

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 «Хроматографічні дослідження чистоти цитокіноподібних
пептидів на прикладі субстанції аллоферону»

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)

Зелена Яна Ігорівна

(прізвище та ініціали)

Керівник: к.б.н., ас. Мелешко Р.А.

(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 ПЕПТИДІВ.....	9
1.1. Особливості хімічної будови пептидів.....	9
1.2. Біологічна активність пептидів.....	11
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ АЛОФЕРОНУ.....	18
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості алоферону.....	18
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	21
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	35
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 – мікрометр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – нанометр

РХ – рідинна хроматографія

см⁻¹ – 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 ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

$^{\circ}\text{C}$ – градуси Цельсія

DM – Декстрометорфан

Hal – галоген

Heterocycl– гетероциклічний фрагмент

J, Гц – значення константи спінової взаємодії, герци

NMDA – N-метил-d-аспартату

ВСТУП

Актуальність теми. Боротьба з вірусними захворюваннями людини на протязі розвитку людства збула важливим аспектом виживання нас як біологічного виду.

Віруси викликають захворювання людини, що виникають в процесі їх проникнення в клітини людського організму. Віруси являють собою форму життя, що містить молекули нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) що є носіями генетичної інформації та капсиду з білків, які можуть виконувати як захисну функцію, так мати і певну ферментативну активність. Вірус розмножується в середині клітини, використовуючи її механізми синтезу, в результаті чого клітина втрачає як енергетичний, так і ресурсний потенціал та гине.

Лікування вірусних захворювань людей пов'язане з низкою труднощів: розвиток імунологічної недостатності організму на фоні тривалого збереження збудника в організмі. Потрібно зауважити на формування резистентності вірусного агенту до фармацевтичних препаратів та імунітету людини внаслідок мутацій та рекомбінації у його геномі.

Віруси чинять цитопатичну дію на клітини, використовують їх метаболічні та генетичні ресурси. Це є однією з важливих причин, чому кількість вірусних інфекцій продовжує збільшуватися, не зважаючи на створення все більшої кількості противірусних фармпрепаратів.

З давніх часів було відмічена можливість використання лікувальних властивостей личинок мух сімейства *Calliphoridae* для загоєння та стерилізації ран. Доктором біологічних наук С. І. Чернишем були відкриті алоферони, пептиди, що вироблялися організмом личинок.

Алоферони - сімейство цитокіноподібних пептидів імунної системи комах, здатних специфічно коригувати механізми антивірусного та протипухлинного імунітету людини. Пептиди, що отримувалися з комах були цікаві за декількома властивостями: вони не викликали гострої імунологічної

реакції у організмі людини, проходили відносно правильний процесінг а також гліколіз, характерний для організмів ссавців.

Цитокіноподібний пептид алоферон має виражену антивірусну та протипухлинну активність. То ж, алоферони – відносно нова група антивірусних препаратів природного походження. Алоферон представляє собою лінійний олігопептид, що має молекулярну масу 1265 дальтон та складається L-амінокислот [1-7].

Алоферони, поряд з антивірусною активністю, мають протипухлинну дію, вперше виявлену в дослідках на тваринах з трансплантованими пухлинами. Як алоферон-1 допомагає при вірусній інфекції? Проілюструємо це з прикладу вірусу герпесу. Відомо, що віруси мають імуносупресивну дію. Наприклад, при герпесвірусній інфекції його механізм такий:

У противірусному захисті організму беруть участь:

Чинники неспецифічного захисту, що знищують або блокують віруси:

- макрофаги та інші клітини-продуценти інтерферонів альфа, бета та гама (ІФН- α , - β , - γ),
- ряд інтерлейкінів (ФНП, ІЛ-6 та ін),
- НК-клітини,
- ряд білків плазми крові

Фактори-клітини, що формують специфічну імунну відповідь проти конкретного вірусу (включаючи клітини пам'яті):

цитотоксичні Т-лімфоцити (CD4+ та CD8+ лімфоцити) та В-лімфоцити, відповідальні за продукцію специфічних антитіл, що блокують реплікацію вірусу та блокують «вільні», тобто розташовані поза клітиною, віруси [8-15].

Для адекватного функціонування цих клітин та підтримки противірусної імунної відповіді необхідна відповідна продукція ІФН та ІЛ.

Інтеферон, що виробляється різними клітинами, гальмує транскрипцію вірусного геному в клітині-хазяїні і перешкоджає трансляції вірусної мРНК, що знижує вірусемію і полегшує процес елімінації, а також сприяє адекватній

імунній відповіді на впровадження вірусу в організм. Відомо, що імуносупресію при герпетичній інфекції викликають такі фактори:

- пряма шкідлива дія вірусу на клітини імунної системи (лімфоцити, макрофаги та натуральні кілери (NK));
- пригнічуючий вплив на імунну систему розчинних факторів вірусного або клітинного походження, що вивільняються з інфікованих вірусом клітин;
- зменшення експресії HLA-DR (HLA-DR — білок-індикатор відсутності вірусу в клітині) на ураженій клітині, що призводить до порушення розпізнавання інфікованих клітин цитотоксичними лімфоцитами CD8⁺ (Т-кілерами) та зниження їх активності;
- деякі білки ВПГ блокують активацію системи комплементу з класичного та альтернативного шляхів (імуносупресія неспецифічного захисту)[16-23].

