

**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<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

$^{\circ}\text{C}$  – 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 досліджах 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- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ),
- 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<sup>+</sup> (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- $\kappa$ 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 дозволяють 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.



## ОСНОВНА ЧАСТИНА

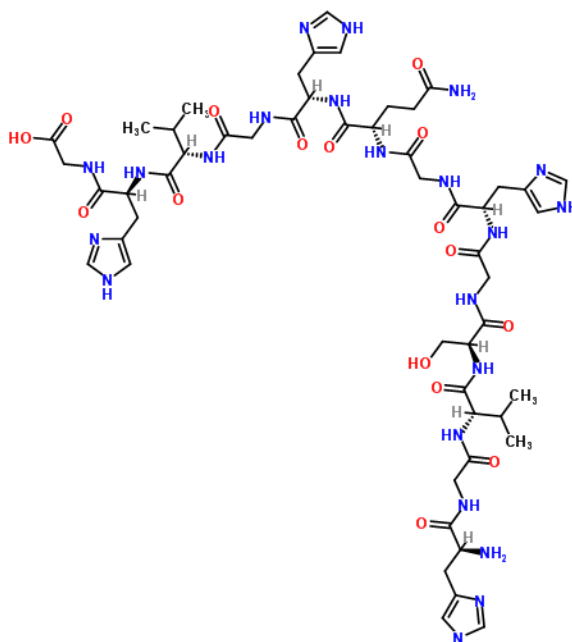
### РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ПЕПТИДІВ

#### 1.1. Особливості хімічної будови пептидів

Алоферон — це тридекапептид (Н-His-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly-ОН), виділений із крові експериментально інфікованих личинок мухи *Calliphora vicina* [24]. Цей пептид виявляє протипухлинну та противірусну активність щодо вірусу грипу, вірусів герпесу та вірусу Коксакі.

Алоферон також індукує синтез інтерферону (ІФН) *in vivo*, що було продемонстровано на моделях тварин і людини. Він також стимулює цитотоксичну активність природних клітин-кілерів (NK). Таким чином, алоферон є важливою лікарською речовиною, яка проявляє себе як потенційний протипухлинний або противірусний препарат [25-31].

Хімічна формула алоферону представлена на рисунку 1.1.1.



1.1.1. Хімічна структура алоферону.

Пряма цитопатогенна дія вірусів на імунокомпетентні клітини полягає в тому, що антигени вірусів індукують поліклональну активацію лімфоцитів і посилюють їх апоптоз, заражені лімфоцити стають мішенями для ЦТЛ, знижується ендогенна продукція ІЛ-2.

Часто рецидивна вірусогерпесна інфекція може супроводжуватися порушенням співвідношення та функціональної активності основних субпопуляцій лімфоцитів, різними дефектами гуморальної ланки імунітету, незавершеністю фагоцитозу.

Є дані про зниження у частини хворих у момент рецидиву рівня та/або активності НК-клітин, продукції кислотолабільного ІФН (зі зниженою противірусною активністю) або пригнічення здатності лейкоцитів до синтезу ІФН.

НК-клітини являють собою популяцію лімфоцитів, що походять з кістково-мозкових попередників. На поверхні НК-клітини є кілінгактивуєчий (КАР) та кілінгінгібіруючий (КІР) рецептори.

Передбачається, що НК дізнаються певні структури високомолекулярних глікопротеїнів, які експресуються на мембрані інфікованих вірусом клітин за допомогою КАР. Збільшення експресії КАР відбувається під впливом цитокінів.

В результаті впізнавання клітини-мішені та зближення з нею натуральні кілери активуються і вміст їх гранул (перфорин) викидається у позаклітинний простір.

Перфорин вбудовується в мембрану клітини-мішені та утворює трансмембранну пору, що призводить до загибелі клітини. НК-клітини здатні лізувати клітини, інфіковані іншими внутрішньоклітинними збудниками, а також деякі пухлинні клітини.

До того ж вони продукують та секретують деякі імунорегуляторні цитокіни (ІФН, ІЛ-1, ІЛ-2, лімфотоксин). Активність НК-клітин не має звичайної імунологічної специфічності, проявляється ще до включення

факторів специфічного імунного захисту та знаходиться під контролем, насамперед ІФН, ІЛ-2,  $\beta$ -ендорфіну та, меншою мірою, вірусних продуктів та імунних комплексів. При герпетичній інфекції порушується здатність НК-клітин розпізнавати на інфікованих вірусом клітинах антигенні структури, що може бути обумовлено їх маскуванням або втратою.

У хворих на герпес знижено продукцію ендogenous інтерферону, активність натуральних кілерів та антитілозалежну клітинну цитотоксичність, знижено абсолютне число та активність Т-лімфоцитів (СД3+ та СД4+ клітин) та нейтрофілів, підвищено кількість імунних комплексів. Виявлені порушення імунітету зберігаються як і фази рецидиву, і у фази ремісії.

## 1.2. Біологічна активність пептидів

Алоферон сприяє:

- індукції синтезу ендogenous інтерферонів;
- активації системи природних кілерів;
- стимуляції розпізнавання та лізису дефектних клітин цитотоксичними лімфоцитами;
- діє у місці розмноження вірусу

Індукція синтезу ендogenous ІФН сприяє:

- формування резистентності інтактних клітин до вірусу;
- активації гуморального та Т-клітинного імунітету;
- стимуляції неспецифічної резистентності організму

Активація системи природних кілерів відбувається в результаті індукції синтезу ендogenous ІФН, який сприяє збільшенню експресії КАР НК-клітин та покращення їх функціонування. Останнє проявляється у вигляді посилення розпізнавання вірусних антигенів та інфікованих клітин натуральними кілерами.

Відбувається інфільтрація вогнища ураження імунокомпетентними клітинами (NK-клітини, нейтрофіли та ін.) та ефективний лізис уражених вірусом клітин.

В даний час алоферон одержують шляхом хімічного синтезу, що значно здешевлює їх виробництво та робить цю групу препаратів доступною для масового споживання у якості лікарських засобів.

Для проведення якісного та кількісного аналізу препаратів на основі алоферону використовують один з найпоширеніших та найбільш точних методів, а саме високоефективну рідинну хроматографію. Завдяки сучасному аналітичному обладнанню та методам обрахунку метод знайшов широке застосування при проведенні аналізу кількісного вмісту діючої речовини так і при дослідженні супровідних домішок.

Останнє особливо важливо, оскільки наявність супровідних домішок може завдати значної та непоправної шкоди організму при використанні фармацевтичних препаратів. Тим більш, при використанні штучно синтезованих олігопептидів. Вважається, що при такому синтезі можуть утворюватися супровідні домішки які у кількості до 4% не будуть наносити значної шкоди організму при терапевтичному застосуванні.

Продовжується пошук нових біологічних властивостей алоферону (N-His-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Gln-His-Gly-Val-His-Gly-OH).

Проведено дослідження зв'язку структура/активність алоферону, синтезованої серії.. Аналоги були модифіковані та являли собою олігопептиди з укороченою пептидною послідовністю.

Біологічні ефекти пептидів оцінювали за проапоптозною дією *in vivo* на гемоцити *Tenebrio molitor* і в кардіотропному тесті *in vitro* на серці *T. molitor*.

У біотестах *in vivo* виявлені нові біологічні дії алоферону та його аналогів. У гемоцитотоксичному біопробі алоферон індукує апоптоз

гемоцитів *T. molitor*. [Phe(p-NH<sub>2</sub>)(1)]-, [Tyr(6)]- та [1-10]-алоферон демонструють більшу активацію каспаз порівняно з алофероном.

Однак алоферон та його аналоги виявляють слабку кардіостимулюючу активність у *Z. atratus*.

Отримані результати свідчать про те, що алоферон виконує плейотропні функції у комах (рис.1.2.1).

