемых образцов [9].

В основу методики выделения ЛХС-1269 из плазмы крови положен простой, универсальный и достаточно эффективный способ депротеинизации охлажденным ацетонитрилом, использованный ранее при фармакокинетических исследованиях гликозидного производного индолокарбазола ЛХС-1208. Выделение ЛХС-1269 проводили после гомогенизации образца с последующим осаждением белков охлажденным ацетонитрилом и дополнительным высаливанием хлоридом натрия [5, 9].

Для приготовления модельных смесей к рассчитанному объему плазмы крови прибавляли растворы ЛХС-1269 с концентрацией 1000, 100 и 10 мкг/мл до общего объема модельной смеси 200 мкл. Для выделения ЛХС-1269 из модельной смеси ко всему объему прибавляли 800 мкл охлажденного до –18 °С ацетонитрила, пренебрегая величиной коэффициента объемного термического расширения ацетонитрила ввиду ее ничтожности. Перемешивали в течение 2 мин на вортексе и центрифугировали в течение 10 мин при скорости вращения ротора 3500 об/мин и температуре 0 °С. После центрифугирования образцы выдерживали в течение 8 ч при температуре 4 °С, супернатант отделяли и использовали для анализа.

К навеске образца печени прибавляли 200 мг прибавляли 400 мкл деионизированной воды

