

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ**  
**О.О.БОГОМОЛЬЦЯ**  
**ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
**ХІМІЇ ЛІКІВ ТА ЛІКАРСЬКОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ**  
(назва кафедри)

**ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

на тему «Дослідження чистоти діючої речовини оксаліплатину  
(субстанція) методом ВЕРХ»

Виконав: здобувач вищої освіти 3 курсу, групи Б1А  
напряму підготовки (спеціальності)  
226 «Фармація, промислова фармація»  
(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)

Фармацевтичний факультет, заочна форма навчання  
Освітньо-кваліфікаційний рівень «магістр»  
«Фармація»  
(назва освітньої програми)

Денісова Вероніка Валеріївна  
(прізвище та ініціали)

Керівник: проф., д.фарм.н. Вельчинська О.В.  
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: доцент, к.фарм.н. Козіко Н.О.  
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

**Київ – 2023-2024 р.р.**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	9
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ АЛКІЛЮЮЧИХ ПРОТИПУХЛИННИХ ЗАСОБІВ.....	9
1.1. Особливості хімічної будови алкілюючих протипухлинних засобів.....	9
1.2. Біологічна активність алкілюючих протипухлинних засобів.....	13
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ОКСАЛПЛАТИНУ.....	16
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості окспліплатину.....	16
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	28
ВИСНОВКИ.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36
SUMMARY.....	40
ДОДАТОК 1.....	41

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

г – грам

ГМДС – гексаметилдисилоксан

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамід

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мкм – мікромметр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – наномметр

РХ – рідинна хроматографія

см<sup>-1</sup> – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

T. кип. – температура кипіння

T. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР  $^1\text{H}$  – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

°C – градуси Цельсія

DACH – діаміноциклогексан

5-FU/LV – 5-фторурацил/лейковорин

Hal – галоген

J, Гц – значення константи спин-спінової взаємодії, герци

IFL – іронотекан плюс 5-FU/LV

MCRC – метастатичний колоректальний рак

OXPt – Оксаліплатин

## ВСТУП

*Актуальність теми.* Оксаліплатин (Eloxatin, Sanofi-Synthelabo) – це перший протипухлинний лікарський засіб, розроблений на основі Платини. Він був схваленим для лікування колоректального раку, який є основною причиною смертності від раку в світі. Оксаліплатин має номенклатурну систематичну назву за ІЮПАК – (транс-*R,R*-циклогексан-1,2-діамін)оксалатоплатина. Оксаліплатин продемонстрував ефективність у багатьох лініях ракових клітин і пухлинах, включаючи деякі, які в основному резистентні до цисплатину та карбоплатину [1-4]. Оксаліплатин отримав схвалення для лікування метастатичного колоректального раку (MCRC) з 1998 року. Елоксатин використовується у поєднанні з 5-фторурацилом/лейковорином (5-FU/LV). Ця схема лікування відома під назвою FOLFOX. Вона показала перевагу перед стандартним лікуванням IFL (іронотекан плюс 5-FU/LV) [5]. Оксаліплатин є більш ефективним, краще переноситься з чітким подовженням середнього часу виживання пацієнтів. Найпоширенішою токсичністю є нейротоксичність.

На сьогоднішній день досліджується лікувальний ефект Оксаліплатину при раку підшлункової залози та шлунка [6], недрібноклітинного раку легенів і раку молочної залози [7-10]. Оксаліплатин є не лише стандартним варіантом лікування онкологічних захворювань, але використовується для ад'ювантної терапії при повній резекції первинного раку товстої кишки III стадії [8-11].

Однак, залишається питання щодо ефективності Оксаліплатину: чому він ефективний у резистентних до цисплатину та карбоплатину клітинних лініях і пухлинах, чи є можливості покращити протипухлинні властивості оксаліплатину. Дві основні відмінності між цисплатином і карбоплатином та оксаліплатином є очевидними. Оксаліплатин є значно більш ліпофільним, ніж два комплекси діамінплатини (II). Аддукти, які утворені з первинною цільовою ДНК, по-різному обробляються клітинним механізмом.

Ліпофільність оксаліплатину є результатом ліганду циклогексан-1,2-діамін (1,2-діаміноциклогексан) порівняно з цис- і карбоплатином. Це виражається великим об'ємом розподілу, повільнішим виведенням через нирки. Ліпофільні властивості оксаліплатину можуть сприяти відмінностям у загальній токсичності, зміні поглинання клітинами. Діаміновий ліганд та його стереохімічні властивості відіграють важливу роль у цитотоксичному профілі оксаліплатину. Комплекси платини з аміногрупами в транс-положенні мають кращу цитотоксичну та протипухлинну активність, ніж цис-(R,S)-ізомер. Транс-(R,R)-ізомер є потужним протипухлинним препаратом, ніж транс-S,S-конгенер.

Аддукти, утворені з ДНК кінцевої мішені, розпізнаються інакше, ніж адукти цисплатину та карбоплатину [11-13]. Це можна пояснити тим, що утворюється певний тип водневого зв'язку з ДНК та оксаліплатину. Завдяки метиленовим ланкам циклогексанового кільця на ДНК утворюється неполярна ділянка. Ці властивості сприяють різному розпізнаванню, репарації аддуктів, які утворюються між оксаліплатином і ДНК. Ліганд DACH має помітний вплив на фармакологічний профіль та ефективність оксаліплатину в основному цис- та карбоплатинрезистентних пухлинах. Дериватизація за фрагментом транс-R,R-циклогексан-1,2-діаміну призводить до покращення протипухлинні властивості. Перші результати з аналогами 4-метил і 4-етил-транс-циклогексан-1,2-діаміноксалатолатину(II) показали ефективність. Були синтезовані похідні 4-пропіл-, 4-трет-бутил- та 4-фенілу для дослідження взаємозв'язку структура-активність. Найкраща цитотоксичність була досягнута з замісниками метил- та етил-. Однак, є недолік у синтетичних процедурах. Аналоги оксаліплатину були синтезовані як суміші транс-R,R/S,S (1:1) (замісники у положенні 4) в аксіальному або екваторіальному положенні. Чисті рацемічні суміші готуються з великими проблемами. Вони є основою для розділення енантіомерів. Зв'язки структура-активність, отримані з діастереомерних сумішей, не дають чіткої інформації, на відміну від тих, що

отримані з чистими рацематами. Природа замісників, стереохімія в С(4) циклогексанового кільця значною мірою сприяють цитотоксичності. Тому, важливими є два шляхи отримання селективних рацематів (не сумішей) з чотирма ізомерами: 1) синтетичний шлях субстанцій з екваторіальними замісниками у положенні 4 циклогексанового кільця, 2) конструкція циклогексану-1 – похідні 2-діаміну із замісниками з фіксованою конфігурацією [14-20].

Таким чином, Оксалиплатин відноситься до токсичних лікарських речовин. Контроль якості цього препарату повинен проводитися високотехнологічними інструментальними методами, оскільки висока якість цього лікарського засобу є важливою для захисту здоров'я та життя пацієнтів.

Оксалиплатин є поліфункціональною органічною сполукою. Молекула містить фармакофорні угруповання, функціональні групи – аміно групу, гетероцикл, кето групу, циклогексановий фрагмент. Субстанцію Оксалиплатину досліджують хімічними методами та інструментальними методами. Можна передбачити формування у субстанції внутрішньомолекулярних зв'язків за рахунок вільних функціональних груп, особливо – кето та аміно групи, реакцій деградації молекули, елімінування. Можливе утворення побічних продуктів, які знаходяться у реакційній суміші під час синтезу субстанції. Можливе утворення супровідних речовин та неприпустимих домішок, які будуть впливати на якість субстанції. Важливим завданням фармацевтичного аналізу Оксалиплатину є введення у фармацевтичну практику сучасних інструментальних методів, розширення кола методів, які рекомендовано Фармакопеями, для підвищення якості аналізу.

Актуальним завданням є розробка хроматографічних умов при дослідженні субстанції Оксалиплатину методом ВЕРХ, методик пробопідготовки зразків при виконанні досліджень методом ВЕРХ, які дозволять зробити коректні висновки щодо якості досліджуваного зразку.

*Мета і завдання дослідження.* Метою експериментального дослідження є розробка умов хроматографування методом ВЕРХ та методик дослідження зразку субстанції Оксаліплатину, які дозволять зробити висновок щодо її якості.

*Завдання експериментального дослідження:*

- розробити умови хроматографування методом ВЕРХ субстанції Оксаліплатину з метою визначення її чистоти;
- розробити методики хроматографування методом ВЕРХ субстанції Оксаліплатину;
- провести хроматографічні дослідження зразків субстанції Оксаліплатину у порівнянні зі стандартними зразками та інтерпретувати результати досліджень.

*Методи дослідження.* Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором, колонка – INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

*Новизна та значення одержаних результатів.* Новизна експериментального дослідження полягає у розробці умов та методик досліджень методом ВЕРХ субстанції Оксаліплатину з метою підтвердження її якості.

*Апробація результатів дослідження.* Результат досліджень апробовано на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький Фармацевтичний Форум-23», Запоріжжя, 23-24 листопада 2023 року.

*Публікації:* За матеріалами дослідження подані до публікації 1 тези доповіді.

*Структура роботи:* загальну кількість сторінок – 41, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 26.



# РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ АЛКІЛЮЮЧИХ ПРОТИПУХЛИННИХ ЗАСОБІВ

## 1.1. Особливості хімічної будови алкілюючих протиракових засобів

Оксаліплатин має номенклатурну систематичну назву за ІЮПАК – (транс-*R,R*-циклогексан-1,2-діамін)оксалатоплатина. Молекула складається із спряженої ароматичної системи, містить гетероциклічний фрагмент та аліциклічний циклогексановий фрагмент, функціональні групи - кето-, аміно групи. Має основні властивості за рахунок присутності у циклічній системі аміно груп (рис. 1.1.1).