Алоферон 3 – це природний пептид. Він опосередковує передачу сигналів шляхом NF- κ B для посилення розпізнавання вірусних, пухлинних антигенів. Він індукує вироблення ендогенних інтерферонів, які сприяють каскаду захисних реакцій, посилюють експресію рецептора CD25. Цитотоксичні лімфоцити стимулюються алоферонами після розпізнавання невластних або аберантних клітин.

Можна передбачати у складі фармацевтичних композицій алоферону процеси внутрішньомолекулярної взаємодії, утворення водневих , оскільки присутні вільні гідрокси та аміно групи. У процесі синтезу та напрацювання субстанції утворюються побічні продукти реакцій, домішки, присутність яких впливає на якість субстанції. Важливе розширення кола інструментальних методів аналізу субстанції алоферону, окрім тих методів, які рекомендовано Фармакопеями. Тому, актуальним завданням є адаптація та модифікація хроматографічних умов при аналізі методом ВЕРХ, які дозволять виявити незадекларовані АФІ у складі субстанції.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є адаптація та модифікація хроматографічних умов, методик приготування розчинів при аналізі методом ВЕРХ фармацевтичної композиції алоферону для ефективного виявлення незадекларованих АФІ у складі субстанції.

Завдання експериментального дослідження:

- адаптувати умови хроматографування методом ВЕРХ фармацевтичної композиції алоферону субстанції;
- модифікувати умови хроматографування для підвищення ефективності дослідження;
- провести хроматографічне дослідження методом ВЕРХ випробувальних зразків у порівнянні зі стандартними за розробленою методикою та інтерпретувати отримані результати.

Методи дослідження. Високоєфективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором, колонка – ODS Hypersil, 250x4,6x3; комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у адаптації та модифікації умов хроматографування методом ВЕРХ фармацевтичної композиції алоферону, які дозволять підвищити ефективність аналізу.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Запорізький Фармацевтичний Форум-2023», 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 – 32.

SUMMARY

Zelena Yana
CHROMATOGRAPHIC STUDIES OF THE PURITY OF CETOKINE-LIKE PEPTIDES USING THE ALLOFERON SUBSTANCE AS AN EXAMPLE

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: PhD (Biol), as. Meleshko R.A.

Keywords: alloferon, tripeptides, HPLC, pharmaceutical analysis.

Introduction. Alloferon 3 is a natural peptide. It mediates NF- κ B signaling to enhance recognition of viral, hormonal antigens. It induces the production of endogenous interferons, which contribute to the expression of the cascade of protective reactions, strengthen the CD25 receptor. Cytotoxic lymphocytes are stimulated by alloferons after recognition of non-self or aberrant cells. It is possible to predict the processes of intramolecular interaction, the formation of aqueous substances in which free hydroxy and amino groups are present in the pharmaceutical compositions of alloferon. In the process of synthesis and development of the substance, side products of reactions and impurities are felt, the presence of which affects the quality of the substance. In the process of synthesis and development of a substance, side products of reactions, impurities are formed, the presence of which affects the quality of the substance. An important expansion of the range of instrumental methods for the analysis of the alloferon substance, in addition to those methods recommended by the Pharmacopoeia. Therefore, an urgent task is the adaptation and modification of chromatographic conditions during HPLC analysis, which will allow detection of undeclared APIs in the composition of the substance.

Materials and methods. Research object are alloferon substances, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of alloferon. Methods: HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector), column ODS Hypersil, 250x4,6x3; computer analysis using the OpenLab CDS program.

Results. Adapted and modified conditions of chromatographic research using the HPLC method of alloferon substance: selective selection of chromatographic columns - C18, C8 and SN columns with a length of 150 and 250 mm; mobile phase - acetonitrile R - trifluoroacetic acid R - 2M solution of ammonium sulfate R - water R (5 : 0.1 : 10 : 84.9, V/V/V). Techniques for performing HPLC chromatography, methods for preparing test solutions of alloferon substances have been developed: the substances contain alloferon as the main component (97.7% for sample #1 and 97.4% for sample #2).

Conclusions. A chromatographic study by the HPLC method of alloferon was carried out, as a result of which the presence of unidentified impurities was detected (the accompanying impurities arise as a result of incomplete synthesis of peptides: Impurity 1 (Rt=1.674 min), Impurity 2 (Rt=1.769 min), Impurity 3 (Rt= 2.281 min), Impurity 4 (Rt=3.598 min), Impurity 5 (Rt=3.802 min), Impurity 6 (Rt=4.632 min), Impurity 7 (Rt=5.065 min), Impurity 8 (Rt=7.396 min), unidentified impurity (Rt=5.403 min).

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

Вельчинська Олена,

Малюта Наталія,

Зелена Яна, Чала Аліна.

Характеристика лікарських форм ліків із модифікованим вивільненням: фізико-хімічні параметри. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Запорізький Фармацевтичний Форум-2023», 23-24 листопада 2023 року, стор. 23.



FIP Symposium, Digital Event

«Learnings from Policy leaders in Pharmacy around the World»

08.12.2023, The Netherland (Online educational activity). Certificate.