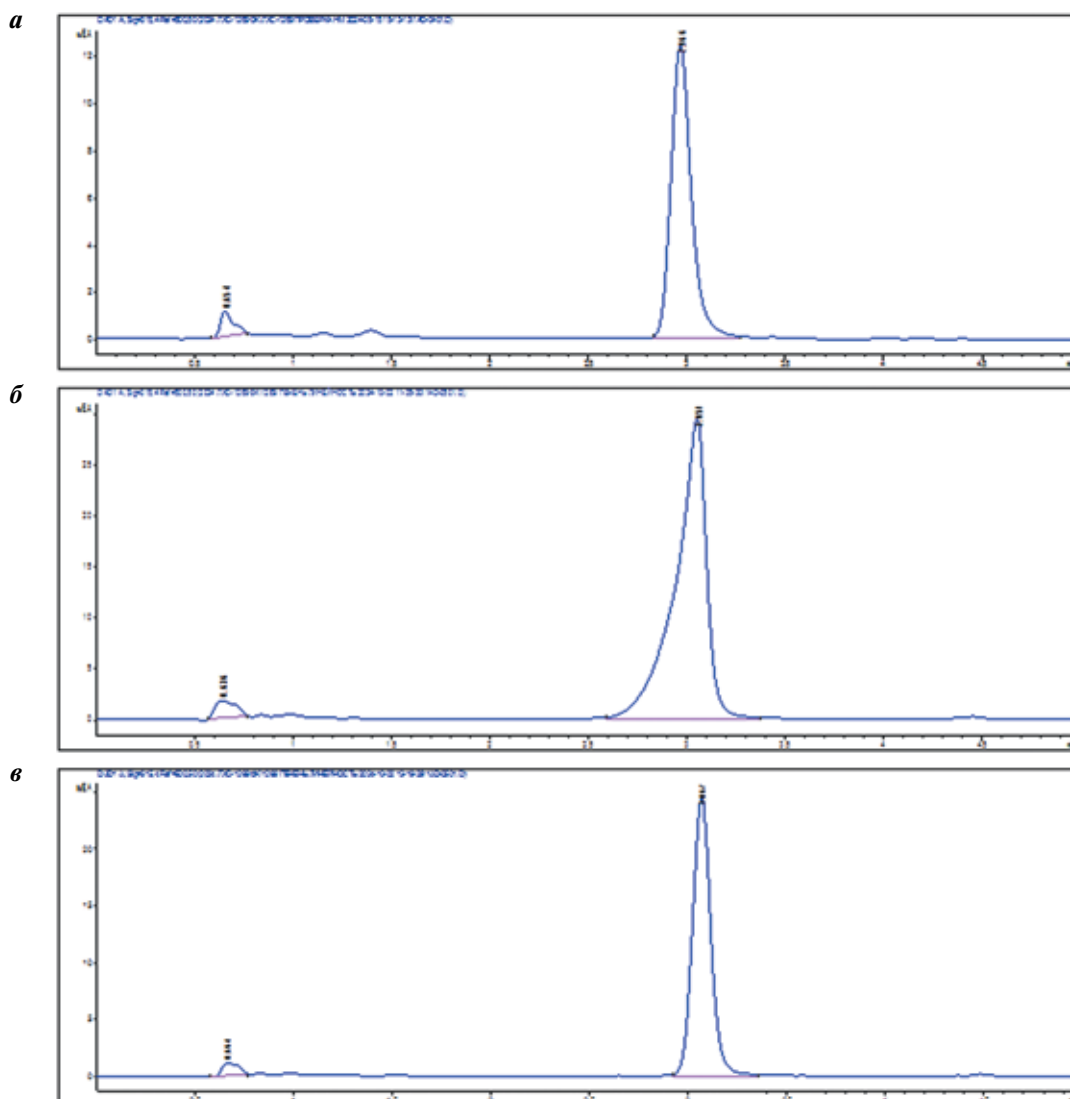


Рис. 2. Хроматограммы биологических образцов, содержащих 10 мкг ЛХС-1269: а — плазма крови; б — печень (объем введения — 10 мкл); в — печень (объем введения — 5 мкл)

Fig. 2. Chromatogram of biological samples, including 10 µg LCS-1269: а — blood plasma; б — liver (injection volume — 10 µl); в — liver (injection volume — 5 µl)

и гомогенизировали на ледяной бане до получения однородной массы. Для приготовления модельной смеси к 400 мкл гомогенизата в центрифужной пробирке прибавляли рассчитанный объем раствора стандартного образца ЛХС-1269 с концентрацией 1000, 100 и 10 мкг/мл, а затем — 300 мкл охлажденного ацетонитрила и 400 мг хлорида натрия. Смесь перемешивали в течение 1 мин на вортексе, прибавляли еще 300 мкл охлажденного ацетонитрила, снова интенсивно перемешивали на вортексе в течение 2 мин, центрифугировали 10 мин при скорости 3500 об/мин и температуре 5 °С и выдерживали в течение 8 ч при температуре 4 °С. Супернатант отделяли и использовали для анализа.

Валидацию биоаналитической методики проводили по следующим параметрам: селективность, эффект

переноса пробы, калибровочная кривая (линейность), нижний предел количественного определения (НПКО), прецизионность, правильность и стабильность.

Селективность разработанной методики определяли при сравнении хроматограмм модельных смесей, содержащих ЛХС-1269 (см. рис. 2, а, в), и холостых образцов плазмы крови и печени. Испытание показало отсутствие влияния содержащихся в пробах веществ на площадь пика ЛХС-1269 (см. рис. 3). Стандартное отклонение (SD) между значениями RT для 6 введений не превышало 0,011, а для площади пика — 2,83. Разрешение между пиком ЛХС-1269 и пиком с RT приблизительно 0,64 мин составило более 3, а симметрия пика не превышала 1,5. Метрологические характеристики воспроизводимости RT и площади пика ЛХС-1269 приведены в табл. 2.

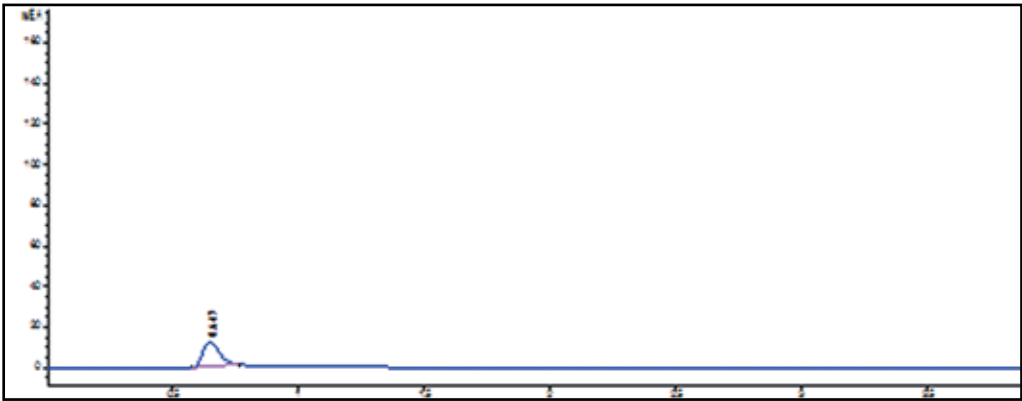


Рис. 3. Хроматограмма холостого образца плазмы крови
Fig. 3. Chromatogram of the blank blood plasma sample