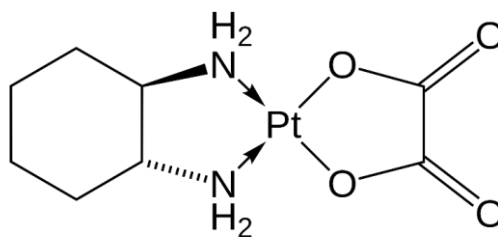
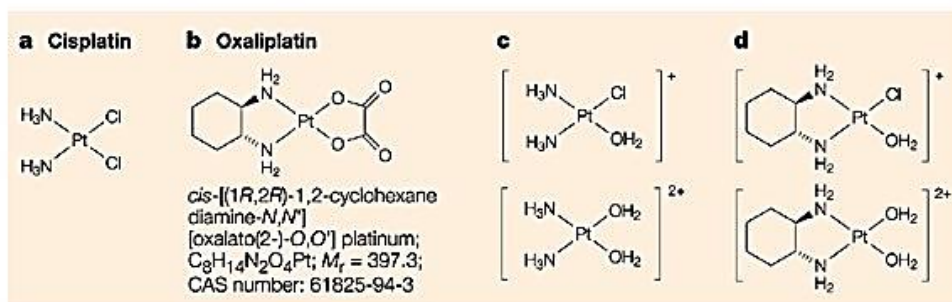


Рисунок 1.1.1. Хімічна формула Оксаліплатину.

Якщо порівнювати хімічну будову Цисплатину та Оксаліплатину, то молекула Оксаліплатину має два цикли – гетероцикл та циклогексан, а Цисплатин містить атоми галогену (Хлору) (рис. 1.1.2)



Nature Reviews | Drug Discovery

Рисунок 1.1.2. Хімічна формула Оксаліплатину та Цисплатину.

Розроблено перше Pt (IV) похідне оксаліплатину, яке має ліганд для TSPO (мітохондріальний транслокаторний білок). Експресія білка-транслокатора в мозку та печінці здорових людей низька на відміну від тканин, які синтезують стероїди.

Новий комплекс Pt (IV), цис,транс,цис-[Pt(етандиоато)Cl{2-(2-(4-(6,8-дихлор-3-(2-(дипропіламіно)-2-оксоетил)імідазо[1,2-а]піридин-2-іл)фенокси)ацетат)-етанолато}(1R,2R-DACH)] та його структура повністю охарактеризована спектроскопічними та спектрометричними методами, досліджена *in vitro* (MCF7) на клітинних лініях карциноми молочної залози, гліобластоми U87, аденокарциноми товстої кишки LoVo.

Досліджували спорідненість до TSPO, поглинання клітинами (більше, ніж у оксаліплатину в ракових клітинах LoVo). Спостерігалось порушення прогресування клітинного циклу.

Одна, нова сполука є менш активна, ніж оксаліплатин, не використовувала синергічний проапоптотичний ефект через присутність ліганду TSPO. Сполука має перспективу в опосередкованому рецептором контексті націлювання ліків на пухлини з надмірною експресією TSPO, зокрема колоректальний рак.

Відкриття протипухлинної активності цисплатину, цис-діаміндіхлоридоплатини було великим успіхом, який відкрив шлях до розробки комплексів платини (II)/(IV) в онкології. Деякі з цих комплексів — карбоплатин і оксаліплатин вже дозволені для використання в клініках (рис. 1.1.3) [18-23].

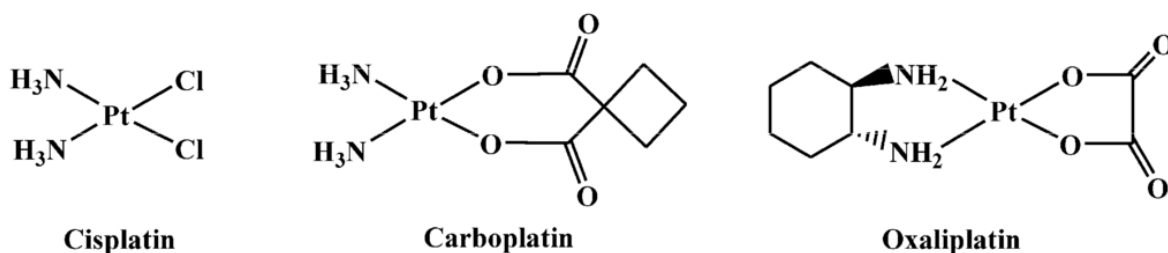


Рисунок 1.1.3. Хімічні формули платиновий комплексів.

Карбоплатин є представником 2-го покоління платинового препарату цис-діамін(1,1-циклобутандикарбоксилато)платини (II). Містить стабільну вихідну групу (1,1-циклобутандикарбоксилато). Модифікація введена для зниження токсичності та зберігання впливу на спектр протипухлинної дії.

Карбоплатин є менш нейро- та нефротоксичним, можна вводити у вищих дозах, ніж цисплатин.

Платиновий препарат 3-го покоління оксаліплатин — транс-1R,2R-діаміноциклогексан(оксалато)платини (II) містить хелатуючий ліганд діаміноциклогексан (1R,2R-DACH). Він отримав міжнародне схвалення для лікування колоректального раку.

Оксаліплатин спричиняє ураження ДНК, як і цисплатин. Однак, спектр його дії відрізняється від спектру дії препарату 1-го покоління. Виникнення резистентності до оксаліплатину відрізняється від резистентності до цисплатину та карбоплатину.

Механізм дії, відповідальний за різну активність оксаліплатину та цисплатину, ще не вивчений. Нерозривний діамін відіграє фундаментальну роль у розпізнаванні адуктів  $\{(DACH)Pt\}$ -ДНК білками. Ці білки відновлюють ДНК.

Ці аддукти можуть сприяти відсутності перехресної резистентності з двома Pt-препаратами цисплатином і карбоплатином. Нейротоксичність є головною дозолімітуючою ознакою, пов'язаною із застосуванням оксаліплатину.

Через низьку розчинність у воді комплекси платини (II) вводять шляхом внутрішньовенної інфузії з низьким комплаєнсом пацієнтів.

Цей недолік можна подолати, замінив їх на препарати на основі платини (IV). Вони відомі як набагато більш стійкі (у порівнянні комплексів Pt (II)) до заміщення у біомолекулах. Вони придатні для перорального застосування.

Сполуки Pt (IV) вважаються про-ліками. Вони повинні бути активовані шляхом внутрішньоклітинного відновлення до своїх аналогів Pt (II). Тому їх структура, замісники, потенціал відновлення комплексів Pt (IV) корелюють з їхньою протипухлинною активністю.

В ряді комплексів Pt (IV) на основі етилендіаміну катодний потенціал для відновлення Pt (IV) до Pt (II) залежить від природи аксіальних лігандів. Він зменшується в порядку Cl > OCOR > OH [20-25].

Аксіальні ліганди представляють спосіб зв'язати біовектори, направляти комплекс до пухлини. Загальна активність не змінюється, оскільки ліганди вивільняються після відновлення з утворенням активного метаболіту Pt (II) [14].

Бензодіазепіновий рецептор (PBR) був перейменований у 18-кДа мітохондріальний транслокаторний білок (TSPO). Використовується як мішень для потенційних ліків із терапевтичним використанням [15,16,17,18].

Експресія TSPO в мозку та печінці здорових людей низька.

В стероїдсинтезуючих та швидко проліферуючих тканинах TSPO є більш потужним і частим.

У кількох патологіях – рак головного мозку, молочної залози, товстої кишки, передміхурової залози, яєчників, в астроцитомах, гепатоцелюлярних і ендометріальних карциномах виявлено надмірну експресію TSPO [19,20].

Нейродегенеративні захворювання – хвороба Альцгеймера та хвороби Паркінсона і Хантінгтона, розсіяний склероз, які пов'язані із запальними процесами, демонструють високі рівні експресії TSPO в активованих мікрогліальних клітинах [21].

Тому, стає зрозумілим, чому TSPO має великої привабливості завдяки використанню його як якої внутрішньоклітинної мішені для візуалізації патологічних тканин при надмірній експресії білка, для вибіркового націлювання на функції, пов'язані з активністю мітохондрій.

Кілька класів лігандів з високою спорідненістю до TSP0 розроблені для діагностичних та терапевтичних цілей. Це – тераностичні агенти.

Каркас 2-фенілімідазо[1,2-а]піридин-N,N-дипропілацетаміду є специфічним для анксиолітичного препарату альпідем. ПЕТ-зображення 18F-мічений агент 2-(2-(4-(2-[18F]фторетокси)феніл)-6,8-дихлороімідазо[1,2-а]піридин-3-іл)-N,N-дипропілацетаміду був розроблений як біомаркер для діагностики нейродеградації, нейрозапалення, пухлинної прогресії.

## 1.2. Біологічна активність алкілюючих протипухлинних засобів

Оксаліплатин — це органічна сполука платини 3-го покоління, схвалена для клінічного застосування. Основною клітинною мішенню Оксаліплатину є ДНК.

Як цисплатин і карбоплатин, Оксаліплатин утворює перехресні зв'язки. Через унікальне показання до колоректального раку, синергетичну взаємодію з фторпіримідинами, особливий профіль токсичності Оксаліплатин відрізняється від цих лікарських засобів.

Численні дослідження вказують на відмінності в транспорті, метаболізмі, платинації ДНК, у відновленні ДНК та трансдукції пошкодження ДНК.

Унікальними властивостями Оксаліплатину є здатність накопичуватися в пухлинних клітинах за допомогою транспортерів органічних катіонів, вбивати мутантні клітини KRAS, активувати імуногенну клітинну смерть.

Дослідження молекулярної фармакології Оксаліплатину допомагають визначити предиктори активності, токсичність препарату для застосування в клінічних умовах (рис. 1.2.1).