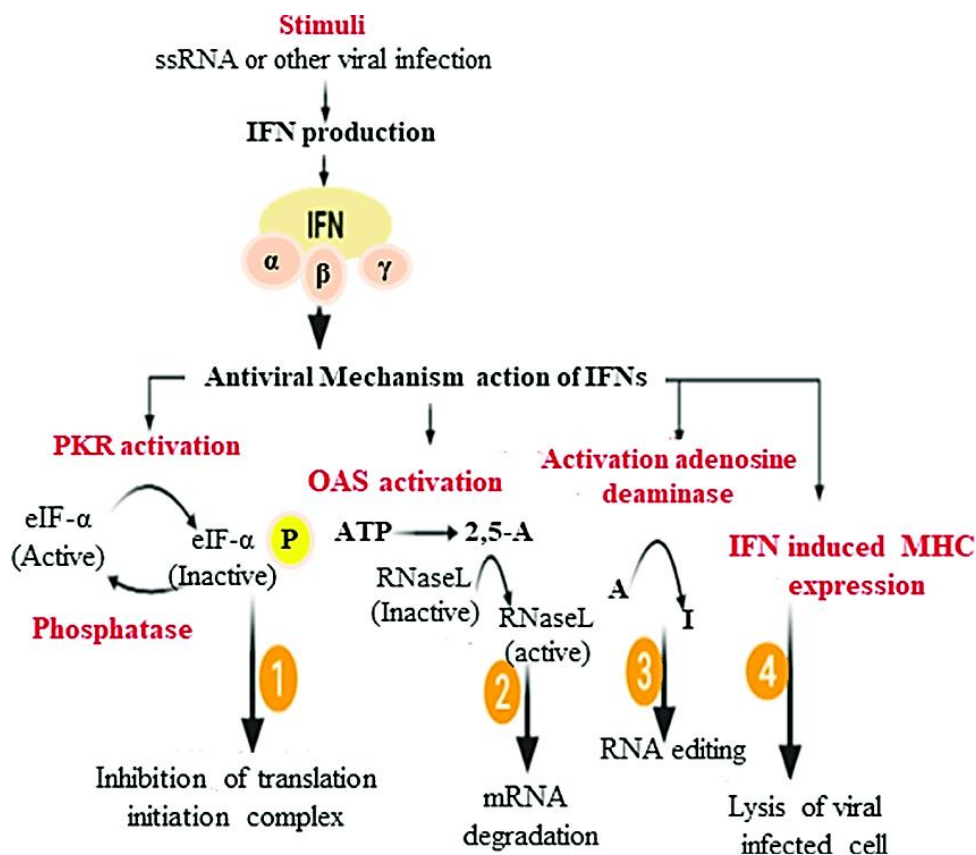


Рисунок 1.2.1. Механізм антивірусної дії.

Досліджувалися імуномодулюючі матеріали природного походження – пептиди ветеринарних та фармацевтичних препаратів, які містять пептиди, що використовувати для лікування імунодефіцитів, інфекцій, онкологічних захворювань.

На сьогодні різноманітні фармацевтичні препарати природного походження, матеріали тварин, включаючи комах, рослинні тканини, які містять ефективність імунної системи, можуть бути стимуляторами.

Описано спосіб отримання клітинного білка, що має активність проти ВІЛ, із CD4-позитивних Т-клітин або мієлоїдних клітин.

Композиція містить екстракт гінкго білоба, який має антибактеріальні та противірусні властивості.

Фармацевтична композиція для стимуляції імунної відповіді організму у якості основного інгредієнта містить антигени головного комплексу гістосумісності. Вони були екстраговані з тканин, сироватки або клітин тварин.

Тканини, клітини або сироватки відбирають з козячої, телячої або свинячої печінки, з еритроцитів великої рогатої худоби.

Фармацевтична композиція з екстрактом рослини *Nigella sativa* рекомендована для лікування раку, уникнення побічних ефектів протиракової хіміотерапії та зміцнення імунних функцій у людей.

Виявлено, що специфічні пептиди мають імуномодулюючі властивості або проявляють імуномодулюючу активність.

Пептиду складається із до 30 амінокислотних залишків і має наступну загальну структурну формулу (1): X<sup>1</sup>-His-Gly-X<sup>2</sup>-His-Gly-Val-X<sup>3</sup> (1), де X<sup>1</sup> відсутній або принаймні один амінокислотний залишок, X<sup>2</sup> являє собою пептидний зв'язок (один амінокислотний залишок), X<sup>3</sup> відсутній або означає один амінокислотний залишок або його фармацевтично прийнятна сіль.

Описано новий клас імуномодулюючих пептидів – «Алоферон», репрезентативні члени яких із крові були виділені з бактерій з личинками комах, мухи *Calliphora vicina* R.-D.

Виявлено, що алоферони мають цитотоксичну протиракову активність, природно стимулюють клітини-кілери тварин і людей.

Експериментальні дані про імуномодулюючу активність алоферонів показують, що цитотоксичну протипухлинну активність лімфоцитів людини і мишей можна стимулювати, використовуючи низькі концентрації.

Мінімальна ефективна концентрація була визначена як 0,0005 нг/мл. Оптимальною виявилася концентрація від 0,05 до 0,5 нг/мл.

Зроблено припущення, що алоферон може бути корисним як противірусний, протимікробний та протипухлинний засіб імуномодулюючої дії (рис. 1.2.2).

Indikator	Interferon	Alloferon
Anzahl der Spender	18	
Anteil des positiv Ansprechens* (wobei die Zielspezifität in Betracht gezogen wird):		
K562	6/18 = 33%	1/18 = 6%
A431	8/18 = 44%	8/18 = 44%
K562 oder A531	10/18 = 56%	9/18 = 50%
Koinzidenz des positives Ansprechens*:		
Interferon- und Alloferon-empfindliche Spender	7/18 = 38%	
Spender selektiv empfindlich für Interferon	4/18 = 22%	
Spender selektiv empfindlich für Alloferon	2/18 = 11%	

Рисунок 1.2.2. Порівняльна характеристика Інтерферону та Алоферону.

Віруси сімейства Coronaviridae поширені в природі через їх існування в широкому спектрі видів ссавців і птахів. РНК-віруси існують як квазі-види через високий рівень мутацій. Проводяться терапевтичні випробування для лікування SARS-CoV2, розглядається можливість лікування алофероном.

Алоферон швидко проникає в кров, де взаємодіє з імунокомпетентними клітинами, після чого виявлення фізичної присутності препарату досить

затруднене через близьку структурну схожість його метаболітів із білками сироватки крові.

Підвищення рівня інтерферону відзначається через 2 години після введення препарату і зберігається на високому рівні (2-2,5 рази вище за звичайний фоновий) протягом 6-8 годин з досягненням вихідних значень до кінця доби. Підвищена функціональна активність природних кілерів спостерігається протягом 7 днів після введення препарату (рис. 1.2.3).

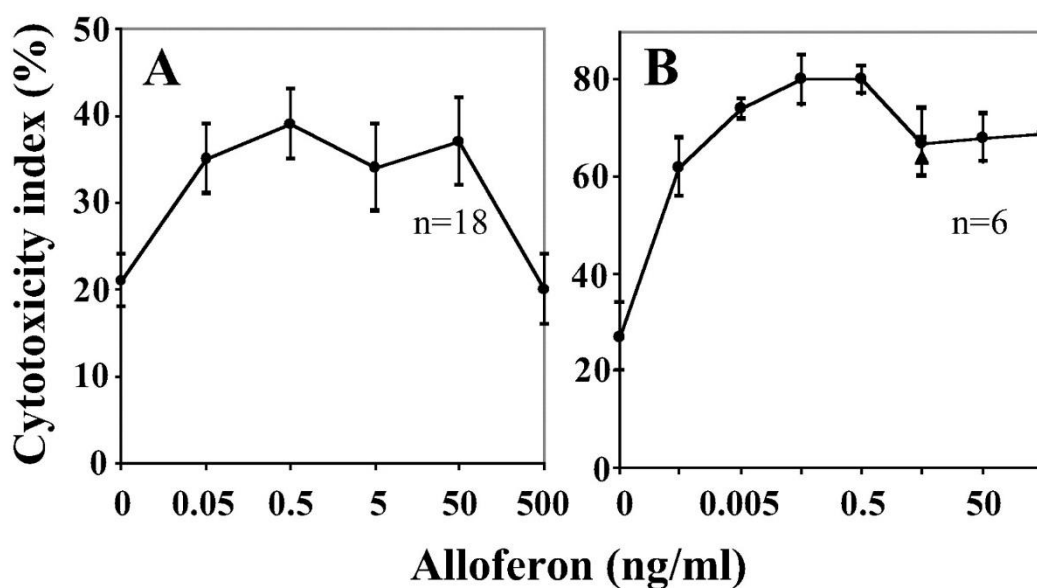


Рисунок 1.2.3. Вплив синтетичного алоферону 1 на активність природних кілерів спленоцитів миші (A) і лімфоцитів людини (B). Лімфоцити людини, спленоцити миші та клітини K562, мічені [3H]уридином, інкубували одночасно за відсутності або в присутності алоферону 1 у різних концентраціях. Індокси цитотоксичності ( $M \pm SE$ ) розраховували для кожної концентрації, на основі 18 або 6 аналізів активності спленоцитів миші або лімфоцитів людини відповідно. Чутливість лімфоцитів людини також порівнювали з відповіддю на IFN- $\alpha$  2b ( $\blacktriangle$ ).