Таблица 2. Метрологические характеристики отклонения времени удерживания и площади пика
Table 2. Metrological characteristics of retention time and peak area deviations

Образец Sample	Время удерживания Retention time	Среднее значение Average value	Стандартное отклонение Standard deviation	Площадь пика Peak area	Среднее значение Average value	Стандартное отклонение Standard deviation
Плазма крови Blood plasma						
1	2,973	2,979	0,011	1105,4	1104,6	2,83
2	2,964			1100,5		
3	2,972			1103,3		
4	2,984			1108,7		
5	2,993			1103,5		
6	2,987			1106,3		
Печень Liver						
1	3,013	3,037	0,016	1548,4	1547,5	2,69
2	3,052			1543,8		
3	3,037			1551,5		
4	3,074			1547,9		
5	3,020			1545,2		
6	3,026			1548,0		

Эффект переноса оценивали в соответствии с «Требованиями к валидации...» при последовательном шестикратном введении холостых образцов плазмы крови или печени после анализа образцов с концентрацией, соответствующей верхнему уровню количественного определения. На хроматограммах холостых образцов отсутствовали пики, по RT соответствующие ЛХС-1269, т. е. перенос сигнала от определяемого вещества в холостой образец отсутствует.

Линейность методики подтверждали графически, анализируя зависимость между площадью пика ЛХС-1269 на хроматограммах модельных смесей и его расчетной концентрацией в анализируемом образце (рис. 4) в диапазоне от 0,5 до 150,0 мкг/мл для плазмы крови и от 0,5 до 150,0 мкг/г для печени. На основе полученных данных рассчитали коэффициенты корреляции (*r*) и значения НПКО (табл. 3). Значения коэффициентов корреляции выше 0,99

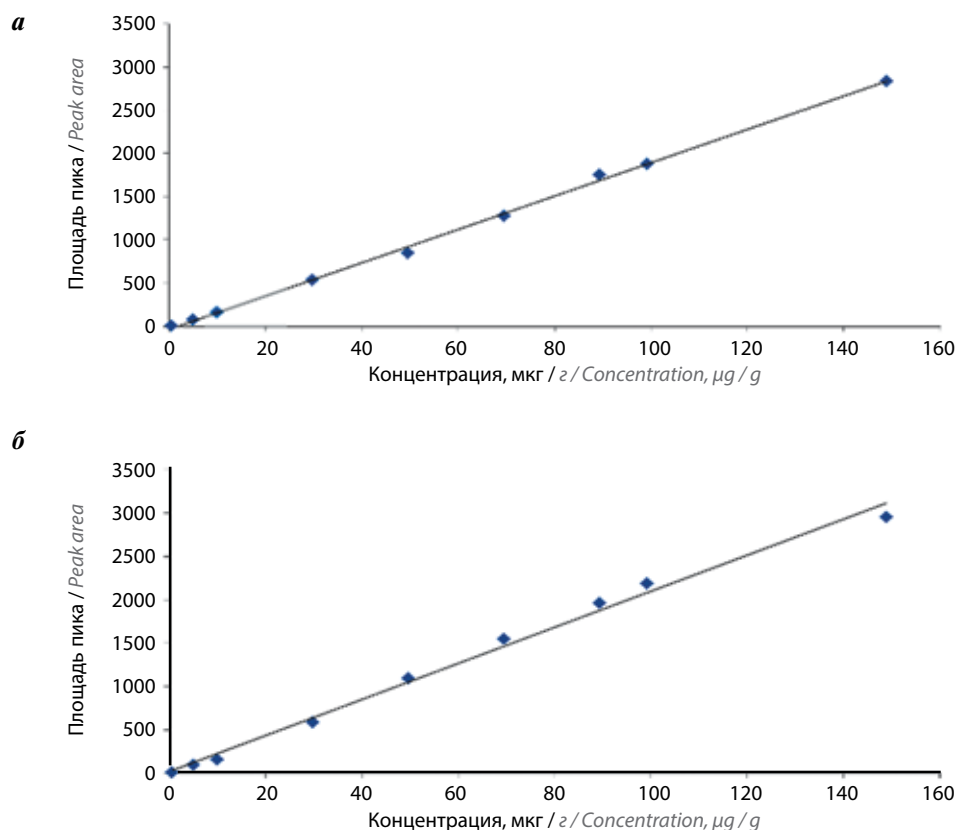


Рис. 4. Зависимость площади пика ЛХС-1269 от его концентрации в образцах плазмы крови (а) и печени (б)