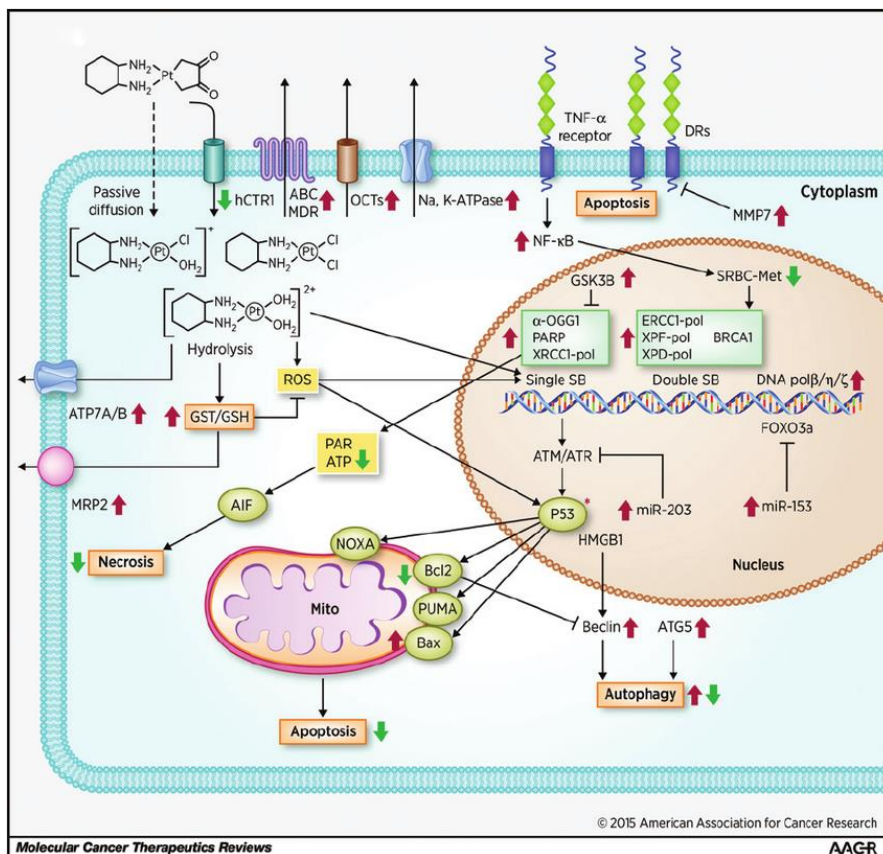


Рисунок 1.2.1. Шляхи впливу Оксаліплатину.

Механізм дії Оксаліплатину наступний: L-ОНР транспортується в клітину носієм розчиненої речовини-переносника Купруму (SLC31A1).

Усередині клітини L-ОНР утворює аддукти з ДНК, з основами гуаніну. Утворює поперечні зв'язки ДНК. Вони індуюють апоптоз клітини. Платина-ДНК-аддукти можуть бути відновлені за допомогою ексцизійної репарації нуклеотидів (NER). Він включає кілька етапів та комплекси ферментів, пігментну ксеродерму, групу комплементатії G (XPG), яка взаємодіє з геліказою TFIIH (шлях утворення ексцизійною репарацією), перехресної комплементатії (ERCC2), пігментної ксеродерми групи В-комплементуючого білка (XPB). При цьому розкручуються пошкоджені ланцюги ДНК. За цим етапом йде етап вирізання пошкодженого фрагмента ДНК. Етап каталізується ендонуклеазним комплексом, утвореним групою перехресної комплементатії ексцизійної репарації (ERCC1) та пігментною ксеродермою, групою F (XPF). Після цього відбувається синтез нового ланцюгу ДНК.

Аддукти платина-ДНК можуть бути відбудовані за допомогою репараційного шляху ексцизії основ (BER). Останній крок включає зв'язування 5 і 3 кінців ДНК за участю рентгенівської репарації, перехресної комплементарності (XRCC1) та ДНК-лігаза III (Lig III). Обидва шляхи ведуть до елімінації аддуктів платини та ДНК. Це пригнічують апоптоз, спричинений пошкодженням ДНК.

L-OHP може бути детоксикований глутатіон-S-трансферазою  $\pi$  1 (GSTP1) у кон'югати L-OHP-тіол. Кон'югати видаляються.

Поліморфізм кодуєчих генів ERCC1, ERCC2, XRCC1 і GSTP1 асоціюється з відповіддю L-OHP. Кілька ферментних комплексів NER та BER також приймають участь у цьому ланцюгу перетворень (рис. 1.2.2).

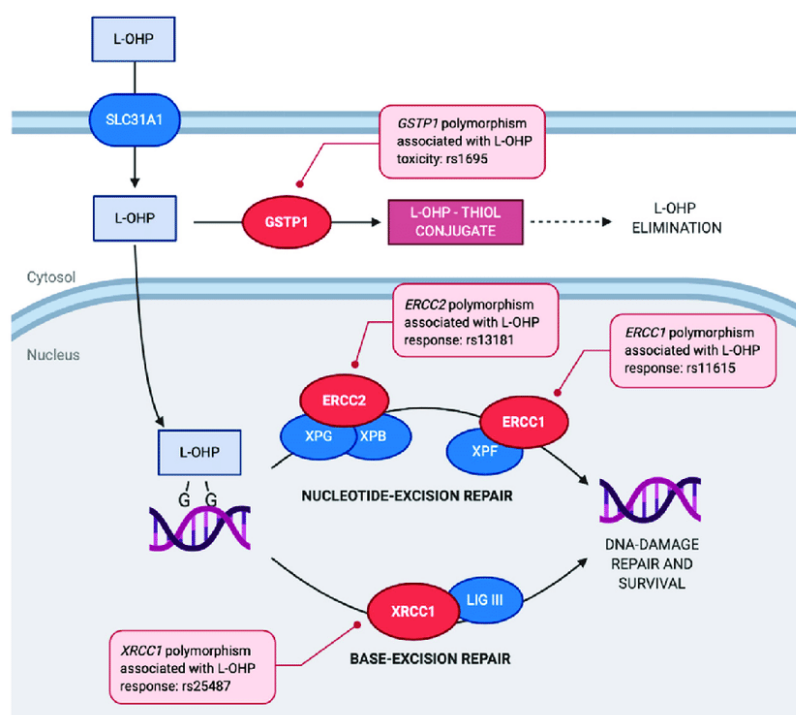


Рисунок 1.2.2. Механізм дії Оксалиплатину.

## РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ОКСАЛІПЛАТИНУ

### 2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості окспліплатину

Оскільки важливим було створення комплексів металів, дія яких була націлена специфічні тканини, синтезувано сполуки платини (II) з лігандами, специфічними для TSPO – 2-[6,8-дихлор-2-(1,3-тіазол-2)-іл]Н-імідазо-[1,2-а]піридин-3-іл]-N,N-дипропілацетамід (TZ6).

Отримана цисплатиноподібна сполука цис-[PtCl<sub>2</sub>(TZ6)] має спорідненість та селективність до TSPO із порівнянною афінністю та селективністю TZ6.

У розчинниках з низькою діелектричною проникністю спостерігали утворення димерного агрегату, який утворився через нековалентні міжмолекулярні взаємодії плоских ароматичних циклів лігандів.

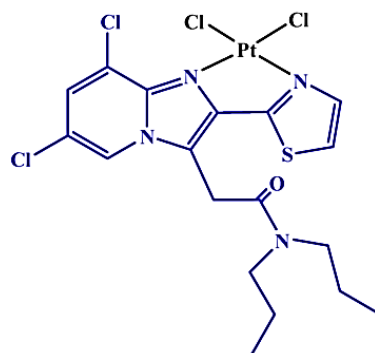
Цей висновок підтверджує потенційну інтеркаляційну здатність цис-[PtCl<sub>2</sub>(TZ6)] до ДНК.

Погана розчинність цис-[PtCl<sub>2</sub>(TZ6)] у воді характерна і для комплексів платини (II) з бідентатними ароматичними лігандами. Це змусило продовжити синтез сполук Pt з лігандами TSPO з підвищеною розчинністю у воді.

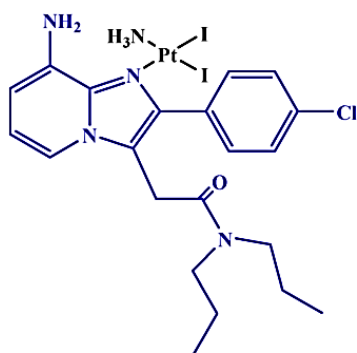
Таким чином, були синтезовані нові сполуки Pt, структурно аналогічні пікоплатину. Вони відрізняються аніонними лігандами, цис-[PtI<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>){[2-(4-хлорфеніл)-8-аміноімідазо[1,2-а]піридин-3-іл]-N,N-ди-н-пропілацетамід}] та цис-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>){[2-(4-хлорфеніл)-8-аміноімідазо[1,2-а]піридин-3-іл]-N,N-ди-н-пропілацетамід}].

Обидва комплекси містили імідазопіридиновий ліганд [2-(4-хлорфеніл)-8-аміноімідазо-[1,2-а]піридин-3-іл]-N,N-ді-н-пропілацетамід, мали високу спорідненість та селективність для ТСПО (рис. 2.1.1).

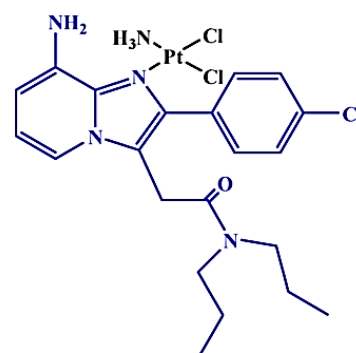




*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(TZ6)]



*cis*-[PtI<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>){[2-(4-chlorophenyl)-8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]-*N,N*-di-*n*-propylacetamide}]



*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>){[2-(4-chlorophenyl)-8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl]-*N,N*-di-*n*-propylacetamide}]

Рисунок 2.1.1. Комплекси платини з TSPO лігандами.

Синтезовані сполуки активно накопичувалися в клітинах гліоми (у 100 разів посилене накопичення), були здатні індукувати апоптоз, як цисплатин.

Розроблено перший комплекс Pt (IV) з лігандом TSPO в аксіальному положенні (є перпендикулярними до квадратно-планарної координаційної площини прекурсора платини (II)).

Розробка комплексу Pt (IV) з лігандом TSPO в аксіальному положенні була проведена, з метою націлювання на ділянку пухлини та потенційним синергетичним проапоптотичним ефектом, який спричинює ліганд TSPO. Він виділяється внутрішньоклітинним відновленням кон'югат Pt(IV).

Похідне оксалиплатину цис,транс,цис-[Pt(етандіоато)-Cl-(2-гідроксіетанолато) (1R,2R-DACH)] було вибрано як попередник Pt (IV).