Описано спосіб отримання лікарського засобу на основі олігопептиду алоферону противірусної та імуномодулюючої спрямованості.



Він характеризується приготуванням лікарської композиції, що містить алоферон у концентрації 1 мг/мл (розчинення у середовищі: 0,9% розчин натрію хлориду на основі на легкій воді у фосфатному або ацетатному буфері з рН 6,0-7,5). Композицію попередньо насичують барботуванням нейтрального до алоферону олігопептидів газом до отримання розчину. Його склад при кімнатній температурі має динамічну в'язкість не більше 1,007 мПа·с, загальну щільність 1,0063 г/ см<sup>3</sup>.

Готовий розчин розливають у флакони або ампули при постійній продувці газом.

Спосіб відрізняється тим, що в якості нейтрального до олігопептидів газового середовища використовують аргон або азот.

Препарат на основі олігопептиду алоферону (композиція) з подовженим терміном придатності противірусної та імуномодулюючої спрямованості складається з 0,1% розчину алоферону в 0,9% розчині натрію хлориду (рис.1.2.3).

Behandlung	Konzentration ng/ml	Cytotoxizitätsindex	
		%	% der Kontrolle
Kontrolle	0	27,3 ± 7,3	100
Interferon-α 2b	5	64,3 ± 3,8	236***
Alloferon	0,0005	62,0 ± 6,4	227***
	0,005	73,8 ± 1,7	270***
	0,05	79,8 ± 5,0	292***
	0,5	79,8 ± 2,8	292***
	5	66,8 ± 7,2	245***
	50	68,0 ± 5,3	249***
	500	68,8 ± 4,4	252***

Рисунок 1.2.3. Дослідження нового препарату Алоферону.

## РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ АЛОФЕРОНУ

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

Для проведення аналізу алоферону використовують наступні реактиви та обладнання:

- Засоби вимірювання
- Ваги лабораторні загального призначення 1 класу точності з найбільшою межею зважування 0,001 – згідно з ДСТУ 7270:2012
- Колби мірні місткістю 10 см<sup>3</sup> – згідно з ДСТУ ISO 1042:2005
- Піпетки градуйовані місткістю 1,0 см<sup>3</sup>, 2,0 см<sup>3</sup>, 5,0 см<sup>3</sup>, 10,0 см<sup>3</sup> згідно з ДСТУ EN ISO 835:2008
- Рідинний хроматограф Agilent 1260 Infinity II з UV детектором;
- Рідинний хроматограф Dionex UltiMate 3000 з DAD детектором
- Допоміжні засоби
- Дистилятор – згідно з чинним стандартом
- Стакани скляні лабораторні місткістю 20 см<sup>3</sup>, 50 см<sup>3</sup>, 500 см<sup>3</sup>, 1000 см<sup>3</sup> – згідно з чинним стандартом
- Струшувач лабораторний – згідний з чинним стандартом
- Холодильник побутовий будь-якої марки, який забезпечує температуру від 5°C до 10°C згідно з чинним стандартом
- Віали для ВЕРХ згідно з чинним стандартом
- Реагенти, матеріали
- Ацетонітрил для ВЕРХ - згідно з чинним стандартом
- Вода очищена для ВЕРХ - згідно з чинним стандартом
- Кислота фосфорна о.с.ч. - згідно з чинним стандартом

- Октадецильна колонка для ВЕРХ (С18) розмірами 250x4, 6x5 або аналогічна – згідно з чинним стандартом, або інше аналогічне обладнання та реагенти.

У якості стандарту використовують фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України алоферону

Зображення молекули алоферону (рис. 2.1.1).

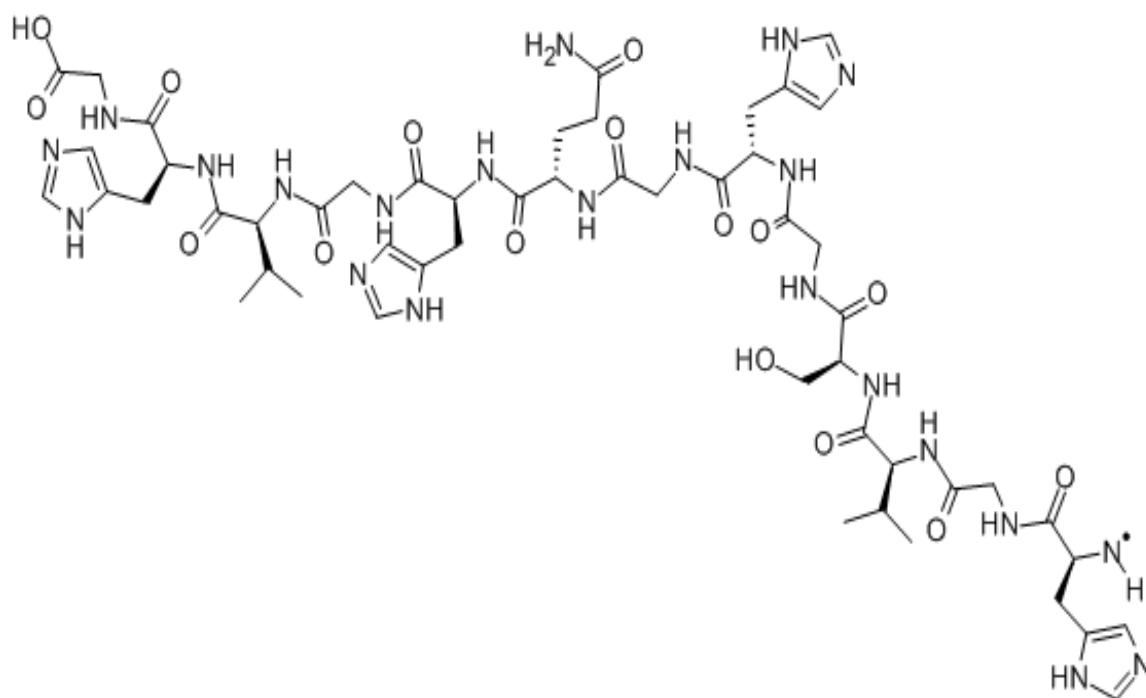


Рисунок 2.1.1. Хімічна формула алоферону.

Якщо розглядати Алоферон як лікарську речовину – субстанцію для проведення фармацевтичного аналізу, то це – кристалічний порошок білого або майже білого кольору. М.м. 1265,3. Відноситься до класу пептидів, молекула складається із залишків амінокислот.

За ДФУ та Європейською Фармакопеею Алоферон не аналізується. Однак Фармакопея США містить монографію щодо фармацевтичного аналізу Алоферону.

Ідентифікацію супровідних домішок субстанції Алоферону проводять методом РХ (2.2.29).

Використовують рухому фазу: ацетонітрил *P* - трифтороцтова кислота *P* -2М розчин амонію сульфату *P* – воду *P* (5 : 0,1 : 10 : 84,9, V/V/V).