Fig. 4. Dependence of LCS-1269 peak area on its concentration in samples of blood plasma (a) and liver (b)

Таблица 3. Параметры линейной зависимости разработанной методики

Table 3. Parameters of the linear dependence of the developed method

Образец Sample	Уравнение линейной зависимости Linear relationship equation	r	Нижний предел количественного определения Limit of quantitation
Плазма крови Blood plasma	$y = 19,27x - 33,83$	0,9984	0,13 мкг/мл 0.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Печень Liver	$y = 20,82x + 16,49$	0,9931	0,31 мкг/г 0.31 $\mu\text{g}/\text{g}$

указывают на высокую степень соответствия зависимости между величиной аналитического сигнала и содержанием аналита в образце.

В соответствии с «Требованиями к валидации...» оценили прецизионность и правильность разработанной методики. Для этого определили содержание ЛХС-1269 в 5 образцах плазмы крови/печени на каждом из 4 уровней концентрации (НПКО, нижний, средний и не менее 75 % от максимальной). Для каждого уровня определили значения коэффициента вариации и отклика при пересчете по уравнению линейной зависимости. Результаты представлены в табл. 4.

Полученные значения коэффициента вариации указывают на небольшую изменчивость вариацион-

ного ряда: ошибка отклика при пересчете по уравнению линейной зависимости не превышала 15 % для всех уровней, в том числе для НПКО.

Оценку стабильности ЛХС-1269 в анализируемых растворах (после пробоподготовки) и в модельных смесях проводили для нижнего, среднего и верхнего уровней концентраций. Показано, что площадь пика ЛХС-1269 на хроматограммах анализируемых растворов остается неизменной в течение 1 дня хранения при комнатной температуре и уменьшается более чем на 15–20 % от начального значения при хранении в течение 5 дней в холодильной камере при температуре 4 °С. Установлено, что хранение модельных смесей в течение 1 мес при температуре не выше –18 °С

Таблица 4. Результаты испытания методики на прецизионность и правильность
Table 4. The results of the Precision and the Accuracy tests

Плазма крови Blood plasma						Печень Liver					
ЛХС-1269, мкг/мл LCS-1269, µg/ml						ЛХС-1269 мкг/г LCS-1269 µg/g					
Введено Introduce	Найдено Found	Среднее значение Average value	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, %	Отклик, % Response, %	Введено Introduce	Найдено Found	Среднее значение Average value	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, %	Отклик, % Response, %		
0,5	0,39	0,40	3,3	80,0	0,50	0,43	0,44	3,5	88,0		
	0,39					0,47					
	0,39					0,44					
	0,40					0,44					
	0,42					0,44					
29,78	27,30	27,08	2,1	90,9	29,78	27,88	28,09	0,8	94,3		
	27,60					28,24					
	27,06					28,25					
	26,13					28,26					
	27,32					27,83					
69,48	65,25	64,34	2,5	92,6	69,48	73,43	74,19	0,8	106,8		
	66,11					74,66					
	62,58					74,76					
	62,63					74,47					
	65,11					73,61					
99,25	94,19	93,99	3,5	94,7	99,25	105,43	104,41	1,0	105,2		
	97,44					104,91					
	91,81					104,16					
	89,68					104,88					
	96,82					102,65					

не оказывает значительного влияния на площадь пика ЛХС-1269. Подтверждена также стабильность ЛХС-1269 в модельных смесях при их 3-кратном замораживании/размораживании. Таким образом, для получения достоверных результатов анализ следует проводить немедленно после приготовления проб. При отсутствии такой возможности образцы должны быть заморожены.