Вибір цієї монофункціональної Pt (IV) похідної оксалиплатину був зроблений, оскільки вона містить одну реакційноздатну групу (гідроксильний фрагмент 2-гідроксіетанолату). Цим самим можна запобігти утворенню продуктів конденсації (моно- та ди-) у сполученні з біовекторами; наявність аксіального хлориду робить відновлення менш негативним («легше») відновлення з термодинамічного показнику), збільшує швидкість відновлення.

Залишок 2-гідроксіетанолато- діє як спейсер, збільшуючи відстань між кон'югованим лігандом TSPO та Pt-центром. Він забезпечує легшу взаємодію з рецептором (рис. 2.1.2).

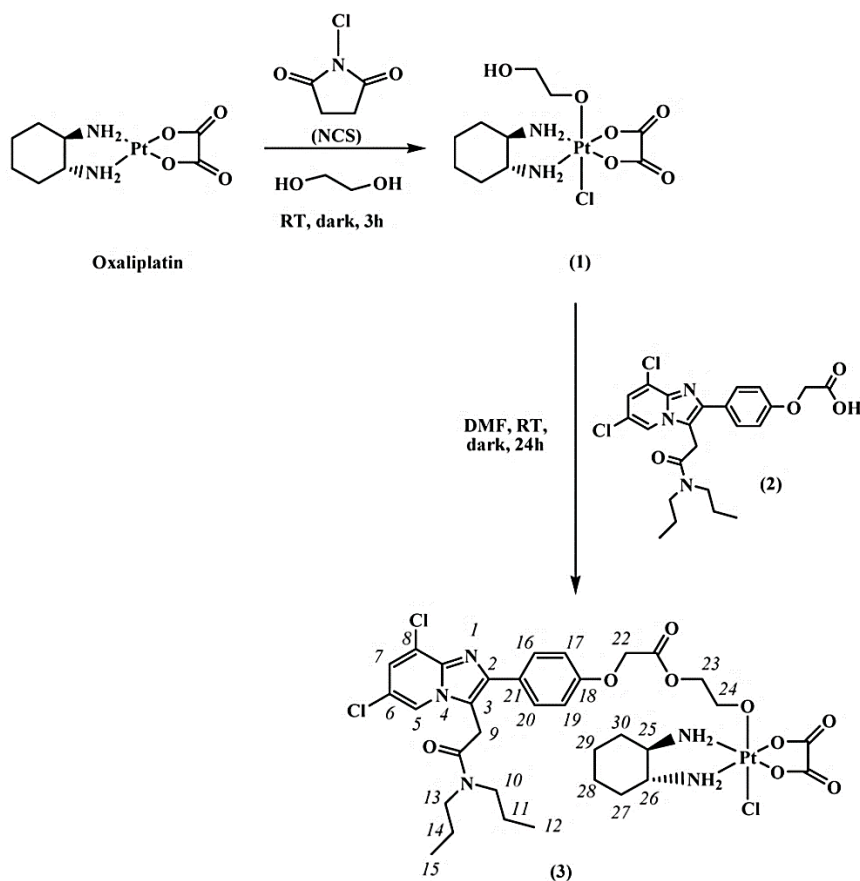


Рисунок 2.1.2. Синтез Pt (IV) похідної оксалиплатину з TSPO лігандом.

Попередник Pt (IV) прив'язаний до потужного ліганду TSPO.

Це характеризується структурою 2-фенілімідазо[1,2-а]-піридинацетаміду, яка містить кінцеву карбоксильну групу, яка дуже корисна для подальшої кон'югації сполуки 2-(4-(6,8-дихлор-3-(2-(дипропіламіно)-2-оксоетил)імідазо[1,2-а]піридин-2-іл)фенокси)оцтової кислоти.

Таким чином, створена нова Pt (IV) похідна оксаліплатину, яка містить ліганд для TSPO, цис,транс,цис-[Pt(етандіоато)-Cl-{2-(2-(4-(6,8-дихлоро-3-(2-(дипропіламіно)-2-оксоетил)імідазо[1,2-а]піридин-2-іл)фенокси)ацетат)-етанолато}(1R,2R-DACH)].

Комплекс Pt (IV) був охарактеризований спектроскопічними та спектрометричними методами, був протестований *in vitro* на клітинних лініях карциноми молочної залози людини MCF7, гліобластоми людини U87, на клітинних ліній аденокарциноми товстої кишки людини LoVo.

Спорідненість цього комплексу до TSPO оцінювали за допомогою аналізу зв'язування з рецепторами, вимірювали здатність заміщати [3H]-1-(2-хлорфеніл)-N-метил-N-(1-метилпропіл)-3-ізохінолінкарбоксамід ([3H]-PK 11195). Проведені експерименти з поглинання клітинами для того, щоб співвіднести цитотоксичність комплексу із здатністю його поглинати клітинами. Проведений аналіз клітинного циклу для оцінки здатності комплексу порушувати прогресування циклу клітин LoVo.

Таким чином, комплекси платини (IV) були ідентифіковані. Знайдено, що вони мають протиракову активність. Це сталося одночасно з відкриттям цисплатину. Клінічна ефективність комплексів була повністю перевірена у клініці.

Властивості комплексів Pt (IV) суттєво відрізняються від властивостей комплексів Pt (II). Оскільки шестикоординатні октаедричні комплекси платини (IV) мають насичену координаційну сферу, вони менш схильні до реакцій заміщення, ніж комплекси платини (II). Можливість координації двох

лігандів в аксіальних положеннях дозволяє налаштовувати хімічні властивості та кон'югацію лігандів, які націлені на рак. Внутрішньоклітинне відновлення до Pt (II) з вивільненням двох аксіальних лігандів є необхідним для того, щоб комплекси Pt (IV) проявили протипухлинну активність.

Комплекси Pt (IV) визначають як про-ліки препаратів на основі платини. Внутрішньоклітинне відновлення комплексів Pt (IV) вивільняє аксіальні ліганди, які можуть бути біологічно активними.

Попередник Pt (IV) дійсно є фармацевтичним агентом подвійної небезпеки. Він поєднує два біологічно активних компоненти в одній молекулі. У створених комплексах Pt (IV) Pt-ядро та аксіальні ліганди можуть мати різні внутрішньоклітинні мішені. Аксіальні ліганди можуть виявляти властивість націлювання на субстрати, які специфічно експресуються в пухлинних клітинах. Тому, був створений комплекс Pt (IV) з лігандом TSPO в аксіальному положенні. Більшість комплексів Pt (IV) отримують шляхом окислення розроблених сполук Pt (II) Хлором або Перекису воднем. Це призводить до комплексів Pt (IV) із симетричними аксіальними лігандами. . Останнім часом були синтезовані несиметричні комплекси Pt (IV).

Для отримання несиметричної Pt (IV) похідної оксаліплатину з одним лігандом TSPO в аксіальному положенні спочатку обробили оксаліплатин N-хлорсукцинімідом (NCS) (джерело «позитивного хлору») в етан-1,2-діол. Отримали асиметричну сполуку.

Окислювальному додаванню до комплексів Pt (II) сприяє координація розчинника, протилежна атакуючому «позитивному хлору». Використовували етан-1,2-діол як розчинник, який координує транс до хлору. Комплекс Pt (IV) вступав у кон'югацію, утворюючи складноєфірний комплекс цис,транс,цис-[Pt(етандіоато)Cl{2-(2-(4-(6,8-дихлор-3-2-(дипропіламіно)-2-оксоетил)імідазо[1,2-а]піридин-2-іл)фенокси)ацетат)етанолато}. Стосовно реакції сполучення, найкращий результат був отриманий при використанні

EDC та HOBT в присутності TEA в DMF. Подібний синтетичний підхід був використаний для кон'югації гліколевого мономера PEG з PLGA.

Синтезовану сполуку характеризували за допомогою елементного аналізу, ESI-MS та ЯМР-спектроскопії. У спектрі ESI-MS був пік при  $m/z = 976,33$ , що відповідає  $[3 + Na]^+$ . Експериментальна ізотопна картина піку добре узгоджується з теоретичною. ЯМР-характеристика сполуки демонструвала розподіл протонів групи метил- 12 і 15 (триплети при 0,82 і 0,87 част./млн.) дипропілацетамідних ланцюгів, які демонструють перехресні піки TOCSY з метиленові протони 11 і 14 (мультиплети при 1,51 і 1,61 м.д.).

Ці сигнали показують перехресні піки TOCSY з двома сигналами, які перекриваються із сигналом розчинника (метилен 10 і 13 при 3,34 і 3,25 ppm). Два синглети при 4,25 і 4,83 ppm були віднесені до метиленових груп 9 і 22 (рис. 2.1.3).

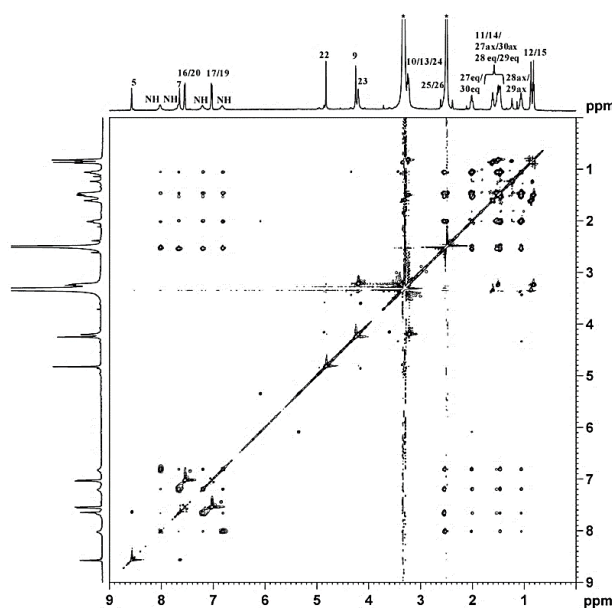


Рисунок 2.1.3. ПМР спектр TOCSY 2D (600 MHz,  $^1H$ ) в  $DMSO-d_6$ .