Для визначення сторонніх домішок методом ВЕРХ використовують реактиви:

- ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ),
- воду (чистоти для ВЕРХ),
- трифтороцтову кислоту (чистоти для ВЕРХ),
- амонію сульфат розчин (чистоти для ВЕРХ).

На рисунку 2.1.2 представлено мас-спектру 0,001М розчину алоферону у воді. Спостерігається декілька характерних для пептидів іонів. Іон з  $m/z$  1265,5896 – однозарядний іон, іон з  $m/z$  633,2992 є двухзарядним іоном  $[M+2H]^{2+}$  та трьохзарядний іон  $[M+3H]^{3+}$  з  $m/z$  422,5351.

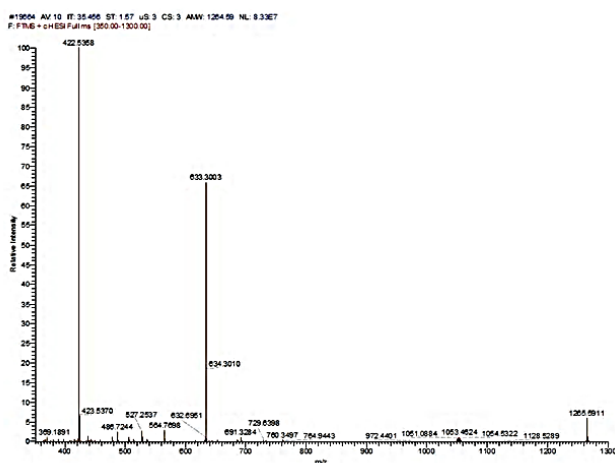


Рисунок 2.1.2. Мас-спектр алоферону.

Спектр комплексу алоферону (рис. 2.1.3) містить сигнал з  $m/z$  443,1731, який відповідає трьохзарядному іону цинкового комплексу  $[M+Zn+H]^{3+}$ , сигнал з  $m/z$  664,2556, який відповідає двухзарядному іону комплексу  $[M+Zn]^{2+}$ .

Обидва сигнали відповідають синтезованому комплексу з брутто формулою  $C_{52}H_{76}N_{22}O_{16}Zn$ .

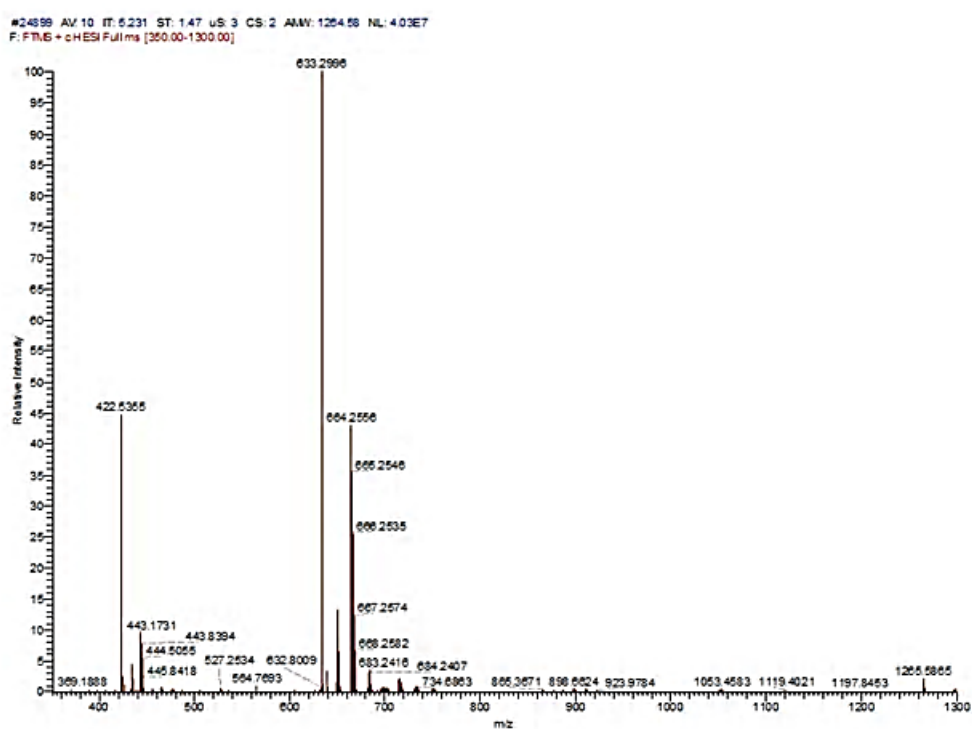


Рисунок 2.1.3. Спектр комплексу алоферону.

### РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Державна Фармакопея України не регламентує [33] аналіз алоферону субстанції. Однак, USP<sub>Ph</sub> містить монографію щодо аналізу алоферону. Крім того, методи контролю якості алоферону описано в патенті UA/13122/01/01 (Germany).

В даній роботі процедура аналізу за методикою контролю якості. Яка описана в зареєстрованому патенті, виконується та описується вперше.

Субстанція алоферону має різну розчинність у органічних та неорганічних розчинниках, у полярних та неполярних розчинах: розчина у ацетонітрилі *P*, у воді *P*.

Чистота. 98.5-101.0% (підтвердження методом ВЕРХ), структура (підтвердження методом ПМР).

Ідентифікація проводиться за методом ІЧ-абсорбційної спектрофотометрії, хроматографічним методом. Порівняння проводиться із стандартом алоферону CRS.

Споріднені сполуки досліджуються методом рідинної хроматографії (РХ). Субстанцію розчиняють у рухомій фазі, яка складається із ацетонітрилу *P* - трифтороцтової кислоти *P* - 2М розчину амонію сульфату *P* – води *P*.

Детектування виконується УФ-спектрофотометрично при 220 нм.

Нами проведено хроматографічне дослідження за допомогою методу ВЕРХ субстанції алоферону з метою адаптації та модифікації умов хроматографування та відповідних методик, а також, виявлення специфікованих та неспецифікованих домішок або неприпустимих речовин.

Для проведення досліджень було отримано субстанцію, що містить у своєму складі алоферон (2 виробника).

## Матеріали та методи.

Для проведення інструментальних досліджень використовували хроматограф Agilent 1260 Infinity II з УФ детектором з колонкою – ODS Hypersil, 250x4,6x3.

Умови хроматографування:

- потік – 1,5 мл/хв
- детектування – УФ при 220 нм
- об'єм інжекції – 20 мкл
- температура колонки – 35°С
- температура зразка – кімнатна

*рухома фаза* – ацетонітрил *P* - трифтороцтова кислота *P* -2М розчин амонію сульфату *P* – воду *P* (5 : 0,1 : 10 : 84,9, V/V/V)

- час хроматографування – 12 хв.

### ***Селективний відбір колонок***

При проведенні аналізу зразків проводився *селективний відбір хроматографічних колонок* для досягнення найбільш якісного розділення піків та для найкращої форми піків.

Застосовувалися:

- C18,
- C8,
- CN колонки з довжиною 150 та 250 мм.

За результатами попередніх досліджень встановлено, що ***найкращі результати отримуються при застосуванні колонки ODS Hypersil (C18) з довжиною 250 мм та діаметром 4,6 мм.***

Також відбиралася співвідношення компонентів рухомої фази для отримання найкращих результатів.

*Методика приготування розчину порівняння:*

Приготування розчину порівняння – розчиняють в рухомій фазі фармакопейний стандартний зразок Державної Фармакопеї України алоферону з концентрацією 1 мг/мл.

*Методика приготування випробувального розчину:*

Приготування випробувального розчину – розчиняють в рухомій фазі субстанцію в концентрації 1 мг/мл алоферону.

*Придатність хроматографічної системи.*

Хроматографічна система вважається придатною тоді, якщо виконуються наступні умови:

- відносне стандартне відхилення, розраховане для площі піку алоферона при 5 заколах стандартного зразка становить не більше 2,0%
- ефективність хроматографічної колонки повинна бути не менше 4000 теоретичних тарілок
- коефіцієнт симетрії основного піку (тейлінг) не має бути більшим 2.0

При проведенні комп'ютерного аналізу використовували програму OpenLab CDS.