Заключение

Разработана биоаналитическая методика для количественного определения ЛХС-1269 методом ВЭЖХ-УФ, подобраны оптимальные условия для извлечения ЛХС-1269 из биологических образцов. Валидация методики подтвердила ее соответствие установленным критериям и возможность использования для исследований доклинической фармакокинетики.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. 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 registratsia lekarstvennykh sredstv = Drug Development & Registration 2020;9(4):128–35. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135
2. Zenkov R.G., Ektova L.V., Vlasova O.A. et al. Indolo[2,3-a]carbazoles: diversity, biological properties, application in antitumor therapy. Chemistry of Heterocyclic Compounds 2020;56(6):644–58. DOI: 10.1007/5637
3. Ektova L.V., Eremina V.A., Tikhonova N.I. et al. Synthesis and cytotoxic activity of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione n-glycosides substituted on the maleimide nitrogen atom. Pharmaceutical Chemistry Journal 2020;54(5):455–8. DOI: 10.1007/s11094-020-02222-x
4. Vartanyan A.A., Misurina V.A., Baryshnikova M.A., Shprakh Z.S. 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
5. Kalitin N.N., Ektova L.V., Kostitsa N.S. et al. A novel glycosylated indolocarbazole derivative LCS 1269 effectively inhibits growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo* through driving of both apoptosis and senescence by inducing of DNA damage and modulating of AKT/mTOR/S6K and ERK pathways. Chem Biol Interact 2022;364:110056. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110056
6. 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. Shprakh Z., Budko A., Kozin D. et al. Development and validation of HPLC method for analysis of indolocarbazole derivative LCS-1269. Pharmacia 2021;68(2):421–37. DOI: 10.3897/pharmacia.68.E63457
8. Шпрах З.С., Игнатьева Е.В., Козин Д.А. и др. Сравнительный анализ методов количественного определения производного индолокарбазола ЛХС-1269 в лекарственной форме. Химико-фармацевтический журнал 2024;58(12):45–9. DOI: 10.30906/0023-1134-2024-58-12-45-49 Shprakh Z.S., Ignatyeva E.V., Kozin D.A. et al. Comparative analysis of methods for the quantitative determination of indolocarbazole derivative LCS-1269 in dosage form. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal 2024;58(12):45–9. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2024-58-12-45-49
9. Ingle R.G., Zeng S., Jiang H., Fang W.J. Current developments of bioanalytical sample preparation techniques in pharmaceuticals. J Pharm Anal 2022;12(4):517–29. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.03.001

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории химического синтеза Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» и лично заведующему лабораторией химического синтеза, канд. хим. наук Д.В. Гусеву за предоставленную для исследований субстанцию ЛХС-1269.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to the staff of the chemical synthesis laboratory of the Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology”, Ministry of Health of the Russia, and personally to the head of the chemical synthesis laboratory, PhD D.V. Gusev, for providing LHS-1269 substance for research.

Вклад авторов

Д.А. Козин: разработка дизайна исследования, выполнение экспериментов, анализ полученных данных, написание текста статьи; Н.Ю. Кульбачевская: разработка дизайна исследования, выполнение экспериментов;

В.А. Балыков: выполнение экспериментов, анализ полученных данных;

З.С. Шпрах: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи, редактирование статьи.

Author's contributions

D.A. Kozin: development of research design, performing of experiments, analysis of the obtained data, writing the text of the article;

N.Yu. Kulbachevskaya: development of research design, performing of experiments;

V.A. Balykov: performing experiments, analyzing of the obtained data;

Z.S. Shprakh: development of research design, analysis of the obtained data, writing the text of the article, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.А. Козин / D.A. Kozin: <https://orcid.org/0000-0003-1125-1932>

Н.Ю. Кульбачевская / N.Yu. Kulbachevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4214-3475>

В.А. Балыков / V.A. Balykov: <https://orcid.org/0000-0002-6689-4452>

З.С. Шпрах / Z.S. Shprakh: <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Доклиническая и фармацевтическая разработка оригинального отечественного противоопухолевого лекарственного средства — ингибитора топоизомеразы I — с целью проведения клинических исследований».

Funding. The study has been conducted as part of the applied research funded under State Assignment “Preclinical and pharmaceutical development of the original domestic antitumor drug — topoisomerase I inhibitor — for the clinical trials”.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование одобрено комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (протокол № 06-р-2024 от 17.09.2024).

Compliance with bioethics principles. The study was approved by the Commission on Bioethics of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russia (Protocol No. 06-p-2024 dated 17.09.2024).

Статья поступила: 23.12.2024. Принята к публикации: 30.05.2025. Опубликована онлайн: 27.06.2025.

Article submitted: 23.12.2024. Accepted for publication: 30.05.2025. Published online: 27.06.2025.