Це було підтверджено експериментом NOESY 2D ЯМР, який показує крос-пик NOESY між метиленою групою 9 та імідазопіридиновим протоном 5 при 8,57 ppm, додатковий крос-пик NOESY для метилену з протонами 17 і 19 фенокисьного кільця при 7,03 ppm. Протон 7 імідазопіридинового кільця

віднесено до синглету при  $\delta = 7,65$  м.д. Дублет при 7,55 м.д. віднесений до протонів 16 і 20 фенокси кільця. З посиленням на спейсер гідроксиетанолато мультиплет при 4,20 част./млн був сигналом протонів метилену. Сигнал метилену показує перехресний пік TOCSY з мультиплетом при 3,23 част./млн (перекривається із сигналом води). 1R,2R-циклогександіамін знаходиться в конформації крісла, через аксіальну асиметрію Pt-комплексу можливі різні сигнали для аксіальних і для екваторіальних протонів.

Таким чином, мультиплет при 1,06 м.д. був утворений аксіальним протонам, які показали перехресні піки TOCSY з мультиплетом при 1,43–1,50 м.д., 2R-DACH). Мультиплет при 2,01 м.д. (екваторіальний протон) і два сигнали, що перекриваються з розчинником (протони метилену) були ідентифіковані. Усі хімічні зсуви для метиленових і метинових протонів DACH добре узгоджуються з тими, що повідомляються для асиметричних октаедричних комплексів Pt (IV), який містять хлоридний і гліколевий фрагменти в аксіальних положеннях (рис. 2.1.4).

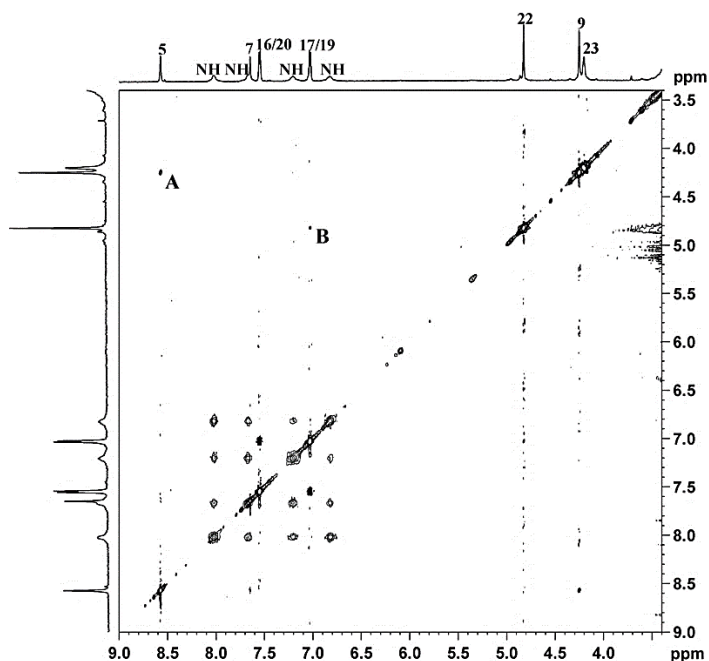


Рисунок 2.1.4.  $^1\text{H}$  та NOESY 2D, NMR спектр (600 MHz,  $^1\text{H}$ ) в  $\text{DMSO-}d_6$ .

Аміногрупи: наявність чотирьох різних сигналів для протонів NH<sub>2</sub> координованого DACH розташовані при 6,83, 7,21, 7,67 і 8,02 ppm (два сигнали спостерігаються для комплексів з рівними аксіальними лігандами).

Спектр 2D ЯМР [1H-195Pt]-HSQC був записаний у ДМСО-d<sub>6</sub>.

Спектр показує чотири перехресні піки при 6,83/887,2, 7,21/887,2, 7,67/887,2 та 8,02/887,2 ppm (1H/ 195Pt) завдяки з'єднанню 195Pt з магнітно нееквівалентними протонами NH<sub>2</sub> DACH. Перехресний пік при 3,23/887,2 ppm – це сигнал зв'язку між 195Pt і CH<sub>2</sub> гліколевого лінкера. Хімічний зсув 195Pt добре узгоджується з даними для асиметричних октаедричних комплексів Pt (IV) з ядром PtClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Віднесення сигналів 13C було здійснено за допомогою 2D ЯМР-спектру [1H-13C]-HSQC. Хімічні зсуви для 1R,2R-DACH і гліколевого лінкера добре узгоджуються з аналогічними комплексами Pt (IV).

Метиленові групи DACH проявляються на 23,5 і 30,1 частках. Повідомляється про утворення продукту етерифікації між ВОС-L-аланіном і цис,транс,цис-[Pt(циклобутан-1,1'-dicarboxylate)Cl(2-hydroxyethanolato) (1R,2R-DACH)] (при 23,5, 30,1 і 30,7 ppm).

Перехресний пік при 2,54/61,5 ppm (1H/13C) був віднесений до метинової групи DACH. Перехресні піки при 3,23/65,5 і 4,20/64,3 ppm (1H/13C) були віднесені до C<sub>24</sub> і C<sub>23</sub> з гліколевий фрагмент (у складноєфірному сполучанні між ВОС-L-аланіном і цис,транс,цис-[Pt(циклобутан-1,1'-дикарбоксилат)Cl(2-гідроксіетанолато)(1R,2R-DACH)]).

Перехресні піки при 122,3 і 123,5 ppm (13C), були віднесені до C<sub>5</sub> і C<sub>7</sub> імідазопіридинового кільця. Перехресні піки при 7,03/114,5 і 7,55/129,0 ppm (1H/13C) були віднесені атомам Карбону 16/20 і 17/19 фенільного кільця. Хімічний зсув 13C метиленових груп становить 28,7 і 64,4 ppm. Дипропілацетамідний ланцюг дає два перехресних піки при 0,82/10,9 і

0,87/10,9 м.д. для двох метильних груп, сигнали при 20,3 і 21,5 м.д., що належать метиленовим групам, два сигнали при 46,9 і 48,9 м.д., що належать до метиленових груп (рис. 2.1.5, 2.1.6).

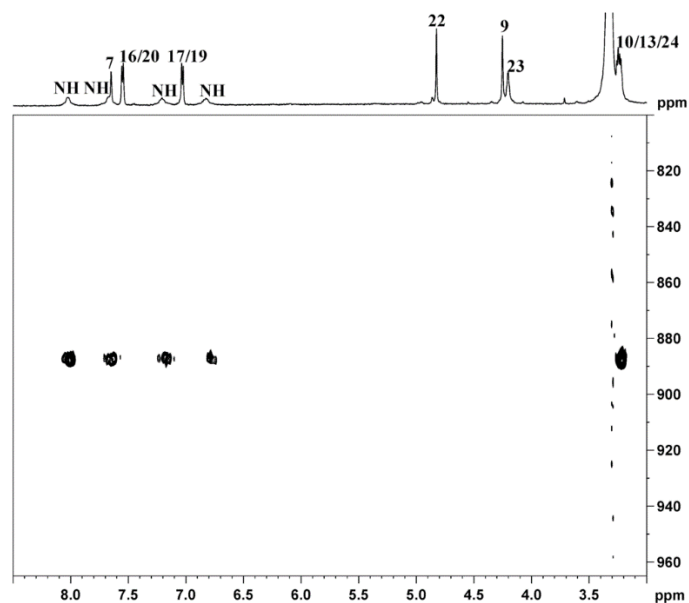


Рисунок 2.1.5.  $[^1\text{H}-^{195}\text{Pt}]$ -HSQC 2D NMR (300 MHz,  $^1\text{H}$ ) в DMSO- $d_6$ .

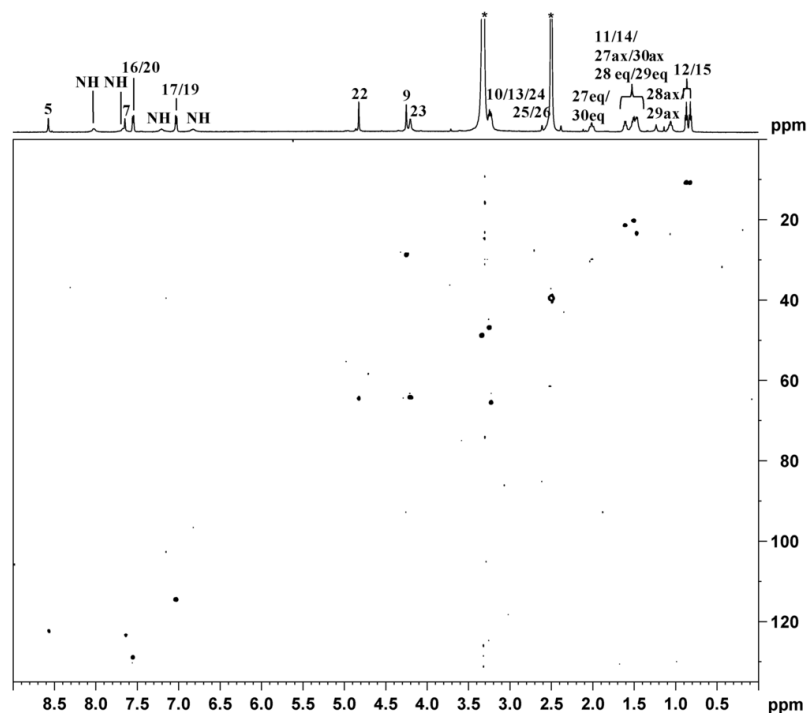


Рисунок 2.1.6.  $^1\text{H}$ ,  $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$  HSQC 2D, NMR (600 MHz,  $^1\text{H}$ ) в DMSO- $d_6$ .

Стабільність комплексів досліджували за допомогою  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопії в DMSO- $d_6$ /D $_2$ O (5:95, об./об.) при рН 7,4 (фосфатний буфер)



при 37 °С. Спектр, отриманий після розчинення, показує лише піки: Н5, 8,11 ppm; Н7, 7,45 ppm; Н16/20, 7,39 ppm. Після 8 годин інкубації спостерігалось зменшення інтенсивності піків і збільшення нового набору піків: Н5, 8,09 ppm; Н7, 7,44 ppm; Н16/20 7,35 ppm, який віднесено шляхом порівняння зі спектром ліганду TSPO. Новий набір сигналів вказує на те, що гідроліз складноєфірного зв'язку з етанолатним лінкером, відбувається у фізіологічних умовах. Спектри, записані через 56 годин, показали зменшення сигналів, які повністю зникли через 108 годин. Період напіврозпаду комплексу на основі ЯМР-експерименту становить 24 години (рис.2.1.7).