Для визначення сторонніх домішок методом ВЕРХ використовували реактиви:

- ацетонітрил (чистоти для ВЕРХ),
- вода (чистоти для ВЕРХ),
- трифтороцтова кислота (чистоти для ВЕРХ),
- амонію сульфат.



### Отримані результати:

При дослідженні стандартних зразків ДФУ, розчинів для ідентифікації та розчинів досліджуваних зразків отримано наступні результати (табл. 3.1-3.5).

Таблиця 3.1. Розчини стандартні.

<i>Стандартний розчин 1</i>				
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>T</i> <i>(≤2.0)</i>	<i>N</i>
	4,043	10715,510	1,1	4115
	4,022	10801,265	1,1	4086
	4,014	10787,913	1,1	4064
	4,011	10793,349	1,1	4043
	4,007	10795,025	1,1	4028
<b>Середнє</b>	<b>4,019</b>	<b>10778,612</b>	<b>1,1</b>	<b>4067</b>
<b>SD</b>	<b>0,014</b>	<b>35,595</b>		
<b>RSD(≤2.0%)</b>	<b>0,36%</b>	<b>0,33%</b>		

*Розчини стандартні:*

*Алоферон, стандарт I:*

- значення  $R_t$  знаходиться в інтервалі 4,007-4,043 хв;
- середнє значення  $R_t$  стандартів знаходиться в інтервалі 4,019 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 10715,510-10801,265;
- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 10778.612;
- SD  $R_t$  0.014;
- SD  $A_r$  35.595;

- RSD Rt (<2.0%) 0.36%;
- RSD Ar (<2.0%) 0.33%.

Таблиця 3.2. Розчин зразку 1.

	<i>Зразок 1</i>									
	<i>Imp 1</i>		<i>Imp 2</i>		<i>Imp 3</i>		<i>Imp 4</i>		<i>Аллоферон</i>	
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>
	1,786	8,374	2,272	33,055	3,003	9,065	3,660	267,730	4,005	9584,547
	1,784	8,940	2,272	32,622	3,003	9,045	3,658	267,999	4,003	9593,609
	1,786	8,586	2,272	32,217	3,004	9,112	3,661	267,811	4,006	9590,673
<b>Середнє</b>	<b>1,785</b>	<b>8,633</b>	<b>2,272</b>	<b>32,631</b>	<b>3,003</b>	<b>9,074</b>	<b>3,660</b>	<b>267,847</b>	<b>4,005</b>	<b>9589,610</b>

Таблиця  
3.3.  
Розчин  
зразку  
1.

	<i>Зразок 1 (продовження)</i>								$\Sigma$ <i>домішок</i>
	<i>Imp 5</i>		<i>Imp 6</i>		<i>Imp 7</i>		<i>Imp 8</i>		
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	
	4,430	55,709	4,822	53,021	5,131	12,971	7,239	140,891	
	4,428	55,971	4,820	53,041	5,130	13,188	7,236	141,170	
	4,431	55,773	4,823	53,149	5,133	13,340	7,237	141,380	
<b>Середнє</b>	<b>4,430</b>	<b>55,818</b>	<b>4,822</b>	<b>53,070</b>	<b>5,131</b>	<b>13,166</b>	<b>7,237</b>	<b>141,147</b>	<b>10170,996</b>

*Розчини зразку:*

*Алоферон, зразок 1:*

- значення Rt знаходиться в інтервалі 4,003-4,006 хв;
- середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі 4,005 хв;
- площа піка на хроматограмі коливається в інтервалі 9584,547-9593,609;

- середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку 9589.610;

Домішка 1 – 1.785 хв

Домішка 2 – 2.272 хв

Домішка 3 – 3.003 хв

Домішка 4 – 3.660 хв

Домішка 5 – 4.430 хв

Домішка 6 – 4.822 хв

Домішка 7 – 5.131 хв

Домішка 8 – 7.237 хв

Σ домішок 10170.996

Таблиця 3.4. Розчин зразку 2.

	<i>Зразок 2</i>								
	<i>Imp 1</i>		<i>Imp 2</i>		<i>Imp 3</i>		<i>Imp 4</i>		<i>Аллофе</i>
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>
	1,761	13,944	2,270	22,488	3,003	9,126	3,659	266,216	4,004
	1,766	12,807	2,270	22,197	3,003	9,252	3,658	266,202	4,003
	1,766	12,800	2,270	22,087	3,003	9,188	3,658	266,015	4,003
<b>Середнє</b>	<b>1,764</b>	<b>13,184</b>	<b>2,270</b>	<b>22,257</b>	<b>3,003</b>	<b>9,189</b>	<b>3,658</b>	<b>266,144</b>	<b>4,003</b>

Таблиця

3.5.

Розчин

зразку 2.

	<i>Зразок 2 (продовження)</i>								Σ
	<i>Imp 5</i>		<i>Imp 6</i>		<i>Imp 7</i>		<i>Imp 8</i>		
	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	<i>RT</i>	<i>Area</i>	
	4,429	55,495	4,821	53,100	5,129	13,308	7,233	139,498	
	4,427	55,419	4,819	53,224	5,127	13,323	7,231	139,700	
	4,427	55,467	4,819	53,464	5,126	13,343	7,230	140,022	
<b>Середнє</b>	<b>4,428</b>	<b>55,460</b>	<b>4,820</b>	<b>53,263</b>	<b>5,127</b>	<b>13,325</b>	<b>7,231</b>	<b>139,740</b>	<b>10119,460</b>