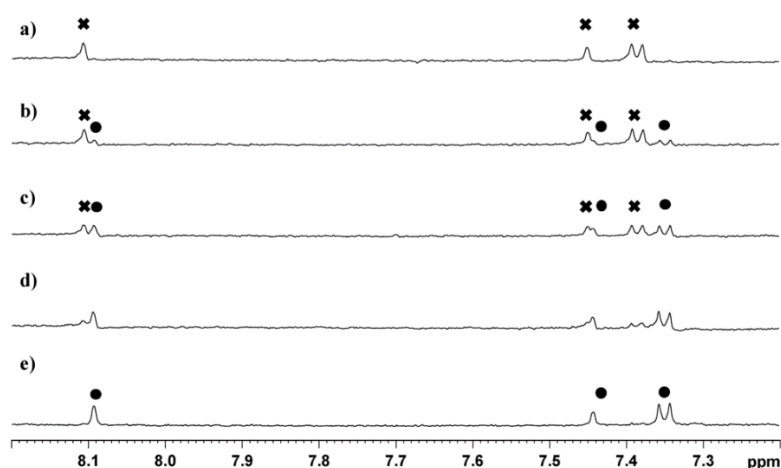


Рисунок 2.1.7.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $^1\text{H}$ ) спектр в DMSO- $d_6$ /D $_2$ O (5:95 v/v), pH 7.4 (2 mM фосфатний буфер) та 37 °С.

Аналіз зразку ВЕРХ проводили після інкубації при 37°С. На хроматограмі видно два піки з часами утримування 8,7 і 21,81 хв, які ідентичні пікам попередника Pt (IV) і вільного ліганду TSPO 2. Дослідження ВЕРХ підтвердило, що комплекс піддається гідролізу складноєфірного зв'язку.

Синтез цис,транс,цис-[Pt(етандиоато)-Cl-{2-(2-(4-(6,8-дихлор-3-(2-(дипропіламіно)-2-оксоетил)імідазо[1,2-а]піридин-2-іл)феноксі)ацетат)-етанолато}(1R,2R-DACH)]. Розчин (37,6 мг, 0,079 ммоль) та 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіміду (EDC, 18 мкл, 0,102 ммоль) у 2 мл сухого ДМФА перемішували при кімнатній температурі. Додавали гідрат 1-

гідроксибензотриазолу (НОВт·Н<sub>2</sub>О, 15,6 мг, 0,102 ммоль), суміш перемішували 10 хвилин. По краплях додавали розчин (38,8 мг, 0,079 ммоль) і триетиламін (ТЕА, 14 мкл, 0,102 ммоль), розчинений у 3 мл сухого ДМФА. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі. Розчинник видаляли випарюванням при тиску. Сполуку очищали прямофазною хроматографією з використанням силікагелю як нерухомої фази та розчину 90:10 хлороформ/метанол як елюент ( $R_f = 0,4$ ). Ан.: розрах. для С<sub>33</sub>Н<sub>42</sub>С<sub>13</sub>Н<sub>5</sub>О<sub>9</sub>Рт·2Н<sub>2</sub>О (3·2Н<sub>2</sub>О): С 40,03; Н 4,68; N 7,07%. Знайдено: С 39,84; Н 4,60; N 6,87%.

<sup>1</sup>Н ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>):  $\delta = 0,82$  (т, 3Н, J = 7,2 Гц, СН<sub>3</sub>, Н<sub>12</sub> або Н<sub>15</sub>), 0,87 (т, 3Н, J = 7,2 Гц, СН<sub>3</sub>, Н<sub>12</sub> або Н<sub>15</sub>), 1,06 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>(ах), Н<sub>28ах</sub>/Н<sub>29ах</sub>), 1,43–1,50 (м, 4Н, СН<sub>2</sub>(ах), СН<sub>2</sub>(еқ), Н<sub>27ах</sub>/Н<sub>30ах</sub>, Н<sub>28ах</sub>/Н<sub>29ах</sub>), 1,51 (м, 4Н, СН<sub>2</sub>, Н<sub>11</sub> або Н<sub>14</sub>), 1,61 (м, 4 Н, СН<sub>2</sub>, Н<sub>11</sub> або Н<sub>14</sub>), 2,01 (м, 2Н, СН<sub>2</sub> (екв.), Н<sub>27еқ</sub>/Н<sub>30еқ</sub>), 2,54 (DMSO-d<sub>6</sub>, 2Н, СН, Н<sub>25</sub>/Н<sub>26</sub>), 3,23 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>, Н<sub>24</sub>), 3,25 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>, Н<sub>10</sub> або Н<sub>13</sub>), 3,34 (перекриття з сигналом води, 2Н, СН<sub>2</sub>, Н<sub>10</sub> або Н<sub>13</sub>), 4,20 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>, Н<sub>23</sub>), 4,25 (с, 2Н, СН<sub>2</sub>, Н<sub>9</sub>), 4,83 (с, 2Н, СН<sub>2</sub>, Н<sub>22</sub>), 6,83 (б, 1Н, NH<sub>2</sub>), 7,03 (д, J = 8,2 Гц, 2Н, СН, Н<sub>17</sub>/Н<sub>19</sub>), 7,21 (б, 1Н, NH<sub>2</sub>), 7,55 (д, J = 8,2 Гц, 2Н, СН, Н<sub>16</sub>/Н<sub>20</sub>), 7,65 (с, 1Н, СН, Н<sub>7</sub>), 7,67 (б, 1Н, NH<sub>2</sub>), 8,02 (б, 1Н, NH<sub>2</sub>), 8,57 (s, 1Н, СН, Н<sub>5</sub>).

Оксаліплатин має номенклатурну систематичну назву за ІЮПАК – (транс-*R,R*-циклогексан-1,2-діамін)оксалатоплатина. Має основні властивості за рахунок присутності у циклічній системі аміно груп (рис. 2.1.8).

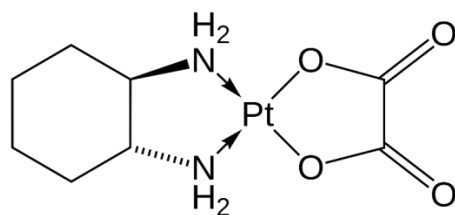


Рисунок 2.1.8. Структура Оксаліплатину.

Якщо розглядати Оксалиплатин як лікарську речовину – субстанцію для проведення фармацевтичного аналізу, то Європейська Фармакопея [26] регламентує аналіз Оксалиплатину субстанції.

Оксалиплатин – це кристалічний порошок білого або майже білого кольору. М.м. 397,3 (безводна речовина).

Оксалиплатин. Чистота 98,0-102,0% (суха речовина). Субстанція мало розчинна у воді *P*, дуже мало розчинна у метанолі *P*, практично не розчинна у етанолі (безводному) *P*.

За Eur.Ph. Оксалиплатин ідентифікують методом абсорбційної ІЧ-спектрофотометрії (2.2.24), відповідністю спектру ФСЗ оксалиплатину, визначенням специфічного оптичного обертання. Домішку D (S,S-енантиомер оксалиплатину) виявляють методом РХ (2.2.29). Тестовий розчин: 30 мг субстанції розчиняють у метанолі *P*, доводять до об'єму 50 мл метанолом *P*.

Рухома фаза: ацетонітрил *P* – аміаку розчин конц. *P* – метанол *P* – метилен хлорид *P* (10 : 20 : 40 : 40, V/V/V/V).

Ідентифікацію супровідних домішок субстанції проводять методом РХ (2.2.29). Для приготування рухомої фази використовують суміш розчинників: етанол *P* – метанол *P* (30 : 70, V/V).

УФ-детектування (імп. D) при 254 нм. Температура 40°C. УФ-детектування (імп. A) при 205 нм. УФ-детектування (імп. B) при 215 нм. УФ-детектування (імп. C) при 210 нм.

Специфіковані домішки – A, B, C, D. Домішка E – оксалатна кислота.

Встановлено ліміти для домішок: Домішка B- 0,15%; Домішка A – 0,15%; Домішка D – 0,15%. Разом домішки (окрім домішки D) – 0,30%.

За Eur.Ph. Rt: Оксалиплатин – 14 хв, домішка D – 16 хв, домішка A – 4,7 хв, домішка B – 4,3 зв, домішка E – 6,4 хв.

### РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Європейська Фармакопея [26] регламентує аналіз Оксаліплатину субстанції.

Оксаліплатин – це кристалічний порошок білого або майже білого кольору. М.м. 397,3 (безводна речовина).

Оксаліплатин. Чистота 98,0-102,0% (суха речовина).

Розчинність: мало розчинна у воді *P*, дуже мало розчинна у метанолі *P*, практично не розчинна у етанолі (безводному) *P*.

Ідентифікація: метод абсорбційної ІЧ-спектрофотометрії (2.2.24), відповідність спектру ФСЗ оксаліплатину, визначення специфічного оптичного обертання.

Домішку D (*S,S*-енантиомер оксаліплатину) виявляють методом РХ (2.2.29). Тестовий розчин: 30 мг субстанції розчиняють у метанолі *P*, доводять до об'єму 50 мл метанолом *P*.

Рухома фаза: ацетонітрил *P* – аміаку розчин конц. *P* –метанол *P* – метилен хлорид *P* (10 : 20 : 40 : 40, V/V/V/V).

В даній роботі дослідження Оксаліплатину субстанції, опираючись на фармакопейні методи, виконується та описується вперше.

Контроль специфікованих та неспецифікованих домішок виконується методом РХ.

Нами проведено хроматографічне дослідження за допомогою методу ВЕРХ субстанції Оксаліплатину з метою розробки та опрацювання умов хроматографування та методик проведення процедур.

#### **Матеріали та методи.**

Для проведення інструментальних досліджень використовували хроматограф Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором; колонка – INERTSIL ODS-3V, 0,25x4,6x5 з температурою – 40°C.