### Зразки хроматограм (рис. 3.1-3.3):

#### Стандартний зразок

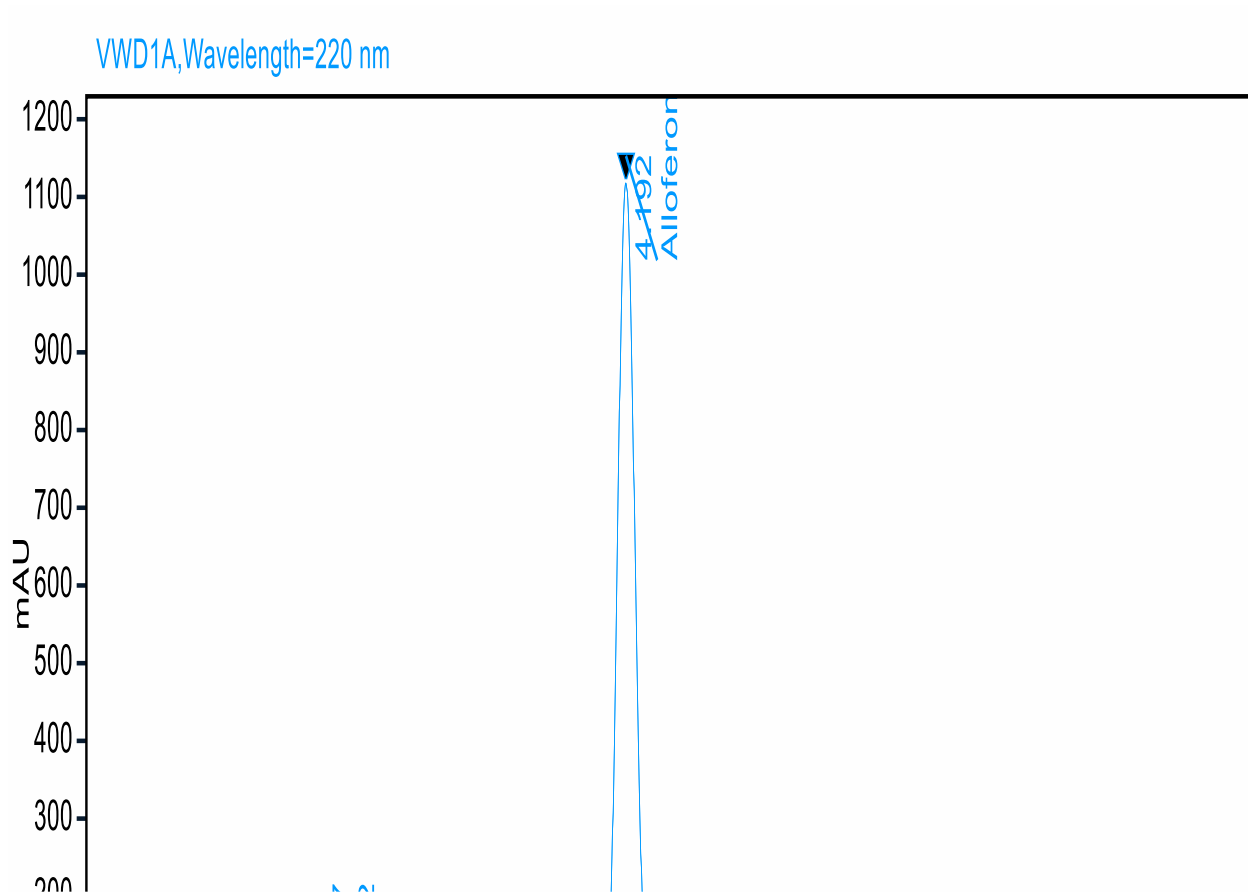


Рисунок 3.1. Хроматограма стандартного зразку алоферону ( $R_t=4,192$  хв), ідентифікованої домішки: Домішка 1 ( $R_t=1,676$  хв), Домішка 2 ( $R_t=1,807$  хв), Домішка 3 ( $R_t=2,366$  хв), Домішка 6 ( $R_t=4,716$  хв), Домішка 7 ( $R_t=5,273$  хв), неідентифікована домішка ( $R_t=9,166$  хв).

## Випробувальний зразок 1

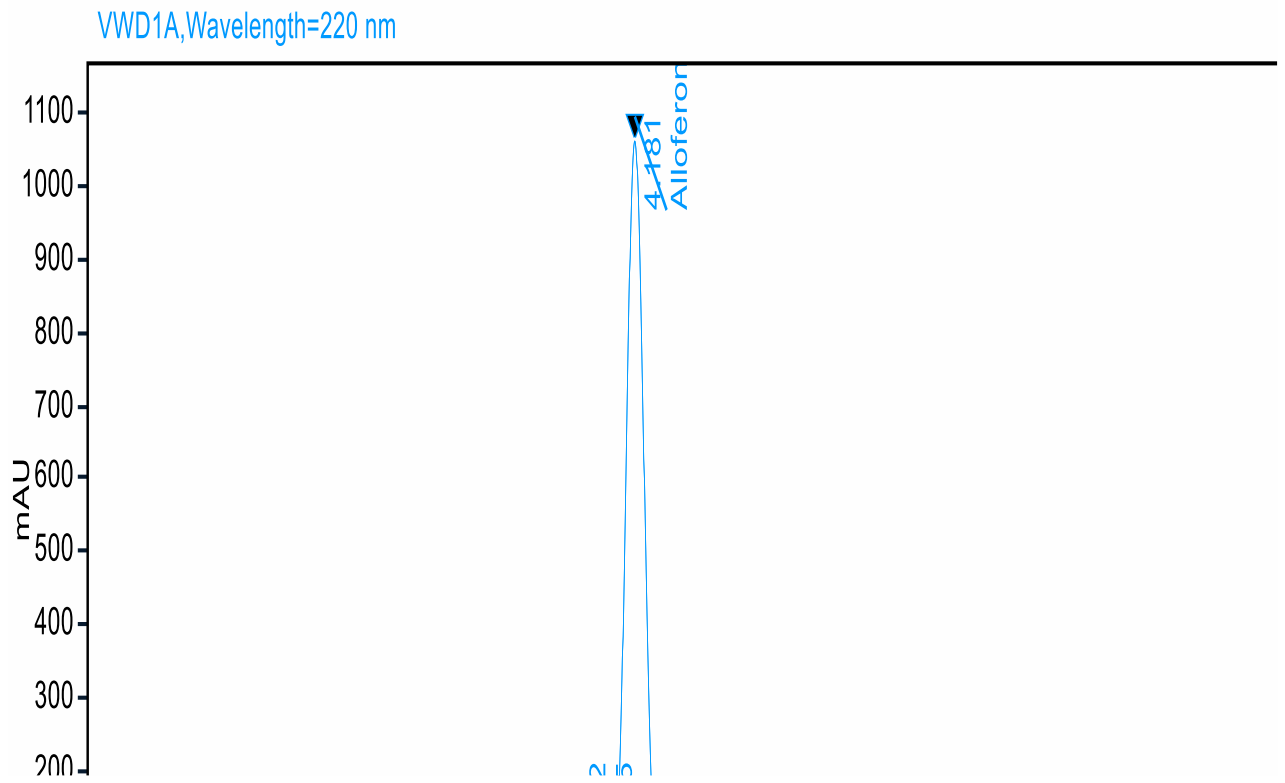


Рисунок 3.2. Хроматограма зразку (1) алоферону ( $R_t=4,181$  хв), ідентифікованої домішки: Домішка 1 ( $R_t=1,674$  хв), Домішка 2 ( $R_t=1,769$  хв), Домішка 3 ( $R_t=2,281$  хв), Домішка 4 ( $R_t=3,598$  хв), Домішка 5 ( $R_t=3,802$  хв), Домішка 6 ( $R_t=4,632$  хв), Домішка 7 ( $R_t=5,065$  хв), Домішка 8 ( $R_t=7,396$  хв), неідентифіковану домішку ( $R_t=5,403$  хв).

## Випробувальний зразок 2

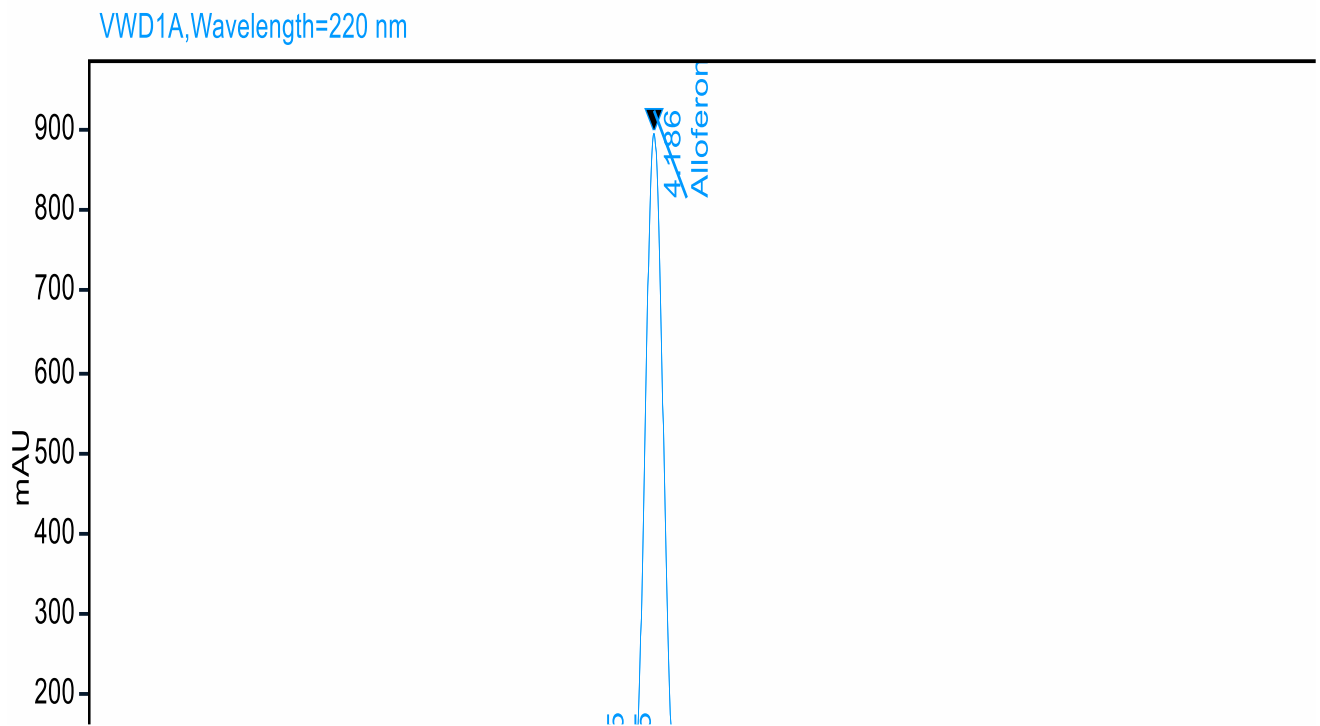


Рисунок 3.3. Хроматограма зразку (1) алоферону ( $R_t=4,186$  хв), ідентифікованої домішки: Домішка 1 ( $R_t=1,697$  хв), Домішка 2 ( $R_t=1,809$  хв), Домішка 3 ( $R_t=2,286$  хв), Домішка 4 ( $R_t=3,602$  хв), Домішка 5 ( $R_t=3,805$  хв), Домішка 6 ( $R_t=4,634$  хв), Домішка 7 ( $R_t=5,069$  хв), Домішка 8 ( $R_t=7,402$  хв).

Після проведення досліджень отримані результати обраховувалися.

За результатами проведених досліджень встановлено, що в зразку субстанції №1:

міститься *97,7% алоферону* у порівнянні з стандартним зразком, а у субстанції №2 :

*97,4% алоферону* у порівнянні з стандартним зразком.

Також встановлено, що в наданій на дослідження субстанції №1 виявлено неідентифіковані супровідні домішки, сумарний вміст яких *становить 2,3% (при допустимій нормі 4%)* та не міститься ні одної домішки, кількість якої перевищувало 2%.

В наданій на дослідження субстанції №2 виявлено неідентифіковані супровідні домішки, сумарний вміст яких *становить 2,6% (при допустимій нормі 4%)* та не міститься ні одної домішки, кількість якої перевищувало 2%.

Алоферон (зміни, що відбулися у хроматографічній картині):

<i>Стандартний зразок</i>	<i>Випробувальний зразок 1</i>
значення Rt знаходиться в інтервалі <b>4,007-4,043 хв</b> ;	значення Rt знаходиться в інтервалі <b>4,003-4,006 хв</b> ;
середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі <b>4,019 хв</b> ;	середнє значення Rt стандартів знаходиться в інтервалі <b>4,005 хв</b> ;
площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>10715,510-10801,265</b> ;	площина піка на хроматограмі коливається в інтервалі <b>9584,547-9593,609</b> ;
середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>10778.612</b> ;	середнє значення площини піку на хроматограмі стандартного зразку <b>9589.610</b> ;
SD Rt 0.014;	Домішка 1 – 1.785 хв

SD Ar 35.595;	Домішка 2 – 2.272 хв
RSD Rt (<2.0%) 0.36%;	Домішка 3 – 3.003 хв
RSD Ar (<2.0%) 0.33%.	Домішка 4 – 3.660 хв
	Домішка 5 – 4.430 хв
	Домішка 6 – 4.822 хв
	Домішка 7 – 5.131 хв
	Домішка 8 – 7.237 хв
	Σ домішок 10170.996

В результаті проведених досліджень встановлено що надані для дослідження субстанції містять у своєму складі у якості основного компоненту алоферон (97,7% для зразка №1, та 97,4 для зразка №2).

В субстанціях виявлено наявність неідентифікованих домішок. Супровідні домішки виникають в результаті неповного синтезу пептидів та частково неправильного синтезу.

Сумарний вміст виявлених домішок не перевищував 4% (фактично становили 2,3% для першої субстанції та 2,6% для другої субстанції) що дозволяє використовувати субстанції для виробництва фармпрепаратів на їх основі. Вказані домішки не впливають на ефективність дії АФІ та не завдають шкоди організму, оскільки являють собою пептиди, що складаються з L-амінокислот.

Також не було виявлено індивідуальних неідентифікованих домішок з вмістом більше 2%, що відповідає нормам використання субстанції для виготовлення фармацевтичних препаратів.

Проведено адаптацію методики для проведення досліджень алоферону, що стосувалося вибору колонки та корекції рухомої фази.



Проводився селективний відбір хроматографічних колонок для досягнення найбільш якісного розділення піків та для найкращої форми піків. Застосовувалися C18, C8 та CN колонки з довжиною 150 та 250 мм.

За результатами попередніх досліджень встановлено, що найкращі результати отримуються при застосуванні колонки ODS Hypersil (C18) з довжиною 250 мм та діаметром 4,6 мм.

Таким чином, на хроматограмах стандарту та досліджуваного зразку алоферону спостерігається зсув піків: значення Rt стандарту змістилося з інтервалу 4,007-4,043 хв до значень Rt зразку у інтервал 4,003-4,006 хв.

На хроматограмі стандарту середнє значення Rt стандартів змістилося зі значення Rt 4,019 хв до значення Rt зразку при 4,005 хв.

На хроматограмі зразку 1 ідентифіковано 8 домішок:

Домішка 1 – 1.785 хв

Домішка 2 – 2.272 хв

Домішка 3 – 3.003 хв

Домішка 4 – 3.660 хв

Домішка 5 – 4.430 хв

Домішка 6 – 4.822 хв

Домішка 7 – 5.131 хв

Домішка 8 – 7.237 хв

**Σ домішок 10170.996**

## ВИСНОВКИ

1. Адаптовано та модифіковано умови хроматографічного дослідження методом ВЕРХ алоферону субстанції: селективний відбір хроматографічних колонок – С18, С8 та СN колонки з довжиною 150 та 250 мм; *рухома фаза* – ацетонітрил *P* - трифтороцтова кислота *P* - 2М розчин амонію сульфату *P* – воду *P* (5 : 0,1 : 10 : 84,9, V/V/V).
2. Розроблено методики для виконання хроматографування методом ВЕРХ, методики приготування випробувальних розчинів алоферону субстанції: субстанції містять у своєму складі у якості основного компоненту алоферон (97,7% для зразка №1, та 97,4 для зразка №2).
3. Проведене хроматографічне дослідження методом ВЕРХ алоферону, в результаті чого, виявлена наявність неідентифікованих домішок (супровідні домішки виникають в результаті неповного синтезу пептидів: Домішка 1 ( $R_t=1,674$  хв), Домішка 2 ( $R_t=1,769$  хв), Домішка 3 ( $R_t=2,281$  хв), Домішка 4 ( $R_t=3,598$  хв), Домішка 5 ( $R_t=3,802$  хв), Домішка 6 ( $R_t=4,632$  хв), Домішка 7 ( $R_t=5,065$  хв), Домішка 8 ( $R_t=7,396$  хв), неідентифіковану домішку ( $R_t=5,403$  хв).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kaur N., Singh R., Dar Z., Bijarnia R.K., Dhingra N., Kaur T. Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV2. *Infect. Genet. Evol.* 2021;89:104490. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104490.
2. Alluwaimi A.M., Alshubaith I.H., Al-Ali A.M., Abohelaika S. The Coronaviruses of Animals and Birds: Their Zoonosis, Vaccines, and Models for SARS-CoV and SARS-CoV2. *Front. Vet. Sci.* 2020;7:582287. doi: 10.3389/fvets.2020.582287.
3. Torresi J., Edeling M.A., Nolan T., Godfrey D.I. A complementary union of SARS-CoV2 natural and vaccine induced immune responses. *Front. Immunol.* 2022;13:914167. doi: 10.3389/fimmu.2022.914167.
4. Yu Z., Ellahi R., Nutini A., Sohail A., Sait S.M. Modeling and simulations of CoViD-19 molecular mechanism induced by cytokines storm during SARS-CoV2 infection. *J. Mol. Liq.* 2021;327:114863. doi: 10.1016/j.molliq.2020.114863.
5. Vanderbeke L., Spriet I., Breynaert C., Rijnders B.J.A., Verweij P.E., Wauters J. Invasive pulmonary aspergillosis complicating severe influenza: Epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2018;31:471–480. doi: 10.1097/QCO.0000000000000504.
6. Kalil A.C., Thomas P.G. Influenza virus-related critical illness: Pathophysiology and epidemiology. *Crit. Care.* 2019;23:258. doi: 10.1186/s13054-019-2539-x.
7. Yue H., Zhang M., Xing L., Wang K., Rao X., Liu H., Tian J., Zhou P., Deng Y., Shang J. The epidemiology and clinical characteristics of co-infection of SARS-CoV-2 and influenza viruses in patients during COVID-19 outbreak. *J. Med. Virol.* 2020;92:2870–2873. doi: 10.1002/jmv.26163.