Умови хроматографування:

- час хроматографування – 56 хв;
- потік – 0,3 мл/хв;
- детектування – УФ при 254 нм;
- об'єм інжекції – 20 мкл;
- рухома фаза: етанол *P* – метанол *P* (30 : 70, V/V).

**Або у іншому варіанті:**

-робочі розчини ОХРt (100,0 мкг/мл) готували шляхом розчинення 10,0 мг субстанції в 100 мл води очищеної. Стандартні розчини використовували для приготування зразків калібрувальних кривих.

-рухома фаза: ацетонітрил – мурашина кислота (0,01 М) (10 : 90; V/V);

-швидкість потоку – 1,5 мл/хв;

*Методика приготування випробувального розчину:*

30 мг субстанції розчиняють у метанолі *P*, доводять до об'єму 50 мл метанолом *P*.

*Методика приготування розчину порівняння (а):*

5,0 мг субстанції оксаліплатину (домішка D) ФСЗ розчиняють у метанолі *P*, доводять до об'єму 100,0 мл метанолом *P*.

*Методика приготування розчину порівняння (b):*

15 мл розчину порівняння (а) доводять до 50 мл метанолом *P*.

*Методика приготування розчину порівняння (с):*

75,0 мг субстанції розчиняють у метанолі *P*, доводять до об'єму 100,0 мл метанолом *P*.

*Методика приготування розчину порівняння (d):*

5 мл розчину порівняння (с) доводять до об'єму 100,0 мл метанолом *P*.

Комп'ютерний аналіз за допомогою програми OpenLab CDS.

Для визначення сторонніх домішок методом ВЕРХ використовували реактиви:

- ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ),
- метанол (чистоти для ВЕРХ),
- етанол (чистоти для ВЕРХ).

### Отримані результати.

При дослідженні стандартних зразків Eur.Ph. – розчинів порівняння, розчинів досліджуваного зразку отримано наступні результати (табл. 3.1, 3.2).

Таблиця 3.1. Розчини стандартних речовин.

	Стандарт (a)		Стандарт (b)		Imp.D
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>
	4,143	59,837	4,744	62,047	6,102 5,798 5,999
4,145	61,500	4,839	63,333		
5,101	59,467				
<b>Середнє</b>	<b>4,854</b>	<b>59,268</b>	<b>4,821</b>	<b>62,690</b>	<b>6,076</b>
<b>SD</b>	<b>0,093</b>	<b>1,083</b>	<b>0,070</b>	<b>0,909</b>	
<b>RSD(&lt;2.0%)</b>	<b>0,38%</b>	<b>1,80%</b>	<b>0,30%</b>	<b>1,45%</b>	

*Розчини стандартні:*

*Оксаліплатин, стандарт (a):*

- значення *Rt* знаходиться в інтервалі 4,143-5,101 хв;
- середнє значення *Rt* стандартів знаходиться в інтервалі 4,854 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 59,467-61,500;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 59.268;
- SD *Rt* 0.093;
- SD *Ar* 1.083;
- RSD *Rt* (<2.0%) 0.38%;
- RSD *Ar* (<2.0%) 1.80%;
- RSD *Ar* (<2.0%) 1.45%.

*Оксаліплатин, стандарт (b):*

- значення *Rt* знаходиться в інтервалі 4,744-4,839 хв;
- середнє значення *Rt* стандартів знаходиться в інтервалі 4,821 хв;

- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 62,047-63,333;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 62.690;
- SD Rt 0.070;
- SD Ar 0.909;
- RSD Rt (<2.0%) 0.30%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.45%.

Домішка D:

- значення Rt знаходиться в інтервалі 5,798-6,102 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 6,076 хв (рис. 3.1).

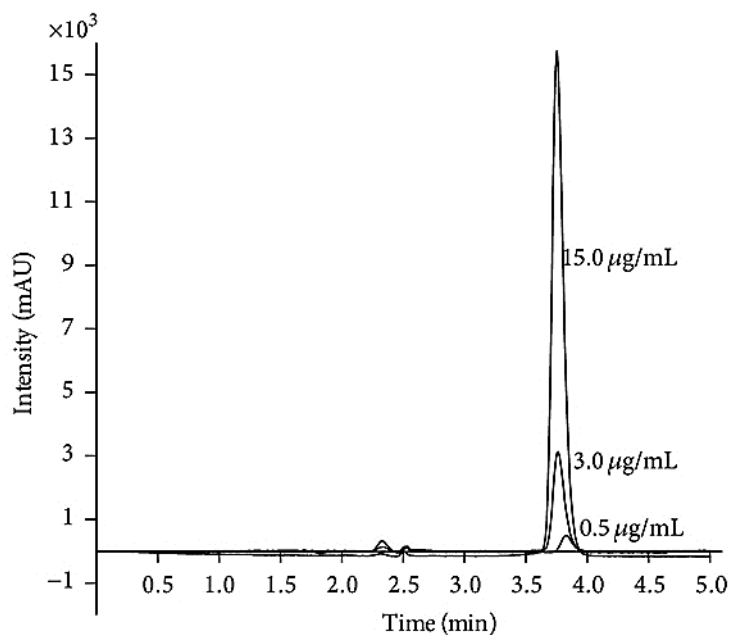


Рисунок 3.1. Хроматограма стандартного зразку: оксаліплатин+домішка D (Rt=3,548 хв).

**Досліджено зразок Оксаліплатину у модифікованих умовах хроматографування:**

- *робочі розчини* ОХРt (100,0 мкг/мл) готували шляхом розчинення 10,0 мг субстанції в 100 мл води очищеної;
- *рухома фаза*: ацетонітрил – мурашина кислота (0,01 М) (10 : 90; V/V);
- *швидкість потоку* – 1,5 мл/хв;

Таблиця 3.2. Розчини досліджуваного зразку.

	Зразок 1		Зразок 2		Imp.D
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>
	1,989	50,837	1,744	61,047	-
2,006	60,500	2,013	62,333		
1,999	58,467				
<b>Середнє</b>	<b>1,996</b>	<b>58,214</b>	<b>1,820</b>	<b>62,221</b>	-
<b>SD</b>	<b>0,093</b>	<b>1,083</b>	<b>0,070</b>	<b>0,909</b>	
<b>RSD(&lt;2.0%)</b>	<b>0,38%</b>	<b>1,80%</b>	<b>0,30%</b>	<b>1,45%</b>	

Розчин зразку :

Оксаліплатин, зразок 1:

- значення Rt знаходиться в інтервалі 1,989-2,006 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 1,996 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 50,837-60,500;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 58.214;
- SD Rt 0.093;
- SD Ar 1.083;
- RSD Rt (<2.0%) 0.38%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.80%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.45%.

Оксаліплатин, зразок 2:

- значення Rt знаходиться в інтервалі 1,744-2,013 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 1,820 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 61,047-62,333;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 62.221;
- SD Rt 0.093;
- SD Ar 1.083;
- RSD Rt (<2.0%) 0.38%;
- RSD Ar (<2.0%) 1.80%;



- RSD Ar (<2.0%) 1.45%.

У досліджуваних зразках 1, 2 є виявлено специфіковану домішку D. Виявлено неприпустимі неідентифіковані домішки: 1 – Rt 1,018 хв; 2 – Rt 1,235 хв, 3 – Rt 11,234 хв.

Таким чином, виявлені Оксаліплатин (Rt 1,998 хв) та неприпустимі домішки: *Домішка 1* (Rt 1,018 хв); *Домішка 2* (Rt 1,235 хв), *Домішка 3* (Rt 11,234 хв).

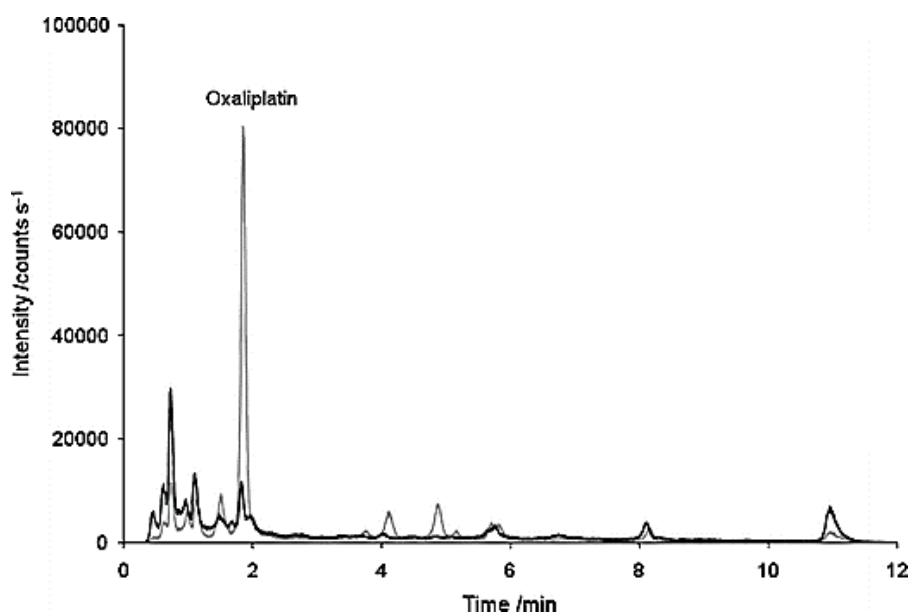


Рисунок 3.2. Хроматограма досліджуваного зразку: Оксаліплатин (Rt 1,998 хв) та неприпустимі домішки: *Домішка 1* (Rt 1,018 хв); *Домішка 2* (Rt 1,235 хв), *Домішка 3* (Rt 11,234 хв).

Оксаліплатин (зміни, що відбулися у хроматографічній картині):

<i>Оксаліплатин, стандарт (а):</i>	<i>Оксаліплатин, зразок:</i>
значення Rt знаходиться в інтервалі <b>4,143-5,101 хв;</b>	значення Rt знаходиться в інтервалі <b>1,989-2,006 хв;</b>
середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі <b>4,854 хв;</b>	середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі <b>1,996 хв;</b>

<p>площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>59,467-61,500;</b></p> <p>середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>59.268;</b></p> <p>SD Rt 0.093;</p> <p>SD Ar 1.083;</p> <p>RSD Rt (&lt;2.0%) 0.38%;</p> <p>RSD Ar (&lt;2.0%) 1.80%;</p> <p>RSD Ar (&lt;2.0%) 1.45%.</p>	<p>площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>50,837-60,500;</b></p> <p>середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>58.214;</b></p> <p>SD Rt 0.093;</p> <p>SD Ar 1.083;</p> <p>RSD Rt (&lt;2.0%) 0.38%;</p> <p>RSD Ar (&lt;2.0%) 1.80%;</p> <p>RSD Ar (&lt;2.0%) 1.45%.</p>
---	---

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено умови хроматографічного дослідження та методики приготування зразків за методом ВЕРХ субстанції Оксаліплатину з метою визначення її чистоти, а саме, запропоновано модифікації: *робочі розчини* ОХРt (100,0 мкг/мл) готували шляхом розчинення 10,0 мг субстанції в 100 мл води очищеної; *рухома фаза*: ацетонітрил – мурашина кислота (0,01 М) (10 : 90; V/V); *швидкість потоку* – 1,5 мл/хв, в результаті чого порівняно хроматограми стандартного та досліджуваного зразків.
2. За допомогою ВЕРХ методу знайдено у складі досліджуваного зразку неприпустимі домішки: *Домішка 1* (Rt 1,018 хв); *Домішка 2* (Rt 1,235 хв), *Домішка 3* (Rt 11,234 хв).
3. Виявлено, що у запропонованих умовах хроматографування за методом ВЕРХ піки Оксаліплатину стандарту (за Eur.Ph.) та зразку мають зсув: значення Rt досліджуваного зразку Оксаліплатину знаходиться в інтервалі 1,989-2,006 хв порівняно із значеннями Rt стандарту Оксаліплатину – у інтервалі 4,143-5,101 хв, що можна пояснити впливом неприпустимих домішок у досліджуваній субстанції.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell* 2018;172:373–86 e10.
2. Kopper O, de Witte CJ, Lohmussaar K, Valle-Inclan JE, Hami N, Kester L, et al. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat Med.* 2019; 25:838–49.
3. Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science* 2019; 364:952–5.
4. Takagi Y, Sakai N, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, et al. High expression of Kruppel-like factor 5 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2020; 111:2078–92.
5. Ruiz de Sabando A, Wang C, He Y, Garcia-Barros M, Kim J, Shroyer KR, et al. ML264, a novel small-molecule compound that potently inhibits growth of colorectal cancer. *Mol Cancer Ther.* 2016; 15:72–83.
6. Dong Z, Yang L, Lai D. KLF5 strengthens drug resistance of ovarian cancer stem-like cells by regulating survivin expression. *Cell Prolif.* 2013;46:425–35.
7. Feng H, Cheng X, Kuang J, Chen L, Yuen S, Shi M, et al. Apatinib-induced protective autophagy and apoptosis through the AKT-mTOR pathway in anaplastic thyroid cancer. *Cell Death Dis.* 2018; 9:1030.
8. Armstrong A, Haque MR, Mirbagheri S, Barlass U, Gilbert DZ, Amin J, et al. Multiplex patient-based drug response assay in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biomedicines.* 2021; 9:705.
9. Xu Z, Zhu C, Chen C, Zong Y, Feng H, Liu D, et al. CCL19 suppresses angiogenesis through promoting miR-206 and inhibiting Met/ERK/Elk-

- 1/HIF-1alpha/VEGF-A pathway in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2018; 9:974.
- 10.Ou B, Sun H, Zhao J, Xu Z, Liu Y, Feng H, et al. Polo-like kinase 3 inhibits glucose metabolism in colorectal cancer by targeting HSP90/STAT3/HK2 signaling. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; 38:426.
- 11.Ou B, Cheng X, Xu Z, Chen C, Shen X, Zhao J, et al. A positive feedback loop of beta-catenin/CCR2 axis promotes regorafenib resistance in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2019; 10:643.
- 12.Ooft SN, Weeber F, Dijkstra KK, McLean CM, Kaing S, van Werkhoven E, et al. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Sci Transl Med.* 2019;11:2574.
- 13.Aboulkheyr EsH, Montazeri L, Aref AR, Vosough M, Baharvand H. Personalized cancer medicine: an organoid approach. *Trends Biotechnol.* 2018; 36:358–71.
- 14.Ganesh K, Basnet H, Kaygusuz Y, Laughney AM, He L, Sharma R, et al. L1CAM defines the regenerative origin of metastasis-initiating cells in colorectal cancer. *Nat Cancer.* 2020; 1:28–45.
- 15.Crespo M, Vilar E, Tsai SY, Chang K, Amin S, Srinivasan T, et al. Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nat Med.* 2017; 23:878–84.
- 16.Yamamoto M, Jin C, Hata T, Yasumizu Y, Zhang Y, Hong D, et al. MUC1-C integrates chromatin remodeling and PARP1 activity in the DNA damage response of triple-negative breast cancer cells. *Cancer Res.* 2019; 79:2031–41.
-

17. Moro H, Hattori N, Nakamura Y, Kimura K, Imai T, Maeda M, et al. Epigenetic priming sensitizes gastric cancer cells to irinotecan and cisplatin by restoring multiple pathways. *Gastric Cancer*. 2020; 23:105–15.
  18. Hsu HY, Lin TY, Hu CH, Shu DTF, Lu MK. Fucoidan upregulates TLR4/CHOP-mediated caspase-3 and PARP activation to enhance cisplatin-induced cytotoxicity in human lung cancer cells. *Cancer Lett*. 2018; 432:112–20.
  19. Zhao C, Li Y, Qiu W, He F, Zhang W, Zhao D, et al. C5a induces A549 cell proliferation of non-small cell lung cancer via GDF15 gene activation mediated by GCN5-dependent KLF5 acetylation. *Oncogene* 2018; 37:4821–37.
  20. Pasch CA, Favreau PF, Yueh AE, Babiarz CP, Gillette AA, Sharick JT, et al. Patient-derived cancer organoid cultures to predict sensitivity to chemotherapy and radiation. *Clin Cancer Res*. 2019; 25:5376–87.
  21. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18:407–18.
- 
22. Kondo J, Inoue M. Application of cancer organoid model for drug screening and personalized therapy. *Cells*. 2019; 8:470.
  23. Rasmussen MH, Lyskjaer I, Jersie-Christensen RR, Tarpgaard LS, Primdal-Bengtson B, Nielsen MM, et al. miR-625-3p regulates oxaliplatin resistance by targeting MAP2K6-p38 signalling in human colorectal adenocarcinoma cells. *Nat Commun*. 2016; 7:12436
  24. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020; 70:7–30.
-

25. Vogel A, Hofheinz RD, Kubicka S, Arnold D. Treatment decisions in metastatic colorectal cancer—Beyond first and second line combination therapies. *Cancer Treat Rev.* 2017; 59:54–60.
26. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 10-th ed., 2019. V.1: 3442-3445.
-

## SUMMARY

**Denisova Veronika**  
**INVESTIGATION OF THE PURITY OF THE ACTIVE INGREDIENT**  
**OXALIPLATIN (SUBSTANCE) BY HPLC**

**The department of medicinal chemistry and toxicology**

**Scientific supervisor: professor, doctor of pharm.sciences Welchinska Olena.**

**Keywords:** Oxaliplatin, antitumour activity, HPLC, admixture.

**Introduction.** Oxaliplatin (Eloxatin, Sanofi-Synthelabo) is the first anticancer drug developed on the basis of Platinum. It has been approved for the treatment of colorectal cancer, which is the leading cause of cancer death in the world. Oxaliplatin has a nomenclature systematic name for IUPAC - (trans-R, R-cyclohexane-1,2-diamine) oxalatoplatinum. Oxaliplatin has demonstrated efficacy in many cancer cell lines and components, including some that are largely resistant to cisplatin and carboplatin. Oxaliplatin belongs to toxic medicinal substances. The quality control of this drug should be carried out by high-tech instrumental methods, since the high quality of this medicinal product is important for protecting the health and life of patients. Oxaliplatin is a multifunctional organic compound. Molecules contain pharmacophore groups, functional groups - amino group, hetero cycle, keto group, cyclohexane fragment. Oxaliplatin substance is investigated by chemical methods and instrumental methods.

**Materials and methods.** Research object are Oxaliplatin substance, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of Oxaliplatin. Methods: HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector), column INERTSIL ODS-3V, 250x4,6x5; computer analysis using the OpenLab CDS program.

**Results.** The conditions of chromatographic research and methods of preparation of samples using the HPLC method of Oxaliplatin substance were developed in order to determine its purity, namely, modifications were proposed: working solutions of OXPt (100.0 µg/ml) were prepared by dissolving 10.0 mg of the substance in 100 ml of water cleaned; mobile phase: acetonitrile - formic acid (0.01 M) (10 : 90; V/V); the flow rate is 1.5 ml/min, as a result of which the chromatograms of the standard and test samples were compared. Using the HPLC method, unacceptable impurities were found in the sample: Impurity 1 (Rt 1.018 min); Impurity 2 (Rt 1.235 min), Impurity 3 (Rt 11.234 min).

**Conclusions.** It was found that under the proposed conditions of chromatography using the HPLC method, the Oxaliplatin peaks of the standard (according to Eur.Ph.) and the sample have a shift: The Rt value of the Oxaliplatin sample is in the range of 1.989-2.006 min compared to the Rt values of the Oxaliplatin standard - in the range of 4.143-5.101 min, which can be explained by the influence of impermeable impurities in the substance under study.



## ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

Вельчинська Олена, *Денісова Вероніка*, Шевченко Мирослава. Розробка методик визначення оптичної густини металовмісних похідних саліцилової кислоти. Тези доповіді. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Запорізький Фармацевтичний Форум-23», Запоріжжя, 23-24 листопада 2023, стор. 22.



FIP Symposium, Digital Event  
«Designing pharmacies towards an accessible, patient-centred and service-oriented model of practice»,  
12.09.2023, The Netherland (Online educational activity). Certificate.