8. Hause B.M., Collin E.A., Liu R., Huang B., Sheng Z., Lu W., Wang D., Nelson E.A., Li F. Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the *Orthomyxoviridae* Family. *Mbio*. 2014;5:e00031-14. doi: 10.1128/mBio.00031-14.
9. Cheung T.K.W., Poon L.L.M. Biology of Influenza A Virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007;1102:1–25. doi: 10.1196/annals.1408.001.
10. Asadi S., ben Hnia N.G., Barre R.S., Wexler A.S., Ristenpart W.D., Bouvier N.M. Influenza A virus is transmissible via aerosolized fomites. *Nat. Commun.* 2020;11:1–9. doi: 10.1038/s41467-020-17888-w.
11. Traxler S., Bischoff A.-C., Saß R., Trefz P., Gierschner P., Brock B., Schwaiger T., Karte C., Blohm U., Schröder C., et al. VOC breath profile in spontaneously breathing awake swine during Influenza A infection. *Sci. Rep.* 2018;8:1–10. doi: 10.1038/s41598-018-33061-2.
12. Medina R.A., Garcia-Sastre A. Influenza A viruses: New research developments. *Nat. Rev. Genet.* 2011;9:590–603. doi: 10.1038/nrmicro2613.
13. Bailey E.S., Fieldhouse J.K., Choi J.Y., Gray G.C. A Mini Review of the Zoonotic Threat Potential of Influenza Viruses, Coronaviruses, Adenoviruses, and Enteroviruses. *Front. Public Health.* 2018;6:104. doi: 10.3389/fpubh.2018.00104.
14. Baigent S.J., McCauley J.W. Influenza type A in humans, mammals and birds: Determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *Bioessays.* 2003;25:657–671. doi: 10.1002/bies.10303.
15. Qiao S, Zhang X, Chen Z, Zhao Y, Tzeng CM // Alloferon-1 ameliorates estrogen deficiency-induced osteoporosis through dampening the NLRP3/caspase-1/IL-1 $\beta$ /IL-18 signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2023 Nov;124(Pt B):110954. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110954. Epub 2023 Sep 22.

16. Zhang X, Retyunskiy V, Qiao S, Zhao Y, Tzeng CM. // Alloferon-1 ameliorates acute inflammatory responses in  $\lambda$ -carrageenan-induced paw edema in mice. Sci Rep. 2022 Oct 6;12(1):16689. doi: 10.1038/s41598-022-20648-z.
17. Dudek D, Miller A, Draghi S, Valensin D, Mikołajczyk A, Matera-Witkiewicz A, Witkowska D, Stokowa-Sołtys K, Rowińska-Żyrek M.J // Zn(II)-alloferon complexes - Similar sequence, different coordination modes, no antibacterial activity. Inorg Biochem. 2020 Dec;213:111275. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111275. Epub 2020 Oct 13. PMID: 33091731
18. Jo H, Lee D, Go C, Jang Y, Bae S, Agura T, Hong J, Kang D, Kim Y, Kang // Alloferon Affects the Chemosensitivity of Pancreatic Cancer by Regulating the Expression of SLC6A14. JS.Biomedicines. 2022 May 11;10(5):1113. doi: 10.3390/biomedicines10051113.
19. Kim H, Im JP, Kim JS, Kang JS, Lee WJ // Alloferon Alleviates Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis. Immune Netw. 2015 Jun;15(3):135-41. doi: 10.4110/in.2015.15.3.135. Epub 2015 Jun 25.
20. Rykaczewska-Czerwińska M, Oleś P, Oleś M, Kuczer M, Konopińska Danuta, Plech A // Effect of alloferon 1 on central nervous system in rats. Acta Pol Pharm. 2015 Jan-Feb;72(1):205-11.
21. Lee D, Jo H, Jang Y, Bae S, Agura T, Kang D, Kang M, Kim Y, Cho NH, Kim Y, Kang JS. // Alloferon and Zanamivir Show Effective Antiviral Activity against Influenza A Virus (H1N1) Infection In Vitro and In Vivo. Int J Mol Sci. 2022 Dec 30;24(1):678. doi: 10.3390/ijms24010678.
22. Jeon J, Kim Y, Kim H, Kang JS, Lee WJ. // Anti-inflammatory Effect of Alloferon on Ovalbumin-induced Asthma. Immune Netw. 2015 Dec;15(6):304-12. doi: 10.4110/in.2015.15.6.304. Epub 2015 Dec 24.
23. Czarniewska E, Urbański A, Chowański S, Kuczer M. // The long-term immunological effects of alloferon and its analogues in the mealworm *Tenebrio molitor*. Insect Sci. 2018 Jun;25(3):429-438. doi: 10.1111/1744-7917.12427. Epub 2017 Mar 14.

24. Ryu MJ, Anikin V, Hong SH, Jeon H, Yu YG, Yu MH, Chernysh S, Lee C. // Expression of Concern: Activation of NF- $\kappa$ B by alloferon through down-regulation of antioxidant proteins and I $\kappa$ B $\alpha$ . *Mol Cell Biochem.* 2023 Jun;478(6):1411. doi: 10.1007/s11010-022-04573-3.
25. Kuczer M, Czarniewska E, Majewska A, Rózanowska M, Rosiński G, Lisowski M. // Novel analogs of alloferon: Synthesis, conformational studies, pro-apoptotic and antiviral activity. *Bioorg Chem.* 2016 Jun;66:12-20. doi: 10.1016/j.bioorg.2016.03.002. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26986636
26. Kadej A, Kuczer M, Czarniewska E, Urbański A, Rosiński G, Kowalik-Jankowska T. // High stability and biological activity of the copper(II) complexes of alloferon 1 analogues containing tryptophan. *J Inorg Biochem.* 2016 Oct;163:147-161. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.07.006. Epub 2016 Jul 9.
27. Kowalik-Jankowska T, Lesiów M, Krupa K, Kuczer M, Czarniewska E. // Copper(ii) complexes with alloferon analogues containing phenylalanine H6F and H12F stability and biological activity lower stabilization of complexes compared to analogues containing tryptophan. *Metallomics.* 2019 Oct 16;11(10):1700-1715. doi: 10.1039/c9mt00182d.
28. Matusiak A, Kuczer M, Czarniewska E, Rosiński G, Kowalik-Jankowska T. // Copper(II) complexes of alloferon 1 with point mutations (H1A) and (H9A) stability structure and biological activity. *J Inorg Biochem.* 2014 Sep;138:99-113. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.05.012. Epub 2014 Jun 2.
29. Huang Y, Shi Y, Wang Q, Qi T, Fu X, Gu Z, Zhang Y, Zhai G, Zhao X, Sun Q, Lin G. // Enzyme responsiveness enhances the specificity and effectiveness of nanoparticles for the treatment of B16F10 melanoma. *J Control Release.* 2019 Dec 28;316:208-222. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.10.052. Epub 2019 Nov 2.
30. Rakitianskaya IA, Riabova TS, Todzhibaev UA, Kalashnikova AA. // Allokin-alpha - new approaches in the treatment of chronic virus Epstein-Barr

- infections. *Vopr Virusol.* 2019;64(3):118-124. doi: 10.18821/0507-4088-2019-64-3-118-124.
31. Rabinovich OF, Rabinovich IM, Abramova ES. *Stomatologiya // Optimization of complex treatment of patients with severe oral leukoplakia.* (Mosk). 2015;94(6):19-21. doi: 10.17116/stomat201594619-21.
32. Державна Фармакопея України. 2-ге вид., у 3-х т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х.: Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів. 2014. Т. 2.

## 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- $\kappa$ 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.

